



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MARIA FERNANDA MADRID MENDOZA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Tithonia diversifolia* (TD) *in vitro* EM LINHAGEM DE CARCINOMA COLORRETAL HCT-116.

FORTALEZA 2020

MARIA FERNANDA MADRID MENDOZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Oncologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Federal do Ceará

Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M157a Madrid Mendoza, Maria Fernanda.
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Tithonia diversifolia* (TD) in vitro EM LINHAGEM DE CARCINOMA COLORRETAL HCT 116. / Maria Fernanda Madrid Mendoza. – 2020.
102 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

1. Apoptose. 2. Estresse Oxidativo. 3. Asteraceae . I. Título.

CDD 615.1

MARIA FERNANDA MADRID MENDOZA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE *Tithonia diversifolia* (TD) *in vitro* EM LINHAGEM DE CARCINOMA COLORRETAL HCT-116.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Farmacologia. Área de concentração: Oncologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Danilo D. Rocha
Universidade Paulo Picanço (FACPP)

Prof. Dra. Fatima de Cassia Evangelista de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, e irmão, pelo amor
e apoio incondicional que me deram,
sempre. Ao meu irmão no céu.

Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS**, por estar sempre presente em cada processo da minha vida, protegendo-me, dando-me força cada dia para continuar e não desistir dos meus objetivos.

Ao **Dr. Manoel Odorico de Filho**, por me receber como sua orientanda e me abrir as portas numa nova linha de pesquisa, pela orientação e ensinamentos dados durante o mestrado para poder realizar este trabalho.

A **Dra. Claudia do Ó Pessoa**, pelos incentivos e motivação de ser melhor como profissional e pessoa.

A **meus Pais**, por serem as primeiras pessoas que acreditaram em mim, em me apoiar para poder sair do meu país, por orar por mim e sem importar a distância, sempre estiveram em cada processo do mestrado.

Agradeço a minha **mãe Maria Mendoza**, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço, me aconselhando para não desistir e sempre ser como pedra firme na minha vida.

A minha **amiga Nathaly Mendoza** que desde o começo me ajudou em tudo, me deu carinho, apoio e motivação. Ensinando-me como ser forte ante as situações da vida. Não só ganhei uma amiga no Brasil se não uma irmã.

Agradeço a minha amiga de graduação **Ana Lizeth** que me ajudou muito durante este processo de trabalho, me motivando todos os dias a fazer melhor as coisas e também meu amigo **Carlos Irias**, a melhor pessoa para escutar, pela sua amizade sincera e incondicional.

Agradeço a **Henry Ponce** por me incentivar a entrar no mundo da pesquisa e me aconselhar de pegar as melhores decisões na minha profissional. **Gina Calderón** e **Nahun Lanza** e **Jorge Mendoza** por me motivar sempre a continuar crescendo profissionalmente.

Aos amigos do laboratório de Oncologia Experimental: Guilherme, Milena, Vanessa, Lucas, Gabriel, Bruno Soares, Arthur, Luciana, Soraya, Pedro Mikael, pela sua amizade e de que de uma forma, aprendi com cada um de vocês e proporcionaram-me um ambiente agradável durante o tempo de trabalho.

Em especial eu agradeço a **Fatima de Cassia, Franceline Silva, Danilo Rocha, Andrea Felinto, Daniel e Bruno Coelho** pelos ensinamentos e disposição de me ajudar sempre.

Ao Dr. Pedro Magalhaes, por me ajudar desde que eu me apresentei ao programa, pelos seus conselhos e apoio.

A Adelânia Marinho, por sempre me ajudar desde o primer momento que eu cheguei a Fortaleza e sempre estar disposta me ajudar.

A técnica Silvana França, pela ajuda dentro do laboratório de oncologia experimental.

Este trabalho foi realizado graças ao auxílio das seguintes instituições

À CNPq, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Organização de Estados Americanos – OEA

Grupo COIMBRA de Universidades Brasileiras

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal d Nível Superior- CAPES

Conselho Nacional de Desenvolvimento Cientifico e Tecnológico-CNPq

RESUMO

O câncer apresenta hoje, uma das grandes preocupações da era moderna. Neste contexto, estudos de novos compostos anticâncer, que têm como fonte produtos naturais, tem se mostrado um campo bastante promissor. Dentro dessa perspectiva, a *Tithonia diversifolia* (TD) é uma espécie que tem despertado interesse porque é uma planta com alto potencial farmacológico. A partir do ano 2002 foram descritas evidências sobre o seu efeito antiproliferativo *in vitro* em diferentes linhagens tumorais, como de Colo2, Hepatoma, Leucemia, entre outras. Com isso, despertou o interesse em avaliar o potencial antiproliferativo *in vitro* do extrato etanólico de TD, em diferentes linhagens de células tumorais. Os resultados obtidos do extrato mostraram atividade citotóxica, nas linhagens tumorais testadas, apresentando valores de IC₅₀ que variaram de 6.00-35.39 µg / ml, após 72 horas de tratamento. Enquanto que, para a linhagem não tumoral (L929) esse valor foi maior (31,45 µg / ml) após 24 horas e menor para o tempo de 72 horas (25,58 µg / ml) demonstrando sua seletividade para as células cancerígenas. No mecanismo de morte induzido pelo TD foi observado que nas células HCT-116 que a indução da apoptose, provavelmente, ocorreu pela via intrínseca após 24 horas de tratamento, além disso, o extrato induziu um tipo de estresse celular podendo ser observado a presença de AVOs após o mesmo período de incubação. Também, foi possível observar lesões ao DNA pelo ensaio cometa, além disso a presença de peroxidação de lipídios e subprodutos de NO. Estes efeitos em HCT-116 podem estar relacionados com a depleção proteica de glutathiona observada, mostrando efeitos pro-oxidativos. Ao realizar o tratamento com N-acetil-L-cisteína percebeu-se a inibição dos efeitos pro-oxidativos avaliados *in vitro*, este fato reforçou o papel da geração das espécies reativas de oxigênio na atividade antitumoral. No entanto, outros testes devem ser realizados para confirmar a proposta de mecanismo de morte do extrato de TD.

Palavras-chave: 1. Apoptose. 2. Estresse Oxidativo. 3. Asteraceae

RESUMEN

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE *Tithonia diversifolia* (TD) *in vitro* EM UNA LÍNEA CELULAR DE CARCINOMA COLORRECTAL HCT-116.

El cáncer se presenta hoy, como una de las más grandes preocupaciones de la era moderna. En ese contexto, estudios de nuevos compuestos con actividad anticancerígena, que tienen como fuente productos derivados de plantas, están mostrando interés. Dentro de esta perspectiva, la planta *Tithonia diversifolia* (TD) es un arbusto perenne nativo de México y también crece en partes de África, Australia, Asia y otros países de América del Norte. Esta especie tiene un gran interés porque es una planta con potencial farmacológico alto. A partir del año 2002, fueron descritas evidencias sobre el efecto antiproliferativo *in vitro* en diferentes líneas celulares tumorales como de Colon2, Hepatoma, Leucemia entre otras. Lo que ha despertado el interés en esta investigación, con el objetivo de evaluar el efecto citotóxico. Entonces, el objetivo de este trabajo es evaluar el potencial anti-cáncer *in vitro* del extracto etanólico de TD en diferentes líneas celulares tumorales. El extracto mostro actividad citotóxica en diferentes líneas celulares tumorales probadas presentando valores de IC₅₀ que varían de 6,00 y 35,39 µg/ml, después de un tratamiento de 72 horas. Mientras que para la línea celular no tumoral (L929) ese valor fue mayor (31,45 µg / ml) después de 24 horas y menor para el tiempo de 72 horas (25,58 µg / ml) demostrando su selectividad para las células cancerígenas. En la evaluación del mecanismo de muerte inducido por TD fue observado en las células HCT-116 una inducción de apoptosis probablemente por la vía intrínseca después de 24 horas, además de inducir un tipo de estrés celular en las células HCT-116, ya que fue observado la presencia de AVOs después del tratamiento de 24 horas. También, fue posible observar lesiones en el ADN por el ensayo cometa, además la presencia de per-oxidación de lípidos y subproductos de NO. Estos efectos en las células HCT-116 pueden estar relacionados con la depleción proteica de glutaciona observada, mostrando efectos pro-oxidativos. El tratamiento con N-acetil-L-cisteina inhibió los efectos pro-oxidativos evaluados *in vitro*, reforzando el papel de la generación de especies reactivas de oxigeno con la actividad antitumoral. Sim embargo, otros ensayos deben ser realizados para confirmar la propuesta de mecanismo de muerte del extracto.

Palabras-clave: 1. Apoptosis. 2. Estrés oxidativo. 3. Asteraceae

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018-2019 por sexo, exceto pele não melanoma*	2
Figura 2 - Desenvolvimento da Carcinogênese	2
Figura 3 - Características essenciais do câncer	3
Figura 4- Fases do ciclo celular	4
Figura 5- Classificação de agentes antineoplásicos	6
Figura 6- Via de morte intrínseca e extrínseca	8
Figura 7- Produtos naturais e ciclo celular	11
Figura 8. Fotos de <i>Tithonia diversifolia</i>	14
Figura 9- Desenho Experimental	17
Figura 10- Tipos de cometa e classificação por categoria de dano: 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%).	31
Figura 11- Progressão anual de artigos publicados ao longo de 10 anos nas bases PubMed, Google acadêmico e Web of Science, associando os termos “ Asteraceae AND death cell”	36
Figura 12- Evolução anual de publicações na Web of Science com o termo <i>Tithonia diversifolia</i> and Cancer	38
Figura 13. Distribuição dos artigos publicados na Web of Science por área de conhecimento.	39
Figura 14- Participação mundial em artigos publicados na Web of Science (<i>Tithonia diversifolia</i> and Cancer).	39
Figura 15- Avaliação da viabilidade celular na linhagem HCT-116, após o tratamento com M1 durante 24 horas de tratamento	44
Figura 16- Imagens da morfologia das células HCT 116 após o tratamento de 24 horas com a M1, coradas com panótico rápido. Células visualizadas por microscópio óptico na objetiva de 20x.	44
Figura 17- Análise da integridade de membrana das células HCT 116 após o tratamento com TD, após incubação de 24 horas.	47
Figura 18- Análise da densidade celular das células HCT 116 após o tratamento com TD, após incubação de 24 horas.	47
Figura 19- Avaliação do perfil do ciclo celular por citometria de fluxo nas células HCT 116 após o tratamento de 24 horas com TD.	48

Figura 20- Avaliação do ciclo celular nas células de HCT 116 após o tratamento de 24 horas com TD. _____	49
Figura 21- Efeito da M1 sobre a fragmentação de DNA, por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento. _____	50
Figura 22- Avaliação do potencial transmembrânico da mitocôndria das células HCT 116 após o tratamento com a M1 durante 24 horas. _____	51
Figura 23- Avaliação do potencial transmembrânico da mitocôndria das células HCT 116 após o tratamento com a M1 durante 24 horas. _____	51
Figura 24- Avaliação de indução de apoptose e necrose pelo método de coloração diferencial por Acridina laranja/ Brometo de Etídio. _____	52
Figura 25- Avaliação da presença de AVOs por microscopia de fluorescência de células HCT-116, após o tratamento de 24 horas com M1, no aumento de 40 x. _____	54
Figura 26- Avaliação de MDA no tratamento com a M1 nas células HCT-116, após 24 horas de incubação. _____	61
Figura 27- Avaliação da produção Nitritos/Nitratos após o tratamento de 24 horas com a M1. _____	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Células utilizadas no ensaio de citotoxicidade	19
Tabela 2- Quantidade de artigos científicos nos bancos de bases de dados utilizados com as palavras-chaves.	35
Tabela 3- Quantidade de artigos científicos nos bancos de dados encontrados nos PubMed, Google acadêmico e web of Science utilizando as palavras-chave.	37
Tabela 4- Quantidade de pedidos de depósitos de patentes encontrados nas principais bases tecnológicas utilizando as Palavras-chave	40
Tabela 5- Potencial antiproliferativo da M1 em linhagens tumorais e não tumoral avaliado pelo ensaio do MTT após 72 h de incubação.....	41
Tabela 6- Potencial antiproliferativo do M1 frente às linhagens HCT-116 e PC3 após 24, 48 e 72 horas de incubação determinado pelo método MTT.	41
Tabela 7- Índice de seletividade (IS) da M1.....	43
Tabela 8- Potencial antiproliferativa da M1 frente a HCT-116 após 24, 48 e 72 horas de incubação determinado pelo método MTT, antes e depois de 2 horas de tratamento com NAC.....	53
Tabela 9- Indução de lesões do DNA, após o tratamento de 24 horas	60
Tabela 10- Níveis intracelulares da glutathiona reduzida e oxidada em células de HCT-116 após 24 horas de tratamento.	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

NO_2^-	Nitrato
NO_3^-	Nitrito
®	Marca registrada
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
ANOVA	Analysis of variance
AO	Acridima Laranja
AVOs	Vesículas acidas
BE	Brometo de etidio
CASPASE	Cysteine-dependente aspartate-directed proteases
CO_2	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsufoxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DRA	Ácido ribonucléico
Dox	Doxorrubicina
E.P.M	Erro padrão da Media
EDTA	ácido etilodínâmico tetra-cálcico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutathiona reduzida
GSSH	Glutathiona oxidada
H	Horas
H_2O_2	Peroxido de Hidrogenio
H_3PO_4	Ácido fosfórico
HCL	Ácido clorídrico
IC_{50}	Concentração inibitória media
IM	Integridade de membrana
INCA	Instituto Nacional do Câncer
M	Molar
MDA	Monodialdeido
mg	Miligrama
min	Minuto

mL	Mililitro
MOMP	Proceso de permeabilização da membrana
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
NAC	N-acetil-L-cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NaNO₃	Nitrito de sódio
NCI	Instituto nacional de câncer dos Estados Unidos
NH₄CL	Cloreto de amônio
nm	Nanômetro
⁻O₂	Oxigênio
°C	Celsius
⁻OH	Hidroxilo
OMS	Organização mundial da saúde
pH	Potencial Hidrogenionico
IP	Iodeto de Propídeo
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
Rh 123	Rodamina 123
RIPA	RadioImmuno Precipitation Assay (Lysis Buffer)
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	Rosswell Park Memorial Institute Medium
SBF	Soro Bovino Fetal
TBARs	Ácido tiobarbitúrico
TD	<i>Tithonia diversifolia</i>
TNB	5-tio-2-nitrobenzoato
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR 1	Fator de necrose tumoral Receptor 1

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O CÂNCER.....	1
1.2 CICLO CELULAR E O CÂNCER	4
1.3 TERAPIAS E VIAS DE MORTE CELULAR ENVOLVIDAS NO CÂNCER	5
1.4 PRODUTOS NATURAIS.....	9
2. OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
3.1 DESENHO EXPERIMENTAL.....	17
3.4 MANUTENÇÃO DE CÉLULAS EM CULTURA.....	19
3.5 ESTUDO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA	20
3.6 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE AVALIAÇÃO TEMPORAL PELO MÉTODO MTT	20
3.7 ESTUDO DO MECANISMO DE MORTE EM CÉLULAS DE CARCINOMA COLORRETAL (HCT 116).....	21
3.8 CITOMETRIA DE FLUXO.....	23
3.10 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL DE AVALIAÇÃO TEMPORAL PELO MÉTODO MTT, UTILIZANDO UM ANTIOXIDANTE (NAC).....	27
3.11 ANÁLISE DA INDUÇÃO DE PRODUÇÃO DE AVOs A TRAVES DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	27
3.12 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE DANOS AO DNA PELO ENSAIO COMETA	29
3.13 AVALIAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO PELO TESTE TBARS.....	31
3.14 AVALIAÇÃO DE PRODUÇÃO DE NITRATOS E NITRITOS	32
3.15 DETERMINAÇÃO DE NÍVEIS DE GLUTATIONA OXIDADA E REDUZIDA	33
4. RESULTADOS	35
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DE TITHONIA DIVERSIFOLIA-TD (M1)	41

4.3	TESTE DE VIABILIDADE CELULAR EM HCT-116 APÓS O TRATAMENTO COM O TD (M1) DURANTE 24 HORAS PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRIPAN.	43
4.4	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA LINHAGEM HCT 116 APÓS O TRATAMENTO COM O TD.....	44
4.5	ESTUDO DE MECANISMO DE MORTE DE TD (M1).....	46
4.5.1	Avaliações da integridade da membrana e da densidade das células de HCT-116 tratadas com TD (M1)	46
	Na análise da integridade de membrana.....	46
4.5.2	Avaliações do ciclo celular das células HCT-116 tratadas com M1	48
	Na análise do perfil ciclo celular.....	48
4.5.3	Avaliações do padrão de morte celular.....	49
4.5.4	Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria	50
4.5.5	Coloração diferencial por Laranja Acridina/ Brometo de Etídio ...	52
4.6	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS PRO-OXIDATIVOS DA M1 NA LINHAGEM DE HCT-116.	53
4.6.1	Atividade citotóxica in vitro da M1 frente a Linhagem HCT-116, utilizando o N-Acetil-L-Cisteína (NAC).....	53
4.6.2	Análise da indução de produção de AVOs em células de HCT-116 após o tratamento com a M1 durante 24 horas.....	54
4.7	DANO AO DNA.....	59
4.7.1	Teste cometa em condições alcalinas e neutras.....	59
4.7.2	Avaliação da peroxidação pelo teste TBARS.....	60
4.7.3	Avaliação da produção de Nitritos/Nitratos	61
4.8	DETERMINAÇÃO DE GSH E GSSH.....	62
5.	DISCUSSÃO	64
6.	CONCLUSÃO.....	73
	BIBLIOGRAFIA	74
	ANEXO A-EQUIPAMENTOS.....	83
	ANEXO B- SOLUÇÕES E KITS	84
	APENDICE A. MODELO HIPOTÉTICO DO MECANISMO DE MORTE DO EXTRATO ETANÓLICO DA TITHONIA DIVERSIFOLIA.	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 O câncer

O câncer é uma doença complexa e de complicada terapia atualmente, pois é classificada por ser um conjunto de diferentes doenças nas que envolve uma sequência de interações gene-ambiente em um processo progressivo que não pode ocorrer sem disfunção em vários sistemas, incluindo reparo de DNA, funções apoptóticas e imunológicas (KNOX, 2010).

Grandes estudos populacionais forneceram informações importantes sobre tendências de morbi-mortalidade e que ajudaram a identificar genótipos, comportamentos e fatores ambientais associados a esta doença. Com base nesse conhecimento, tornou-se cada vez mais evidente que o câncer é responsável pela maior mortalidade no mundo. Mostrando que, para o ano de 2018, estimou-se que houve 18,1 milhões de novos casos, com 9,6 milhões de morte por câncer mundialmente. O câncer de pulmão apresentou-se como o sítio primário com maior incidência quando avaliados os sexos masculino e feminino em conjunto (11,6% do total), e também o de maior mortalidade (18,4% do total de mortes por câncer). No que diz respeito à incidência, apareceram na sequência o câncer de mama (11,6%), próstata (7,1%) e cólon (6,1%); enquanto no tocante à mortalidade, o tumor de pulmão é seguido pelo câncer colorretal (9,2%), gástrico (8,2%) e hepático (8,2%). Entretanto, conforme apontou o documento, encontrou-se uma ampla diversidade na incidência dos diferentes sítios primários dentre as diferentes regiões do mundo em decorrência das diferenças socioeconômicas e de estilos de vida (IRCA, 2018).

Estudos epidemiológicos realizados no Brasil, deram uma estimativa de câncer no biênio 2018-2019, onde foi estimado que ocorreriam em torno de 600 mil novos casos de câncer por ano. Dentre essa estimativa os tipos de cânceres mais incidentes eram o de próstata, pulmão, mama feminina e cólon e reto, em distribuição proporcional por sexo (Figura 1) (INCA, 2019).

Figura 1- Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018-2019 por sexo, exceto pele não melanoma*

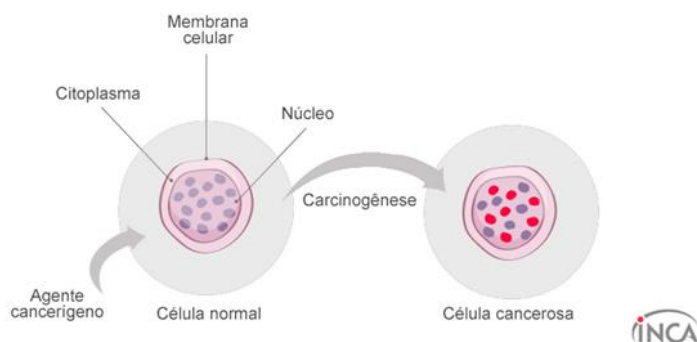
Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: INCA (2018)

A carcinogênese é um processo de desenvolvimento do câncer, em pessoas e animais, com diferentes mecanismos envolvido no processo. Em geral, um agente cancerígeno é responsável pelo início, promoção e progressão do processo que acontece lentamente, numa célula normal, podendo levar a formação de células cancerosas que proliferam e originam um tumor (Figura 2) (INCA, 2018; OLIVEIRA et al., 2007).

As células normais se dividem de maneira ordenada e elas morrem quando estão danificadas, e novas células tomam seu lugar. Nas células tumorais não existe esse controle, elas continuam crescendo e produzindo novas células com características de dividir-se rapidamente, e tendem a ser muito mais agressivas determinando a formação de tumores, que podem espalhar-se para outras regiões do corpo, processo que é conhecido como metástase (INCA, 2018; KEPP et al., 2011).

Figura 2 - Desenvolvimento da Carcinogênese



Fonte: INCA (2018)

Dentro da homeostase do organismo existem os proto-oncogenes, que estão inativos em células normais, porém quando ocorre mutações nesses genes fazem com que as células normais se tornem cancerosas. As mutações em proto-oncogenes são tipicamente dominantes por natureza e frequentemente, codificam proteínas que funcionam estimulando a divisão celular, inibindo a diferenciação celular e interrompendo a morte celular. Todos esses processos são importantes para o desenvolvimento humano normal e para a manutenção de tecidos e órgãos. No entanto, geralmente exibem aumento da produção dessas proteínas, levando a alterações no processo celular normal (FUTREAL et al., 2004; KLIONSKY et al., 2016).

As células cancerígenas, ao desregular esses sinais, promove um desequilíbrio no ciclo celular, permitindo que o ciclo ocorra sem a promoção de uma checagem normal, isto permite que seu crescimento seja descontrolado e com características que sustenta a sinalização proliferativa anormal. Além de ocorrer alterações fisiológicas nas células, é necessário que ocorra uma instabilidade genômica, autossuficiência aos sinais de crescimento, resistência aos sinais antiproliferativos, invasão tecidual, metástase, proliferação ilimitada, indução a angiogênese e resistência a morte (Figura 3) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 3 - Características essenciais do câncer

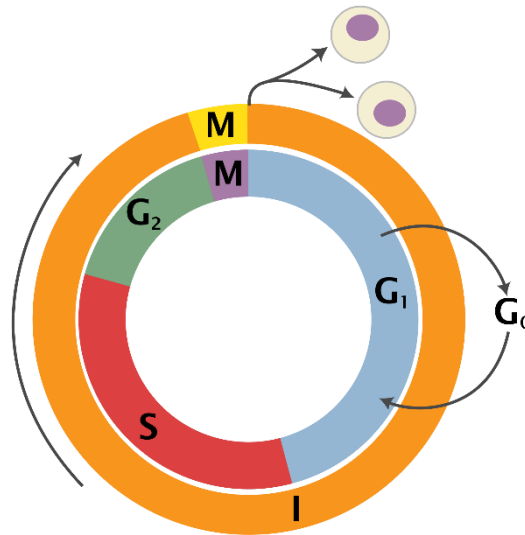


Fonte: Adaptado de HANAHAN e WEINBERG (2011)

1.2 Ciclo celular e o câncer

No desenvolvimento celular normal, diferentes tipos de células são originados a partir do processo da divisão celular e da diferenciação celular característicos. Esse processo de divisão e duplicação, é chamado de ciclo celular (Figura 4).

Figura 4- Fases do ciclo celular



Fonte: Richard Wheeler (2006).

Neste contexto, o câncer é causado pela interrupção do ciclo celular normal; causando uma série de eventos entre uma divisão mitótica e a seguinte divisão. O ciclo celular normal está compreendido pelas fases: intervalo 1 (G₁), síntese (S), intervalo 2 (G₂) e a mitose (M) e não podemos esquecer que as células que não estão em divisão encontram-se em uma fase diferenciada chamada G₀.

Para entender a desregulação dos eventos celulares e o que ocorre de errado sobre o ciclo celular torna-se necessário um entendimento mais detalhado sobre o ciclo normal (ROSENBERG; ROSENBERG, 2012). No começo da divisão, uma célula entra na primeira fase G₁, fase responsável pelo crescimento da célula, duplicação das organelas e da produção de muitos produtos químicos necessários para sua manutenção. Esta fase varia muito em duração; é curta em sua divisão celular, demorando lentamente as células em divisão e as células permanentes em não divisão (G₀). Posteriormente passa para a fase posterior de síntese (S). Nesta fase o DNA é replicado produzindo duas cromátides irmãs idênticas, que são unidas pelo centrômero. O intervalo 2 (G₂) segue posterior a fase

S, e é geralmente de curta duração. Durante o G2 a célula cresce mais (mais não como a fase G1) e sintetiza uma variedade de proteínas necessárias para a mitose. Na fase mitótica (M) uma variedade de eventos ocorre durante esta quarta fase do ciclo: tanto o DNA como as organelas duplicadas irão sofrer o processo de divisão para a formação de duas novas células filhas idênticas (ROSENBERG; ROSENBERG, 2012).

