



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

ANDRÉA FELINTO MOURA

**BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS DE *Combretum fruticosum* COM
POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO EM CÉLULAS TUMORAIS *in vitro***

FORTALEZA

2015

ANDRÉA FELINTO MOURA

**BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS DE *Combretum fruticosum* COM
POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO EM CÉLULAS TUMORAIS *in vitro***

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Co-orientadora: Dra. Ana Jérsia Araújo

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- M884b Moura, Andréa Felinto.
Bioprospecção de compostos isolados de *Combretum fruticosum* com potencial antiproliferativo em células tumorais *in vitro*/ Andréa Felinto Moura. – Fortaleza, 2015.
91 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2015.
Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.
1. Lignanais. 2. Combretum. 3. Autofagia. 4. Antineoplásicos. I. Título.
-

CDD 615.1

ANDRÉA FELINTO MOURA

**BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS DE *Combretum fruticosum* COM
POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO EM CÉLULAS TUMORAIS *in vitro***

Dissertação submetida à coordenação do Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho
Co-orientadora: Dra. Ana Jérsia Araújo

BANCA EXAMINADORA

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

Dra. Ana Jérsia Araújo (Co-orientadora)
Universidade Federal do Piauí

Dr. Pedro Jorge Caldas Magalhães
Universidade Federal do Ceará

Dra. Maria do Carmo de Carvalho e Martins
Universidade Federal do Piauí

Dedico esta dissertação a meus pais, pelo amor, carinho, educação e exemplo que me deram;
à minha família e a meus amigos pelo apoio constante. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por sempre iluminar minha vida e minha mente, traçando bons caminhos por onde cruzei com pessoas maravilhosas. Cada pessoa com seu jeito particular de tornar aquilo que muitos considerariam problemas ou dificuldades, em coisas tão insignificantes perto dos braços acolhedores de cada um.

Aos meus pais, **Rosa Áurea e Benício** (*in memoriam*) pelo amor, carinho, educação e exemplo que me deram. Por me ensinarem que, fazendo o bem, agindo com honestidade e sinceridade, eu poderia alcançar todos os meus objetivos. Por me prepararem para que ainda jovem me dissessem: “filha agora você terá que voar com suas próprias asas”; pois, por mais que fosse difícil a separação, confiaram e sabiam que eu estava preparada para isso.

Aos meus irmãos, **Benício Jr. e Flávio**, por serem meus exemplos de crescimento pessoal e profissional. Agradeço pelo cuidado que sempre tiveram comigo, pelo companheirismo, amor e respeito existente entre nós.

Às minhas tias-mães, **Iraneide, Irani e Mirian**, por me darem o privilégio de ter quatro mães lindas, carinhosas e dedicadas e pelo exemplo de amor e união fraterna.

À toda **minha família e amigos de Teresina**, pelo apoio em todas as minhas decisões, incentivo aos estudos e dedicação.

Aos meus tios e pais cearenses, **José Nunes e Fátima Paiva**, por cuidarem de mim como filha, pelo apoio constante e torcida pelo meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. **Manoel Odorico de Moraes**, por me receber de braços abertos na Universidade Federal do Ceará (UFC) e por me dar a oportunidade de aprender muito nesses quase dois anos, vivenciando um “mundo” totalmente novo e fantástico.

À Dra. **Cláudia Pessoa**, pelo incentivo à pesquisa e crescimento do laboratório e pelas oportunidades dadas, acreditando no meu crescimento como pesquisadora.

À Dra. **Letícia Veras Costa Lotufo**, que apesar da pouca convivência, sempre foi solícita, compartilhando ensinamento e demonstrando simplicidade e competência.

Ao Dr. **Diego Veras**, pela ajuda incondicional, estando sempre disponível e de portas abertas para trocar ideias e compartilhar seu conhecimento.

À Dra. **Maria do Carmo de Carvalho e Martins**, por ter incentivado o início da minha vida científica, me orientando como aluna de PIBIC e por ter aceitado participar da minha banca. Naquela época, nunca pensei estaria hoje terminando um mestrado.

Ao Dr. **Pedro Magalhães**, por ter aceitado o convite de compor a banca e pelo conhecimento repassado na disciplina de Farmacologia Geral e Autonômica, a quem admiro muito como professor e pesquisador.

Ao Dr. **Edilberto Silveira**, Dra. **Otília Pessoa** e Dra. **Thiciana Sousa** pela dedicação e ajuda na parte química deste trabalho.

À minha co-orientadora, Dra. **Ana Jérsia Araújo**, por me ajudar a levantar quando tudo parecia ter dado errado, pelas palavras “calma, no final tudo dá certo”, pelo enorme conhecimento repassado, pela amizade, carinho, paciência, disponibilidade e solicitude e por ter me presenteado com um “co-co-orientador”, seu esposo, Dr. **Delano Marinho**, que sempre se dispôs a ajudar, compartilhando conhecimento e, algumas vezes, me deixando um tanto desesperada.

À **família ECOTOX**, por me receber com tanto carinho na reta final da minha trajetória de mestrado.

À **família LOE**. Em especial, à minha “mãe LOE”, psicóloga e amiga, **Adelânia Marinho**, pelo companheirismo, preocupação, cuidado e carinho constante. Por ter sempre tempo disponível para desabafos, palavras de apoio, além de muitos momentos de descontração, entre risadas e lanchinhos. À **Silvana França**, que conquistou minha amizade e carinho, por todo o suporte nos trabalhos do laboratório, pela paciência e dedicação. À **D. Rogéria Montenegro**, por está sempre disposta a ajudar. A todos os amigos do LOE, mais do que especiais, que Deus me presenteou nessa vinda a Fortaleza, que sempre me ajudaram e me proporcionaram muitos momentos de risadas, dentro e fora do laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, pela ajuda indispensável em questões relacionadas à coordenação do programa de pós-graduação.

Este trabalho foi realizado com o auxílio das seguintes instituições:

Universidade Federal do Ceará

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP

Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa - FUNCAP

RESUMO

BIOPROSPECÇÃO DE COMPOSTOS ISOLADOS DE *Combretum fruticosum* COM POTENCIAL ANTIPROLIFERATIVO EM CÉLULAS TUMORAIS *in vitro*

A utilização de substâncias derivadas de produtos naturais tem crescido com o passar dos anos, formando a base dos produtos terapêuticos. As lignanas são moléculas com amplo uso farmacêutico, o que tem despertado interesse na pesquisa e busca de novos fármacos no tratamento de doenças. Muito interesse tem sido focado na sua eficácia como agente antineoplásico. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial anticâncer *in vitro* de compostos isolados a partir do extrato etanólico dos talos da *Combretum fruticosum*, bem como, estudar os possíveis mecanismos de ação da trachelogenina, uma lignana do tipo dibenzilbutirolactona, em células de câncer colorretal (HCT-116). O fracionamento do extrato etanólico da *C. fruticosum* resultou no isolamento de sete compostos: três triterpenos, duas misturas dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol e duas lignanas. Dentre eles, a trachelogenina mostrou maior atividade citotóxica, apresentando valores de CI_{50} que variaram de 0,8 a 32,4 μ M em células tumorais de glioblastoma (SF-295) e leucêmicas (HL-60), respectivamente, após 72 horas de incubação. Enquanto que, para células não tumorais (3T3-L1 e CMSP) esses valores foram maiores que 64,3 μ M. O perfil antiproliferativo em diferentes períodos de incubação foi realizado em células SF-295 e HCT-116. O efeito citotóxico em células SF-295 foi observado apenas após 72 horas de incubação, enquanto que, em células HCT-116, esse efeito foi observado após 48 horas, sendo intensificados após 72 horas de incubação. Diante desses resultados, em células HCT-116, a análise do perfil do ciclo celular, integridade de membrana, externalização da fosfatidilserina e expressão de proteínas relacionadas ao processo de morte celular por apoptose não apresentou alterações significativas, sugerindo que o efeito antiproliferativo desta lignana não está relacionado com processos de morte por apoptose e/ou necrose. A autofagia parece estar envolvida no mecanismo antiproliferativo da trachelogenina, visto que foi possível verificar um aumento do número e do tamanho de organelas vesiculares ácidas (AVOs) bem como um aumento da expressão de proteínas recrutadas durante a autofagia (LC3 A e B II e Beclina-1) nas células tratadas com a trachelogenina, embora não pareça ser o único processo envolvido. Logo, podemos concluir que a trachelogenina apresentou potente atividade anticâncer *in vitro*, e este efeito pode estar relacionado com a indução da autofagia. No entanto, outros testes devem ser realizados para confirmar as propostas acima apresentadas e para uma melhor avaliação do mecanismo de ação e do potencial terapêutico desta molécula.

Palavras-chave: Lignanas. Combretum. Autofagia. Antineoplásicos.