Esses mecanismos acontecem em perfeita harmonia respondendo a fatores externos por meio de uma cascata de sinalização que induz a célula a sair de uma fase e entrar em outra (MALUMBRES; BARBACID, 2009; WILLIAMS; STOEBER, 2012).

Porém, quando há uma alteração do ciclo celular surge o câncer. Alterações nesta homeostase devido a uma mutação genética, ou seja, por uma alteração no DNA da célula, está passa a receber instruções erradas para as suas atividades. Com isso, as células cancerosas diferem das normais pelo fato de continuarem a crescer e se dividir, não obedecendo ao controle biológico natural do organismo. Devido a essa divisão ser de forma descontrolada faz que estas células adquiram novas características genéticas que as tornam mais agressivas, determinado a formação do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011; ROSENBERG; ROSENBERG, 2012).

Portanto o conhecimento aprofundando de marcantes características nas células tumorais que formam o microambiente tumoral, e do processo de divisão do qual dependem para seu crescimento descontrolado, ajudam no desenvolvimento de novas terapias ou métodos para o tratamento deste tipo de doença, despertando interesse na busca de novos fármacos antineoplásicos que atuem por mecanismos capazes de superar essas características marcantes das células tumorais, a fim de alcançar sucesso no tratamento.

1.3 Terapias e vias de morte celular envolvidas no câncer

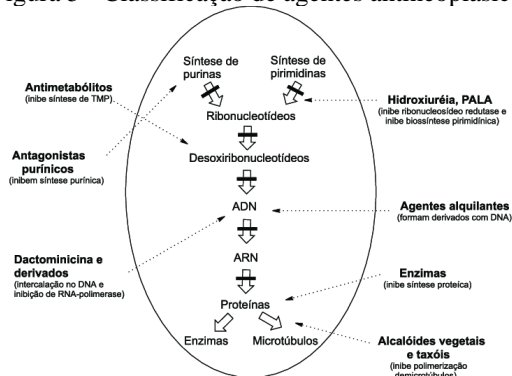
Atualmente, existem diferentes tipos de tratamentos para combater o câncer, como a cirurgia, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e outras modalidades terapêuticas (ROBBINS; KUMAR; COTRAN, 2010). Na maioria dos casos, é necessário combinar mais de um tratamento ou terapia para poder ter sucesso e eliminar as células cancerígenas (NEILAN et al., 2007).

Há décadas atrás, se relata sucesso do uso dessas terapias, porém ainda não foi desenvolvido o medicamento ideal para poder tratar de uma forma mais específica a doença, além disso, as terapias utilizadas nem sempre são eficazes, porque sempre existe uma reincidência do câncer, metástase e os pacientes sofrem pelos efeitos colaterais.

A quimioterapia é um tratamento à base de fármacos que interferem em diferentes processos tais como desenvolvimento, crescimento, disseminação e invasão de células cancerígenas (LÚCIA DE ALMEIDA et al., 2005), que pode ser utilizado em monoquimioterapia ou poliquimioterapia. O objetivo de utilizar quimioterapias combinadas é de aumentar a eficácia do tratamento e otimizar a resposta do paciente durante cada ciclo de tratamento. Porém o objetivo primário da quimioterapia é destruir as células neoplásicas, e preservar as normais, entretanto, a maioria dos agentes quimioterápicos atuam de forma não-específica, lesando tanto células malignas quanto normais (MURAD, ANDRÉ MÁRCIO, 1996).

Os medicamentos antineoplásicos convencionais, possuem propriedades citotóxicas nas células para poder induzir uso processo de morte celular nas células tumorais (RIXE; FOJO, 2007), dentro desses agentes citotóxicos uma grande maioria fazem a indução da apoptose celular. Podem agir por diferentes vias por exemplo aqueles que atuam nas diferentes etapas da síntese do DNA, transcrição e transdução e subsequente fazem a indução da apoptose, podemos mencionar os agentes alquilantes, compostos de platina, inibidores da topoisomerase e antimetabólitos, entre outros (Figura 5) (CEPEDA et al., 2008; LÚCIA DE ALMEIDA et al., 2005; MONTECUCCO; BIAMONTI, 2007).

Figura 5- Classificação de agentes antineoplásicos



Fonte: Calabresi e Chabner (1995)

As diferentes vias de morte celular são ativas para poder impedir a propagação de células com mutações as danificadas. Uma das vias é, quando é induzida uma morte por apoptose intrínseca (Figura 6), se promove a retração celular, a qual vai perdendo a ligação com as células vizinhas e matriz extracelular. Entretanto, os sinais que desencadeiam este tipo de morte sejam variáveis, todos os estímulos estão relacionados a um mecanismo de controle na mitocôndria na quais podem ter a membrana externa rompida durante esse processo. Com isso, a membrana externa da mitocôndria passa por um processo de permeabilização da membrana (MOMP), devido à atividade de formação de poros (GALLUZZI; VITALE, 2018; KROEMER et al., 2009).

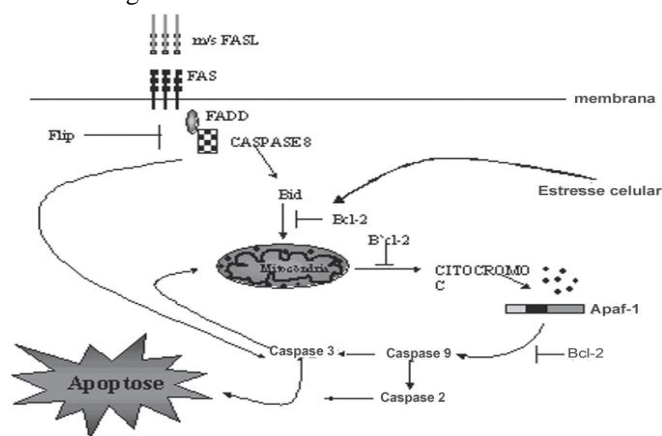
Esse evento de MOMP passa por consequências, tais como: colapso do potencial de membrana mitocondrial interna, aumentando a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), ativando um mecanismo de amplificação dos sinais apoptótico, com isso esse aumento na produção de EROS promove a oxidação lipídica, proteica e de ácidos nucleicos, piorando a situação de colapso do potencial da membrana mitocondrial, além de promover a ativação da caspase-9 e caspase-3 (GALLUZZI et al., 2012b).

Outra via que pode ser induzida por quimioterápicos é a via por ativação de receptor ou via extrínseca, é induzido por sinais de estresse extracelular que são detectados e propagados por receptores transmembranares (Figura 6) (GALLUZZI; VITALE, 2018). Pode ser iniciada pela ligação de ligantes letais, como FAS /Ligante CD95, o fator de necrose tumoral α (TNF α), melhor conhecido como ligante indutor de apoptose relacionada ao TNF, o TRAIL, para vários receptores de morte (TNFR1), e receptor TRAIL (TRAILR1-2). Esta via é dependente da ação das caspases, mais precisamente a caspase 8, a qual é uma protease responsável pelo início da cascata de morte celular, que existe nas células sob a forma de uma proenzima inativa (WAJANT, 2002).

A semelhança entre os dois tipos de morte são as características morfológicas, mostrando a formação dos *blebs* na membrana celular. Os *blebs* são prolongamentos, os quais se multiplicam até o rompimento, dando origem a estruturas compostas pelo mesmo conteúdo da célula. Além disso, em ambos processos ocorre fragmentação nuclear e os

fragmentos, juntamente com o produto do rompimento dos prolongamentos formados na membrana, formam os chamados corpos apoptóticos (GALLUZZI et al., 2012a).

Figura 6- Via de morte intrínseca e extrínseca



Fonte: Ana Paula F. Bergantini (2005)

Alguns dos quimioterápicos mencionados anteriormente, que ativam a morte celular por apoptose, envolvem também vias dependentes de EROs, como por exemplo as antraciclinas, a bleomicina, os complexos de platino, e também as quinonas.

Essa via destaca-se no mecanismo de ação do estresse oxidativo que provocam, ao induzirem a formação deletéria endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio (O_2 , OH , O_2 e H_2O_2). Representando o DNA como principal alvo, e a inibição do complexo das topoisomerasas, ações que provoca o desencadeamento da apoptose celular (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; SCHIEBER; CHANDEL, 2014; YANG et al., 2018).

Nas células normais os EROs estão envolvidos na sobrevivência e captação de nutrientes para o crescimento e proliferação celular. As células cancerígenas “sequestram” a maquinaria celular normal, ativando constitutivamente as vias dos fatores de crescimento para sustentar o crescimento e a proliferação celular. Isso permite que as células cancerígenas absorvam nutrientes abundantes, sobrevivam ao estresse e proliferam continuamente. Porém, o desequilíbrio entre a formação de radicais livres nas células, ou seja, o aumento de EROs, leva um estado pro-oxidativo induzido por um quimioterápico, favorece a ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas, tais como no DNA, lipídios e proteínas. Quando o dano no DNA é de dupla fita, normalmente a

célula não conseguiu reparar-lo provocando uma instabilidade genética e consequentemente levando a uma morte celular, caracterizando assim o estresse oxidativo (SCHIEBER; CHANDEL, 2014).

A imunoterapia como tratamento para o câncer tem feito progressos significativos nos últimos anos devido à melhor compreensão dos princípios subjacentes à biologia e imunologia de tumores. Neste sentido, melhorando o entendimento do microambiente tumoral, pode-se diminuir a toxicidade causada pelos quimioterápicos (GALLUZZI; VITALE, 2018; KIRKWOOD et al., 2012). Entre os que se destacam, o interferón alfa (Roferon-A), o interferón gama (Biogama) e a interleucina-2 (Proleukin).(CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997).

A identificação e maior elucidação do papel da imunoterapia em diferentes tipos de tumores, e o desenvolvimento de estratégias para combinar a imunoterapia com agentes citotóxicos, para o tratamento do câncer permitirá um progresso ainda maior, que finalmente, levará a melhores resultados para os pacientes.

1.4 Produtos Naturais

Os produtos naturais podem ser de diferentes fontes, por exemplo, plantas medicinais, animais, micróbios entre outros. Sendo as plantas medicinais a principal fonte para a descoberta de novos fármacos para combater ao câncer e outras series de doenças, que vem sendo utilizadas ao longo dos tempos em diferentes populações (KLIONSKY et al., 2016; NETO; NETO, 2012; VAN DEN BERG; SILVA, 1988). Aproximadamente 77% derivados de plantas são utilizadas na medicina tradicional, no qual, 119 compostos derivados de 90 espécies de plantas podem ser considerados medicamentos importantes e em uso para o tratamento do câncer (FARNSWORTH et al., 1985).

O uso de plantas medicinais como forma alternativa de tratamento no combate contra o câncer e outras series de doenças já vem sendo relatado ao longo dos tempos em diferentes populações (KLIONSKY et al., 2016; NETO; NETO, 2012; VAN DEN BERG; SILVA, 1988)

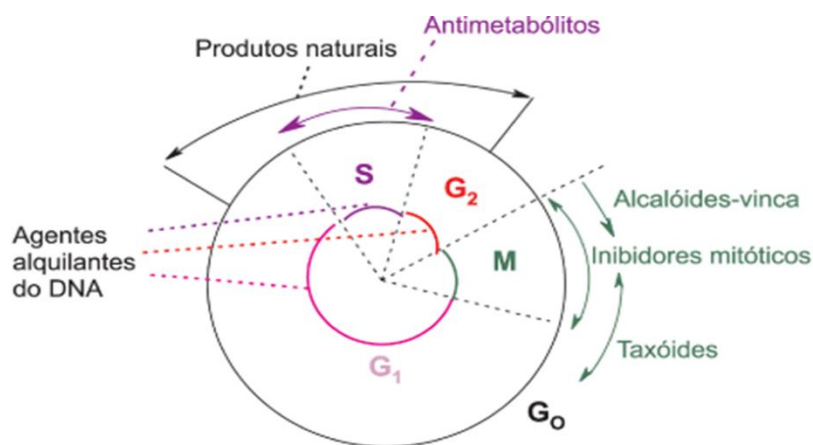
Embora a medicina moderna esteja bem desenvolvida na maior parte do mundo, a OMS reconhece que grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% destes utilizam plantas ou preparações destas (OMS, 2006).

A procura por novos medicamentos anticancerígenos tem aumentado com vistas a se encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos, ou que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço da doença. Baseadas em avanços significativos na biologia do câncer, as pesquisas buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo da enfermidade, como inibição da polimerização da tubulina, atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares (ALTMANN; GERTSCH, 2007).

A descoberta de novos anticancerígenos de origem vegetal tem incentivado as pesquisas nessa área. Um dos exemplos mais importantes é o da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, conhecida também como vinca, que é utilizada pela população de Madagascar no tratamento de diabetes. Durante os testes de atividade hipoglicemiante, os extratos dessa espécie produziram granulocitopenia em consequência da supressão da medula óssea dos animais, sugerindo avaliação em modelos de leucemias e linfomas. A confirmação da atividade nesses modelos levou ao isolamento dos alcaloides vimblastina e vincristina que, atualmente, são de grande utilidade no tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário, testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil. Outra descoberta importante na área de câncer foi a das substâncias presentes em espécies do gênero *Podophyllum*, tais como *P. peltatum* e *P. emodii*, utilizadas pelas populações nativas da América e da Ásia no tratamento do câncer de pele e verrugas. A partir da podofilotoxina, uma lignana ariltetralínica, foram obtidos o etoposídeo e o teniposídeo, cujos estudos experimentais permitiram a introdução desses na terapia do câncer. Estas descobertas encorajaram o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) a realizar o programa de screening para agentes anticancerígenos, com vegetais e entre 1960 e 1982 foram avaliadas 35.000 amostras vegetais. O resultado mais importante foi a descoberta do paclitaxel, isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt.). Em 1971 estudos clínicos revelaram que essa substância era capaz de regredir o câncer de mama e de ovário resistentes à terapia tradicional (MANN, 2002).

Estas moléculas possuem um mecanismo de ação (Figura 7) promovendo efeitos citotóxicos, antiproliferativos e antioangiogênicos. Podendo também levar a uma inibição do ciclo celular por diferentes formas como, inibição da síntese de DNA, polimerização da tubulina ou inibem a fase mitótica do ciclo celular entre outros (LÚCIA DE ALMEIDA et al., 2005).

Figura 7- Produtos naturais e ciclo celular



Fonte: Almeida (2005)

O câncer se apresenta hoje como uma das grandes preocupações da era moderna. Neste contexto, estudos de novos compostos com atividade antineoplásica, que têm como fonte produtos naturais, mostram-se cada vez mais importantes como ferramentas no combate a essa enfermidade, e também com um desafio para a indústria farmacêutica. Então, é importante o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas a fim de eliminar o tumor, protegendo as células normais e minimizando os efeitos colaterais para o paciente, ou seja, que seja mais eficaz.

Com isso, estudos em numerosos representantes da família Asteraceae revelaram a presença de produtos naturais quimicamente diversos, com significativo potencial farmacêutico e medicinal.

A Asteraceae é uma família de plantas mais rica em espécies, contendo aproximadamente 1500 gêneros e 25000 espécies, dispostos em 17 tribos e 3 subfamílias (HATTORI; NAKAJIMA, 2008; USDA, 2019). É de distribuição sub-cosmopolita,

porque está apresentada em todos os continentes a exceção da Antártica e a Groenlândia. A maior biodiversidade está em zonas tropicais e subtropicais (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003), sendo o Brasil o país que detém aproximadamente 250 gêneros e 2000 espécies, e são encontradas por todo o território nacional (PESSOA DA SILVA et al., 2014).

A família Asteraceae apresenta uma gama de usos populares em diversos campos, onde desde o ponto de vista econômico, cerca de 40 espécies têm importância direta na alimentação humana em diferentes partes do mundo, como alface (*Lactuca sativa* L.) e chicória (*Cichorium endívia* L.), também a indireta obtenção de produtos, como girassol (*Helianthus annus* L.), camomila (*Matricaria recutita* L.) e carqueja (*Baccharis trimera* Less.).

Além disso, mostrando também espécies que produzem metabolitos secundários de uso farmacêutico ou potencial biológico, como: antidiabéticos, antioxidantes, hepatoprotetores, gastroprotetores, antimicrobianos, antialérgicos e anti-inflamatórios (ANGEL; VITTO; PETENATTI, 2009). As Asteraceae, também, são consideradas fontes importantes de agentes quimio-preventivos devido ao seu conteúdo em diferentes classes de compostos antioxidantes, e com efeito antiproliferativo e podemos mencionar a *Achillea millefolium* (yarrow) e *Calendula officinalis* (calêndula) que apresenta efeitos citotóxicos *in vitro*. Também achados relatam que extratos metanoicos de catorze plantas do Oriente Médio da família Asteraceae foram rastreados quanto à atividade antiproliferativa como por exemplo a *Psiadia punctulata* (BADER et al., 2019).

Outra espécie que podemos mencionar é a *Artemisia annua* L. que tem derivados ativos como a artemisinina que está sendo investigado em ensaios clínicos para o lúpus, câncer metastático de pulmão e câncer colorretal, o artesunato para o câncer pulmonar de células não pequenas, melanoma metastático, carcinoma espinho celular da laringe, e a thapsigargina para tumores sólidos avançados e outros tumores linfáticos no sangue (GHANTOUS et al., 2010; ZHANG et al., 2018).

O gênero *Tithonia* é uma fonte importante de diversos produtos naturais, pertencente também as Asteraceae. O gênero *Tithonia*, é nativo do México e da América Central (DUKE, 1982), embora, atualmente, muitas espécies são distribuídas em todo o

mundo. Compreende 13 táxons, distribuídos em onze espécies e espécies duas seções a seguir, a primeira seção *Tithonia*, que inclui ervas perenes e anuais com características morfológicas e químicas que divergem do estoque ancestral (*T. fruticosa*, *T. pedunculata*, *T. diversifolia*, *T. koelzi*, *T. brachypoda*, *T. rotundifolia*, *T. thurberi* e *T. tubaeformis*) e a segunda seção Mirasola, que inclui apenas taxa perene que divergiram morfológicamente do estoque ancestral, mas mantiveram esqueletos de flavonóides básicos (*T. auriculata*, *T. calva* var, *T. calva* var. *lancifolia*, *T. hondurensis* e *T. longiradiata*) (CHAGAS-PAULA et al., 2012; MISSOURI BOTANICA GARDEM, 2010).

Esse gênero, apresenta diferentes atividades farmacológicas como, anti-inflamatório, analgésico, antimalárico, atividades antivirais, antidiabéticas, antidiarreicas, antimicrobianas, antiespasmódicas, vasorelaxantes, quimio-preventivas ao câncer, citotóxicas, toxicológicas, bioinseticidas e repelentes (CHAGAS-PAULA et al., 2012).

Contudo, espécies como *T. diversifolia* e *T. rotundifolia* são agora encontrado na maior parte do mundo, incluindo a Ásia e África, onde eles se tornaram espécies invasivas (MUOGHALU; CHUBA, 2005). A *T. rotundifolia* foi relatado apenas como usado como fonte de medicamento para tratar febre na Venezuela (JÁTEM - LÁSSER; RICARDI; ADAMO, 1998), e achados atuais revelam que apresenta uma variedade de atividade antimicrobiana contra espécies bacterianas, micobacterianas e fúngicas (OMOKHUA et al., 2018).

A *Tithonia diversifolia* é explorada como fonte de medicamento em diferentes partes do mundo para tratar uma ou mais doenças, por que apresenta uma grande variedade de metabolitos secundários ativos.

1.5 *Tithonia diversifolia*

Dentro dessa perspectiva, a espécie *T. diversifolia* (Figura 8) é nativa do México e também cresce em partes da África, Austrália, Ásia e outros países da América do Norte. (DUKE, 1987), sendo bastante utilizada tanto na medicina tradicional como planta ornamental e biomassa verde para melhorar a fertilidade do solo (Giuseppe Orsomando, 2016). Seus principais constituintes metabólitos apresentam diversas propriedades

farmacológicas, tais como atividade espamolítica, antimalárica, anti-inflamatória, antiproliferativa antidiarreico, antiamebico, antimicrobiano e também para o tratamento da hepatite (GOFFIN et al., 2002; PEREIRA et al., 1997).

Figura 8. Fotos de *Tithonia diversifolia*



Fotógrafo: Manoel Odorico de Moraes Filho.

Com isso, estudos revelam que a partir de uma extração inicial com solventes hidrofílicos se pode obter a extração de metabolitos secundários mais importantes das folhas, que tem características antiproliferativa (CHIANG et al., 2004; LIAO et al., 2013; YOHANKA et al., 2012).

Devido à importância na área médica mostrada para o extrato da *Tithonia diversifolia*, foi realizada uma prospecção (Resultado 4.1) que objetivou buscar informações e apresentar uma visão geral do estado atual do desenvolvimento tecnológico relacionado ao uso de *Tithonia diversifolia* no tratamento do câncer, através da verificação da progressão de publicações de artigos científicos publicados e de patentes registradas.

Com as informações encontradas sobre a *Tithonia diversifolia* nas bases de dados, pode-se ter uma visão do estado atual e importância desta planta no tratamento do câncer.

Então, as plantas medicinais são um tesouro que não se deve desperdiçar já que os medicamentos, que são derivados de plantas ocupam um importante lugar na medicina tanto tradicional, como na medicina moderna. Com isso, é necessário aproveitar essa matéria prima para o desenvolvimento de novos medicamentos antineoplásicos.

A nível global, existe uma diferente e enorme biodiversidade vegetal, sendo a América o continente com maior biodiversidade do mundo, seguido de alguns países da Ásia, a Austrália e a Ilha de Papúa de nova Guiné na Oceania. Nestes lugares encontram-se mais do 60% da biodiversidade do mundo, embora seu território só representa o 10% da superfície terrestre. O país com a maior biodiversidade é o Brasil já que detém 55 mil espécies de plantas, o que corresponde a aproximadamente 22% das 250 mil existentes no planeta (ECOTICIA, 2016).

Como foi mostrado acima, a *Tithonia diversifolia* é uma planta que possui uma importante utilidade na medicina por sua amplitude de atividades farmacológicas que oferece, como, atividades anti-inflamatória, antifúngica e como potencial espécie antineoplásica.

Nessa perspectiva, um dos principais focos deste trabalho foi avaliar o efeito antiproliferativo *in vitro* do extrato etanólico da *Tithonia diversifolia*, além de estudar o seu possível mecanismo de morte envolvido na atividade antiproliferativa na linhagem de HCT-116.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar as propriedades antiproliferativa e os possíveis mecanismos de morte do extrato de *Tithonia diversifolia* (TD) em linhagens tumorais.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar prospecção tecnológica da *Tithonia diversifolia* utilizado no câncer.
- Determinar o potencial citotóxico *in vitro* em diferentes linhagens tumorais.
- Avaliar o padrão temporal nas linhagens tumorais mais sensíveis após 24, 48 e 72 horas de tratamento com o extrato de TD.

- Avaliar os possíveis mecanismos de morte envolvidos na citotoxicidade induzida pelo extrato de TD.

- Analisar as alterações morfológicas e estruturais (Integridade de membrana e Densidade Celular) induzidas pelo tratamento com TD;
- Analisar a interferência do extrato sobre o ciclo celular;
- Avaliar os padrões de interferência na polarização mitocondrial;

- Avaliar o efeito antiproliferativo do extrato de TD, frente a linhagem de HCT-116 após o tratamento de 24, 48, 72 horas, na presença de um antioxidante (NAC).

- Avaliar os efeitos pro-oxidativos de TD na linhagem de HCT-116, após o tratamento de 24 horas.

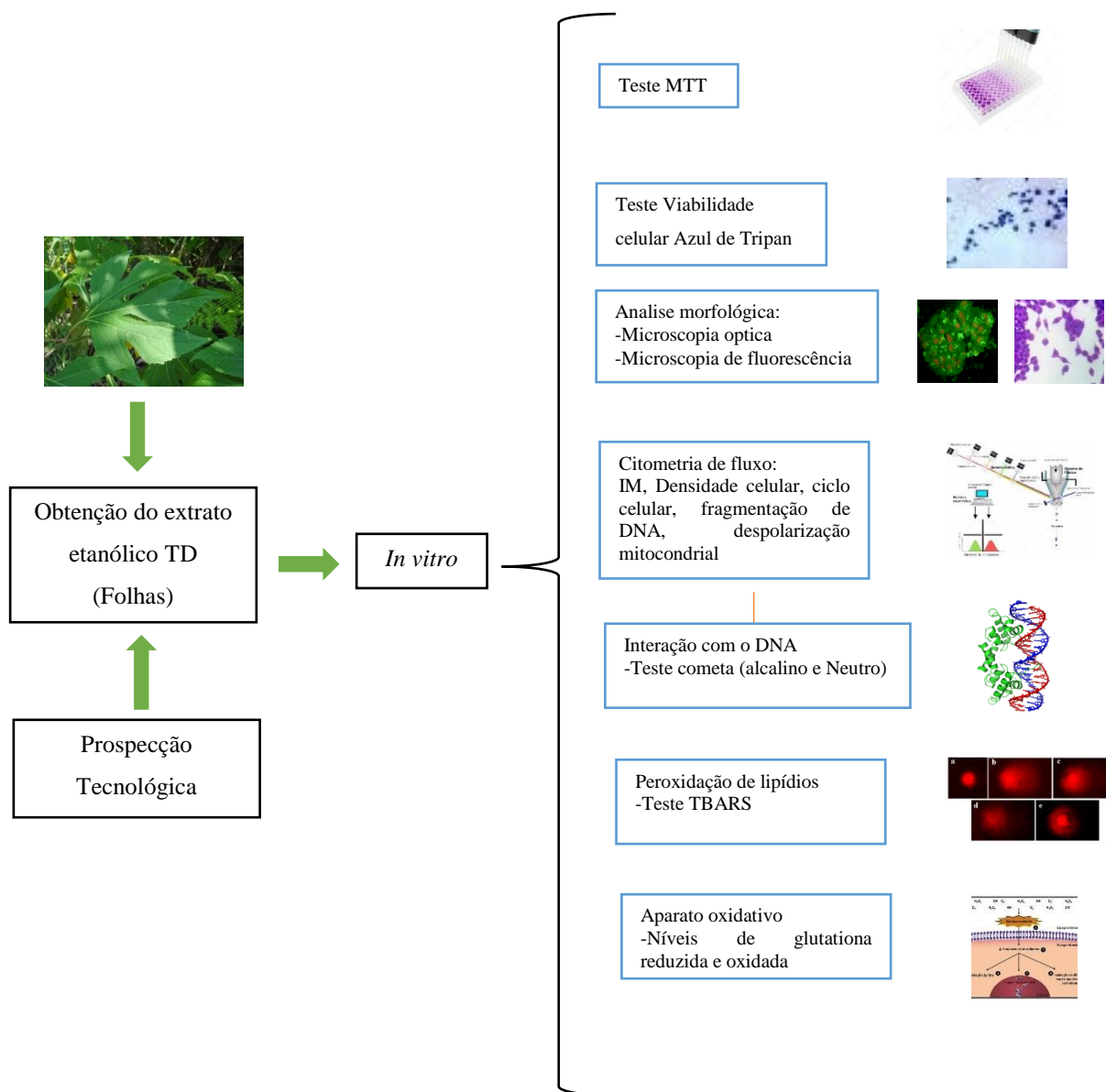
- Monitorar a indução AVOs após o tratamento com TD durante um tratamento de 24 horas nas células de HCT-116.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental

A figura 9 apresenta o desenho experimental onde está descrito resumidamente todas as etapas deste trabalho como a metodologia empregada.

Figura 9- Desenho Experimental



Fonte: Própria (2019)

3.2 Prospecção do potencial biotecnológico da utilização da *Tithonia diversifolia* contra o câncer.

Desenvolvimento

A prospecção científica foi realizada em junho de 2019, utilizando-se os bancos de dados PubMed, Google acadêmico e Web of Science. A avaliação do perfil de interesse tecnológico foi realizada a través da avaliação dos pedidos de patentes depositadas no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI), no United States Patent and Trademark Office (USPTO), na World Intellectual Property Organization (WIPO), e base de Dados em Espanhol e Português (LATIPAT-ESPACENET).

O levantamento de publicações foi realizado considerando os artigos publicados com os descritores “Asteraceae”, “*Tithonia*” e “*Tithonia diversifolia*” e esses termos associados aos descritores “*cancer*” ou “*cytotoxicity*” ou “*death cell*”. Foi considerado o ano de publicação, a participação mundial dos trabalhos publicados e a área de publicação. Na avaliação dos periódicos foi utilizado os filtros: tópico e ano de publicação.

3.3 Obtenção de extrato etanólico de *Tithonia diversifolia* (TD)

O extrato seco etanólico foi obtido pela parceria realizada com a professora Dra. Yohandra Reis e o aluno de doutorado João Turco, do departamento de Química da Universidade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO) de Guarapuava, PR, Brasil.

As folhas de *T. diversifolia* foram secas a temperatura ambiente durante uma semana e depois foram trituradas com pistilo em almofariz. Posteriormente, 50 g de folhas foram colocadas em um frasco erlenmeyer e em seguida foram acrescentados 200 mL de etanol (Tedia® 99%). Na sequência, a mistura ficou sob agitação constante em incubadora (Tecnal®) a 180 rpm a 25°C durante 48 h. Após o período de agitação, o extrato foi filtrado sob baixa pressão, com filtro de papel qualitativo. O resíduo sólido foi descartado e em seguida o extrato líquido foi levado ao evaporador rotativo (Fisatom®) para a secagem do solvente e obtenção do extrato seco. O extrato seco de *T. diversifolia*

foi guardado em frasco de vidro com tampa e permaneceu sob refrigeração em geladeira. Para os testes de atividade citotóxica a amostra foi identificada com o nome de M1, e foi dissolvida utilizando dimetilsufóxido (DMSO) em uma concentração de solução estoque de 50 mg/ml.

3.2 Células

Para a avaliação da citotoxicidade as linhagens celulares utilizadas no ensaio estão listadas quanto ao tipo histológico, fonte e origem na tabela 1.

Tabela 1- Células utilizadas no ensaio de citotoxicidade

Linhagem	Tipo histológico	Origem	Concentração (cel/ml)	Fonte
L929	Não tumoral	Murinho	$0,1 \times 10^6$	Banco Rio de Janeiro
HCT 116	Carcinoma colorretal	Humana	$0,7 \times 10^5$	Instituto Nacional do Câncer (EUA)
PC 3	Carcinoma de próstata	Humana	$0,1 \times 10^6$	
SNB 19	Carcinoma de cérebro	Humana	$0,1 \times 10^6$	
NCIH 460	Carcinoma de pulmão	Humana	$5,0 \times 10^4$	
MCF 7	Câncer de mama	Humana	$0,1 \times 10^6$	

*linhagem pertencentes ao laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará.

3.4 Manutenção de células em cultura

As linhagens tumorais utilizadas foram cultivadas em meio RPMI 1640 ou DMEM, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de antibióticos (penicilina/estreptomicina) como recomendado pelo datasheet celular. As células foram mantidas na incubadora a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂ e diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio invertido. O meio era trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência celular necessária (90%) para renovação de nutrientes.

3.5 Estudo da atividade citotóxica

Princípio do teste

A avaliação do potencial citotóxico de TD foi realizado em células humanas tumorais e uma não tumoral, através da técnica de MTT que é um ensaio quantitativo para determinar a interrupção de uma função bioquímica crítica. Este ensaio quantifica a atividade mitocondrial, medindo-se a formação de cristais de formazam, produto formado pela redução de tetrazolium MTT (Mosmann, 1983). A redução de MTT ocorre principalmente na mitocôndria através da ação da succinato desidrogenase fornecendo então uma medida de função mitocondrial, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

Procedimento experimental MTT

As células aderidas foram distribuídas em placas de 96 poços numa concentração de plaqueamento descrita na tabela 1. Após 24 horas, o extrato etanólico de TD foi diluída em uma curva de concentrações (100µg/ml- 0.78125µg/ml), e depois foram incubadas durante 72 horas. Após o período de incubação foram centrifugadas a 1500 RPM/15 min e o sobrenadante foi descartado. A cada poço foi adicionado 100 µl de MTT 1% e foi reincubada durante 3 horas a 5% de CO₂ a 37° C. Após esse período as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm/10 min, o sobrenadante foi descartado e a cada poço foi adicionado 100 µl de DMSO. Para a quantificação de sal reduzida nas células se utilizou um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 595nm.

3.6 Procedimento experimental de avaliação temporal pelo método MTT

Procedimento experimental

Nas linhagens que foram mais sensíveis ao extrato de TD, foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade (cél/ml), para HCT-116 (0,7 x10⁵) e PC-3(0,1 x10⁶) e estas foram incubadas em diferentes tempos (24, 48 e 72 horas) de tratamento. O extrato etanólico de TD foi diluída numa curva de concentrações (100µg/ml- 0.78125µg/ml).

Analises dos dados

O extrato foi testado em diluição seriada duplicada ou triplicada, sendo realizadas duas repetições individuais, para cada linhagem previamente indicado. Para a determinação da IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular) as absorbâncias das amostras foram analisadas utilizando-se o logaritmo das concentrações testadas por regressão não-linear com sus respectivos intervalos de confiança 95%. Todos os experimentos foram analisados utilizando-se do programa GraphPad Prism 5.0

3.7 Estudo do mecanismo de morte em células de carcinoma colorretal (HCT 116)

Para esse estudo as células da linhagem HCT-116, na concentração de $5,0 \times 10^4$ células/mL, foram incubadas por 24 horas com diferentes (4,5; 9 e 18 µg/mL) concentrações de TD (M1) que foram estimadas a partir do valor da IC₅₀ encontrada no método do MTT para esta mesma linhagem celular (HCT-116) após incubação por 24 horas. A doxorrubicina (0,3 µg/mL) foi utilizada como controle positivo.

3.7.1 Determinação de viabilidade celular pelo método de exclusão por azul de tripan

Princípio do teste

É um método direto de avaliação do potencial citotóxico de substancias. Ele permite diferenciar células viáveis de não viáveis, pois as viáveis são impermeáveis a este corante, uma vez que sua penetração na célula indica a perda da integridade de sua membrana (ESMERALDA et al., 2002).

Procedimento experimental

Em uma alíquota de 90 µl da suspensão de células foi adicionado 10 µl do corante de Azul de tripan (0,4%). As células viáveis e as não viáveis foram diferenciadas e contadas em câmara de Neubauer, contando-se todas células presentes nos quadrantes.

Analise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad prism 5.0, e foram comparados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.7.2 Análise de Morfologia celular-coloração Panótico rápido

Princípio do teste

A coloração panótico rápido é um método de coloração diferencial que permite a observação das células sanguíneas. Devido à interação entre os corantes, núcleos e grânulos podem ser diferenciados na cor violeta. É uma modificação da mancha de Romanowsky, proporcionando um procedimento muito mais rápido com base em imersões (HOROBIN, 2011).

Procedimento experimental

Células da linhagem HCT-116, foram plaqueadas na concentração de $2,5 \times 10^4$ células/ml foram incubadas por 24 horas com o extrato e examinadas ao microscópio óptica. Para observar a morfologia, 70 μ l da suspensão de células foram adicionadas à centrífuga de lamina durante 5 minutos. Após adesão das células na lâmina, a fixação e a coloração foi feita por meio do kit do panótico.

Análise morfológica

As lamina contendo as células coradas foram levadas ao microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas ao controle (não tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia em microscopia óptica.

3.8 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia que mede e analisa simultaneamente múltiplas características físicas de partículas individuais, geralmente células, à medida que fluem em um fluido através de um feixe de luz. As propriedades medidas incluem o tamanho relativo de uma partícula, granularidade relativa ou complexidade interna e intensidade relativa de fluorescência. Essas características são determinadas usando um sistema de acoplamento óptico-eletrônico que registra como a célula ou partícula dispersa a luz do laser incidente e emite fluorescência. Os dados do modo de lista são coletados em cada partícula ou evento. As características ou os parâmetros de cada evento são baseados em suas propriedades de dispersão de luz e fluorescente (DICKINSON, 2000).

3.8.1 Avaliações da integridade da membrana, e a densidade das células HCT-116.

Princípio do teste

Iodeto de propídeo (PI) é um corante fluorescente conhecido por se ligar a ácidos nucleicos (DNA e RNA) das células e citoplasma. É relativamente excluído pelas células vivas, porém penetra rapidamente nas células com membranas danificadas, tornando-as brilhantemente fluorescentes, por sua capacidade de penetrar na célula cuja membrana esteja rompida por ser hidrofílico. A célula com a membrana íntegra emite baixa fluorescência. Deste modo, este método permite avaliar a viabilidade celular através da avaliação de integridade de membrana plasmática das células. O iodeto de propídeo é excitado pelo laser de argônio (488 nm) (MACKLIS; MADISON, 1990).

Procedimento experimental

Após 24 horas de tratamento com TD, as células foram suspendidas em uma alíquota de 500 µL de PBS, 2% de EDTA e 1% soro bovino fetal (SBF) e foram incubadas com 10% de PI a 50µg/mL (diluído em tampão fosfato) para poder ter uma concentração final de 5µg/mL nas células em suspensão. Após 10 minutos foram analisadas por citometria de fluxo e as informações sobre densidade celular foram obtidas utilizando o filtro para o espectro vermelho.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad prism 5.0, e foram comparados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.8.2 Análise do conteúdo de DNA nuclear da célula e fragmentação de DNA

Princípio do teste

O teste baseia-se na capacidade do iodeto de propídeo ligar-se ao DNA. As células foram lisadas inicialmente com um detergente, permitindo que o PI ligue-se ao DNA de todas as células. As células, com DNA íntegro, emitem alta fluorescência. No entanto, as células com DNA fragmentado emitem baixa intensidade, o que sugere que pode ser um tipo de morte por apoptose e a necrose (SHAPIRO, 1985).

Procedimento experimental

Para a determinação do conteúdo de DNA celular, esse se reflete nas fases do ciclo celular, o teste foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o PI como fluorocromo. O controle positivo utilizado foi a Doxorubicina 0,3 $\mu\text{g/mL}$ e o TD em diferentes concentrações de 4,5; 9,00 e 18,00 $\mu\text{g/ml}$. Após 24 horas de incubação, as células foram suspensas em PBS e colocadas em solução detergente de Triton X-100 0,1% e 10% de PI. Depois elas foram colocadas no escuro durante 30 minutos e após esse período foram analisadas no citômetro de fluxo.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad prism 5.0,

e foram comparados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), seguido pelo teste Dunnett's e Tukey's Multiple Comparison.

3.8.3 Determinação do potencial transmembrânico.

Princípio do teste

O teste baseia-se na capacidade da mitocôndria sequestrar um corante nucleofílico fluorescente, como a Rodamina 123 (Rh 123). Quando a mitocôndria apresenta o potencial transmembrânico inalterado, as células sequestram a Rh123 e emitem alta fluorescência quando excitados pelo laser. No entanto, quando existe alteração no potencial transmembrânico da célula, observa-se uma diminuição da fluorescência por um efluxo da Rh 123 de dentro da mitocôndria (MARCHETTI et al., 1996)

Procedimento experimental

As células foram suspensas num volume de 250 μL de uma solução de Rodamina 123 na concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, e foram incubadas na estufa a 37°C e 5% CO_2 durante 15 minutos. Após 15 min de incubação, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm durante 15 minutos e posteriormente o sobrenadante foi descartado em seguida foram adicionados 400 μL de PBS em cada tubo. Após o período de incubação de 30 minutos no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo, utilizando o filtro para o espectro verde.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad prism 5.0, e foram comparados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Seguido do teste Dunnett's e Tukey's Multiple Comparison.

3.9 Ensaio de proporção de células necróticas ou apoptóticas-Coloração diferencial Acridina laranja/ Brometo de Etídio por microscopia de fluorescência

Princípio do teste

O teste consiste na identificação de características morfológicas de morte por apoptose ou necrose com base na fluorescência celular promovida pelos dois corantes brometo de etídio e laranja de acridina. A laranja de acridina é um corante permeável na membrana plasmática celular que pode-se ligar na molécula DNA emitindo fluorescência verde. Quando é avaliado a viabilidade celular verifica-se que as células viáveis apresentam uma fluorescência totalmente verde no núcleo, porém, quando estas estão inviáveis o brometo de etídio que também possui a propriedade de fluorescência, faz com que a coloração corresponda seja alaranjada. Com tudo, as células com membrana íntegras apresentarão um padrão de cor verde totalmente uniforme em seu núcleo (Cury-Benaventura et al, 2006).

Procedimento experimental

As células em suspensão em eppendorf foram centrifugadas por 5 minutos a uma rotação de 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS, em seguida foi preparada uma solução de laranja de acridina (1mg/mL) /brometo de etídio (2mg/mL) (AO/BE) em PBS numa proporção de 0,4:1,6:20 µL, em seguida foi adicionado 4 µL da solução de AO/BE a cada tubo. Depois uma alíquota de 50 µL foi transferida para uma lâmina e posteriormente foi montado uma lamínula para, em seguida, ser contada cada célula de interesse.

Análise estatística

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad prism 5.0 e foram comparados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Seguido pelo teste Dunnett's e Tukey's Multiple Comparison.

3.10 Procedimento experimental de avaliação temporal pelo método MTT, utilizando um antioxidante (NAC)

Procedimento experimental

Para poder avaliar se o possível mecanismo de ação de TD estava relacionada com a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) foi utilizado a N-acetil-L-cisteína (NAC) que age como sequestrador ou inibidor de espécies reativas de oxigênio (EROs) envolvidos nas vias do estresse oxidativo. Para essa avaliação o NAC foi pré-incubada na concentração de 4 μ M durante duas horas, posteriormente as placas foram centrifugadas 1500 rpm/5 minutos, depois o meio foi retirado e um meio novo de cultura foi adicionado com concentrações seriadas do extrato de TD por mais 24 horas. Além disso, o NAC foi utilizado em outro método, em que sua adição ocorreu 2 horas depois de colocar na placa as diluições seriadas do extrato de TD e, após essa adição elas foram incubadas novamente por 24 horas, para ver se o NAC conseguiu reverter o efeito citotóxico de TD. Este teste foi avaliado durante um período de incubação de 24, 48 e 72 horas.

Analises dos dados

O extrato foi testado em diluição seriada duplicada ou triplicada, sendo realizadas duas repetições individuais, para cada linhagem previamente indicada. Para a determinação da IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50 % do crescimento celular) as absorbâncias das amostras foram analisadas utilizando-se o logaritmo das concentrações testadas por regressão não-linear com seus respectivos intervalos de confiança 95%. Todos os experimentos foram analisados utilizando-se do programa GraphPad Prism 5.0

3.11 Análise da indução de produção de AVOs a través de microscopia de fluorescência.

Princípio do teste

A laranja de acridina (AO) é um corante permeável nas células, possui um pico de absorção dominante a 460 nm, e o pico de emissão de fluorescência a 530 nm quando excitado pelo laser a 488 nm. É frequentemente descrito por emitir fluorescência

vermelha em compartimentos ácidos, como as organelas ácidas, tais como autolisossomo e lisossomos (AVOs) que podem ser formados como resposta ao estresse celular. Assumindo pH 5, a laranja de acridina está em sua forma protonada promovendo sua concentração em os compartimentos ácidos que irá resultar na emissão concomitante de fluorescência verde e vermelha do tecido corado com AO (NADRIGNY et al., 2007; THOMÉ et al., 2016).

Procedimento experimental

Foram utilizadas lamínulas previamente esterilizadas e colocadas em cada poço numa placa de 24 poços, e as células de HCT-116 foram plaqueadas numa concentração de 30000 células/ml. Após 24 horas foi adicionado o extrato de TD nas concentrações de 4,5 e 9,00 µg/ml, sem ou na presença do NAC 4 µM, e foram incubadas novamente durante 24 horas mais. A Rapamicina 0,02 µM, foi utilizado como controle positivo (THOMÉ et al., 2016).

Após 24 horas, foi adicionado o cloreto de amônio NH₄CL 10 µM por um período de incubação de 1 hora, utilizado com agente lisosomotropico, para inibir a protonação de AO nas vesículas ácidas e dessa forma identificar morfologicamente a presença das AVOs (KLIONSKY et al., 2016), posteriormente foram incubados todos os poços com AO 1µg/ml, durante 15 minutos e mantidas no escuro. Posteriormente, cada poço foi retirado todo o meio completo e foi lavado 3 vezes com PBS em seguida foi retirada a lamínula e colocada sobre uma lamina para posterior observação ao microscópio de fluorescência (WEN; ZHAO; GUO, 2016).

Análise morfológica

As lâminas contendo as células com AO, foram levadas ao microscópio de fluorescência para avaliação da indução de AVOs e foram comparadas ao controle negativo (não tratadas). O registro das alterações celulares foi feito por fotografia em microscopia de fluorescência.

3.12 Avaliação da indução de danos ao DNA pelo ensaio cometa

Princípio do teste

O teste cometa é um teste de biomonitoramento humano, epidemiologia molecular e ecogenotoxicologia, bem como pesquisa fundamental em danos e reparo de DNA. Existem dois variantes do teste cometa, o primeiro e o teste em meio alcalino que permite análises de possíveis lesões oxidativas no DNA para isso é utilizado um pH aproximado de 13 que permitiu a separação das duas cadeias, ou seja, uma desnaturação do DNA para poder detectar diversas lesões, como quebras de fitas simples e duplas. A segunda variação por sua vez utilizou-se um pH 7,0-8,5 pois detecta apenas, quebras de fita dupla em DNA ou ligações cruzadas entre DNA e RNA ou DNA xenobiótico (COLLINS, 2004).

Procedimento experimental

O ensaio do cometa foi realizado em condições alcalinas e em condições neutras (HARTMANN & SPEIT, 1997; SINGH & SINGH, 2002; WOJEWODZKA et al. 2002). A β -lapachona (10 μ M) foi usado como controle positivo em todos os experimentos (CAVALCANTI et al., 2011) enquanto que o controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir o extrato. As células foram tratadas com TD na presença e ausência de NAC e bromoheptano (BH) a fim de se evidenciar a participação de enzimas dependentes de glutatona sobre a genotoxicidade da amostra.

Preparo de laminas

Após o período de incubação (24 h), as células foram lavadas com PBS gelado, removidas com 100 μ L de tripsina 0,15% e ressuspensas em meio completo. Modificações do ensaio do cometa alcalino foram realizadas de modo que permitisse analisar possíveis lesões oxidativas no DNA. Para isso, logo após o procedimento de lise celular, as lâminas foram incubadas com a endonuclease 8-hidroxiguanina glicosilase (hOGG-1,1:500) que age via excisão de bases removendo guaninas oxidadas no DNA.

Em seguida, 20 μL da suspensão de células foi dissolvido em 0,5% em agarose com baixo ponto de fusão e imediatamente espalhada sobre uma lâmina.

Preparação de lise celular

As células foram, então, colocadas em solução de lise por pelo menos 1 hora a 4 °C.

Neutralização e eletroforese

Posteriormente as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese e preenchida com tampão de corrida, em pH, de 13, para o ensaio do cometa em condições alcalinas (SINGH, 2002) ou em pH 8,0 para o ensaio do cometa em condições neutras (WOJEWODZKA et al., 2002), por 60 min para permitir o equilíbrio com o tampão de corrida. A eletroforese foi conduzida em baixa luminosidade por 20 min, usando 14 V e uma corrente de 12 mA (0,5 V/cm). Após a corrida eletroforética, as lâminas foram retiradas e mergulhadas na solução de neutralização durante 5 minutos.

Coloração e análise de laminas

A análise foi realizada por coloração com brometo de etídio e as células foram contadas em microscópio de fluorescência. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas.

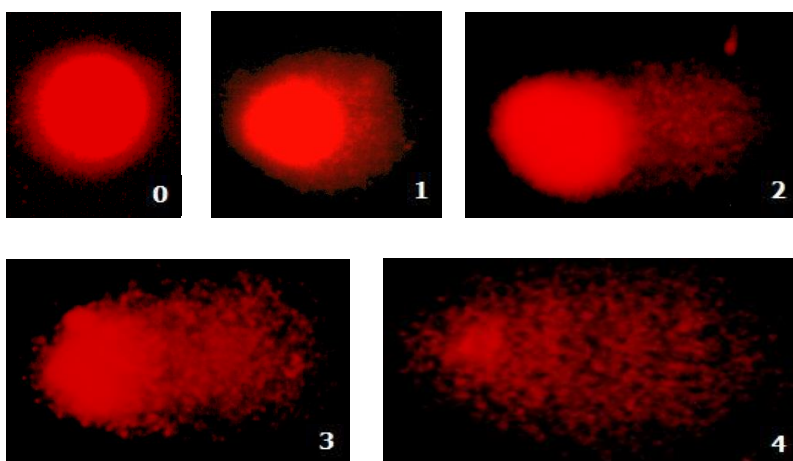
Análise dos dados

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON et al., 2007; HARTMANN & SPEIT, 1997; TICE et al., 2000). Foram contados 100 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA, de acordo com a figura 10.

Foram calculados o índice (ID) sendo este obtido pela seguinte formula: $ID = 400 - \sum$ escores. Os dados foram analisados a partir da média \pm D.P. de 3 experimentos.

Para avaliação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 5.0.

Figura 10- Tipos de cometa e classificação por categoria de dano: 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%).



3.13 Avaliação da Peroxidação pelo teste TBARS

Princípio do teste

Como as espécies reativas de oxigênio (EROs) têm meia-vida extremamente curta, é difícil medir diretamente. Em vez disso, o que pode ser medido são vários produtos dos danos produzidos pelo estresse oxidativo, como o ácido tiobarbitúrico (TBARS). O teste mede o malondialdeído (MDA) presente na amostra, bem como o malondialdeído gerado a partir de hidroperóxidos lipídicos pelas condições hidrolíticas da reação. O MDA é um dos vários produtos finais de baixo peso molecular formados através da decomposição de certos produtos de peroxidação lipídica primária e secundária. No entanto, apenas certos produtos de peroxidação lipídica geram MDA, e o MDA não é o único produto final da formação e decomposição de peróxidos graxos, nem uma substância gerada exclusivamente através da peroxidação lipídica (TREVISAN, 2001).