ABSTRACT

BIOPROSPECTION OF COMPOUNDS ISOLATED FROM *Combretum fruticosum* WITH ANTIPROLIFERATIVE POTENTIAL IN TUMOR CELLS

The use of substances from natural products has grown over the years, being the basis of therapeutic products. Lignans are molecules with large pharmaceutical use, which has aroused interest in search of new drugs to treat diseases. Much interest has been focused on their effectiveness as an antineoplastic agent. Thus, the aim of this study was to evaluate the *in vitro* anticancer potential of compounds isolated from ethanolic extract of *Combretum fruticosum*, as well as, to study the possible mechanisms of action of a dibenzylbutyrolactone type lignan, trachelogenin, in colorectal cancer cells. The fractionation of the ethanolic extract of *C. fruticosum* resulted in the isolation of seven compounds: three triterpenes, two mixtures of β -sitosterol and stigmasterol steroids and two lignans. Among them, the lignan, trachelogenin showed higher cytotoxic activity, with IC_{50} values ranging from 0.8 to 32.4 μ M in glioblastoma (SF-295) and leukemic (HL-60) cells, respectively. While in normal cells (3T3-L1 and PBMC cells) the IC_{50} values were greater than 64.3 μ M. The antiproliferative profile of different times of incubation was performed in SF-295 and HCT-116 cells. The cytotoxic effect on SF-295 cells was only observed after 72 hours of incubation, whereas in HCT-116 cells, this effect was observed after 48 hours, and it was enhanced after 72 hours of incubation. Before these results, analyzing cell cycle profile, membrane integrity, phosphatidylserine externalization and expression of proteins related to cell death by apoptosis in HCT-116 cells, it was not observed significantly changed, suggesting that the antiproliferative effect of this lignan is not related to mechanisms of cell death such as apoptosis and/or necrosis. Autophagy seems to be one of the cell death mechanisms involved in the antiproliferative effect of trachelogenin, because we observed an increase on number and size of acidic vesicular organelles (AVO) as well as the expression of proteins recruited during autophagy (LC3 A and B-II and Beclin-1) in cells treated with trachelogenin, although this seems not to be the only process involved. Therefore, we conclude that trachelogenin showed potent antitumor activity *in vitro*, and this effect may be related to the induction of autophagy. However, further tests should be conducted to confirm these proposals and to evaluate its mechanism of action and the therapeutic potential of this molecule better.

Keywords: Lignans. Combretum. Autophagy. Antineoplastic Agents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma.....	18
Figura 2 - Características essenciais do câncer.....	20
Figura 3 - Fases do ciclo celular.....	21
Figura 4 - Características moleculares das vias de morte celular autofágica, apoptóticas e necrótica (A); Detecção simultânea de múltiplos parâmetros relacionados à morte celular (B).....	24
Figura 5 - Desenho esquemático das vias indutoras de apoptose.....	25
Figura 6 - Estágios do processo de autofagia.....	26
Figura 7 - Atividade dos agentes antineoplásicos ciclo celular específicos.....	31
Figura 8 - Estrutura química da vincristina, vimblastina, etoposídeo, tenoposídeo, paclitaxel e doxorrubicina.....	32
Figura 9 - Fotos de <i>Combretum fruticosum</i> . Folha (A), frutos (B) e flor (C)	34
Figura 10 - Representação dos esqueletos das lignanas.....	35
Figura 11 - Desenho experimental.....	40
Figura 12 - Estruturas dos compostos isolados dos talos da <i>Combretum fruticosum</i>	41
Figura 13 - Perfil do potencial antiproliferativo da trachelogenina frente às linhagens SF-295 e HCT-116 após 72 horas de tratamento determinado pelo método MTT.....	55
Figura 14 - Perfil antiproliferativo da trachelogenina frente a linhagem HCT-116 após 24 e 48 horas de tratamento determinado pelo método MTT.....	56
Figura 15 - Efeito da trachelogenina na viabilidade de HCT-116 determinado pelo ensaio por exclusão de azul de Trypan após 24 e 48 horas de tratamento.....	57
Figura 16 - Imagens da morfologia das células HCT-116 após 48 horas de tratamento com trachelogenina, coradas com kit panótico rápido.....	58

Figura 17 - Efeito da trachelogenina sobre a proliferação celular das células HCT-116, avaliado pela integridade de membrana e densidade de células, determinada por citometria de fluxo.....	59
Figura 18 - Efeito da trachelogenina (TRA) na distribuição das fases do ciclo celular.....	60
Figura 19 - Efeito da trachelogenina sobre a fragmentação de DNA, por citometria de fluxo, após 48 horas de incubação.....	61
Figura 20 - Avaliação de indução de apoptose por citometria de fluxo e <i>Western blot</i>	62
Figura 21 - Avaliação da presença de compartimentos ácidos por microscopia confocal.....	64
Figura 22 - Avaliação de indução de autofagia por microscopia confocal e <i>Western blot</i>	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens celulares utilizadas.....	43
Tabela 2 - Avaliação da atividade citotóxica dos compostos isolados dos talos da <i>Combretum fruticosum</i> frente a quatro linhagens de células tumorais avaliados pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação.....	53
Tabela 3 - Potencial antiproliferativo da trachelogenina em linhagens tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h de tratamento.....	54
Tabela 4 - Potencial antiproliferativo da trachelogenina frente as linhagens SF-295 e HCT-116 após 24, 48 e 72 horas de incubação determinado pelo método MTT.....	55

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AGS	Adenocarcinoma Gástrico Humano
ANOVA	Análise de Variância
Atg 12	Proteína 12 relacionada com Autofagia
A431	Linhagem celular de Carcinoma epidermóide
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CI ₅₀	Concentração Inibitória Média
CDk	Quinases Dependentes de Ciclinas
CMSP	Células Mononucleadas do Sangue Periférico
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
Fas-L	Proteína transmembranar do tipo II pertencente ao fator de necrose
FSC	<i>Forward Scatter</i>
HCT116	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HCT 8	Linhagem celular de carcinoma colorretal
HDAC	Histona Desacetilase
HSQC	<i>Heteronuclear Simple Quantum Correlation</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HL 60	Linhagem celular de Leucemia Prómielocítica Humana
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IV	Infravermelho
HeLa	Linhagem celular de câncer cervical
HePa 1c1c7	Linhagem celular de Hepatoma de Rato
LC3	Cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos
MCF7	Linhagem celular de Câncer de Mama
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>

MTT	3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NBT/BCIP	<i>Nitro blue tetrazolium /5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OVCAR8	Linhagem celular de Carcinoma Ovariano
PARP	Ciclina-CDK poli (ADP-Ribose) polimerase
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i>
PC-3	Linhagem celular de Adenocarcinoma de Próstata
PI	<i>Propidium Iodide</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RPMI	<i>Roswell Parrk Memorial Institute Medium</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SF 295	Linhagem celular de Glioblastoma
SQSTM1	Sequestossoma 1
SSC	<i>Side Scatter</i>
SW480	Linhagem celular de Adenocarcinoma de Cólon
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline with Tween-20</i>
US-NCI	<i>United States - National Cancer Institute</i>
Vps34	<i>Vacuolar protein sorting 34</i>
3T3-L1	Linhagem celular de Fibroblastos não Transformados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	CÂNCER	18
1.2	CICLO CELULAR E O CÂNCER.....	20
1.3	VIAS DE MORTE CELULAR E O CÂNCER.....	23
1.4	ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DO CÂNCER.....	28
1.5	PRODUTOS NATURAIS COMO FONTE DE SUBSTÂNCIA ANTINEOPLÁSICAS.....	30
1.6	<i>Combretum fruticosum</i>	33
1.7	LIGNANAS.....	34
1.7.1	Mecanismo anticâncer das lignanas	35
1.8	RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....	37
2	OBJETIVOS	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	MATERIAIS UTILIZADOS	40
3.2	DESENHO EXPERIMENTAL	40
3.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	41
3.3.1	Isolamento e identificação das amostras	41
3.3.2	Avaliação da citotoxicidade in vitro	42
3.3.2.1	Linhagens celulares	42
3.3.2.2	Manutenção das linhagens celulares	43
3.3.2.3	Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)	44
3.3.2.4	Avaliação da atividade antiproliferativa <i>in vitro</i> - método do MTT.....	44
3.3.2.5	Avaliação da atividade antiproliferativa pelo método de exclusão por azul de Trypan.....	45
3.3.2.6	Análise morfológica – Coloração diferencial com panótico rápido.....	46