Procedimento experimental

As células de HCT-116, foram incubadas com o TD por 24 h. Depois foram lisados com Tris-HCl 15 mM por 1 h. Dois mililitros de ácido tricloroacético (0,4 mg / mL) e HCl (0,25 M) foram adicionados ao lisado, que foi então incubado com 6,7 mg /mL de TBA por 15 min a 100 °C. A mistura foi centrifugada a 750 g por 10 min. Como o TBA reage com outros produtos da peroxidação lipídica além do MDA, os resultados são expressos em termos de reativo tiobarbitúrico (TBARS), determinadas por absorvância a 532 nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteínas.

Análise de dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad prism 5.0 e foram comparados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Seguido pelo teste Dunnett's e Tukey's Multiple Comparison.

3.14 Avaliação de produção de nitratos e nitritos

Princípio do teste

Nitritos e nitratos representam os produtos finais da oxidação do NO e consequentemente, sua concentração no meio do cultivo celular depende da produção em si, permitindo a sua quantificação. O NO é produzido por óxido nítrico sintasas que é um bem caracterizado segundo mensageiro que ativa guanilato ciclase. Quando existem hidroperóxidos lipídicos o NO está envolvido na sinalização, e outras espécies, que podem causar danos oxidativos induzidos por EROs provocando danos em macromoléculas perturbando a integridade celular (HEGEDÚS et al., 2018).

O ensaio colorimétrico de nitrato / nitrito baseia-se para medir os níveis de subprodutos estáveis de óxido nítrico (NO), nitrato (NO_2^-) e nitrito (NO_3^-) como uma indicação da produção de NO. Devido ao fato de que a proporção de NO_2^- e NO_3^- é variável

e não pode ser prevista com certeza, a soma de ambos os subprodutos de NO é um indicador mais preciso da produção de NO (PIERINI; BRYAN, 2015; SCHIEBER; CHANDEL, 2014; YANG et al., 2018).

Procedimento Experimental

Após o tratamento celular (24 h), 100 µL do sobrenadante da cultura foi adicionado a 100 µL do reagente de Griess [1% sulfanilamida em 1% de H₃PO₄ / 0,1% de N- (1-naftil) –etilenodiamina dicloridrato / 1% de H₃PO₄ / água destilada, 1: 1: 1: 1] e foram misturas. Foi incubado em temperatura ambiente por 10 min. Uma curva padrão foi preparado com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 0,75 100 µM) nas mesmas condições. Os espaços em branco foram preparados por adição de 100 µL do reagente de Griess a 100 µL do meio de cultura. A absorbância foi medida usando um leitor de múltiplas placas a 560 nm.

Análise de dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entres os diferentes grupos, os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad prisma 5.0 e foram comparados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%(p<0,05). Seguido pelo teste Dunnett's e Tukey's Multiple Comparison.

3.15 Determinação de níveis de glutathiona oxidada e reduzida

Princípio do teste

Glutathiona é um antioxidante hidrossolúvel, reconhecido como o tiol não proteico mais importante. Pode encontrar-se na forma reduzida (GSH) ou oxidada (GSSG), atuando direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, incluindo metabolismo proteção celular. A importância deste par é tal que a razão GSH/GSSG é normalmente utilizada para estimar o estado redox dos sistemas biológicos.

A Glutathiona total (GSH + GSSG) foi determinado por um ensaio espectrofotométrico baseado em a formação de 5-tio-2-nitrobenzoato (TNB) a partir de DTNB, que é utilizado para monitorar quantidade de GSH (AKERBOOM; SIES, 1981).

Procedimento experimental

Extração de proteína

Ao final do tratamento de 24 horas, as células foram suspensas e centrifugadas 2000 rpm por 5 minutos sendo lavadas duas vezes com PBS. O precipitado foi ressuspendido no gelo, em 200 μ L de solução de RIPA contendo inibidor de protease, PMSF, B-glicerofosfato. Posteriormente colocado no sonicador com tempo intermitentes de 2:1 minutos durante 3 vezes, e depois foi deixado em agitação durante 20 minutos, depois foi centrifugado 2000 rpm por 5 minutos a 4 °C. o sobrenadante foi recuperado.

Quantificação

Para a determinação espectrofotométrica, 910 μ L do sobrenadante do extrato celular ou de um padrão solução de glutathione, foi misturada com 50 μ L de 4 mg / mL de NADPH em 0,5% (p / v) de NaHCO_3 , 20 μ L de 6 U / mL de glutathione redutase em tampão fosfato-EDTA e 20 μ L de 1,5 mg / mL de DTNB em 0,5% NaHCO_3 . O aumento da absorbância foi medido a 412 nm. Os resultados foram normalizados pelo teor de proteína. O conteúdo total de glutathione foi determinado como μ g / mg de proteína.

Para Determinação GSSG, 4-vinipiridina foi adicionada a uma concentração final 0,1% (v / v) e depois incubada por 1 h em temperatura ambiente. Nesta concentração, a 4-vinipiridina é capaz de reagir com todos os GSH sem interferir na determinação do GSSG. O GSH foi determinado com base em os resultados de glutathione total e concentração de GSSG.

Análise de dados

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão da média de 3 experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram analisados utilizando o programa GraphPad prism 5.0 e foram comparados por análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5% (p<0,05). Seguido pelo teste Tukey's Multiple Comparison.

4. RESULTADOS

4.1 Prospecção do potencial biotecnológico da utilização da *Tithonia diversifolia* contra o câncer.

O presente levantamento bibliográfico teve como objetivo realizar um levantamento do potencial biotecnológico da utilização da *Tithonia diversifolia* contra o câncer, utilizando-se como estratégia a avaliação dos perfis de publicação de estudos e aplicações biotecnológicas com a espécie.

Dentre os resultados obtidos do mapeamento de informação, foi realizado uma busca de informação sobre a família Asteraceae, termo associado aos descritores “*cancer*” ou “*cytotoxicity*” ou “*death cell*”, como tema nos artigos sendo procurados em três plataformas de bases de dados como PubMed, Web of Science e Google acadêmico (Tabela 2)

Tabela 2- Quantidade de artigos científicos nos bancos de bases de dados utilizados com as palavras-chaves.

Palavra-chave	PUBMED	Google acadêmico	Web of Science
Asteraceae	26675	447000	6244
Asteraceae and cancer	1511	35800	430
Asteraceae and cytotoxicity	836	16300	407
Asteraceae and death cell	802	227	94

Fonte: pesquisa de campo (2019)

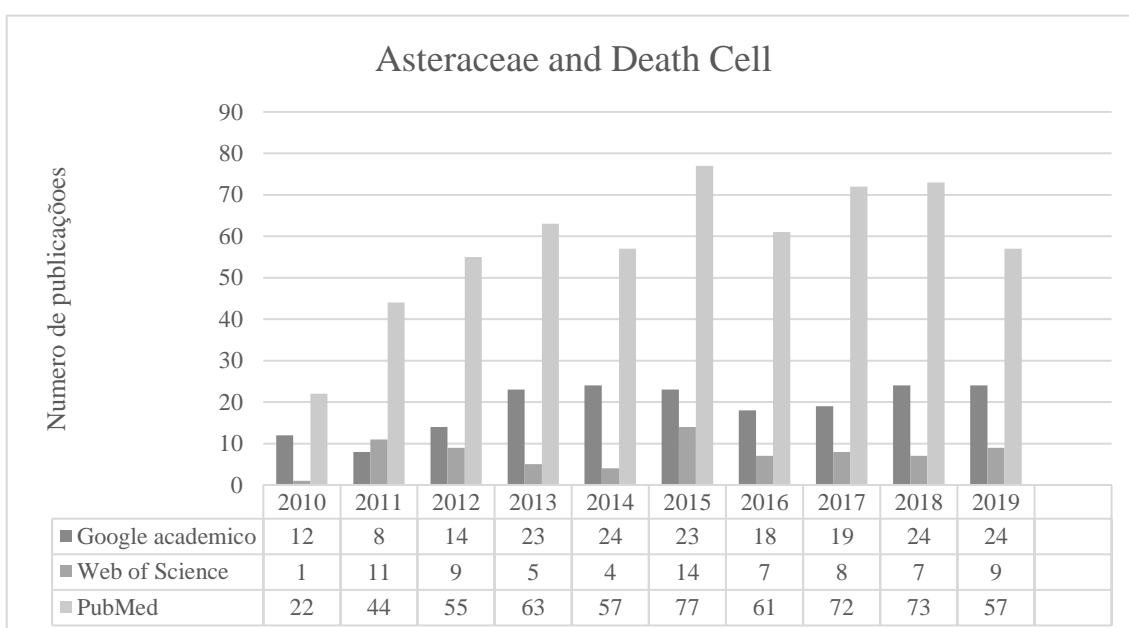
Observou-se que o Google acadêmico mostrou o maior depósito de artigos para a família (447000 estudos), assim como para a família e as palavra-chave “*cancer*” (35800 estudos) e “*cytotoxicity*” (16300 estudos), apresentando o banco de dados PubMed a maior cobertura para a família e “*death cell*” (802 estudos).

Dentre os artigos encontrados uma grande maioria começaram a serem publicados a partir do ano 1945, relatando como eram utilizados os extratos da família Asteraceae para o controle de pragas como inseticidas e para tratar a malária, além disso se mostram

artigos atuais sobre estudos sobre uma gama de atividade farmacológicas que apresenta esta família, assim como espécies que tem atividade antiproliferativa.

Posteriormente foi realizado um mapeamento de publicações nos últimos 10 anos (2010-2019) nas três plataformas de pesquisas anteriormente utilizadas, com o termo “*death cell*”. Mostrando que dentre esse intervalo de anos, o PubMed apresenta o maior depósito de artigos (581 estudos) seguido do Google acadêmico (189 estudos) e Web of Science (75 estudos) (Figura 11).

Figura 11- Progressão anual de artigos publicados ao longo de 10 anos nas bases PubMed, Google acadêmico e Web of Science, associando os termos “ Asteraceae AND death cell”



Fonte: pesquisa de campo (2019)

Dentre esses resultados tem estudos de diferentes espécies pertencentes a família, *Zinnia elegans*, *Lactutua sativa*, *Centaurea stoebe.*, *Artemisia annua*, *Echinacea*, *saussurea involucrata*, *Silibum marianum*, *Taraxacum officinale*, *Centaurea deflexa.*, *Ormenis africana*, *Carpesium faberi*, e *Tithonia diversifolia* que mostram efeitos antiproliferativo em diferentes linhagens celulares.

Ao realizar o mapeamento de informação da espécie *Tithonia diversifolia* contra o cancer, após a busca prospectiva os resultados foram organizados e expressos na Tabela 2 e 3.

Tabela 3- Quantidade de artigos científicos nos bancos de dados encontrados nos PubMed, Google acadêmico e web of Science utilizando as palavras-chave.

Palavras-chave	PubMed	Google acadêmico	Web of Science
<i>Tithonia</i>	26070	14100	497
<i>Tithonia diversifolia</i>	94	10200	411
<i>Tithonia diversifolia</i> and cancer	10	1450	10 si
<i>Tithonia diversifolia</i> and cytotoxicity	4	1170	17
<i>Tithonia diversifolia</i> and cell death	3	1410	5

*pesquisa de campo (2019)

O banco de dados PubMed indicou uma maior cobertura de resultados para o gênero (26.070 estudos), seguido do banco de dados Google acadêmico para o gênero (14.100 estudos) e indicando uma menor quantidade de estudos referente à o gênero o banco de dados da web of Science (497 estudos). Ao observar os resultados para o gênero e espécie indica um maior número de resultados para o banco de dados Google acadêmico (12.200 estudos), seguido do bando de dados Web of Science (411 estudos) e apresentando a menor cobertura de resultados o bando de dados PubMed (94 estudos).

O banco de dados Google acadêmico apresentou maior cobertura de resultados para o gênero, espécie e a palavra “Cancer” (1450 estudos) e para os bancos de dados Web of Science e PubMed foram equivalentes na quantidade de resultados para o gênero, espécie e a palavra “Cancer” (10 estudos) que foram publicados a partir do ano 2002, e que mostram 6 estudos iguais entre os dos bancos de dados. Consequentemente os resultados obtidos utilizando o gênero, espécie e a palavra “cytotoxicity” indicou mais resultados para a base de dados Google acadêmico (1170 estudos), seguido do Web of Science indicando menor quantidade de resultados (17 estudos), e para a base de dados PubMed apresentou menores resultados (4 estudos).

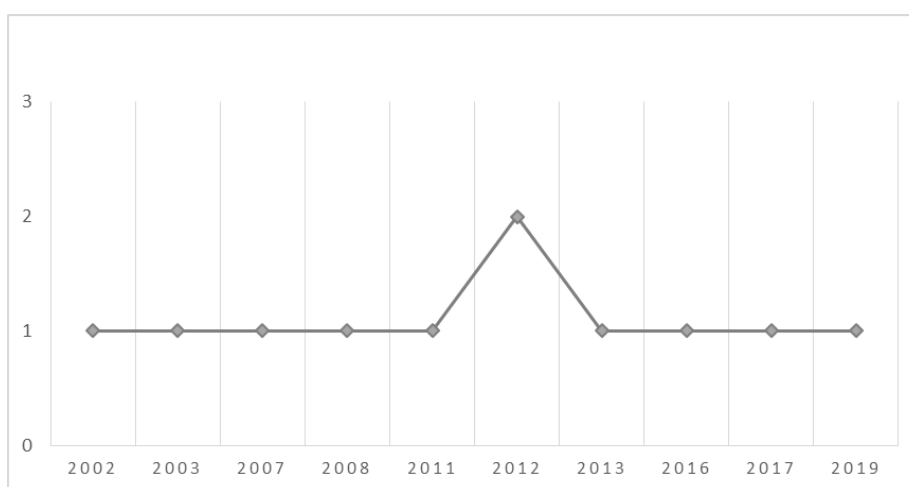
No entanto, para ser mais específicos, foi utilizado o termo espécie, gênero mais o termo “cell death” os resultados obtidos mostraram, menor obtenção de resultados para os bancos de dados Web of Science (5 estudos) mostrando artigos datam desde o ano 2005, e para PubMed (3 estudos) mostrando resultados que foram publicados em anos mais recentes a partir do ano 2011.

Na base de dados do Google acadêmico foi encontrada a maior cobertura de resultados, o que corresponde porque estão publicadas em 100 revistas de diferentes categorias, sendo 20 revistas da saúde e ciências médicas, avaliadas com um índice h5 (h de artigos publicados nos últimos 5 anos completos).

Além disso, após fazer essa primeira triagem, foi avaliada as três bases de dados no contexto de fornecer análises bibliométricas dos resultados que ajudem a construir indicadores, sobre a dinâmica de evolução por ano, país de publicação, área de publicação da informação científica de interesse, e também foi considerado a maior cobertura de resultados, no entanto a base de dados Google acadêmico fornece a maior quantidade de estudos, não conseguiu fazer análises bibliométricas, e somente mostra as categorias de publicação em relação ao índice h, dificultando fazer a análise retrospectiva.

Com isso todo, foi escolhida a base de dados da Web of Science que permitiu fazer as análises dos resultados encontrados, mostrando 10 artigos relacionados com o a palavra-chave descrita na tabela 1, número 3. Então, ao avaliar a evolução do número de artigos publicados por ano (Figura 12) verifica-se que, desde 2002, as pesquisas envolvendo a palavra-chave, ocorre crescimento. Porém, o ano de 2012 foi o que apresentou o maior número de publicações científicas.

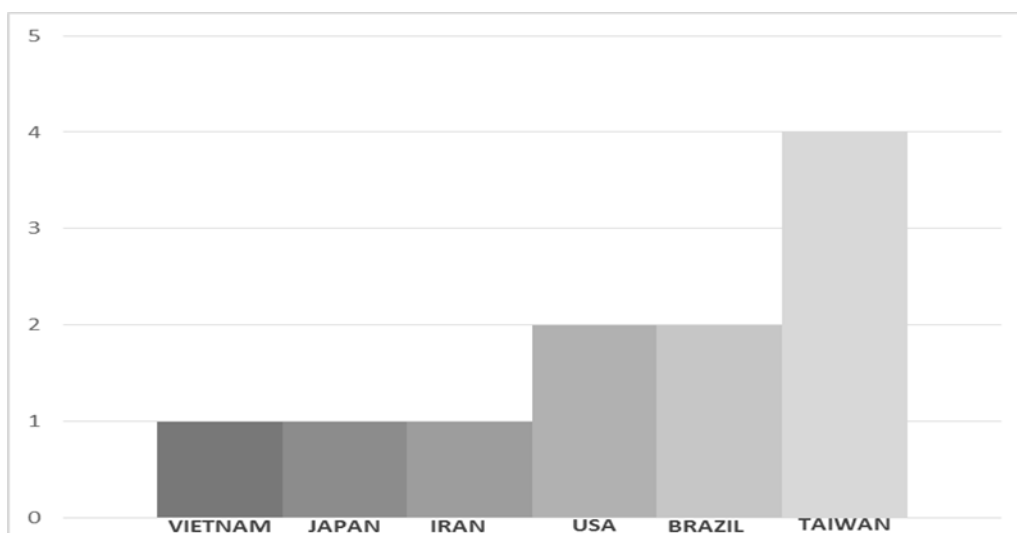
Figura 12- Evolução anual de publicações na Web of Science com o termo *Tithonia diversifolia* and Cancer



Fonte: Web of Science 2019.

Nesse mesmo contexto foi realizado um mapeamento das áreas de pesquisa que mais apresentaram publicações. A agronomia foi a que apresentou maior número de pesquisas depositadas na web of Science com 16% seguida de ciências da planta 12% e mostrando-se a farmacológica 8% no quinto lugar (Figura 13).

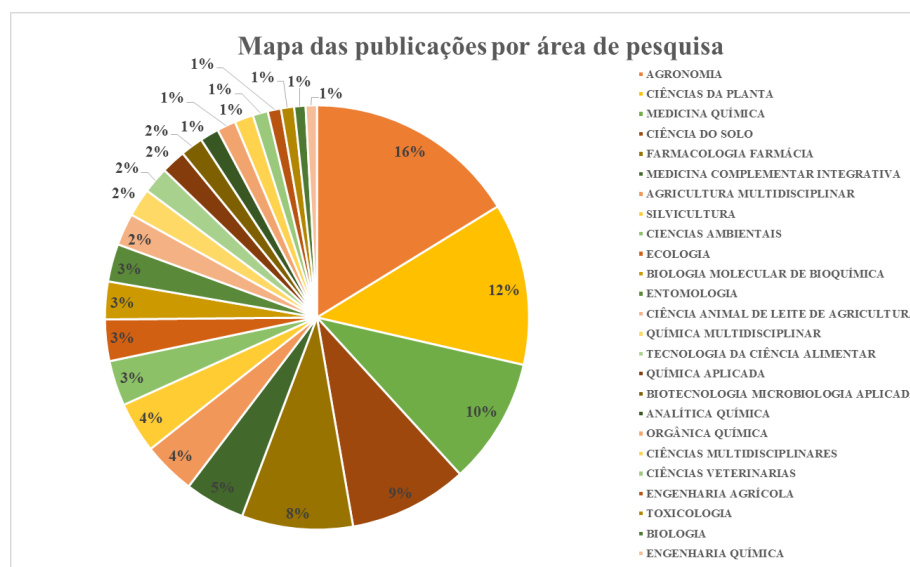
Figura 13. Distribuição dos artigos publicados na Web of Science por área de conhecimento.



Fonte: Web of Science, 2019.

Em seguida foi realizado uma busca por distribuição desses artigos por países utilizando os descritores “*Tithonia diversifolia* and Cancer” foi observado que Taiwan é o país que mais contribui com a publicação científica envolvendo esse assunto, com 4 artigos, seguido do Brasil, com 2 artigos (Figura 14).

Figura 14- Participação mundial em artigos publicados na Web of Science (*Tithonia diversifolia* and Cancer).



Ao realizar as buscas nos principais bancos de patentes (Tabela 3) foi possível observar que os maiores cobertura de depósito de patentes para o gênero foi o Google patents (650) seguido da USPTO AppTF (pedidos de patente e texto completo) (34) , a WIPO (33) USPTO PatFT (verificar se a patente que já foi registrada ou concedida) (22), e o banco do patentes do Brasil apresenta menor quantidade de patentes registradas (1). Continuando a avaliação para o gênero e espécie o banco de patente do Google Patents apresenta novamente a maior cobertura de resultados (485), seguido da WIPO (29), e mostrando que os resultados na USPTO PatFT e UPSTO AppTF foram equivalentes, ou seja, as que as patentes que foram solicitadas já foram aceitas.

Ao avaliar o gênero, espécie and “Cancer ”, verificou-se que Google acadêmico foi a que apresentou maior número de depósito (123), continuando com a USPTO PatFT (6) e UPSTO AppTF(7).A quantidade de patentes depositadas na base Google Patents apresenta maiores resultados (52), quando é avaliado o gênero, espécie and “Cytotoxicity”, seguido do bando de patentes da UPSTO AppTF (1). Além disso, verificou-se que ao utilizar o gênero, espécie and “Cell death” a Google Patents mostrou maior parte de resultados (40) seguido novamente da UPSTO AppTF (1).

Tabela 4- Quantidade de pedidos de depósitos de patentes encontrados nas principais bases tecnológicas utilizando as Palavras-chave

Palavras-chave	INPI	USPTO PatFT	USPTO AppFT	WIPO	LATIPAT-ESPACENET	Google Patents
1. <i>Tithonia</i>	1	22	34	33	0	650
2. <i>Tithonia diversifolia</i>	0	14	4	29	0	485
3. <i>Tithonia diversifolia</i> and cancer	0	6	7	0	0	123
4. <i>Tithonia diversifolia</i> and cytotoxicity	0	0	1	0	0	52
5. <i>Tithonia diversifolia</i> and cell death	0	0	1	0	0	40

Fonte: pesquisa de campo (2019)

4.2 Avaliação da atividade citotóxica de *Tithonia diversifolia*-TD (M1)

A atividade citotóxica do extrato de *Tithonia diversifolia*-TD (M1) foi avaliada frente a cinco linhagens de células tumorais (mama, próstata, glioblastoma, pulmão e câncer colorretal) e uma não tumoral (fibroblasto murinho) pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação (Tabela 5)

Tabela 5- Potencial antiproliferativo da M1 em linhagens tumorais e não tumoral avaliado pelo ensaio do MTT após 72 h de incubação

Amostra	IC ₅₀ (Intervalo) µg/mL					
	L929	HCT-116	MCF 7	PC3	SNB 19	NCIH-460
M1	25,58 (21,78 – 30,05)	7,15 (6,27 – 8,16)	20,50 (19,00- 22,12)	6,00 (5,71- 6,31)	35,39 (33,10- 37,83)	14,98 (14,23 – 15,77)

Os valores de IC₅₀ estão apresentados em µg/mL e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata.

Os resultados mostraram que o extrato da M1, apresentava potente atividade citotóxica em linhagens de células tumorais, com valores de CI₅₀ que variaram de 7,15 a 35,39 µg/mL para as linhagens testadas. Entretanto, deve-se ressaltar que a M1 exibiu maior atividade frente às linhagens de carcinoma colorretal (HCT-116) e carcinoma de próstata (PC3), após 72 horas de tratamento.

Diante dos resultados acima descritos, foi realizada uma análise temporal da atividade antiproliferativa do extrato frente a estas linhagens, utilizando concentrações seriadas, após 24 e 48 horas de tratamento. Os valores de CI₅₀ foram determinados pelo teste do MTT e estão exibidos na tabela 6.

Tabela 6- Potencial antiproliferativo do M1 frente às linhagens HCT-116 e PC3 após 24, 48 e 72 horas de incubação determinado pelo método MTT.

Linhagem	CI ₅₀ (Intervalo) µg/mL		
	24 H	48 H	72 H
HCT-116	8,74	8,46	7,15

	(6,84- 11,18)	(6,45 -11,09)	(6,27 -8,16)
PC 3	33,51	23,98	6,00
	(28,66 – 39,17)	(22,26 – 25,83)	(5,71 – 6,31)
L 929	31,45	---	25,58
	(27,43-36,07)		(21,78 – 30,05)

Os valores de CI_{50} estão apresentados em $\mu\text{g/mL}$ e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata.

A M1 apresentou efeito citotóxico nas linhagens tumorais testadas após tratamento por 24 horas até a concentração de 33,51 $\mu\text{g/mL}$, a maior encontrada nesse período, permitindo calcular os valores de CI_{50} . Nas células da linhagem HCT-116, o extrato testado apresentou efeito citotóxico de maneira tempo-independente, com valores de CI_{50} de 8,74 $\mu\text{g/mL}$, após 24 horas de tratamento e 7,15 $\mu\text{g/mL}$, para um tempo de 72 horas, enquanto que nas células da linhagem PC3, avaliando o efeito durante o mesmo tempo de incubação, mostrou um efeito citotóxico após o tempo de 24 horas com valores de CI_{50} 33,51 8,74 $\mu\text{g/mL}$ até 6,00 8,74 $\mu\text{g/mL}$ após um tempo de 72 horas mostrando um comportamento tempo-dependente (Tabela 5).

Além dessa análise foi determinado o índice de seletividade, e se o resultado for >2 significa apresentar seletividade para células tumorais. Os resultados estão apresentados na tabela 7.

Tabela 7- Índice de seletividade (IS) da M1

Linhagem	IS*
HCT-116	3,57
PC3	4,26
MCF-7	1,26
SNB-19	0,76
NCIH-460	1,71

* (IS=CI₅₀ linhagem não tumora/CI₅₀ linhagem tumoral)

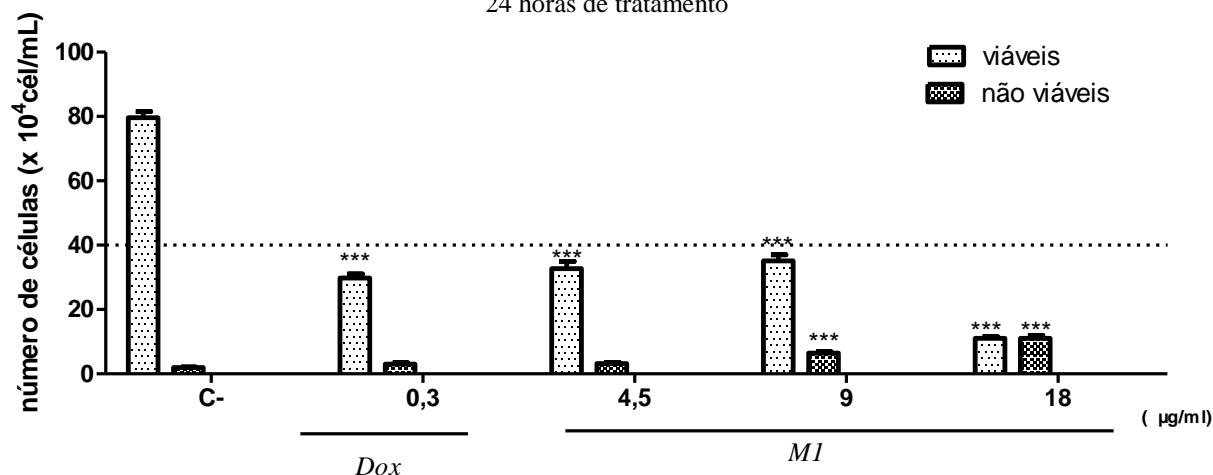
Os resultados mostraram que a M1 é mais seletiva a linhagem HCT-116, PC3, (IS=3,57 e 4,26, respetivamente) com um tempo de tratamento de 72 horas, quando comparados frente as outras linhagens tumorais.

4.3 Teste de viabilidade celular em HCT-116 após o tratamento com o TD (M1) durante 24 horas pelo método de exclusão do corante azul de Tripan.

O teste de viabilidade celular por exclusão do azul de Tripan foi realizado para quantificar individualmente células viáveis e não viáveis após 24 horas de incubação com o TD (Figura 15). As concentrações de 4,5; 9,00 e 18,00 µg/mL foram utilizadas no ensaio baseadas no valor de CI₅₀ obtido pelo teste do MTT após 24 horas de incubação na linhagem HCT-116.

O resultado deste teste mostrou uma redução estatisticamente significativa (p<0,0001) do número de células viáveis em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle. Além disso todas as concentrações testadas foram capazes de reduzir em aproximadamente 50% o número de células viáveis. Esses dados sugerem que possivelmente o extrato da M1 atue de forma citotóxica, inibindo da proliferação celular frente às células HCT-116.

Figura 15- Avaliação da viabilidade celular na linhagem HCT-116, após o tratamento com M1 durante 24 horas de tratamento

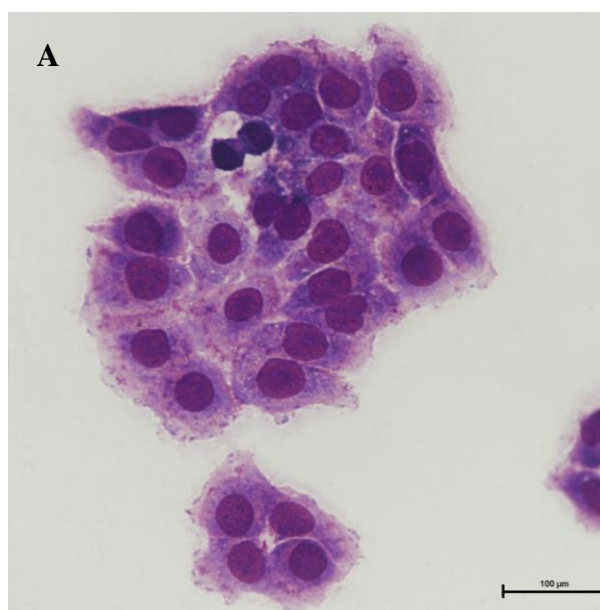


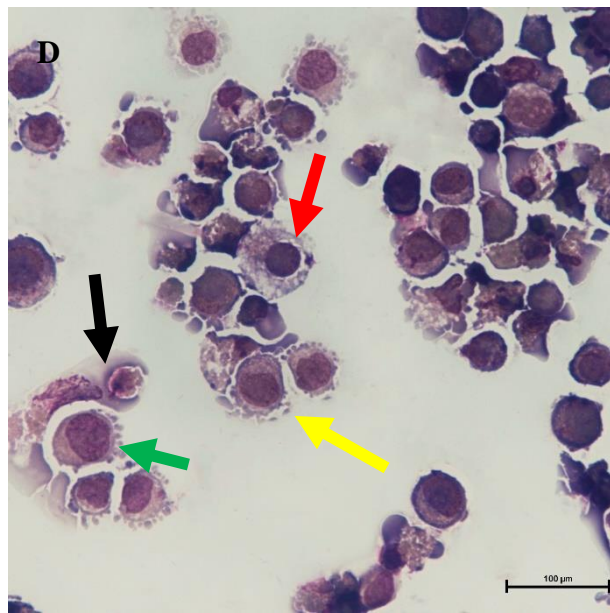
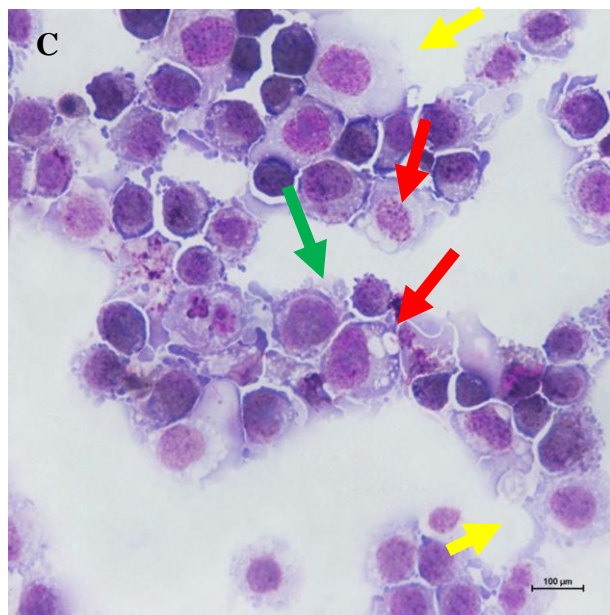
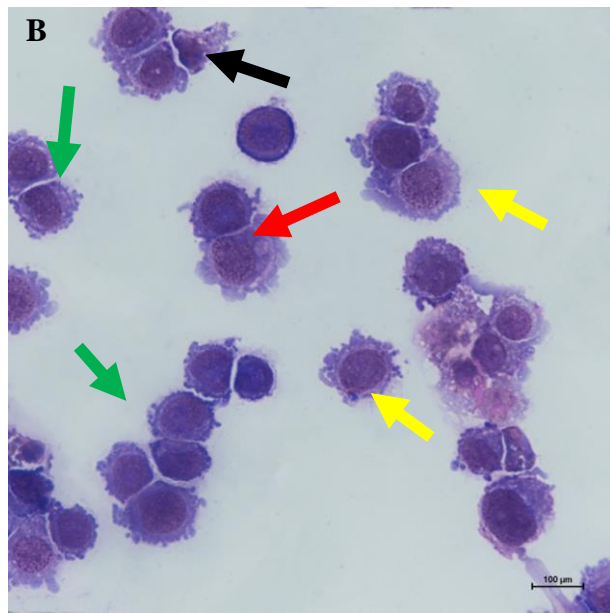
Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de no mínimo três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo, ** $p < 0,05$, *** < 0.0001 comparado com o controle negativo por ANOVA.

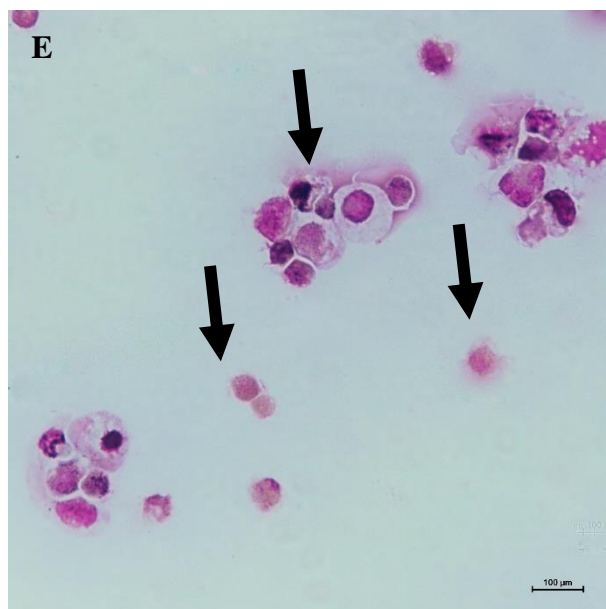
4.4 Avaliação das alterações morfológicas da linhagem HCT 116 após o tratamento com a M1

As células HCT-116 são caracterizadas pela sua morfologia poligonal, com citoplasma visível e de forma irregular, núcleo definido. Após os dados do citotoxicidade, foi realizado a análise morfologia das células tratadas com o TD foi realizada por microscopia optica e por meio do Kit panótico rápido (Figura 16).

Figura 16- Imagens da morfologia das células HCT 116 após o tratamento de 24 horas com a M1, coradas com panótico rápido. Células visualizadas por microscópio optico na objetiva de 20x.







(A e B) controle negativo e a Doxorrubicina 0,3 μ g/ml como controle positivo, respectivamente. (C, D e E) células de HCT 116 tratadas com a M1 nas concentrações de 4,5; 9 e 18 μ g/mL. Respectivamente. Células com presença de "Blebs" estão representadas pelas setas verdes; células com aumento do tamanho vacúolos estão representadas pelas setas vermelhas; células com aumento do citoplasma estão representadas pelas setas amarela e células em necrose estão representadas com setas pretas.

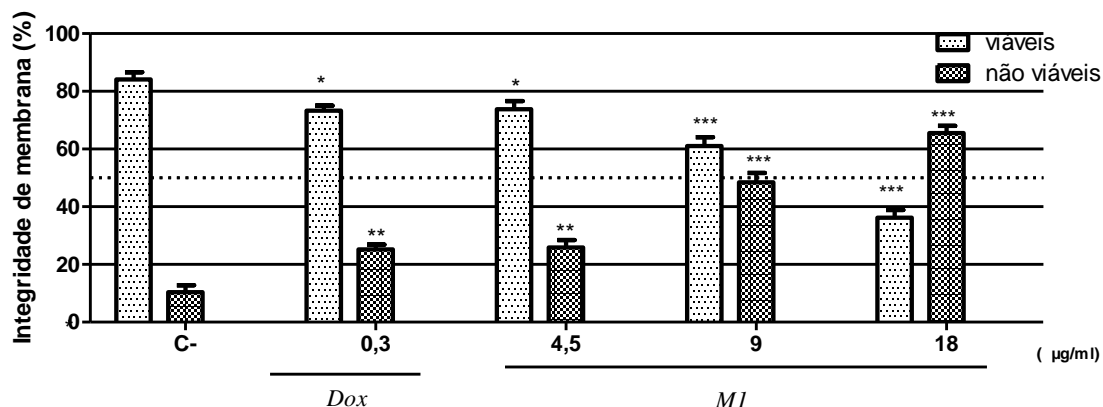
Na análise das imagens foi possível visualizar um aumento do número de vacúolos, e uma mudança na morfologia da célula a partir da primeira concentração testada do extrato (4,5 μ g/mL) e quando comparamos com a maior concentração de 18 μ g/mL essa diferença morfológica celular se apresenta mais acentuada. Outro fato visualizado é que desde a menor concentração se observou a presença de *blebs* o que pode indicar o início de um processo de apoptose, além disso foi visualizado uma diminuição da densidade celular quando comparado ao controle. A partir da concentração de 9,00 μ g/ml (D) existe uma presença de células necróticas assinaladas pelas setas pretas.

4.5 Estudo de mecanismo de morte de TD (M1)

4.5.1 Avaliações da integridade da membrana e da densidade das células de HCT-116 tratadas com TD (M1)

Na análise da integridade de membrana observou-se uma resposta ao efeito da M1 sobre a integridade de membrana (Figura 17) e densidade das células HCT-116 (Figura 18), determinada por citometria de fluxo.

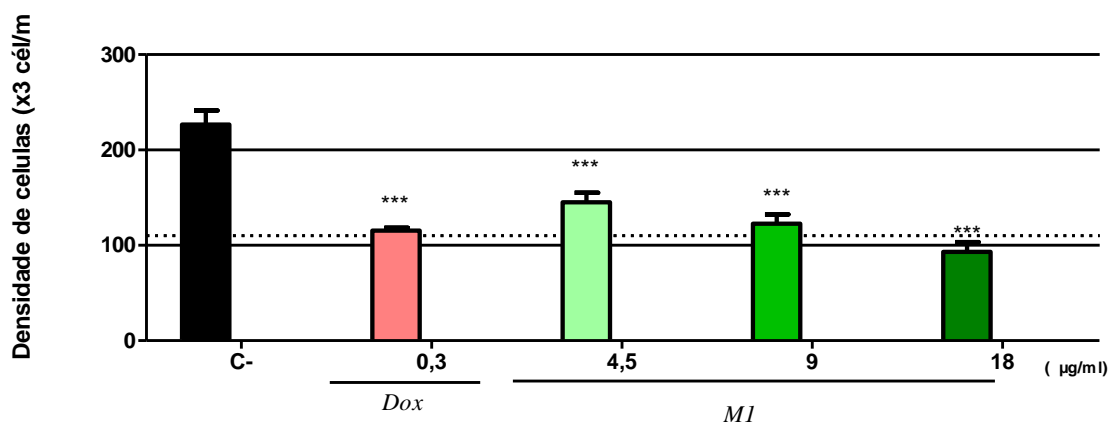
Figura 17- Análise da integridade de membrana das células HCT 116 após o tratamento com TD, após incubação de 24 horas.



Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de no mínimo três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo, ** $p < 0,05$, *** < 0.0001 comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido do teste Dunnett's e Tukey's Multiple Comparison.

Como observado na figura 17, foram encontradas alterações estatisticamente significativas na integridade da membrana das células tratadas com TD (M1), sendo possível observar que a amostra teste causou danos na membrana das células. Ao avaliar a densidade celular (Figura 18), foi observado uma diminuição estatisticamente significativa (< 0.0001) do número de células nas diferentes concentrações testadas quando comparado com o controle, sugerindo que o TD (M1) proporciona uma inibição da proliferação de células HCT-116. A doxorubicina (Dox) alterou a integridade de membrana das células de forma significativa, além de reduzir a densidade de células.

Figura 18- Análise da densidade celular das células HCT 116 após o tratamento com o TD, após incubação de 24 horas.

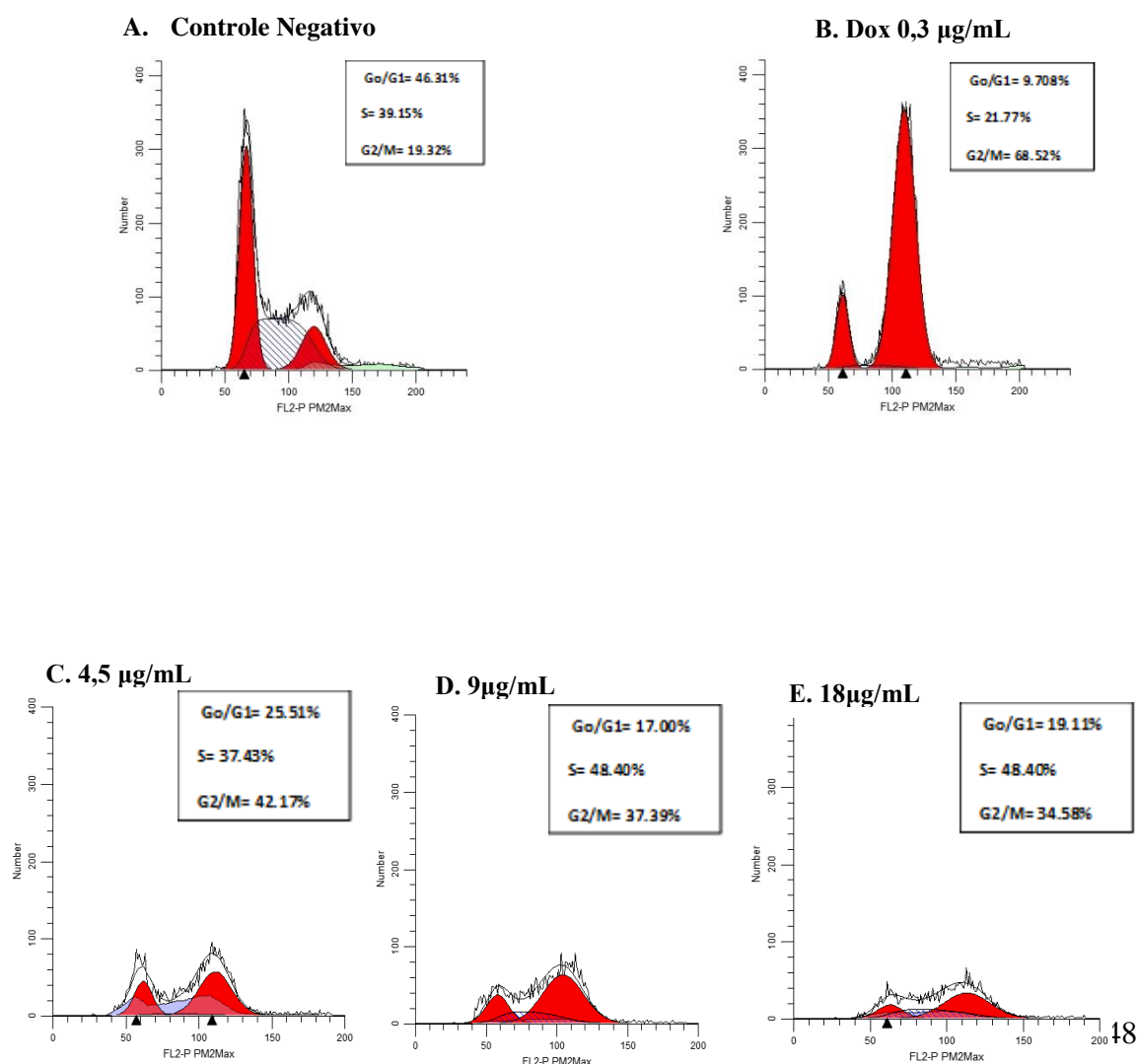


Os dados estão apresentados como os valores da média \pm E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.05$, *** < 0.0001 comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido do teste Dunnett's e Tukey's Multiple Comparison.

4.5.2 Avaliações do ciclo celular das células HCT-116 tratadas com M1

Na análise do perfil ciclo celular das células HCT-116 tratadas com M1 por 24 horas, foi possível verificar que a M1 interferiu no ciclo celular das células tratadas. Quando comparadas ao controle negativo. Seu comportamento foi parecido ao perfil promovido, neste experimento, pela doxorubicina (Dox) que além, de diminuir o número de células na fase G₀/G₁ e aumento da fase G₂/M, de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (Figura 19 e 20).

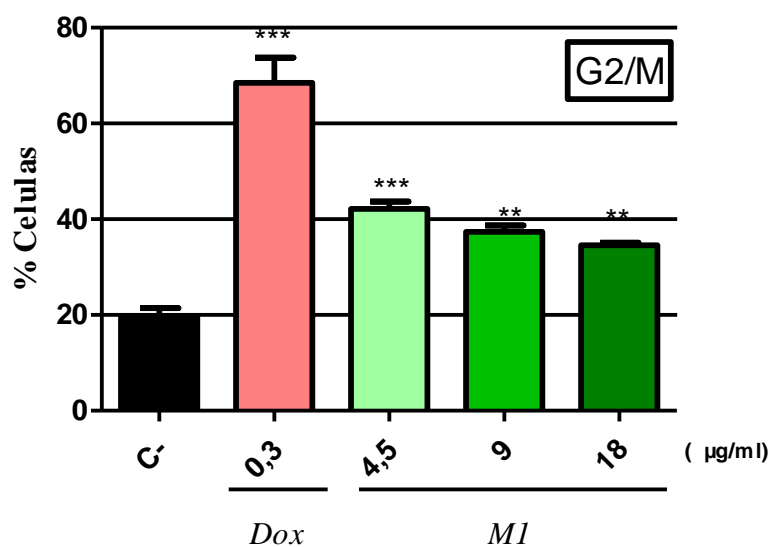
Figura 19- Avaliação do perfil do ciclo celular por citometria de fluxo nas células HCT 116 após o tratamento de 24 horas com TD.



Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o programa ModFit LT. Ilustração de uma réplica representativa de cada experimento.

Avaliação do ciclo celular nas células de HCT 116 após o tratamento de 24 horas com o TD nas concentrações testadas (4,5; 9,00 e 18,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$); seguiram o padrão do controle positivo utilizando a Doxorrubicina 0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como controle positivo, podendo ser observado na figura 20, que o extrato promove uma parada do ciclo celular em G2/M, quando comparada com o controle negativo.

Figura 20- Avaliação do ciclo celular nas células de HCT 116 após o tratamento de 24 horas com TD.



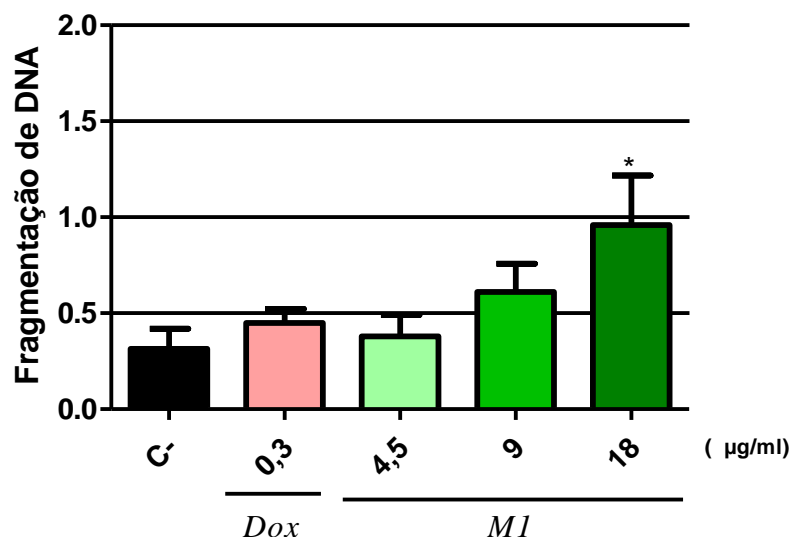
Os dados estão apresentados como os valores da média \pm E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata * $p < 0,05$, ** $p < 0,05$, *** < 0.0001 comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido do teste Dunnett's e Tukey's Multiple Comparison.

4.5.3 Avaliações do padrão de morte celular

Os resultados são apresentados na figura 21, mostraram que a M1 induziu uma fragmentação do DNA de forma significativa ($p < 0,05$) somente na concentração de 18,00

μ /mL quando comparado com o controle negativo, sugerindo que M1 pode causar dano ao DNA em concentrações maiores.

Figura 21- Efeito da M1 sobre a fragmentação de DNA, por citometria de fluxo, após 24 horas de tratamento.

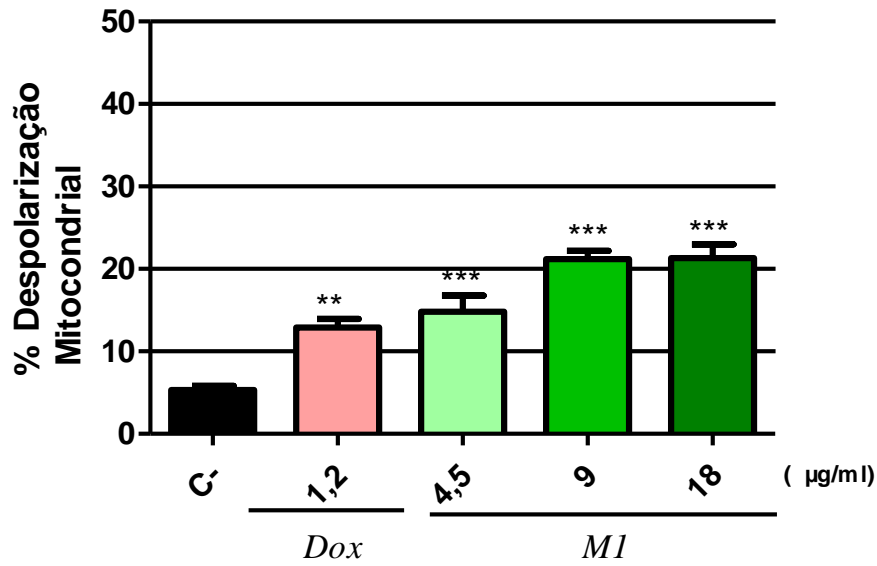


Os dados estão apresentados como valores de média \pm E.P.M., obtidos por 3 experimentos realizados em quintuplicada * $p < 0.05$ comparado com o controle, por ANOVA seguido do teste Dunnett's e Tukey's Multiple Comparison.