3.3.3	Estudo do mecanismo de ação	46
3.3.3.1	Citometria de Fluxo	46
3.3.3.1.1	<i>Avaliação da integridade da membrana, da densidade de células e da morfologia celular.....</i>	<i>47</i>
3.3.3.1.2	<i>Análise de conteúdo e fragmentação de DNA</i>	<i>48</i>
3.3.3.1.3	<i>Avaliação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V</i>	<i>48</i>
3.3.3.2	Detecção de células autofágicas por coloração com laranja de acridina.....	49
3.3.3.3	Avaliação da expressão proteica por <i>Western blot</i>	50
3.3.3.3.1	<i>Extração de proteínas.....</i>	<i>50</i>
3.3.3.3.2	<i>Quantificação de proteínas.....</i>	<i>51</i>
3.3.3.3.3	<i>Eletroforese em gel de poliacrilamida.....</i>	<i>51</i>
3.3.3.3.4	<i>Eletrotransferência.....</i>	<i>52</i>
3.3.3.3.5	<i>Imunodeteção.....</i>	<i>52</i>
3.3.3.3.6	<i>Análise de dados.....</i>	<i>52</i>
4	RESULTADOS	53
4.1	AVALIAÇÃO INICIAL DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS COMPOSTOS ISOLADOS DOS TALOS DA <i>Combretum fruticosum</i>	53
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA TRACHELOGENINA.....	54
4.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA TRACHELOGENINA FRENTE À LINHAGEM HCT-116 PELO MÉTODO DE EXCLUSÃO DO CORANTE AZUL DE TRYPAN.....	56
4.4	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DA LINHAGEM HCT-116 APÓS O TRATAMENTO COM TRACHELOGENINA.....	57
4.5	ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DA TRACHELOGENINA.....	59

4.5.1	Avaliação da integridade da membrana, da densidade das células e do ciclo celular de células HCT-116 tratadas com trachelogenina.....	59
4.5.2	Avaliação do padrão de morte celular.....	60
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÃO.....	78
	REFERÊNCIAS	81
	ANEXO A - EQUIPAMENTOS.....	91
	ANEXO B - SOLUÇÕES E KITS.....	92


1. INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER

O câncer é considerado uma doença complexa e de difícil tratamento caracterizado por um conjunto de doenças de fundo genético e/ou epigenético, que envolve crescimento desordenado de células anormais com potencial invasivo, sendo uma das patologias alvos de pesquisas para o desenvolvimento ou descoberta de novos fármacos (PINHO, 2005; KUMAR et al., 2010; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

Segundo as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012, houve 14,1 milhões de novos casos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer em todo o mundo. Em 2030, estima-se que a incidência global será de 21,4 milhões de novos casos e de 13,2 milhões de mortes por câncer como consequência do crescimento e do envelhecimento da população. No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, válida também para o ano de 2015, aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, comum em ambos os sexos, com incidência de 182 mil novos casos. Além disso, estima-se uma maior incidência de câncer de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral em homens e de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireóide em mulheres (Figura 1), reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014).

Figura 1. Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo no Brasil, exceto pele não melanoma.

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

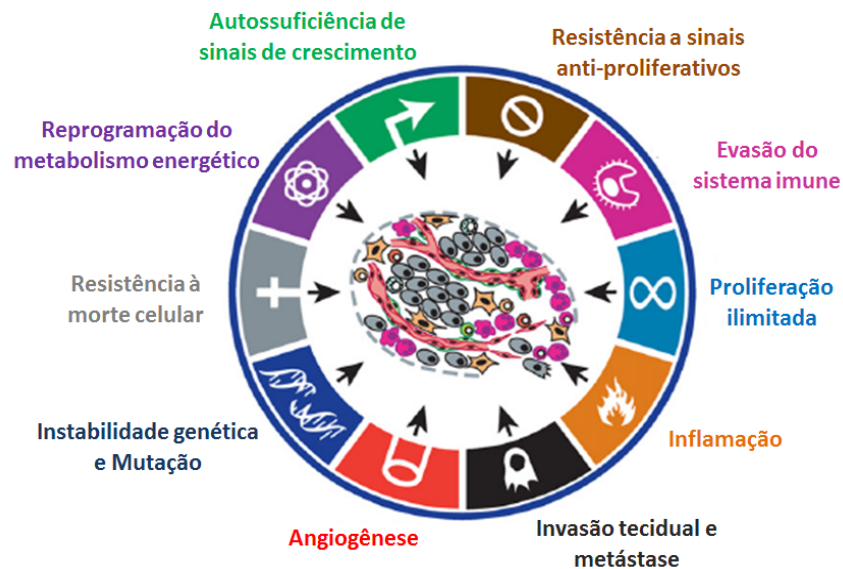
Fonte: Instituto Nacional de Câncer, 2014.

A homeostase do crescimento celular normal é mantida por meio de mecanismos que regulam a proliferação, como parada do crescimento e apoptose. As células tumorais mostram uma perda no controle da proliferação celular e, muitas vezes, tornam-se independentes de sinais mitogênicos para a sua progressão por meio das diferentes fases do ciclo celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LOURO et al., 2002). O princípio biomolecular do distúrbio proliferativo observado na carcinogênese baseia-se na presença de mutações gênicas que interferem na expressão normal de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular e da morte celular. A lesão genética ou a mutação, responsável pelo desenvolvimento de neoplasias, é resultante de mutações em células germinativas ou somáticas, sendo de origem hereditária ou adquirida, respectivamente (LOURO et al., 2002).

Os principais genes responsáveis pela complexidade do câncer são os proto-oncogenes, que promovem o crescimento celular, os genes supressores, que inibem o crescimento, e os genes reguladores de apoptose (ROBBINS; CONTRAN; KUMAR, 1995). A mutação nesses genes reguladores do ciclo celular resulta na perda do controle da proliferação celular (LOURO et al., 2002; FOSTER, 2008). Dessa forma, as alterações nos mecanismos de regulação do ciclo celular tornam a célula apta a passar pelo ciclo celular sem a devida checagem, permitindo o crescimento desordenado das células e o acúmulo de uma série de mutações que contribuem para o surgimento das características malignas do tumor (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O crescimento desordenado das células no câncer é resultado da autossuficiência na sinalização de fatores de crescimento e da insensibilidade destas células aos inibidores do crescimento. Além disso, elas têm a capacidade de evasão da morte celular programada e do sistema imunológico, apresentando um potencial replicativo ilimitado e de reprogramação do seu metabolismo energético, sendo capaz de invadir e formar metástase e de promover a angiogênese, o que resulta na imortalização das mesmas (Figura 2) (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2. Características essenciais do câncer



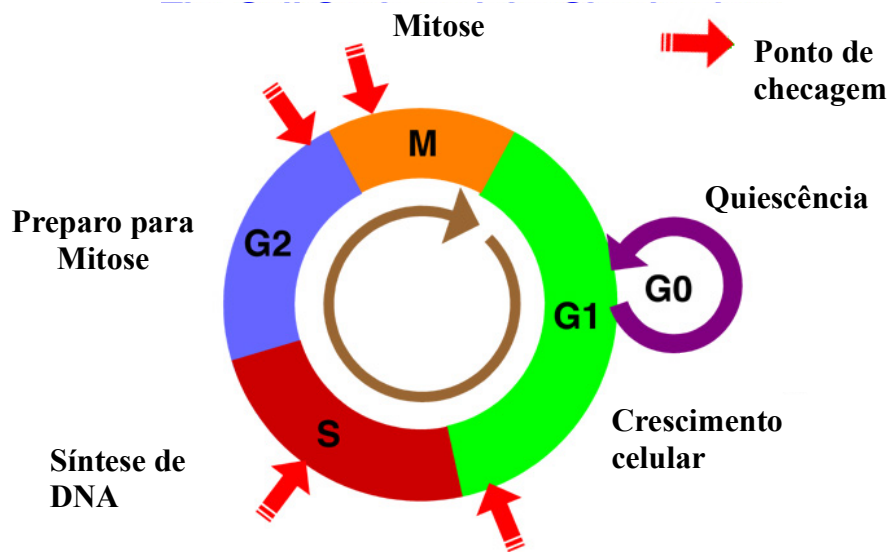
Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Além das características intrínsecas do câncer, é importante ressaltar que este se desenvolve em um microambiente complexo, do qual depende para seu crescimento sustentado, invasão e metástase. A interação entre as células tumorais e o estroma representa uma forte relação que influencia na iniciação e progressão da doença e no prognóstico do paciente (QUAIL; JOYCE, 2013). Como proposto por Paget em 1889, o microambiente de um tumor em desenvolvimento é um regulador crucial do crescimento tumoral.

1.2 Ciclo celular e o câncer

Durante o desenvolvimento celular, diferentes tipos de células são originados a partir de sucessivos ciclos de divisão celular e de processos de diferenciação celular característicos. No processo de ciclo celular, ocorre a replicação do DNA, na fase de síntese (fase S), seguida da segregação do material genético replicado em duas células filhas, na fase de mitose (fase M). Essas duas fases são precedidas por dois intervalos de preparo do material genético, fase G_1 e G_2 , responsáveis pela monitoração de uma nova replicação e entrada em mitose, respectivamente (Figura 3) (PINHO, 2005; FOSTER, 2008).

Figura 3. Fases do ciclo celular



Fonte: Adaptado de Foster (2008); Weinberg (2008).

Além disso, existem mecanismos moleculares de monitoramento da progressão do ciclo celular nos pontos de transição de uma fase a outra, denominados “*checkpoints*” ou pontos de checagem. Esses pontos controlam a progressão do ciclo, permitindo que as células entrem em mitose e se diferenciem, ou entrem em processo de morte celular programada ou que se mantenham na fase de quiescência, denominada fase G_0 (WEINBERG, 2008).

As células na fase G_1 integram uma série de sinais que ativam o processo de divisão celular, tornando-se comprometidas à duplicação do genoma. Durante essa fase, a célula se desenvolve, aumenta a quantidade de suas organelas e integra os diferentes sinais do microambiente para a tomada de decisão de início ou não do ciclo celular. É o intervalo correspondente ao período de crescimento celular e de uma atividade intracelular marcada pela síntese de RNA e proteínas, elementos essenciais para o início da fase S. A predominância de sinais mitogênicos faz com que o ponto de checagem G_1/S seja ultrapassado a fim de que as células avancem no ciclo e se proliferem (SIVIERO, 2013).

A fase de síntese ou fase S caracteriza-se pela ativação de complexos replicativos e pela duplicação do DNA, em que cada cromossomo é constituído por duas cromátides. O intervalo entre a fase S e a mitose é denominado fase G_2 . Nesta fase, as células apresentam-se com material genético já duplicado com duas cópias idênticas de cada um de seus cromossomos, sendo caracterizada pelo preparo do DNA e pela reorganização do esqueleto celular, permitindo a segregação adequada dos cromossomos na fase de mitose subsequente.

Antes de entrar em fase de mitose, as células passam por outro ponto de checagem (G_2/M) responsável por verificar a presença de erros no DNA. A fase M, por sua vez, é caracterizada pela mitose, em que ocorre a separação dos cromossomos pela citocinese, que é o processo pelo qual a célula divide o seu citoplasma gerando duas células-filhas independentes com o mesmo número de cromossomos da célula de origem (PINHO, 2005; ALMEIDA et al., 2005; SIVIERO, 2013).

Nos pontos de checagem, os mecanismos moleculares dependem da ação de um grande número de proteínas que são ativadas ou inativadas mediante um processo de fosforilação, sendo catalisado pela presença de enzimas do tipo proteínas quinases. Estas quinases, para realizar a função de fosforilar outras proteínas, necessitam estarem ligadas a outro grupo de proteínas, as ciclinas, sendo por isso, denominadas quinases dependentes de ciclinas (Cdk). Cada ciclina é específica para determinados períodos do ciclo celular, sendo a ciclina D sintetizada durante a fase G_1 , a ciclina E produzida nesta mesma fase, em uma etapa mais tardia, a ciclina A sintetizada na fase S e na fase G_2 enquanto que a ciclina B tem seus níveis celulares presentes durante as fases G_2 e M (BLAGOSKLONNY, 2001; PINHO, 2005; WEINBERG, 2008).

Vários estudos mostram que a desregulação do ciclo celular é uma característica comum das células tumorais. A principal diferença entre células normais e neoplásicas não é a velocidade de divisão celular, mas a capacidade de responder aos estímulos inibitórios que determinam sua saída do ciclo celular e entrada no período de quiescência (G_0) após a cessação do estímulo proliferativo (PINHO, 2005). As células neoplásicas são caracterizadas por proliferação ilimitada, instabilidade genômica com elevado potencial replicativo de células com mutações no DNA e aberrações cromossômicas (KASTAN; BARTEK, 2004; FOSTER, 2008).

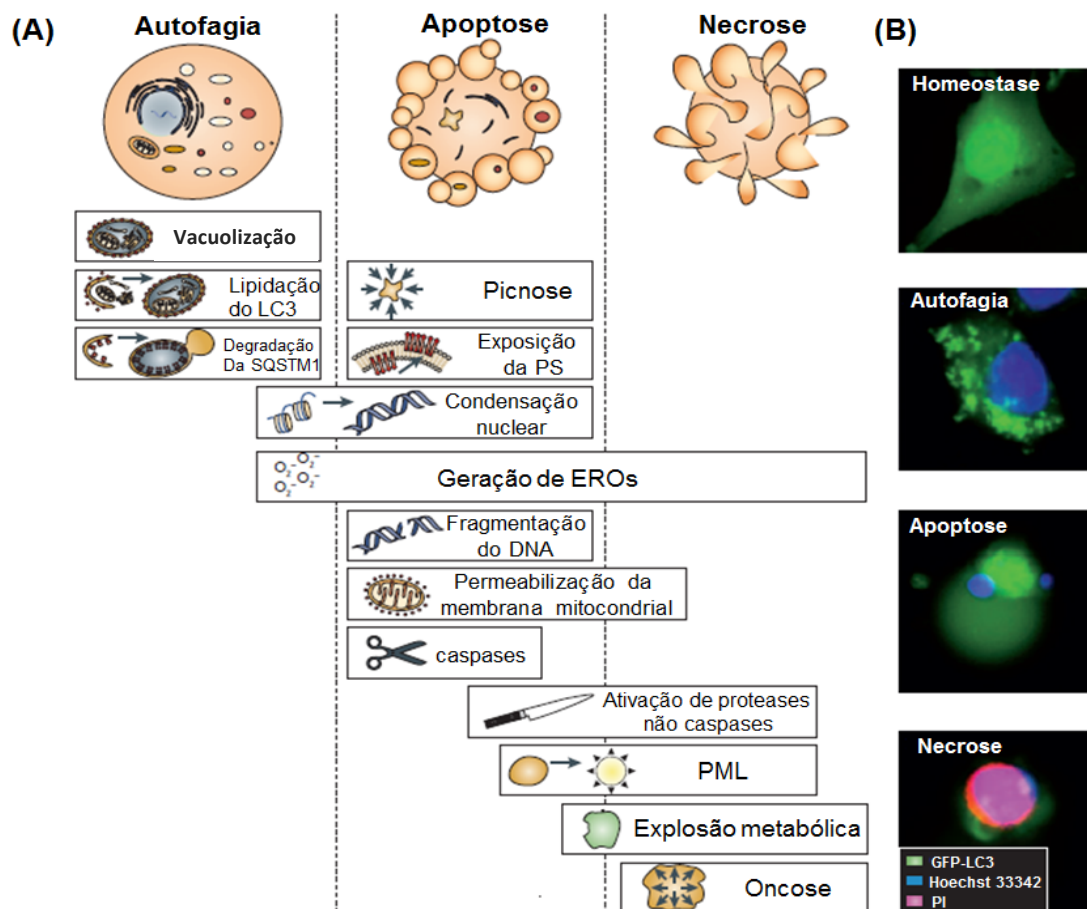
O aumento do número de divisões de células com mutações, resistentes aos fatores inibitórios de proliferação e a situações adversas como a hipóxia e a privação de nutrientes, permite que o tecido formado por células neoplásicas apresente maior crescimento do que as células normais. Esse acúmulo de células tumorais resulta não somente na ativação de oncogenes promotores do crescimento ou da inativação de genes supressores de tumor que suprimem o crescimento, mas também de mutações de genes que regulam a apoptose (PINHO, 2005; KUMAR et al., 2010).

1.3 Vias de morte celular e o câncer

A expansão clonal de uma célula neoplásica depende da sua capacidade proliferativa descontrolada e de sua resistência à morte celular programada. A morte celular programada é essencial para a eliminação de células indesejadas e prejudiciais durante o desenvolvimento, homeostase e patogenias de um organismo. As vias de morte celular são ativadas no intuito de impedir a propagação de células com mutações ou danificadas. O desequilíbrio ou a inativação desse processo é um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento de células neoplásicas. As principais vias de morte celular envolvidas no câncer são apoptose, autofagia e necrose, facilmente distintas pelas suas diferenças quanto às alterações morfológicas, bioquímicas e moleculares (Figura 4) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; KEPP et al., 2011; OUYANG et al., 2012).

A apoptose é um mecanismo de morte celular em que uma sequência de eventos leva à eliminação de restos celulares sem a liberação de substâncias nocivas na área circundante, sendo uma das principais responsáveis pela eliminação de células desnecessárias, danificadas ou velhas (GALLUZZI et al., 2007). Esse mecanismo de morte é caracterizado por alterações morfológicas, como compactação celular, condensação de cromatina, formação de prolongamentos na membrana, denominados “*blebs*”, e perda de adesão celular às células vizinhas ou à matriz extracelular, além de alterações bioquímicas como clivagem internucleossomal do DNA (LEE et al., 1999; OUYANG et al., 2012).