4.5.4 Determinação do potencial transmembrânico da mitocôndria

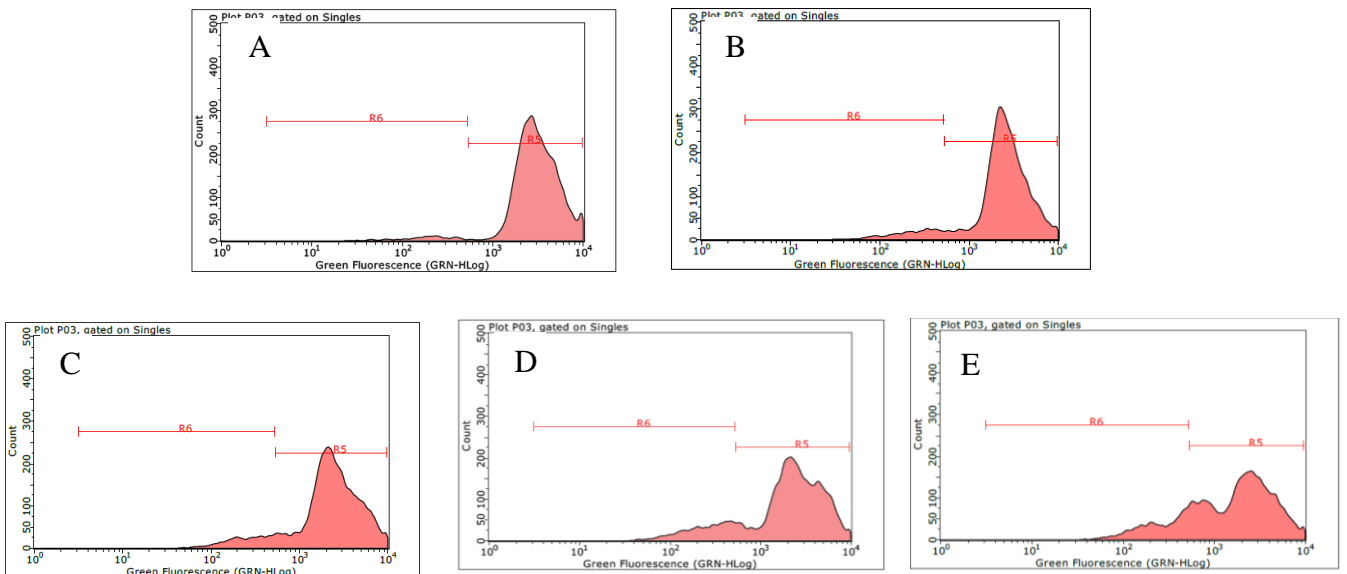
Para avaliar o papel da mitocôndria no tipo de morte de apoptose induzida pela M1 foi conferido se o extrato promove alterações no potencial transmembrânico da mitocôndria. Foi utilizado como controle positivo a doxorubicina 1,2 μ g/mL e utilizando o TD (M1) nas concentrações de 4,5; 9,00 e 18,00 μ g/mL. Com esse experimento foi observado despolarização mitocondrial nas células HCT-116 tratadas com M1 e a Doxorubicina (Figura 22 e 23), mostrando uma diferença significativa ($P < 0,0001$) quando comparado ao controle negativo.

Figura 22- Avaliação do potencial transmembrânico da mitocôndria das células HCT 116 após o tratamento com a M1 durante 24 horas.



Os dados estão apresentados como os valores da média \pm E.P.M., obtidos por dos experimentos realizados em quintuplicada. * $p < 0.05$, ** $p < 0,05$, *** < 0.0001 comparado com o controle negativo por ANOVA, seguido do teste Dunnett's e Tukey's Multiple Comparison.

Figura 23- Avaliação do potencial transmembrânico da mitocôndria das células HCT 116 após o tratamento com a M1 durante 24 horas.

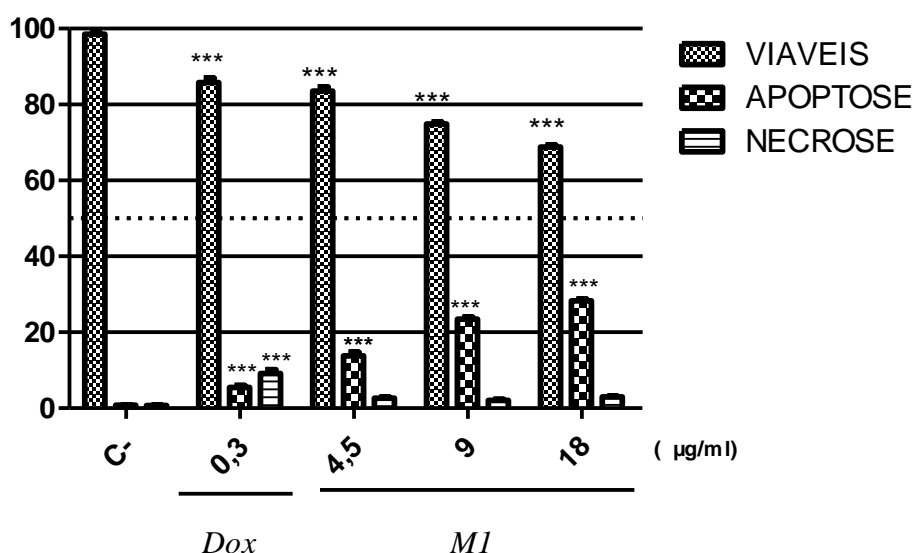


A. Controle negativo, B. controle positivo (Dox), C.D. e E. 4,5; 9,00 e 18,00 µg/M1 respectivamente. Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o programa GUAVA IN CITY. Ilustração de uma réplica representativa de cada experimento.

4.5.5 Coloração diferencial por Laranja Acridina/ Brometo de Etídio

Para confirmar a atividade antiproliferativa de TD (M1) relaciona-se com a indução de apoptose ou necrose, a análise morfológica das células HCT 116 tratadas com o extrato de TD foi investigada utilizando a coloração diferencial de acridina laranja-brometo de etídio por microscopia de fluorescência. O percentual de células viáveis, apoptóticas e necróticas foram observadas em comparação do grupo controle negativo, atingido 98.5% das células viáveis. Como nos demais testes o extrato de TD causou alterações morfológicas significativas em todas as concentrações testadas nas células HCT 116 quando comparadas com o controle negativo. Também foi observado uma diminuição da porcentagem de células viáveis e que a partir da primeira concentração de 4,5 µg/mL teve um aumento de um 13,8% das células apoptóticas, enquanto que para as concentrações de 9, 18 µg/mL o aumento foi de 23,43% e 28,33% respectivamente. No entanto, na concentração de 18 µg/mL apresentou um discreto aumento de 2,96% de células em processo de necrose. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo, causou 5,4% de apoptose e um 9,10 % de necrose, provocando também uma diminuição das células viáveis (Figura 24).

Figura 24- Avaliação de indução de apoptose e necrose pelo método de coloração diferencial por Acridina laranja/ Brometo de Etídio.



Efeito do extrato de TD na viabilidade de células HCT 116 coradas com Acridina laranja/brometo de Etídio determinado por microscopia de fluorescência após o tratamento de 24 horas de incubação. Doxorrubicina 1.2 µg/mL foi utilizada como controle positivo (Dox). Os dados estão apresentados como

valores de média \pm E.P.M., obtidos por 3 experimentos realizados em quintuplicada * $p < 0.05$ comparado com o controle, por ANOVA seguido do teste Dunnett's e Comparison.

4.6 Avaliação dos efeitos pro-oxidativos da M1 na linhagem de HCT-116.

4.6.1 Atividade citotóxica in vitro da M1 frente a Linhagem HCT-116, utilizando o N-Acetil-L-Cisteína (NAC).

Para avaliar o perfil de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi utilizado o NAC 4 μ M como antioxidante de escolha, durante 2 horas antes e depois de testar o extrato da M1 durante 24, 48 e 72 horas (Tabela 8).

Tabela 8- Potencial antiproliferativa da M1 frente a HCT-116 após 24, 48 e 72 horas de incubação determinado pelo método MTT, antes e depois de 2 horas de tratamento com NAC.

Amostra	IC ₅₀ (INTERVALO) μ g/ml		
	24 H	48 H	72 H
M1	8,74 (6,83 – 11,18)	8,46 (6,452 -11,09)	7,15 (6,26-8,17)
M1 + NAC (2 HORAS ANTES)	44,91 (39,93 – 50,52)	18,12 (16,18 -20,28)	16,11 (14,47- 17,94)
M1+NAC (2 HORAS DEPOIS)	>100	39,36 (36,16 – 42,84)	21,87 (19,51 -24,51)

Os valores de IC₅₀ estão apresentados em μ g/mL e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata.

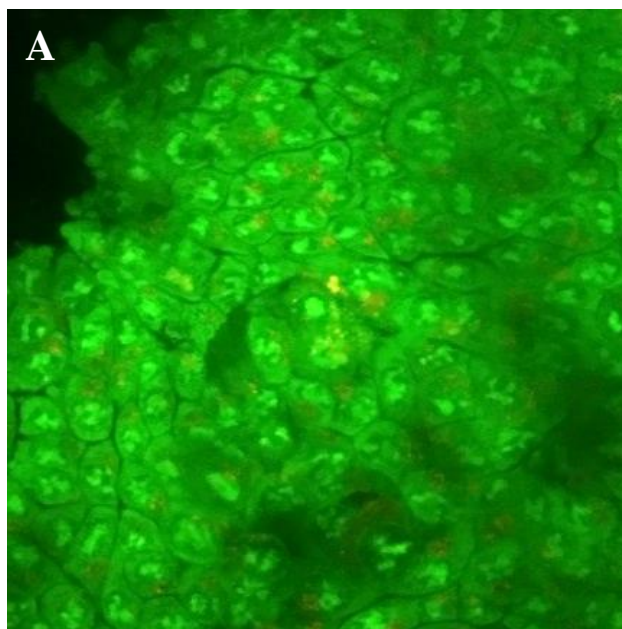
Com os resultados obtidos na tabela 8, se observa que o potencial antiproliferativa da M1 diminuiu a partir de um tempo de incubação de 24 horas passando de uma concentração de 8,74 μ g/ml para uma de 44,91 μ g/ml quando a placa foi pré tratada com o NAC pois, a substância não promove atividade antiproliferativa na presença do NAC (>100 μ g/ml). Para um tempo de incubação de 48 horas a concentração passa de 8,46 μ g/ml para uma concentração de 18,12 μ g/ml quando a placa é pre-tratada com NAC a IC₅₀ aumenta para 39,36 μ g/ml na presença do NAC. No tempo de 72 h passa de uma concentração de 7,15 μ g/ml para uma concentração de 16,11 μ g/ml e quando está na presença do NAC aumenta para 21,87 μ g/ml. Com os resultados mostrados acima na

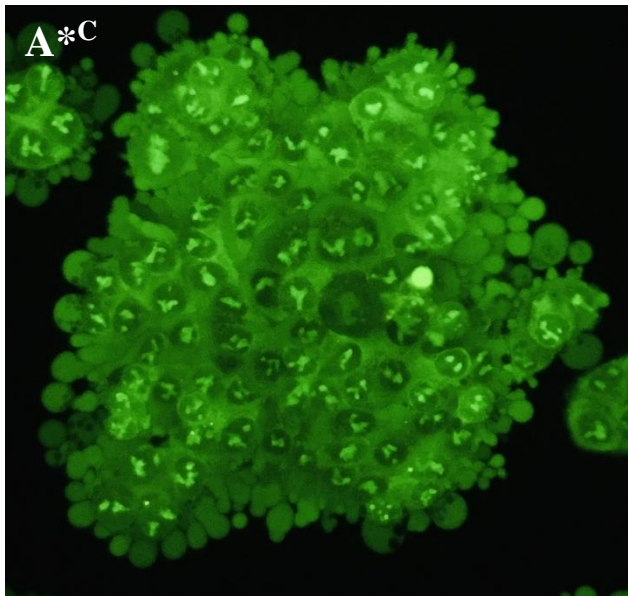
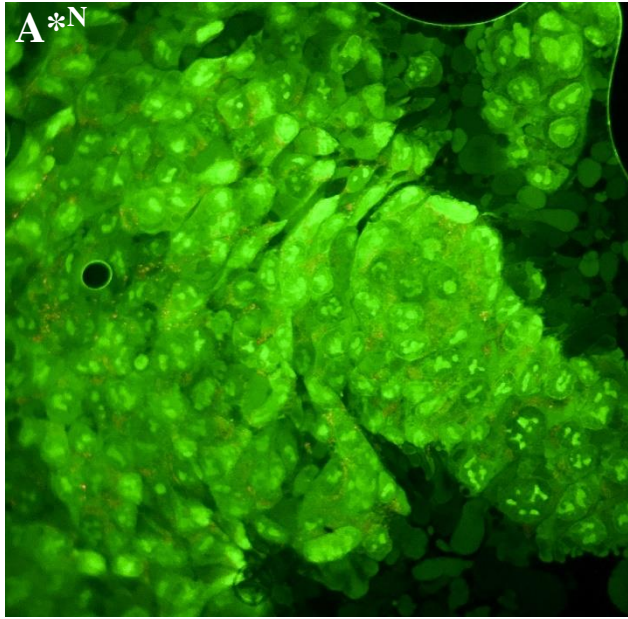
tabela 8, quando a placa é pre-tratada com o NAC 2 horas antes, e 2 horas depois, apresenta uma diferença significativa nas concentrações de IC₅₀ obtidas. A M1 apresentou um perfil de concentração tempo-independente na linhagem HCT-116, porém o NAC reverteu o efeito antiproliferativo da M1, sugerindo que a M1 é dependente da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) para ter efeito antiproliferativo.

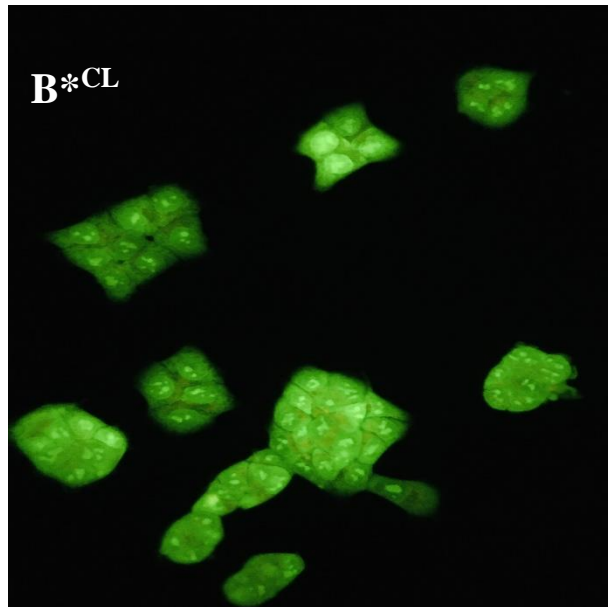
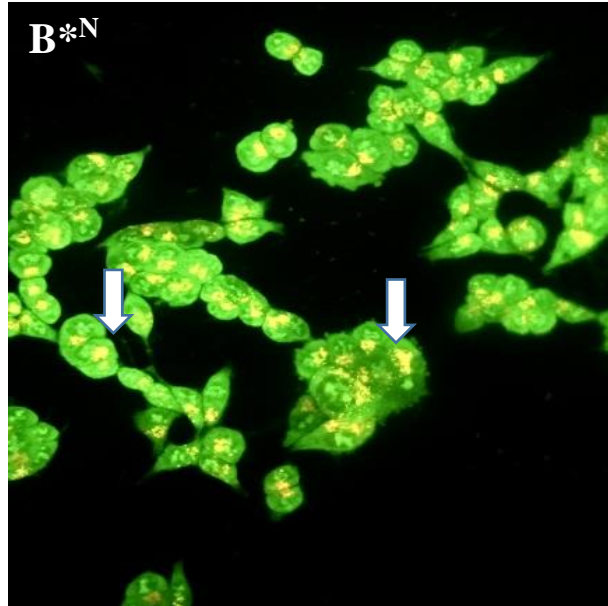
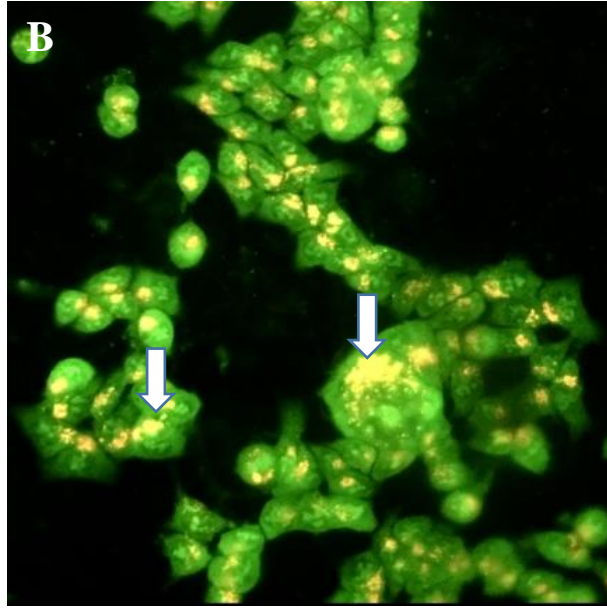
4.6.2 Análise da indução de produção de AVOs em células de HCT-116 após o tratamento com a M1 durante 24 horas.

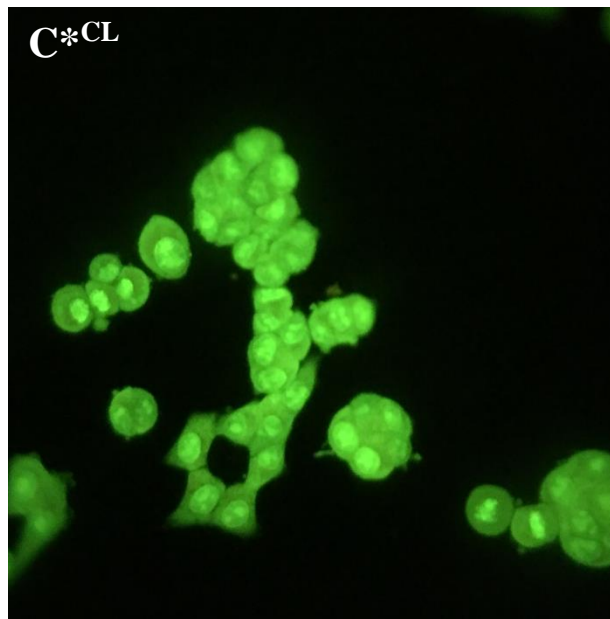
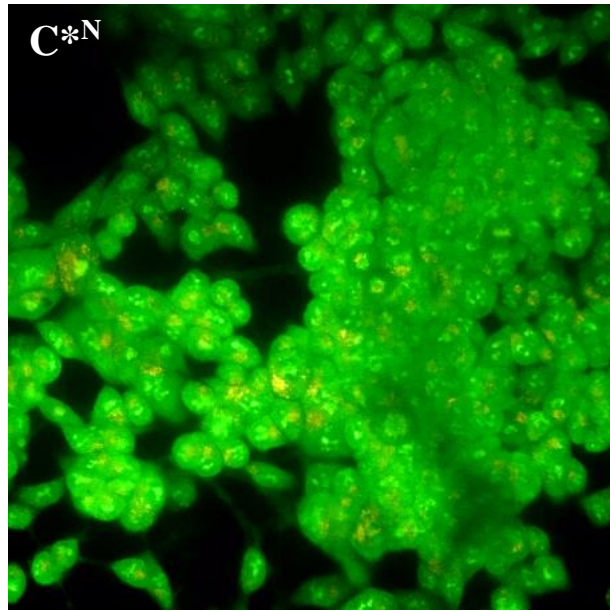
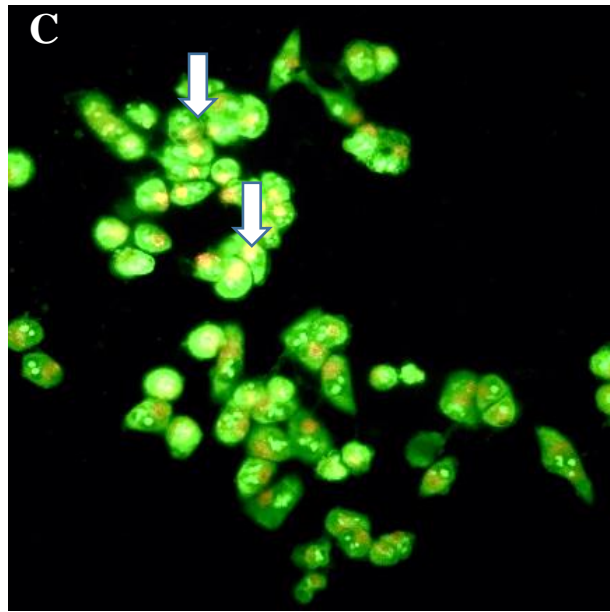
Por meio de análise visual foi possível verificar o aumento da fluorescência vermelha nas células que foram tratadas com a M1 na concentração de 4,5 µg/ml e na concentração de 9,00 µg/ml pode se observar a diminuição de células viáveis, quando comparado com o controle negativo, e na presença do NAC não foi observado essa redução de células, relacionando-se os resultados que as células de HCT-116 após o tratamento com o extrato, ocorre uma indução de um processo de estresse celular. (Figura 25).

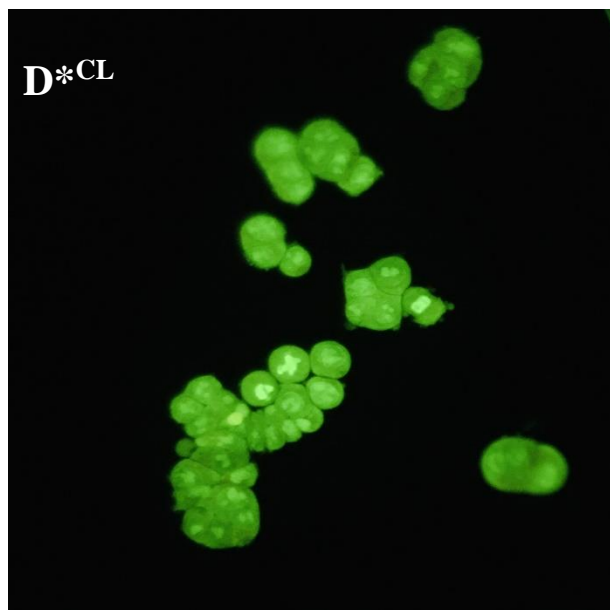
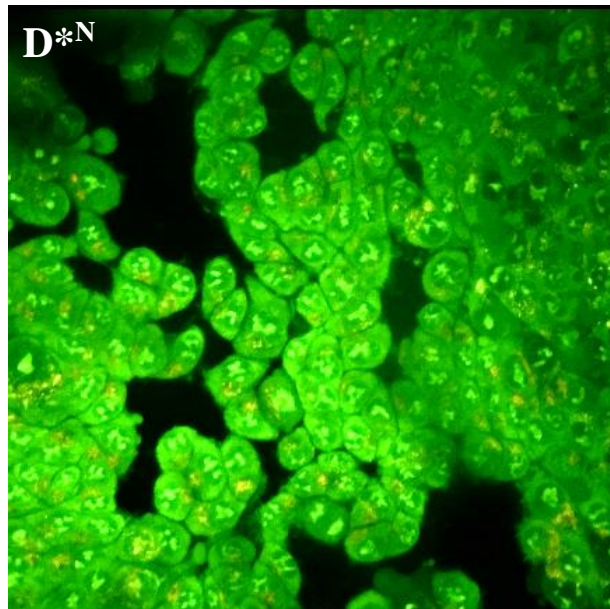
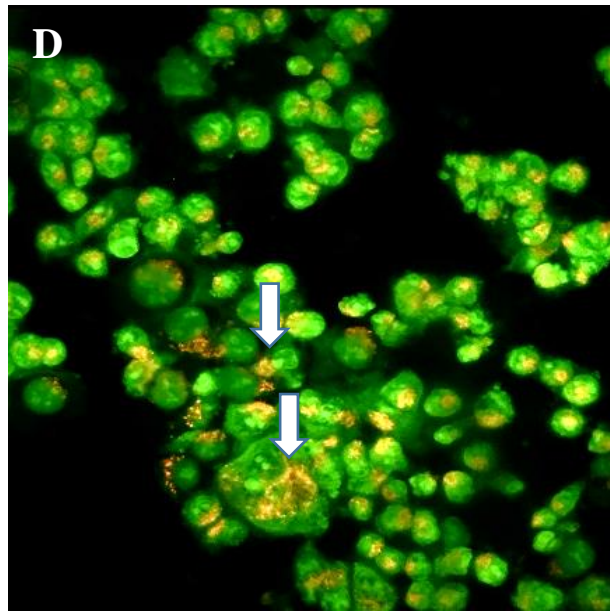
Figura 25- Avaliação da presença de AVOs por microscopia de fluorescência de células HCT-116, após o tratamento de 24 horas com M1, no aumento de 40 x.