Figura 4- Características moleculares das vias de morte celular autofágica, apoptótica e necrótica (A); Detecção simultânea de múltiplos parâmetros relacionados à morte celular: células de osteosarcoma U2OS estavelmente expressando a proteína quimera fluorescente verde (GFP)-LC3 foram mantidas em condições de controle (homeostase) ou tratadas por 12 horas com 1 μ M de rapamicina (estimula a autofagia) ou 1 μ M de estaurosporina, quer sozinha (desencadeando a apoptose), ou junto com 20 μ M de Z-VAD-fmk (levando a necrose). As células foram então coradas com Hoechst 33342 (corante nuclear) e iodeto de propídio. As células autofágicas, apoptóticas e necróticas apresentaram GFP-LC3 agregação, condensação nuclear e captação de iodeto de propídio, respectivamente (B). LC3 – cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos; SQSTM1- Sequestossoma 1; PS – Fosfatidilserina, do inglês *Phosphatidylserine*; EROs – Espécies Reativas de Oxigênio; PML – proteína de leucemia promielocítica, do inglês *promyelocytic leukemia protein*



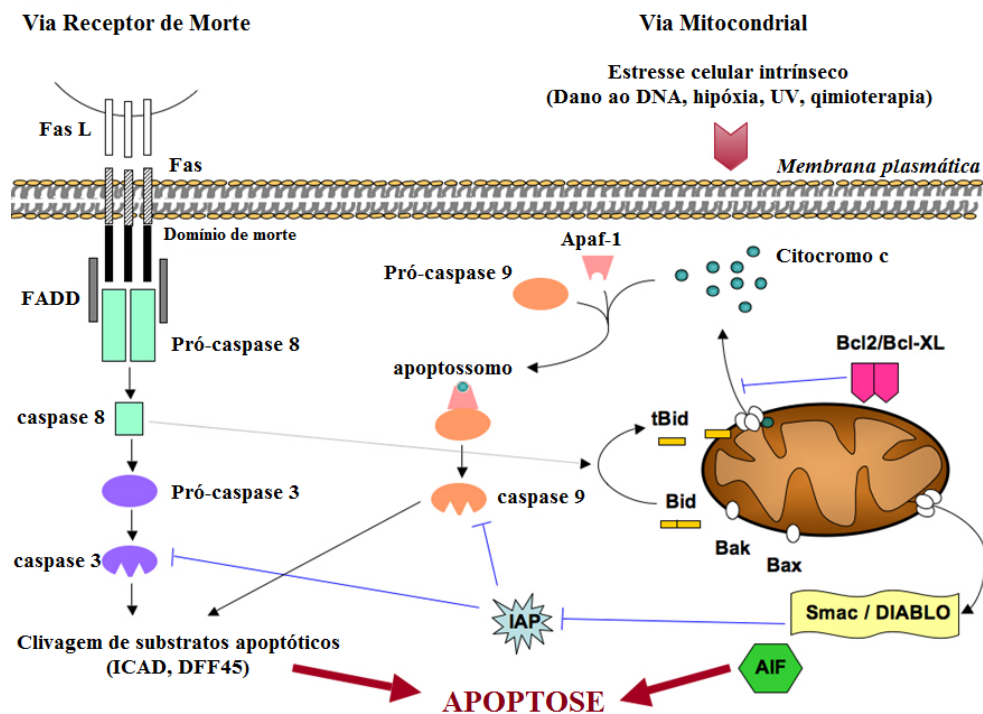
Fonte: Adaptado de Kepp et al. (2011).

Existem duas vias indutoras de apoptose, a via extrínseca que utiliza a via de receptor de morte e a via intrínseca ou via mitocondrial (Figura 5). A via extrínseca é desencadeada pela ligação do receptor de membrana Fas com seu ligante extracelular, Fas-L. A formação do complexo Fas/Fas-L ocorre quando a morte celular é estimulada. Este complexo ativa a pró-caspase-8 que desencadeia a ativação da pró-caspase-3, a penúltima enzima para a execução do processo apoptótico (OUYANG et al., 2012). As pró-caspases são ativadas por proteínas adaptadoras que fazem com que múltiplas cópias específicas, chamadas iniciadoras, se unam

e formem um complexo. Essas pró-caspases são dotadas de pequena atividade de protease e, quando forçadas a entrar no complexo, sua proximidade faz com que uma clive a outra, desencadeando uma cascata de amplificação proteolítica (ALBERTS et al, 2010).

A via intrínseca é controlada por pro-enzimas mitocondriais. Em ambos os casos, se uma célula é estimulada a iniciar o processo de morte celular tanto por estímulos extrínsecos quanto pelos sinais intracelulares, as membranas tornam-se permeáveis ao citocromo c, que é liberado no citosol. O citocromo c, por sua vez, recruta o Apaf-1 e a pró-caspase 9 para compor o apoptossomo, que desencadeia uma cascata de sinalização da caspase 9, resultando na apoptose (BELLANCE; LESTIENNE; ROSSIGNOL, 2009; OUYANG et al., 2012).

Figura 5. Desenho esquemático das vias indutoras de apoptose.



Fonte: Adaptado de Bellance, Lestienne e Rossignol (2009).

A autofagia é uma via de sobrevivência ativada em resposta a privação de nutrientes e outros estímulos estressantes, bem como ao estresse metabólico e à exposição a drogas anticâncer (CHEN; KARANTZA-WADSWORTH, 2009). É um processo catabólico que degrada os componentes celulares por meio de um mecanismo lisossomal, sendo um dos sistemas de degradação de proteína mais importantes em células eucarióticas. Existem três vias autofágicas distintas, denominadas microautofagia, autofagia mediada por chaperonas e macroautofagia, sendo esta última a mais estudada devido a suas características intrínsecas,

como a presença de vesículas de dupla membrana que carregam o material celular para os lisossomos (TANABE et al., 2011; VIJAYAKURUP et al., 2014).

Na microautofagia, a membrana lisossômica, por si só sequestra parte do citoplasma. Enquanto que, na autofagia mediada por chaperonas, proteínas que possuem uma sequência pentapeptídica específica ligam-se ao seu substrato alvo no citosol, depois a um receptor na membrana lisossômica e, posteriormente, serão descartadas por meio de uma translocação direta para o lúmen do lisossomo para a sua degradação. A macroautofagia, ou autofagia propriamente dita, é um mecanismo complexo que possui diferentes estágios. O primeiro é a indução ou iniciação, seguido pela nucleação, caracterizada pela formação da vesícula que será o fagóforo. Em seguida, ocorre o alongamento, em que há o crescimento da vesícula e consequentemente a sua maturação, que corresponde ao fechamento do autofagossomo e sua fusão com os lisossomos formando os autofagolisossomos, resultando nas fases finais de degradação e reciclagem (Figura 6) (TANABE et al. 2011; SIVIERO, 2013; XIA et al., 2013; VIJAYAKURUP et al., 2014).

Figura 6. Estágios do processo de autofagia



Fonte: Adaptado de Deretic e Klionsky (2008).

A autofagia possui um importante papel na homeostase celular, mantendo o controle de qualidade dos componentes celulares essenciais. O papel da autofagia como fonte de energia alternativa e como um mecanismo de sobrevivência temporal frente a condições de estresse é bem conhecido. No entanto, a presença de autofagossomos em células em processo de morte aumenta a possibilidade de que a autofagia pode ter, também, um papel no processo de morte celular ativo (CHEN; KARANTZA-WADSWORTH, 2009).

A via clássica da autofagia atua por meio do mTOR, uma proteína quinase importante no controle da tradução, progressão do ciclo celular e regulação negativa da autofagia. Além disso, existem outras vias de controle da autofagia, como o complexo Beclina-1/Vps34, em que há uma inibição da autofagia quando o Bcl-2 sequestra a Beclina-1, inativando o complexo. A formação e expansão da membrana dos autofagossomos são mediadas pelos sistemas de conjugação LC3 e Atg12. O LC3 em sua forma citosólica, conhecida como LC3-I, sofre uma clivagem na porção C-terminal, quando um sinal pró-autofágico é reconhecido pela célula, sendo convertido por proteínas ubiquitinas para formar o LC3-II, que é conjugado a um lipídeo, a fosfatidiletanolamina (SIVIERO, 2013).

A desregulação do processo de autofagia resulta em várias doenças humanas, incluindo miopatias, doenças neurodegenerativas, infecções microbianas, doenças inflamatórias e câncer. Com isso, o mecanismo pelo qual um defeito na autofagia contribui para a tumorigênese tem sido bastante investigado. Em tumores, a autofagia é ativada em áreas de hipóxia e mantém a sobrevivência da célula frente a condições de estresse metabólico. Assim, a indução da autofagia em resposta aos agentes anticâncer representa um mecanismo de sobrevivência ativado para minimizar os efeitos deletérios do estresse metabólico endógeno e, possivelmente, do tratamento em células tumorais. A indução da autofagia pelas células tumorais é capaz de remover proteínas e organelas que estão muito danificadas devido ao estresse induzido pelos agentes quimioterapêuticos, funcionando como um mecanismo de defesa (CHEN; KARANTZA-WADSWORTH, 2009; TANABE et al., 2011).

Por outro lado, a autofagia, quando ocorre de forma persistente, utilizando fármacos indutores de autofagia, por exemplo, pode resultar em eliminação de células tumorais. Isso porque, a autofagia descontrolada pode resultar em morte celular por meio da digestão de componentes citoplasmáticos essenciais em células tumorais. Além disso, a estimulação da autofagia e a preservação da aptidão celular pela manutenção do controle de qualidade de

organelas e proteínas, supressão de dano do DNA e instabilidade genômica, e limitação da inflamação associada à necrose pode ser um ponto chave na prevenção do câncer (CHEN; KARANTZA-WADSWORTH, 2009; VIJAYAKURUP et al., 2014).

Contudo, a resistência à morte celular programada é um importante mecanismo no processo de tumorigênese, assim como no desenvolvimento de resistência a drogas antitumorais. Isso tem despertado interesse na busca de novos fármacos antineoplásicos que atuem por mecanismos capazes de superar a resistência à morte celular pelas células tumorais, reativando essas vias com o objetivo de alcançar uma boa resposta clínica (RONINSON; BROUDE; CHANG, 2001; TSCHAN; SIMON, 2010).

1.4 Estratégias terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer

A carcinogênese é um processo de várias etapas resultante do acúmulo de múltiplas mutações. As células malignas apresentam diversos atributos fenotípicos, tais como crescimento excessivo, invasividade local e habilidade de formar metástase. No decorrer do tempo, os tumores se tornam mais agressivos e adquirem um maior potencial maligno. A heterogeneidade das células malignas é uma das características relacionadas com a agressividade do tumor. Isso porque, durante a carcinogênese ocorre o acúmulo independente de múltiplas mutações em diferentes células, gerando subclones com habilidades variadas de crescimento, invasão, metástase e resistência à terapia (KUMAR et al., 2010).

Com isso, algumas estratégias terapêuticas têm sido utilizadas no intuito de combater a carcinogênese, tais como intervenção cirúrgica, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, terapia gênica e hormonal, dentre outros (KUMAR et al., 2010). Muitas técnicas têm otimizado o tratamento dos pacientes, no entanto, nem sempre alcançando resultados satisfatórios, apresentando elevadas taxas de recidiva do tumor e o aparecimento de metástases devido, principalmente, à heterogeneidade das células malignas, além de induzir muitos efeitos colaterais (SALGALLER; LODGE, 1998).

A remoção cirúrgica do tumor é eficaz nos estágios iniciais da doença quando não há metástase, sendo, na maioria das vezes associada a outras terapias. Dentre estas, é utilizada a radioterapia, com o uso de raios gama e radioisótopos, a fim de aumentar a eficiência do tratamento. A radioterapia é uma técnica antineoplástica muito utilizada, podendo reduzir o tamanho do tumor, evitar o aparecimento de metástases ou de recidivas. No entanto, o

tratamento por radiação oferece muitas limitações devido aos efeitos colaterais observados (ALMEIDA et al., 2005). Atualmente, a imunoterapia tem sido utilizada como tratamento coadjuvante, eliminando células tumorais residuais após intervenção cirúrgica ou outro tratamento, por meio da estimulação das células de defesa do corpo (ALMEIDA et al., 2005; LOUIS et al., 2012).

O uso dessas medidas locais no tratamento do câncer tem sido eficaz em cerca de um terço dos pacientes nos estágios iniciais da doença. No entanto, os demais casos necessitam de uma intervenção sistêmica, sendo a quimioterapia uma alternativa de tratamento. A quimioterapia tem como objetivo destruir as células tumorais, interferindo no processo de crescimento, divisão e invasão celular, preservando as células normais (FULDA; DEBATIN, 2004; ALMEIDA et al., 2005; SOUZA et al., 2007).

Os fármacos quimioterápicos podem ser administrados isoladamente (monoquimioterapia) ou combinados (poliquimioterapia). A terapia farmacológica combinada tem sido utilizada no tratamento de neoplasias com o objetivo de aumentar a eficácia do tratamento e de evitar a resistência tumoral aos fármacos. O uso combinado de medicamentos com diferentes alvos terapêuticos é capaz de otimizar as respostas do paciente ao tratamento (SOUZA, 2004). Entretanto, a quimioterapia pode oferecer efeitos secundários, principalmente sobre células normais de crescimento rápido, como as gastrointestinais, as do sistema imunológico e os capilares, resultando em diversos efeitos colaterais, como, diarreia, náuseas, vômitos, alopecia e imunodepressão (ALMEIDA et al., 2005; BRANDÃO et al., 2010).

A busca por novos fármacos específicos para as células neoplásicas, com toxicidade reduzida e índice terapêutico favorável tem sido um desafio para indústria farmacêutica, a fim de reduzir os efeitos colaterais resultantes do tratamento com quimioterápicos (ALMEIDA et al., 2005). Diante disto, é importante que novas estratégias terapêuticas sejam desenvolvidas a fim de eliminar a massa tumoral, protegendo as células normais e minimizando o desconforto do paciente, tornando-se mais eficaz (BRANNON-PEPPAS; BLANCHETTE, 2004). Isso tem motivado as pesquisas, incluindo a busca por novos medicamentos antineoplásicos desenvolvidos a partir de produtos naturais.

1.5 Produtos naturais como fonte de substâncias antineoplásicas

Desde a antiguidade, as propriedades farmacológicas de produtos naturais são utilizadas no tratamento de doenças. Em 1985, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimou que aproximadamente 65% da população mundial utilizava a medicina popular derivada de plantas como cuidado primário de saúde (CRAGG; NEWMAN, 2013). O conhecimento sobre produtos naturais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Estes produtos podem ser originados de plantas, animais, micróbios ou organismos marinhos (TULP; BOHLIN, 2004; BRANDÃO et al., 2010).

A natureza dispõe de uma abrangente diversidade química. As plantas são importantes fontes de novas substâncias, devido, principalmente, aos seus metabólitos secundários utilizados para modular seu próprio metabolismo e para se defender do ataque de herbívoros e patógenos. Estes metabólitos são moléculas de constituição química complexa com potencial terapêutico para doenças humanas (FERREIRA; PINTO, 2010; BRANDÃO et al., 2010).

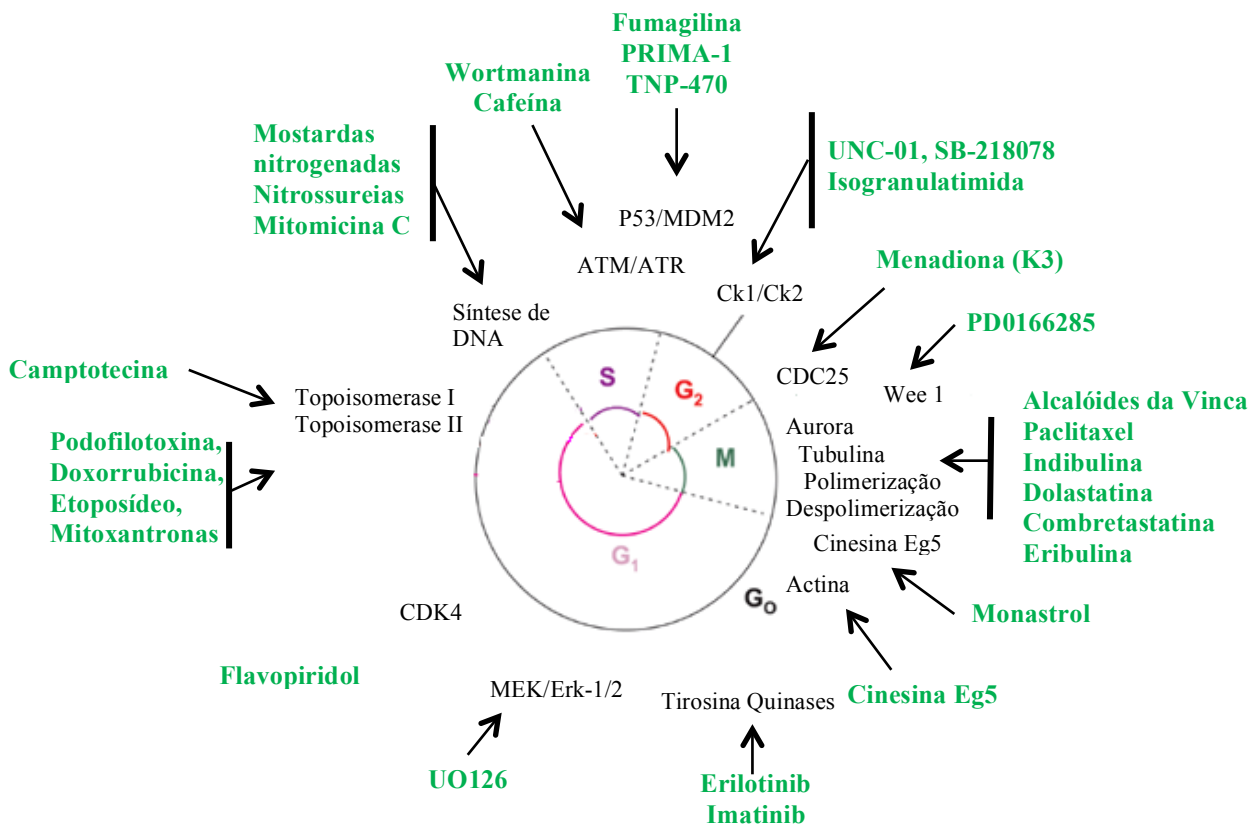
Até o século XIX, os recursos terapêuticos eram constituídos predominantemente por plantas e extratos vegetais; ou seja, as plantas medicinais e os extratos destas constituíam a maioria dos medicamentos (SIMÕES et al., 2010). Com isso, um grande avanço na indústria farmacêutica foi dado na pesquisa de produtos naturais de origem vegetal no século XX (CRAGG; NEWMAN, 2013). Nos últimos anos, a importância dos organismos vegetais como fontes produtivas de substâncias anticancerígenas e outras atividades biológicas reativaram interesses sociais e econômicos, superando obstáculos na construção de um cenário crescente. Hoje, os produtos naturais formam a base dos produtos terapêuticos (BRAZ, 2010).