A) controle negativo, B) controle positivo Doxorubicina C) M1 4,5 µg/ml D) 9,00 µg/ml .
*N=NAC 4 µM, *CL=Cloreto de amônio 10 µM. As fotos apresentadas foram obtidas utilizando câmera através no microscópio de fluorescência. Ilustração de uma réplica representativa de três experimentos. Setas brancas representam AVOS.

4.7 Dano ao DNA

4.7.1 Teste cometa em condições alcalinas e neutras

Foi avaliado de forma indireta se a M1 promove dano ao DNA, através da formação de EROs. Para conferir a ocorrência de lesões no DNA, o teste cometa foi realizado nas células HCT-116 em condições alcalinas, após o tratamento de 24 horas. Foi observado que M1 gerou dano ao DNA das células HCT-116 (74,5). Além disso, foi utilizada a enzima hOGG1 que reconhece lesões de DNA por EROs, especificamente danos na base nitrogenada Guanina, quando sofrerem oxidação e pode-se observar que dentro desse dano provocado pela M1, existe um dano nas guaninas (135,55). Com isso também foi utilizado o Bromoheptano (BH), que reduz as concentrações intracelulares de glutathiona, e observou-se que na presença da M1 o dano ao DNA é mais pronunciado (192,50), porém este efeito foi totalmente revertido quando as células foram tratadas com NAC 4µM, efeitos que foram comparados ao controle negativo (Tabela 9).

O teste cometa em condições neutras, foi realizado para avaliar lesões mais severas do DNA, que acontece quando ocorre a quebra de fita dupla no DNA. Como foi observado anteriormente a M1 induzi lesões no DNA, mas a lesão não é específica, então como estes resultados se observa que dentro das lesões está a quebra de fita dupla (18,00) no DNA, e esta é aumentado quando existe uma privação de glutathion intracelular (54,16), porém os efeitos foram reduzidos pelo NAC, tanto para o controle positivo e a M1 sugerindo que, provavelmente o dano no DNA ocorre através de um dano oxidativo dependente de EROs (Tabela 9).

Tabela 9- Indução de lesões do DNA, após o tratamento de 24 horas

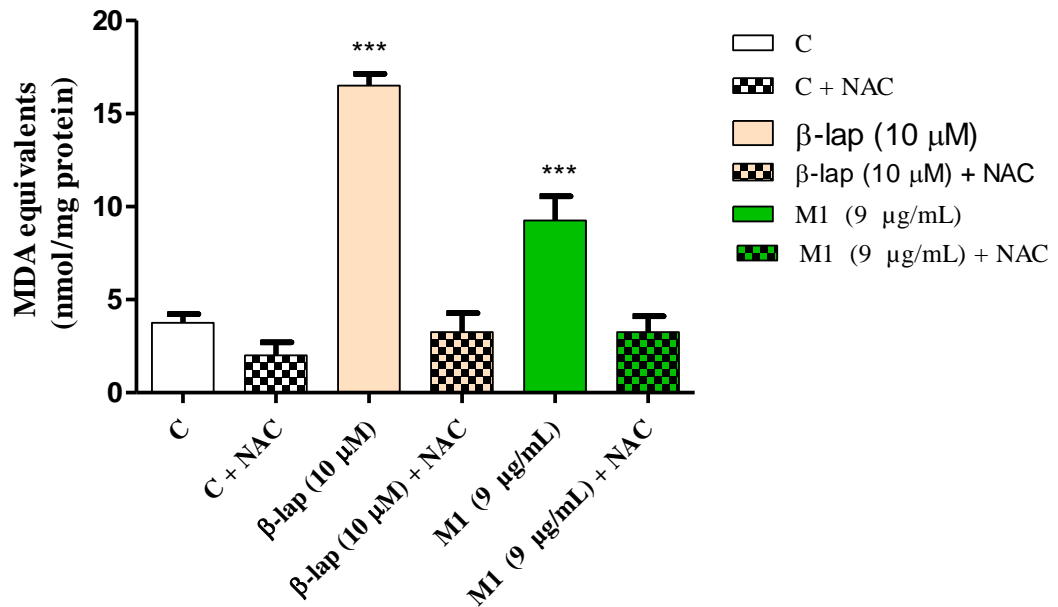
Amostra	Concentração	Condições de pH.	
		Índice de lesões ao DNA \pm E.P.M	
		pH>13	pH 8.5
Controle negativo	---	5,00 \pm 2,09	2,16 \pm 1,60
Controle negativo ^H		6,33 \pm 1,75	---
Controle negativo ^N		7,00 \pm 2,60	5,33 \pm 3,15
B-lapachona	10 μ M	108,00 \pm 17,65*	28,25 \pm 6,70*
B-lapachona ^N		3,75 \pm 2,06	5,00 \pm 2,70
B-lapachona ^B		181,75 \pm 8,95*	75,25 \pm 9,81*
M1	9,00 μ g/mL	74,5 \pm 7,24*	18,00 \pm 5,53*
M1 ^N		12,67 \pm 2,06	4,50 \pm 2,88
M1 ^B		192,50 \pm 18,04*	54,16 \pm 7,46*
M1 ^H		135,35 \pm 11,75*	---

^B BH=50 μ M, ^H HOGG1=1:500, ^N NAC 4 μ M *p< 0,0001 comparado com o controle os valores de índice de lesões foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata

4.7.2 Avaliação da peroxidação pelo teste TBARS

Para medir se existem um processo oxidativo por EROs, é possível medir um dos produtos do resultado do processo de peroxidação de lipídica primária e secundária pelas condições hidrolíticas da reação. O teste mede o malondialdeído (MDA) presente na amostra. E observou-se um aumento significativo das concentrações do MDA (9,25 nmol/mg proteína) após o tratamento com a M1 na concentração de 9,00 μ g/mL, quando comparado ao controle negativo, efeito observado também para a B-lapachona (16,50 nmol/mg proteína), sugerindo que existe um processo de peroxidação de lipídios como resposta ao estresse oxidativo provado por EROs, já que os efeitos da M1 e do controle positivo são revertidos na presença do NAC (Figura 26).

Figura 26- Avaliação de MDA no tratamento com a M1 nas células HCT-116, após 24 horas de incubação.

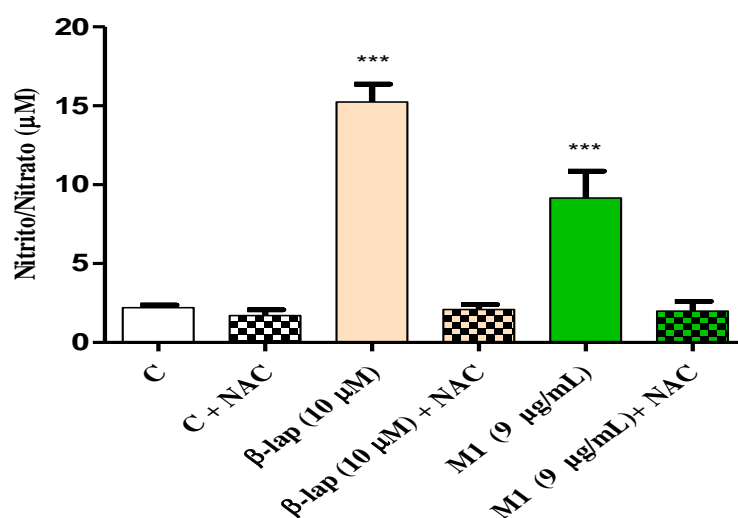


Os dados estão apresentados como valores de média \pm E.P.M., obtidos por 3 experimentos realizados em quintuplicada * $p < 0.05$ comparado com o controle, por ANOVA seguido do teste Dunnett's e Comparison.

4.7.3 Avaliação da produção de Nitritos/Nitratos

Quando existe a peroxidação de lipídios o NO está envolvido na sinalização, e outras espécies, que provoca danos oxidativos induzidos por EROs. O NO é medido em concentrações de subproduto de nitratos e nitritos. Nos resultados observou-se que existem um aumento significativo desses dos compostos quando comparadas ao controle negativo, tanto para a M1 e o controle positivo B-Lapachona e não se observou diferença significativa quando foram tratados com NAC, sugerindo que existem um processo de estresse oxidativo por EROs, induzido pela M1 (Figura 27).

Figura 27- Avaliação da produção Nitritos/Nitrato após o tratamento de 24 horas com a M1.



Os dados estão apresentados como valores de média \pm E.P.M., obtidos por 3 experimentos realizados em quintuplicada * $p < 0.05$ comparado com o controle, por ANOVA seguido do teste Dunnett's e Comparison.

4.8 Determinação de GSH e GSSH

Os níveis intracelulares de glutatona reduzida e oxidada nas células HCT-116, foi avaliado após um tempo de incubação de 24 horas e confirmar se os níveis de EROs estão relacionados a depleção de glutatona nas células tratadas. Com isso, a tabela 6 mostra que os níveis de glutatona reduzida foram diminuídos apresentando, assim, diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle negativo. Com isso, os níveis de glutatona oxidada aumentaram, após o tratamento com TD (9,00 µg/mL) e Doxorrubicina (controle positivo 0,3 µg/mL). Além disso, houve diminuição da razão GSH/GSSH quando comparado ao controle negativo (Tabela 10).

Tabela 10- Níveis intracelulares da glutathiona reduzida e oxidada em células de HCT-116 após 24 horas de tratamento.

Amostra	Concentração µg/mL	Tióis intracelulares (µg/mg proteína)		
		GSH 24 H	GSSH 24 H	GSH/GSSH
Controle negativo	-	2,74± 0,04	0,95± 0,032	3,70±0,025
Doxorrubicina	0,30	2,11± 0,072*	1,52± 0,047*	3,63±0,091
M1	9,00	1,28± 0,035*	2,06± 0,127*	3,34±0,035*

*p< 0.0001 comparado com o controle, Os valores de tióis intracelulares apresentados em µg/mg proteína e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata.

5. DISCUSSÃO

O potencial uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças é conhecido em todas as sociedades, e tem sido aplicado na medicina tradicional. Com a ajuda do desenvolvimento de tecnologias modernas, nos últimos anos, está permitindo o isolamento dos elementos ativos de plantas com diversas atividades farmacológicas. No ano de 1950 e 1970, foram introduzidas no mercado farmacêutico dos Estados Unidos aproximadamente 100 novos fármacos antineoplásicos derivados de plantas, como a Deserpídina, Rescinamina, Reserpina, Vinblastina e Vincristina. De 1971 ao ano 1990, apareceram no mercado mundial Etopósidos, Tenipósido e Glicósidos. De 1991 a 1995, foram introduzidos o Pacitaxel, o Topotecan, e o Irinotecan (CRAGG; NEWMAN; SNADER, 1997).

A procura de novos compostos com atividade antineoplásica estão sendo investigados, para obter compostos mais seletivos a células tumorais e assim, diminuir os efeitos colaterais provocados pelos quimioterápicos atualmente utilizados. Com isso tem ocorrido estudos em diferentes espécies de plantas como a família Asteraceae que apresentam efeitos biológicos antitumorais a partir dos extratos de etanólicos de diferentes espécies (*Arctium lappa*, *Artemisia absinthium*, *Calendula officinalis*, *Centaurea cyanus*, *Tanacetum vulgare* e *Tragopogon pratensis*) exibindo propriedades citotóxicas *in vitro* e induzindo a morte celular (MAGDALENA WEGIERA, 2012).

Dentro dessa visão, estudos vêm sendo realizados com *Tithonia diversifolia* (TD) pois esta espécie tem mostrado que extratos produzidos da parte aérea da planta possui vários metabolitos secundários que têm atividade antiproliferativa significativa (BOHLMANN et al., 1980; GU et al., 2002; HE et al., 2010).

No presente trabalho foi avaliado o potencial antiproliferativo do extrato etanólico das folhas de *Tithonia diversifolia* (TD), em diferentes linhagens tumorais por meio do método de MTT, além disso, também foi investigado o possível mecanismo de morte *in vitro* em células de câncer colorretal HCT-116.

O resultado obtido, no ensaio de citotoxicidade, foi que para as linhagens testadas com extrato etanólico apresentaram CI_{50} que variaram de 6,006 a 35,39 $\mu\text{g/ml}$, após um tempo de incubação de 72 horas. Este efeito também foi observado por Gu e colaboradores (2002), no primeiro trabalho publicado sobre o TD, que realizou o estudo utilizando o fracionamento guiado do extrato de acetato de etila das partes aéreas em células de câncer de cólon humano (Col2) e em leucemia mielocítica humana (HL-60) por meio do teste colorimétrico de Sulforodamina B. Nesse estudo, foi avaliado o seu potencial como agentes quimiopreventivos do câncer, além da atividade antiproliferativa e de sua indução de diferenciação celular. Hua Liao e colaboradores (2011), também, relataram atividade citotóxica contra o Hepatoma humano Hep-G2 no ensaio realizado ao extrato metanólico de TD. Chiang e colaboradores (2004), avaliaram pelo método colorimétrico XTT o extrato de cinco plantas medicinais tradicionalmente usadas em Taiwan contra células leucêmicas *in vitro* (K562, L1210, P3HR1, Raji e U937), e em seus resultados a TD apresentou valores de IC_{50} significativos contra as outras quatro linhagens leucêmica. Posteriormente no fracionamento guiado a citotoxicidade do extrato MetTOH a 80% de *Tithonia diversifolia* apresentou atividade citotóxica contra células de leucemia HL-60.

Neste trabalho foi avaliado o efeito temporal que do extrato de TD observou-se que este exibiu diferentes comportamentos temporais nas linhagens celulares testadas, apresentando menores CI_{50} para as linhagens de câncer de colorretal e próstata. Porém, para a linhagem de PC3 mostrou um comportamento tempo dependente, enquanto esse efeito não foi observado para a linhagem HCT-116 (tempo independente). Essa variação pode estar relacionada a diferentes fatores como por exemplo o tempo de replicação da linhagem celular, o plaqueamento. Este efeito também foi observado em outra espécie da família Asteraceae, em diferentes estudos do extrato da *Artemisia annua L.* que exibiu um comportamento temporal tempo dependente, na linhagem de cancer colorretal (HCT-116) no seu efeito citotóxico (KIM et al., 2017; LEE et al., 2019), porém na linhagem PC3 mostrou um comportamento tempo não dependente (WORKU et al., 2013).

Quanto a seletividade do extrato frente as linhagens tumorais e não tumoral, foi observado o comportamento de seletividade de TD frente as linhagens tumorais, mostrando maior seletividade para as duas linhagens tumorais PC-3 e HCT-116 do que para a linhagem não tumoral (L929). Em estudos realizados por Kim e colaboradores

(2017) mostraram que a *Artemisia annua L.* não teve efeito na viabilidade celular em células normais de fibroblastos humanos.

No trabalho realizado por Magdalena e colaboradores (2012) apresentaram para uma linhagem celular de leucemia T aguda humana, a citotoxicidade com o teste de exclusão do azul de tripan foi conduzido em uma faixa de concentrações ($0,04 \pm 1,0$ mg/ml) em diferentes espécies da família Asteraceae após 24 horas de tratamento, sendo capazes de inibir aproximadamente o 46,33-50,97% do crescimento celular. Também estudos realizados do extrato aquoso da *Achyrocline satureioides* (Asteraceae) apresenta também efeitos concentração dependente com o teste de azul de tripan, mostrando diminuição da proliferação celular (MARTA C.T. DUARTE, 2016).

Quando realizado o teste de viabilidade celular por exclusão do corante azul de tripan, os resultados corroboraram com o teste de MTT, pois foi possível observar que o TD reduziu o número de células viáveis, ou seja, uma diminuição na proliferação celular e um aumento estatisticamente significativo das células não viáveis de HCT-116, quando comparado com o controle negativo, mostrando um comportamento concentração dependente, após de um tempo de incubação de 24 horas. Estudos realizados por Liao e colaboradores (2011) mostraram que o extrato de TD apresenta uma diminuição da viabilidade celular nas células U373 após o tratamento de incubação de 24 horas a partir de uma concentração de 1,25 µg/ml, com um comportamento concentração dependente.

Diferentes extratos de diferentes espécies da família Asteraceae induzem mudanças morfológicas em diferentes linhagens celulares com características de morte por apoptose, necrose ou autofagia entre outras (BABAEI et al., 2018; LIAO et al., 2013; MAGDALENA WEGIERA, 2012; MARTA C.T. DUARTE, 2016).

Ao analisar a morfologia celular das células HCT-116 após um tempo de incubação de 24 horas com o TD, todas as características foram comparadas com o controle negativo, mostrou visualmente que os resultados mostravam o mesmo padrão observados nos demais testes realizados, isto é, uma diminuição da densidade celular, com um padrão concentração dependente. Além disso, morfologicamente foi observado a presença de aumento do citoplasma, presença de *blebs*, perda da membrana plasmática, presença de vacúolos em todas as concentrações e células necróticas só nas concentrações

maiores testadas. Estes resultados sugerem que o TD, nas células HCT-116, ocasiona um tipo de estresse celular, induzindo como consequência um tipo de morte por apoptose. Com a continuidade do estudo de mecanismo de morte do extrato de TD frente a linhagem HCT-116 os resultados de citometria de fluxo, mostraram uma redução significativa do número de células tratadas com o TD, quando comparadas com o controle negativo, dados que corroboram com o teste do tripan. Houve diferença significativa entre as concentrações testadas (4,5 µg/ml; 9,00 µg/ml e 18,00 µg/ml) quanto a densidade de células. Além disso, a amostra causou danos na integridade de membrana celular. Estes achados sugerem uma possível atividade citotóxica do extrato após 24 horas de incubação.

Em estudos da análise morfológica realizada em células U373 mostraram evidencia de características de morte por apoptose além de presença de vacúolos após o tratamento de 24 horas com o TD ao serem analisados por microscopia eletrônica (LIAO et al., 2011), além disso, nas células Hep-G2 observou-se, uma diminuição da população celular sendo concentração dependente, presença de *blebs* e aumento do tamanho citoplasmático (LIAO et al., 2013) após o tratamento de 24 horas com o extrato de TD.

Com a continuidade do estudo de mecanismo de morte do extrato de TD frente a linhagem HCT-116 os resultados de citometria de fluxo, mostraram uma redução significativa do número de células tratadas com o TD, quando comparadas com o controle negativo, dados que corroboram com o teste do Tripan. Houve diferença significativa entre as concentrações testadas (4,5 µg/ml; 9,00 µg/ml e 18,00 µg/ml) quanto a densidade de células. Além disso, a amostra causou danos na integridade de membrana celular. Estes achados sugerem uma possível atividade citotóxica do extrato após 24 horas de incubação.

Muitas moléculas com atividade antineoplásica atuam interferindo no ciclo celular, algumas são fase-específica e outras fase-inespecífica (LÚCIA DE ALMEIDA et al., 2005). Existem também muitos agentes anticâncer que promovem danos no DNA que provocam parada do ciclo celular, na fase G₀ / G₁ ou G₂ / M, que podem induzir apoptose (HU et al., 2009; KESSEL; LUO, 2000). Liao e colaboradores (2011) demonstraram a atividade antitumoral de extrato de *Tithonia diversifolia*, frente a células de glioblastoma (U373), e os resultados exibiram seu potencial para produzir parada na fase G₂ / M após

um tempo de incubação de 24 horas. Na análise do efeito de TD no perfil do ciclo celular das células HCT-116, após um tempo de incubação de 24 horas, por meio da análise do conteúdo de DNA, foi possível verificar alterações no ciclo celular, apresentando uma parada na fase G2 / M, não apresentando diferença estatisticamente significativa entre as concentrações testadas porém, existiu diferença quando comparada ao controle negativo, levando a uma inibição do crescimento celular. Entretanto, Liao e colaboradores (2013), realizando a mesma análise sobre o extrato de *Tithonia diversifolia* em células de carcinoma de Hepatoma (Hep-G2), a resposta foi a parada na fase S do ciclo celular.

A apoptose, é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas. Dentre as alterações morfológicas, pode-se mencionar a redução do volume celular, condensação e fragmentação nuclear, formação de *blebs* e perda de adesão a células vizinhas. Em quanto a alterações bioquímicas envolvem a ativação de endonucleases, responsáveis pelo processo de fragmentação do DNA (GRIVICICH A.; 2007).

A ocorrência de fragmentação do DNA é característica de diferentes processos de morte celular. No estudo feitos por Liao e colaboradores (2011-2013), apresentam que o extrato de *Tithonia diversifolia* apresenta um aumento na fase Sub-G1, ou seja, uma fragmentação do DNA (LIAO et al., 2013, 2011), neste trabalho também o extrato apresentou um aumento na fase Sub-G1, na última concentração testada, quando comparado ao controle negativo.

Um dos eventos que marcam o mecanismo de apoptose intrínseca é a ocorrência de despolarização mitocondrial (GALLUZZI et al., 2012), pois a mitocôndria tem um papel importante na regulação da sinalização apoptótica (JOHNSON; WALSH; CHEN, 1980). Este efeito pode ser analisado por meio de um teste denominado de Rodamina 123. Ao realizá-lo com as células HCT-116 tratadas com TD o resultado foi que ocorreu uma despolarização mitocondrial, o que sugere que o extrato induz a apoptose por colapso do potencial de membrana celular. Com os parâmetros avaliados anteriormente por citometria de fluxo e coloração diferencial confirmou-se as alterações morfológicas com apoptose, após o tratamento com o TD.

Alguns fitoquímicos podem desencadear citotoxicidade e apoptose mediadas por EROs em células cancerígenas. Embora outros compostos derivados de plantas possam

melhorar defesas antioxidantes por eliminação de radicais ou estimulação de enzimas antioxidantes intracelulares, a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que levam ao estresse oxidativo, é uma das estratégias que podem-se mostrar eficazes em danificar células cancerosas (VALLEJO; SALAZAR; GRIJALVA, 2017).

Alguns trabalhos indicam que a produção de radicais livres pode induzir alterações celulares, além de estarem envolvidos com proliferação, diferenciação e morte da célula (SAHU et al., 2007). Ao avaliar se o efeito antiproliferativo causado pelo extrato de TD, está relacionado ao estresse oxidativos, foi determinada novamente a CI_{50} frente a linhagem de HCT-116 durante 24, 48, 72 horas de tratamento, utilizando o NAC 4 μ M (LUNGEN, KLINIK, KASSEL, 2011) para saber se diminui ou reverte o efeito de TD, e observou-se que o NAC conseguiu reverter o efeito antiproliferativo provocado do extrato de TD, alterando as concentrações, já que na presença do NAC a concentração CI_{50} é alterada significativamente, após o tratamento de 24, 48 e 72 horas, sugerindo uma perda de efeito antiproliferativo. O NAC é uma molécula reativa que forma complexos, por se complexar com algumas substâncias ela ocasiona diminuição do efeito citotóxico, isto provavelmente ocorreu com o extrato de TD, pois foi possível observar alterações nas CI_{50} com a mudança nas concentrações testadas.

Ao avaliar se o TD induz um estresse celular nas células de HCT-116, após o tratamento de 24 horas, foi utilizado o corante AO, para poder identificar a presença de AVOs, através de microscopia de fluorescência, e na análise foi encontrado um aumento de AVOs nas células tratadas com TD, quando comparado ao controle negativo. Também foi possível verificar que o TD na presença do NAC 4 μ M, não houve um aumento visual significativo de AVOs, quando comparado o TD sem a presença do NAC, mostrando maior quantidade de células viáveis. Isto indica que, o TD induz o processo de estresse celular nas células HCT-116, como resposta da formação de EROs.

Existem diferentes quimioterápicos atuam induzindo direta ou indiretamente quebras de fita dupla no DNA, por diversas vias, (DA SILVA; FERREIRA; DE SOUZA, 2003; SCHIEBER; CHANDEL, 2014; YANG et al., 2018), que são utilizadas no tratamento do câncer e promovem seus efeitos antineoplásicos através de formação de EROs. O estresse oxidativo é conhecido por causar danos celulares como dano na integridade de membrana ocasionando instabilidade genômica e induzindo dano ao DNA

(FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIÈRE, 2002). O dano ao DNA é alvo e a lesão pode ser na dupla fita de DNA podendo levar as células para uma morte por apoptose (JACOBS; SCHÄR, 2012; KRYSTON et al., 2011). O reconhecimento dessas lesões é iniciado por diversas proteínas o que finalmente resulta em parada o ciclo celular, reparo do DNA ou apoptose (JÚNIOR et al., 2015).

Uma grande diversidade estrutural e uma ampla gama de atividades e são encontradas principalmente no gênero da família Asteraceae, como a *Artemísia*, a *Arnica*, a *Ambrosia*, a *Helenium*, a *Tanacetum* e a *Vernonia* mostrando efeitos antiploriferativos no aumento de EROs que podem induzir apoptose através de efeitos mitocondriais, mostrando lesões ao DNA e níveis baixos de glutathiona reduzida em células cancerígenas (BABAEI et al., 2018; BUSKUHL et al., 2009)

Quando avaliado se o TD provoca danos ao DNA das células tumorais (HCT-116), pelo teste cometa após 24 horas de tratamento foi percebido que o dano ao DNA nas células tumorais foi significativo. Além disso, todos os danos gerados pelo TD nas células HCT-116 foram revertidos quando as células foram tratadas com o NAC.