A pesquisa e a produção de fármacos a partir de produtos de origem vegetal exige uma equipe multidisciplinar. Inicialmente, a planta é coletada e identificada por um botânico, etnobotânico ou ecólogo. Geralmente, o estudo de determinada planta possui uma relação taxonômica com outros compostos ativos já isolados de plantas da mesma espécie ou pela sua utilização na medicina popular. A partir do preparo do extrato do material, é realizada uma triagem biológica por meio de ensaios farmacológicos. A presença do efeito farmacológico direciona o processo de isolamento de compostos químicos ativos, guiado por testes de atividade biológica (MACIEL et al., 2002; CARVALHO, 2006). Com isso, além das investigações estruturais, técnicas de biologia celular, análise genética e modulação química

têm sido realizadas a fim de descobrir o mecanismo de ação desses compostos, por meio da determinação dos sítios celulares envolvidos (KANG et al., 2014).

A diversidade química dessas moléculas oferece atividades biológicas variadas por meio de diferentes mecanismos, conferindo a elas, por exemplo, atividade antiproliferativa, citotóxica e ou antiangiogênica. Desse modo, baseado na ampla variação biológica da carcinogênese, as pesquisas buscam moléculas que atuam por mecanismos específicos, como inibição da polimerização da tubulina e inibição da topoisomerase I e II, no intuito de encontrar tratamentos mais efetivos e seletivos (BRANDÃO et al., 2010). Muitos fármacos utilizados no tratamento do câncer atuam sobre as células que se encontram em diferentes fases do ciclo celular, sendo conhecidas como ciclo-celular específicos, sendo a maior parte desses antineoplásicos de origem natural (Figura 7) (ALMEIDA et al., 2005).

Figura 7. Atividade dos agentes antineoplásicos ciclo celular específicos.

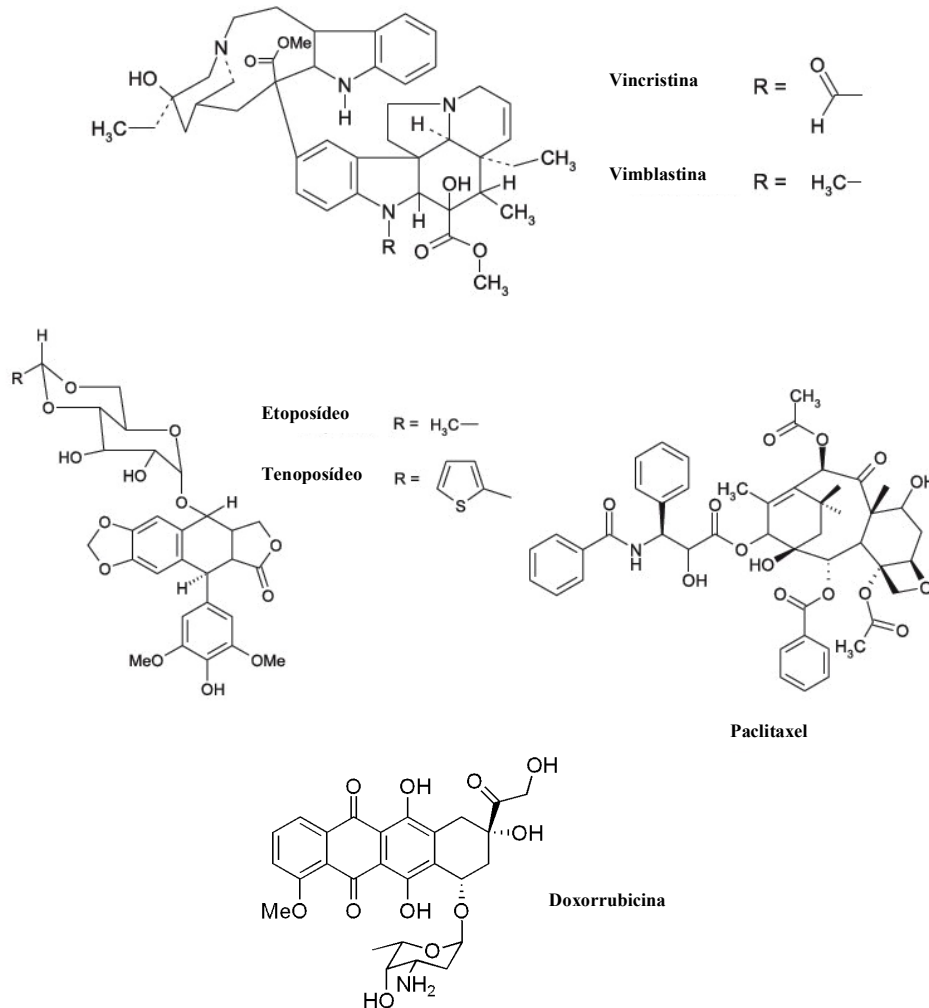


Fonte: Adaptado de Cragg; Grothaus; Newman (2009); Meijer (2003).

Os alcalóides da vinca, vincristina e a vimblastina (Figura 8), são exemplos de substâncias isoladas da *Catharanthus roseus*, conhecida como Vinca rósea, primeiramente utilizada no tratamento da diabetes, sendo descoberta e confirmada sua ação farmacológica

como agente anticancer (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009). Os alcalóides da vinca atuam inibindo o fuso mitótico, ligando-se às proteínas microtubulares e, conseqüentemente, interrompendo a divisão celular na metáfase (ALMEIDA et al., 2005).

Figura 8. Estrutura química da vincristina, vimblastina, etoposídeo, tenoposídeo, paclitaxel e doxorubicina.



Fonte: Adaptado de Almeida et al. (2005).

Outra substância de origem natural utilizada para o tratamento do câncer é o Paclitaxel, isolado da casca do teixo das espécies *Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*, nomeado comercialmente como Taxol[®] (Figura 8), responsável pela inibição do fuso mitótico por meio do bloqueio da formação de microtúbulos, que resulta no bloqueio da multiplicação celular e na perda da viabilidade celular (WANI et al., 1971; ALMEIDA et al., 2005; BRANDÃO et al., 2010). Além destes, pode-se destacar diversas outras classes de moléculas com atividade antineoplásica, como a doxorubicina, a podofilotoxina e seus análogos etoposídeo e tenoposídeo (Figura 8), a camptotecina e seus análogos topotecano e irinotecano, que atuam

na inibição da topoisomerase I ou II (COSTA-LOTUFO et al., 2010; CRAGG; NEWMAN, 2013).

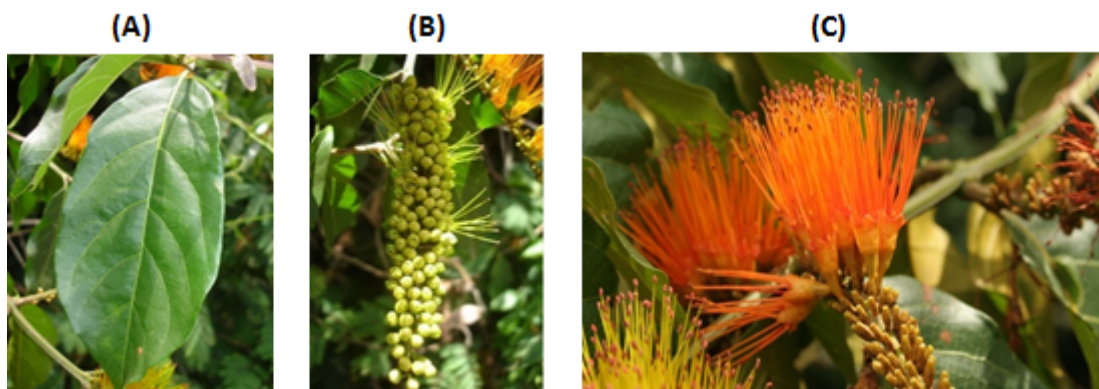
A contribuição dos produtos naturais na descoberta de novos fármacos para tratamento do câncer tem amplo potencial, visto que menos de 2% das plantas superiores foram exploradas, a fim de detectar novos compostos com atividade anticâncer (COSTA-LOTUFO et al., 2010). A extensa área e a variedade de zonas climáticas do Brasil contribuem para sua diversidade ecológica, tornando o país detentor de 20% do número total de espécies do planeta, sendo muitas dessas espécies endêmicas (KATO, 2001; PINTO et al., 2002). Esta biodiversidade representa para a sociedade brasileira uma região de enorme importância científica, econômica, social, cultural e ambiental, sendo um enorme potencial para a descoberta de medicamentos baseados em produtos naturais (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

1.6 *Combretum fruticosum*

A família Combretaceae, composta por ervas, arbustos e árvores, compreende cerca de 20 gêneros e 600 espécies que se encontram amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, como na África e no Brasil. Os maiores gêneros pertencentes a esta família são *Combretum* e *Terminalia*, com cerca de 370 e 200 espécies, respectivamente (LIMA et al., 2012). As plantas pertencentes a esses gêneros são utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças abdominais, infecções bacterianas, câncer, dismenorrea, febre, úlcera gástrica, doenças cardíacas, pneumonia, doenças de pele, dentre outras (ELOFF; KATERERE; MCGAW, 2008). Estudos fitoquímicos realizados no gênero *Combretum* demonstraram a ocorrência de muitas classes de componentes, incluindo triterpenos, lignanas, flavonóides e aminoácidos não proteicos, entre outros (LIMA et al., 2012).