Com o teste cometa, na variação alcalina é capaz de detectar tanto quebras de fitas simples quanto de dupla fita (lesões totais ao DNA) já a variação neutra detecta apenas quebras de dupla fita (CAVALCANTI et al., 2011). O resultado deste estudo na variação alcalina observou-se que o TD induz uma lesão no DNA das células HCT-116 após o tratamento de 24 horas, percebendo um aumento da lesão na presença do BH que reduz o glutathiona intracelular. Além disso, foi utilizada a enzima hOGG1 que reconhece lesões do DNA provocada EROs, mais especificamente quando existe guaninas em estado oxidado. Com isso, dentro do dano total gerado ao DNA existe um dano específico em umas bases nitrogenadas (guaninas). Nos resultados do teste cometa da variação neutra, os resultados mostraram uma lesão de dupla fita do DNA das células HCT-116, que foram mais pronunciados quando a célula foi privada de glutathiona intracelular. Efeitos que foram revertidos pelo NAC.

Dano ao DNA é um conceito abrangente para mencionar diversas modificações que ocorrem na estrutura do DNA que podem ativar um processo de morte celular. O mecanismo pelo qual estas modificações iniciam o processo de morte pode depender do

tipo de lesão e a maneira que a célula processa ou detecta as modificações (FLEURY; MIGNOTTE; VAYSSIÈRE, 2002). Por tanto, as lesões no DNA podem ser induzidas de forma direta ou indireta no material genético através de modificações nas estruturas de nucleotídeos, inibição de síntese de DNA ou complexo DAN-proteínas que são necessárias para sua replicação adequada e também por despolarização mitocondrial (KRYSTON et al., 2011).

Corroborando com os resultados mostrados acima, se mediu um dos produtos do resultado do processo de peroxidação de lipídica. O teste TBARS mede o malondialdeído (MDA) presente na amostra e quando existe o processo de peroxidação de lipídios o NO pode estar envolvido na sinalização, e outras espécies, que provoca danos oxidativos induzidos por EROs. E observou-se um aumento significativo das concentrações do MDA e um aumento das concentrações do subproduto de nitrato e nitritos após o tratamento com TD um tempo de incubação de 24 horas. Porém, esse produto não se obteve diferença significativa quando foi tratado com o NAC. Dados que sugerem que as EROs desempenham um papel importante nas atividades antiproliferativa do extrato de TD. Sustentando novamente a hipótese, de que o extrato induz um processo de estresse oxidativo.

A glutathiona é um tripeptídeo contendo tiol que consiste em L-glutamato, cisteína e glicina. É abundantemente distribuído nas células de mamíferos e existe principalmente nas formas de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (dissulfeto de glutathiona (GSSG)). A GSH é predominantemente distribuída no citosol e com menor conteúdo nas organelas subcelulares, como as mitocôndrias, o núcleo e o retículo endoplasmático (ER) (LV et al., 2019).

O aumento do nível de GSH foi observado em diferentes células cancerígenas humanas, e é um importante contribuinte para a patologia do câncer e a resistência à terapia anticâncer (TRAVERSO et al., 2013). Pelo contrário, a depleção de GSH aumenta a suscetibilidade das células cancerígenas a várias formas de morte celular programada e a sensibilidade às quimioterapias (SCHUMACKER, 2015). Conseqüentemente, o papel do GSH no início da morte celular programada em células cancerígenas tem sido bem implicado em estudos acumulativos mostrando que existem inter-relações entre essas diferentes formas de morte celular programada induzida pelo GSH.

Além disso, estudos demonstraram que o status redox do GSH / GSSG é um importante indicador de apoptose nas células cancerígenas. A apoptose está consistentemente associada a uma redução na proporção GSH / GSSG (ZHAO; ZHANG; SUO, 2012). A depleção do GSH prejudica o sistema antioxidante e leva ao aumento da geração de EROs, que acelera os danos mitocondriais e induz apoptose (LV et al., 2019).

Como já foi determinado anteriormente o extrato de TD tem seus efeitos relacionado na geração de EROs. Por tanto foi avaliado se, além de formar EROs o TD tinha efeito nos níveis intracelulares de glutathione intracelular e assim, confirmar se os EROs estão relacionados a depleção da glutathione nas células tratadas. Observou-se uma redução da glutathione reduzida e um aumento da glutathione oxidada intracelular, provocando também uma diminuição da razão GSH / GSSG implicando que este processo esteja provavelmente induzindo tanto a despolarização mitocondrial como apoptose nas células tumorais tratadas (HCT-116). Liao e colaboradores (2011) comentaram que existem uma probabilidade de que os EROs estejam envolvidos no mecanismo de indução de apoptose nas células U 373, após o tratamento de 24 horas com TD, pelos achados na sua pesquisa. Porém não existe relatos confirmatórios que o extrato de TD induz EROs para induzir morte celular. Com os resultados obtidos neste trabalho sugere-se que o TD também esteja relacionado com a depleção de glutathione do aparato antioxidante intracelular das células HCT-116, após o tratamento de 24 horas, além disso, que os efeitos antitumorais observados pelo TD *in vitro* é dependente de espécies reativas de oxigênio, e este fato mostra o extrato como pro-oxidativo.

6. CONCLUSÃO

O extrato de *Thitonia diversifolia* apresentou um comportamento pro-oxidativo ativando a apoptose após o tratamento de 24 horas frente a linhagem de HCT-116 com um comportamento tempo não dependente. Além disso, o extrato de TD mostrou uma potente atividade antitumoral *in vitro* de maneira seletiva e dependente da geração de espécies reativas de oxigênio. De forma indireta, a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), levou ao estresse celular provocando um apoptose intrínseca causando despolarização mitocondrial, provocando lesões ao DNA e parada na fase do ciclo celular (G2/M).

No entanto, é necessário a realização de mais experimentos a fim de confirmar os possíveis mecanismos de morte acima apresentadas, para elucidar todo o mecanismo de ação do extrato de *Tithonia diversifolia*.

BIBLIOGRAFIA

- AKERBOOM, T. P. M.; SIES, H. Assay of Glutathione, Glutathione Disulfide, and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. **Methods in Enzymology**, v. 77, n. C, p. 373–382, 1 jan. 1981.
- ALTMANN, K.-H.; GERTSCH, J. Anticancer drugs from nature—natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, n. 2, p. 327–357, 28 mar. 2007.
- ANGEL, L.; VITTO, D.; PETENATTI, E. MORFOLÓGICA Y TAXONÓMICA , IMPORTANCIA. n. December, 2009.
- BABAEI, G. et al. **Application of sesquiterpene lactone: A new promising way for cancer therapy based on anticancer activity** **Biomedicine and Pharmacotherapy** Elsevier Masson SAS, , 1 out. 2018.
- BADER, A. et al. Cytotoxicity of some plants of the asteraceae family: Antiproliferative activity of Psiadia punctulata root sesquiterpenes. **Records of Natural Products**, v. 13, n. 4, p. 307–315, 2019.
- BOHLMANN, F. et al. Caryophyllene derivatives and a heliangolide from *Lychnophora* species. **Phytochemistry**, v. 19, n. 11, p. 2381–2385, jan. 1980.
- BUSKUHLE, H. et al. A new polyacetylene from *Vernonia scorpioides* (Lam.) Pers. (Asteraceae) and its in vitro antitumoral activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 7, p. 1327–1333, 2009.
- CAVALCANTI, B. C. et al. Preclinical genotoxicology of nor- β -lapachone in human cultured lymphocytes and Chinese hamster lung fibroblasts. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 9, p. 1560–1574, 2011.
- CEPEDA, V. et al. Biochemical Mechanisms of Cisplatin Cytotoxicity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 3–18, 18 abr. 2008.
- CHAGAS-PAULA, D. A. et al. **Ethnobotany, chemistry, and biological activities of the genus *Tithonia* (Asteraceae)** **Chemistry and Biodiversity**, fev. 2012.
- CHIANG, L.-C. et al. *In vitro* Anti-leukemic and Antiviral Activities of Traditionally Used Medicinal Plants in Taiwan. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 32, n. 05, p. 695–704, 10 jan. 2004.

COLLINS, A. R. **The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations** *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*, 2004.

CORDELL, G. A. Natural products in drug discovery – Creating a new vision. *Phytochemistry Reviews*, v. 1, n. 3, p. 261–273, out. 2002.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. *Journal of Natural Products*, v. 60, n. 1, p. 52–60, jan. 1997.

DA SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; DE SOUZA, M. C. B. V. **Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -Lapachona e derivados** *Quimica Nova*, maio 2003.

DICKINSON, B. **Introduction to flow cytometry**. [s.l: s.n.].

DUKE, J. . **Revision of Tithonia. Rhodora**. Disponível em: <[https://www.scirp.org/\(S\(351jmbntvnsjt1aadkposzje\)\)/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1323489](https://www.scirp.org/(S(351jmbntvnsjt1aadkposzje))/reference/ReferencesPapers.aspx?ReferenceID=1323489)>. Acesso em: 20 dez. 2019.

DUKE, J. C. LA. The Existence of Hypotheses in Plant Systematics or Biting the Hand That Feeds You. *Taxon*, v. 36, n. 1, p. 60, fev. 1987.

ECOTICIA. **Los 10 países con mejor biodiversidad del mundo**. Disponível em: <<https://www.ecoticias.com/naturaleza/111451/10-paises-mejor-biodiversidad-mundo>>. Acesso em: 15 set. 2019.

FADILA DERGUINIFABIEN PLISSONGEORGES MASSIOT. **New tagitinine derivatives are proteasome inhibitors useful for the treatment of cancer** *Francia*, 2009.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 63, n. 6, p. 965–81, 1985.

FLEURY, C.; MIGNOTTE, B.; VAYSSIÈRE, J. L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*, v. 84, n. 2–3, p. 131–141, 2002.

FUTREAL, P. A. et al. **A census of human cancer genes** *Nature Reviews Cancer* *Nature Publishing Group*, , 2004.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death & Differentiation*, v.

19, n. 1, p. 107–120, 15 jan. 2012.

GALLUZZI, L.; VITALE, I. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, p. 486–541, 2018.

GHANTOUS, A. et al. What made sesquiterpene lactones reach cancer clinical trials? **Drug Discovery Today**, v. 15, n. 15–16, p. 668–678, ago. 2010.

GOFFIN, E. et al. In Vitro Antiplasmodial Activity of *Tithonia diversifolia* and Identification of its Main Active Constituent: Tagitinin C. **Planta Medica**, v. 68, n. 6, p. 543–545, jun. 2002.

GRIVICICH A; **Revista brasileira de cancerologia : órgão oficial do Serviço Nacional de Câncer**. [s.l.] Serviço Nacional de Câncer, 2007. v. 53

GU, J.-Q. et al. Sesquiterpenoids from *Tithonia diversifolia* with potential cancer chemopreventive activity. **Journal of natural products**, v. 65, n. 4, p. 532–6, abr. 2002.

GUPTA; SHYAM K. **Antiaging Chirally-Correct Mitoprotectant Amino Acid and Peptide Complexes**, 2009. Disponível em: <[HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011.](http://appft.uspto.gov/netacgi/nph-Parser?Sect1=PTO2&Sect2=HITOFF&p=1&u=%2Fnetacgi%2FPTO%2Fsearch-bool.html&r=1&f=G&l=50&co1=AND&d=PG01&s1=%22Tithonia+diversifolia%22&s2=%22cell+death%22&OS=%22Tithonia+diversifolia%22+AND+%22cell+death%22&RS=%22Tithonia+>. Acesso em: 2 set. 2019</p></div><div data-bbox=)

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. Asteraceae from EPDA-Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brazil. **Rodriguesia**, v. 59, n. 4, p. 687–749, 1 out. 2008.

HE, X.-F. et al. Sesquiterpenes and Dimeric Sesquiterpenoids from *Sarcandra glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 1, p. 45–50, 22 jan. 2010.

HEGEDŰS, C. et al. **Redox control of cancer cell destruction** **Redox Biology** Elsevier B.V., , 1 jun. 2018.

HOROBIN, R. W. How Romanowsky stains work and why they remain valuable - Including a proposed universal Romanowsky staining mechanism and a rational troubleshooting scheme. **Biotechnic and Histochemistry**, v. 86, n. 1, p. 36–51, fev.

2011.

HSIAO-CHUAN WENMING-YI LEEYUNG-NUAN TSAI. **TW201143787A - Method for isolating sesquiterpenoid lactone compounds from *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray, compositions and use thereof - Google Patents**, 2010.

Disponível em:

<<https://patents.google.com/patent/TW201143787A/en?q=tithonia&q=diversifolia&q=cancer&oq=tithonia+diversifolia+cancer>>. Acesso em: 9 nov. 2019

HU, Y.-W. et al. Induction of apoptosis in human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells in vitro by flavonoids from *Astragalus complanatus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 2, p. 293–301, 22 jun. 2009.

INCA. **O que é câncer? | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>>. Acesso em: 23 mar. 2019.

INCA. **Estatísticas de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em:

<<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 4 set. 2019.

IRCA. **IRCA**. [s.l: s.n.].

JACOBS, A. L.; SCHÄR, P. DNA glycosylases: In DNA repair and beyond.

Chromosoma, v. 121, n. 1, p. 1–20, 2012.

JÁTEM-LÁSSER, A.; RICARDI, M. S.; ADAMO, G. Herbal traditional medicine of Venezuelan Andes: an ethnopharmacological study. **Phytotherapy Research**, v. 12, n. S1, p. S53–S59, 1 jan. 1998.

JOHNSON, L. V; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. **Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123 (fluorescence microscopy/Rous sarcoma virus/colchicine)**

Natl. Acad. Sc. USA. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC348409/pdf/pnas00665-0305.pdf>>.

Acesso em: 5 abr. 2019.

JÚNIOR, A. L. G. et al. Serum Oxidative Stress Markers and Genotoxic Profile Induced by Chemotherapy in Patients with Breast Cancer: A Pilot Study. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 221–237, 1 mar. 2011.

KESSEL, D.; LUO, Y. Cells in cryptophycin-induced cell-cycle arrest are susceptible to

- apoptosis. **Cancer letters**, v. 151, n. 1, p. 25–9, 3 abr. 2000.
- KIM, E. J. et al. Apoptosis-induced effects of extract from *Artemisia annua* Linné by modulating PTEN/p53/PDK1/Akt/ signal pathways through PTEN/p53-independent manner in HCT116 colon cancer cells. 2017.
- KIRKWOOD, J. M. et al. Immunotherapy of cancer in 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 62, n. 5, p. 309–335, set. 2012.
- KLIONSKY, D. J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). **Autophagy**, v. 12, n. 1, p. 1–222, 2016.
- KNOX, S. S. From “omics” to complex disease: A systems biology approach to gene-environment interactions in cancer. **Cancer Cell International**, v. 10, 26 abr. 2010.
- KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, jan. 2009.
- KRYSTON, T. B. et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 711, n. 1–2, p. 193–201, 2011.
- LEE, W. S. et al. **Polyphenols from Korean artemisia annua L (pKAL) showed anti-cancer effects by multiple mechanisms on HCT116 human colorectal cancer cells**. American Association for Cancer Research (AACR), 1 jul. 2019
- LIAO, M.-H. et al. Anti-human hepatoma Hep-G2 proliferative, apoptotic, and antimutagenic activity of tagitinin C from *Tithonia diversifolia* leaves. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 1, p. 98–106, 4 jan. 2013.
- LIAO, M. H. et al. *Tithonia diversifolia* and its main active component tagitinin C induce survivin inhibition and G2/M arrest in human malignant glioblastoma cells. **Fitoterapia**, v. 82, n. 3, p. 331–341, 2011.
- LIU, L. et al. 1,10-secoguaianolides from *artemisia austro-yunnanensis* and their anti-inflammatory effects. **Molecules**, v. 23, n. 7, 2018.
- LIU, S. S. et al. 1-Oxoeudesm-11(13)-eno-12,8a-lactone induces G 2/M arrest and apoptosis of human glioblastoma cells in vitro. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, n. 2, p. 271–281, fev. 2013.
- LÚCIA DE ALMEIDA, V. et al. CÂNCER E AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

CICLO-CELULAR ESPECÍFICOS E CICLO-CELULAR NÃO ESPECÍFICOS QUE INTERAGEM COM O DNA: UMA INTRODUÇÃO. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.

LUNGEN, KLINIK, KASSEL, K. **Indicaciones Terapeuticas de la N-Aceticisteina**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <https://www.siicsalud.com/pdf/tc_acetilcisteina_22513.pdf>. Acesso em: 6 set. 2019.

LV, H. et al. **Unraveling the potential role of glutathione in multiple forms of cell death in cancer therapy** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Hindawi Limited, , 2019.

MACKLIS, J. D.; MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **Journal of Neuroscience Methods**, 1990.

MAGDALENA WEGIERA, H. D. S. M. J. D. M. K. AND K. K. CYTOTOXIC EFFECT OF SOME MEDICINAL PLANTS FROM ASTERACEAE FAMILY ON J-45.01 LEUKEMIC CELL LINE ñ PILOT STUDY. 2012.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 2, p. 143–148, fev. 2002.

MARCHETTI, P. et al. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 3, p. 1155–1160, 1 set. 1996.

MARTA C.T. DUARTE, M. R. **Therapeutic Medicinal Plants: From Lab to the Market - Google Libros**. [s.l.: s.n.].

MISSOURI BOTANICA GARDEM. **Tithonia — The Plant List**. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/browse/A/Compositae/Tithonia/>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

MONTECUCCO, A.; BIAMONTI, G. **Cellular response to etoposide treatment** *Cancer Letters*, 8 jul. 2007.

MUOGHALU, J. I.; CHUBA, D. K. Seed germination and reproductive strategies of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) gray and *Tithonia rotundifolia* (P.M) blake. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 3, n. 1, p. 39–46, 2005.

MURAD ,ANDRÉ MÁRCIO, A. K. **Oncologia Bases Clinicas do Tratamento -**

Andre Marcio Murad e Artur Katz Orgs | Estante Virtual. [s.l: s.n.].

NADRIGNY, F. et al. Systematic colocalization errors between acridine orange and EGFP in astrocyte vesicular organelles. **Biophysical journal**, v. 93, n. 3, p. 969–80, 1 ago. 2007.

NEILAN, T. G. et al. Disruption of Nitric Oxide Synthase 3 Protects Against the Cardiac Injury, Dysfunction, and Mortality Induced by Doxorubicin. **Circulation**, v. 116, n. 5, p. 506–514, 31 jul. 2007.

NETO, G.; NETO, G. G. O SABER TRADICIONAL PANTANEIRO: AS PLANTAS MEDICINAIS E A EDUCAÇÃO AMBIENTAL. **REMEA - Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**, v. 17, n. 0, 9 nov. 2012.

OLIVEIRA, P. A. et al. Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 4, p. 593–616, dez. 2007.

OMOKHUA, A. G. et al. A comprehensive study of the potential phytomedicinal use and toxicity of invasive Tithonia species in South Africa 06 Biological Sciences 0605 Microbiology. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, 3 out. 2018.

OMS. POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. Brasília : [s.n.]. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_fitoterpicos.pdf>.

Acesso em: 10 set. 2019.

PEREIRA, P. S. et al. Sesquiterpene lactones from brazilian Tithonia diversifolia. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1445–1448, ago. 1997.

PESSOA DA SILVA, M. et al. **Estudo taxonômico e etnobotânico sobre a família Asteraceae (Dumortier) em uma comunidade rural no Nordeste do Brasil** *Gaia Scientia*. [s.l: s.n.]. Disponível em:

<<http://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/gaia/index>>. Acesso em: 20 dez. 2019.

PIERINI, D.; BRYAN, N. S. Nitric oxide availability as a marker of oxidative stress. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1208, p. 63–71, 2015.

RIXE, O.; FOJO, T. **Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytotostasis sufficient?** *Clinical Cancer Research*, 15 dez. 2007.

ROBBINS, S. L. (STANLEY L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. S. **Robbins and Cotran**

- pathologic basis of disease.** [s.l.] Saunders/Elsevier, 2010.
- ROSENBERG, L. E.; ROSENBERG, D. D. The Genetics of Cancer. In: **Human Genes and Genomes.** [s.l.] Elsevier, 2012. p. 259–288.
- SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. S. **ROS function in redox signaling and oxidative stress***Current Biology*Cell Press, , 19 maio 2014.
- SCHUMACKER, P. **Reactive Oxygen Species in Cancer: A Dance with the Devil***Cancer Cell*Cell Press, , 9 fev. 2015.
- SINGH, Y. N. Therapeutic potential of kava in the treatment of anxiety disorders. **Central Nervous System Drugs**, v. 16, p. 731 – 743, 2002.
- THOMÉ, M. P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, p. 4622–2632, 2016.
- TRAN, T. T. T.; TRAN, V. H.; LAM, T. T. Encapsulation of tagitinin C in liposomes coated by Tithonia diversifolia pectin. **Journal of Microencapsulation**, v. 36, n. 1, p. 53–61, 2 jan. 2019.
- TRAVERSO, N. et al. **Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance***Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013.
- TREVISAN, M. Correlates of Markers of Oxidative Status in the General Population. **American Journal of Epidemiology**, v. 154, n. 4, p. 348–356, 15 ago. 2001.
- USDA. **Classification | USDA PLANTS.** Disponível em:
<<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=Asteraceae>>. Acesso em: 19 dez. 2019.
- VALLEJO, M. J.; SALAZAR, L.; GRIJALVA, M. Oxidative Stress Modulation and ROS-Mediated Toxicity in Cancer: A Review on In Vitro Models for Plant-Derived Compounds. 2017.
- VAN DEN BERG, M. E.; SILVA, M. H. L. DA. Contribuição ao conhecimento da flora medicinal de Roraima. **Acta Amazonica**, v. 18, n. suppl 1-2, p. 23–35, 1988.
- WAJANT, H. The Fas Signaling Pathway: More Than a Paradigm. **Science**, v. 296, n. 5573, p. 1635–1636, 31 maio 2002.
- WEN, J.; ZHAO, Y.; GUO, L. Orexin A induces autophagy in HCT-116 human colon cancer cells through the ERK signaling pathway. **International Journal of Molecular**

Medicine, v. 37, n. 1, p. 126–132, 2016.

WORKU, N. et al. Evaluation of the In Vitro Efficacy of *Artemisia annua*, *Rumex abyssinicus*, and *Catha edulis* Forsk Extracts in Cancer and *Trypanosoma brucei* Cells. v. 2013, 2013.

YANG, H. et al. **The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy***Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*BioMed Central Ltd., , 1 nov. 2018.

YOHANKA et al. Qualitative characterization of the content of secondary metabolites in the edible fraction of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray. **Pastos y Forrajes**, v. 35, n. 3, p. 283–291, 2012.

ZHANG, Y. et al. Antitumor Research on Artemisinin and Its Bioactive Derivatives. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 8, n. 4, p. 303–319, 2018.

ZHAO, Y. F.; ZHANG, C.; SUO, Y. R. MMPT as a reactive oxygen species generator induces apoptosis via the depletion of intracellular GSH contents in A549 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 688, n. 1–3, p. 6–13, 5 ago. 2012.

義春 横尾康 酒井. **Method for producing a plant powder containing plant extract**, 2001.

陈彬. **Traditional Chinese medicament for treating qi and yin deficiency type infective endocarditis and preparation method for traditional Chinese medicament**, 2016.

Anexo A-EQUIPAMENTOS

Agitador mecânico de placa, Biomixer TS 2000®

Agitador de soluções Phoenix Luferco AP56®

Bancada de Fluxo laminar Pachane PCR T4 ECO®

Bancada de fluxo laminar, VECO®

Bomba vácuo Primatec®

Banho-maria Kacil BM03®

Balanza analítica Melter Toledo

Citocentrífuga HANIL Micro 17 TR®

Citometro de fluxo, Guava EasyCyte mini®

Centrifuga Eppendorf 5810R®

Citocentrífuga Ciente C CT2000®

Deonizador de água Mili-Q, Milipore®

Espectrofotômetro de placa Beckman Coulter, DTX 880®

Estufa HNuaire®

Microscópio inversão óptica Axiovert 40 C®

Microscópio óptico Nikon Eclipse E100®

Ph-metro, Mircronal®

pipetas automáticas, Gilson®

ANEXO B- SOLUÇÕES E KITS

CULTURA DE CELULAS	CITOMETRIA DE FLUXO
PBS (PHOSPHATE BUFER SOLUTION, PH 7.2)	Solução Iodeto de Propídeo PI
	sigma
NACL 0,15 M	PI 50µg/mL
NA ₂ HPO ₄ 10 MM	Triton X-100 0,1%
KH ₂ PO ₄ 2MM	Solução de Rodamina 123
	Rh 123 1mg/mL
KIT PANOTICO RÁPIDO HE	
MEIO DE CULTURA RPMI	
MEIO DE CULTURA DMEN	
N-ACEITL-L-CISTEINA 4µM	
(NAC) PH 7.4-7.7	
DMSO	

APENDICE A. Modelo hipotético do mecanismo de morte do extrato etanólico da *Tithonia diversifolia*.