A espécie *Combretum fruticosum* é uma trepadeira (Figura 9) encontrada em florestas tropicais e subtropicais, nas regiões do México a Argentina. No Brasil, recebe o nome popular de escovinha, escova-de-macaco alaranjada e flor de fogo (BRAGA et al., 2007). Essa espécie, ainda pouco estudada, tem algumas atividades biológicas descritas, como inibidora da enzima conversora de angiotensina (BRAGA et al., 2007; SERRA et al., 2005) e efeito citotóxico (NASCIMENTO; MELLO; CHIAPPETA, 1985).

Figura 9. Fotos de *Combretum fruticosum*. Folha (A), frutos (B) e flor (C)



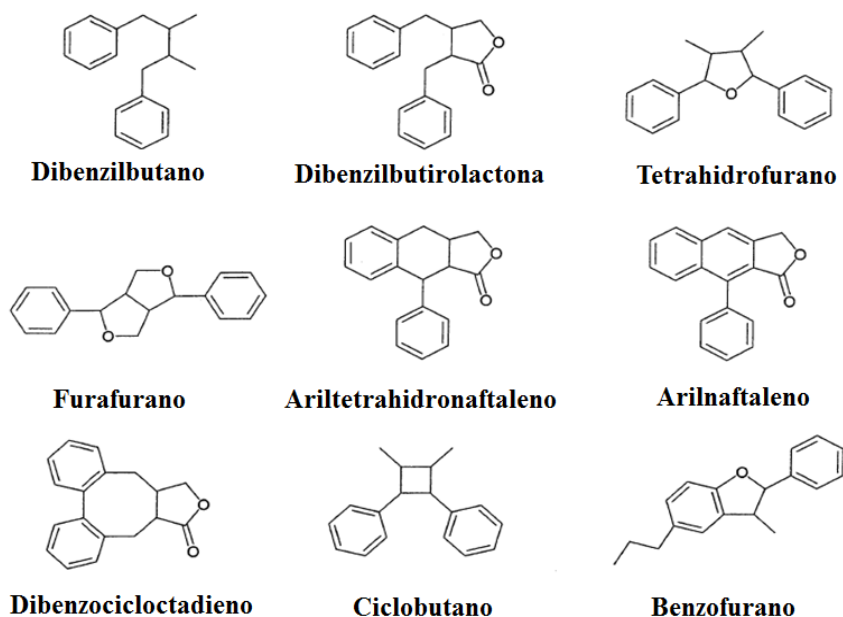
Fonte: http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=5024. Fotógrafo: Eduardo L. H. Giehl.

1.7 Lignanas

As lignanas são uma classe bem conhecida de produtos naturais com grande diversidade estrutural e biológica. Elas são largamente distribuídas em numerosas espécies de plantas e estão presentes em diferentes níveis de abundância em todas as partes da planta, incluindo as raízes, rizomas, madeira, casca, folhas, caules, flores, frutos e sementes (AYRES; LOIKE, 1990). Centenas de compostos têm sido identificadas em dezenas de famílias de plantas (LAMBLIN et al., 2008).

As lignanas são divididas em diversos tipos, tais como dibenzilbutirolactonas (artigenina, trachelogenina e savinina), furofuranos (pinoresionol e eudesmina) e dibenzilbutanos (secoisolariciresinol) (Figura 10) (CHO et al., 2001). O termo lignana foi introduzido por Harworth em 1942 (GOTTILIEB; YOSHIDA, 1984) a fim de descrever um grupo de produtos naturais caracterizados pela presença de duas unidades ligadas por meio de carbonos centrais. Esses compostos são, em sua maioria, polifenóis derivados da fenilalanina caracterizados pela dimerização de duas unidades de fenilpropanóide (C6-C3) ligadas por meio de carbonos centrais de suas cadeias laterais, apesar de alguns oligômeros terem sido relatados. A dimerização fenilpropanóide, a incorporação de oxigênio e o esqueleto funcional podem ocorrer de diferentes formas, aumentando a variedade estrutural dessas moléculas (MACRAE; TOWERS, 1984; LEE; XIAO, 2003).

Figura 10. Representação dos esqueletos das lignanas



Fonte: Adaptado de Lee; Xiao (2003).

O amplo uso farmacológico das lignanas está relacionado com suas atividades antitumorais, antivirais, hepatoprotetoras, antagonistas do fator de ativação plaquetária, dentre outras. A variedade estrutural dessas moléculas é a principal responsável pela diversidade de atividades biológicas observadas nessa classe. Com isso, as lignanas representam uma classe de produtos naturais bioativos com diversas atividades biológicas, sendo uma classe de moléculas promissora para o desenvolvimento de agentes terapêuticos (LEE; XIAO, 2003).

1.7.1 Mecanismo anticâncer das lignanas

A atividade de lignanas e de seus metabólitos na quimioprevenção da carcinogênese tem sido relacionadas com suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e fitoestrogênicas, bem como suas habilidades de inibir a proliferação, invasão e angiogênese e de promover a apoptose (BOBE et al., 2012). Algumas lignanas estão presentes em fibras, como na linhaça. Quando ingeridas, são metabolizadas em enterolignanas que inibem a proliferação de células tumorais (LAMBLIN et al., 2008; ZHOU et al., 2013). As enterolignanas são capazes de inibir moderadamente a aromatase, enzima envolvida na produção de estrona a partir de andrógenos, reduzindo o crescimento tumoral. Além disso, inibem a proliferação celular endotelial vascular e a angiogênese (CORDEIRO; FERNANDES; BARBOSA, 2009).

Nas últimas décadas, os fitoestrógenos têm despertado interesse devido a sua relação com a prevenção do câncer. O efeito antioxidante provido por algumas enterolignanas tem sugerido a diminuição do risco de desenvolvimento do câncer. Além disso, numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os fitoestrógenos podem inibir o crescimento tumoral. Esse grupo diverso de compostos não-esteroidais sintetizados por plantas apresentam como maiores classes os isoflavanóides e as lignanas. Dentre estes, as lignanas mais estudadas são secoisolariciresinol e a matairesinol (ABARZUA et al., 2012).

Estudos realizados até 1984 destacaram a atividade citotóxica e citostática antitumoral de 33 lignanas através de modelos *in vitro* e *in vivo* (MACRAE; TOWERS, 1984). De todas as lignanas derivadas de plantas conhecidas, a mais estudada é a podofilotoxina. O extrato alcoólico da planta podofilina foi o primeiro citado em 1942 como tratamento tópico de verrugas venéreas causadas por papiloma vírus (CHARLTON, 1998). Atualmente, a podofilotoxina é a lignana ariltetralínica com atividade antitumoral mais conhecida, sendo um componente bioativo das espécies *Podophyllum peltatum*, *P. emodi* e *P. pleianthum* (LEE; XIAO, 2003).

Apesar do uso terapêutico da podofilotoxina como droga anticâncer não ter sido possível devido a sua alta toxicidade, alguns acetatos glucosídicos semi-sintéticos, etoposídeo e teniposídeo, análogos dessa substância, são frequentemente utilizados no tratamento clínico de vários cânceres (BHATTACHARYYA et al., 2012). O etoposídeo, por exemplo, é clinicamente usado no tratamento do câncer de pulmão e de testículo. O mecanismo de ação dos análogos da podofilotoxina incluem a prevenção da formação da tubulina dentro dos microtúbulos ou a inibição da atividade catalítica da Topoisomerase II do DNA. (DAMAYANTHI; LOWN, 1998; CHENG et al., 2014).

Além da podofilotoxina, outros tipos de lignanas e neolignanas têm sido caracterizadas como inibidoras da polimerização da tubulina. Algumas lignanas do tipo dihidrobenzofuranos, pertencentes à classe de neolignanas, apresentaram atividade antitumoral em estudos *in vitro* contra várias linhagens de células tumorais. Estes compostos são capazes de inibir a mitose em concentrações da ordem de micromolar em cultura de células (PIETERS et al., 1999). Além disso, outras lignanas dihidrobenzofuranos apresentaram atividade antiangiogênica em ensaios em membrana corioalantóide (APERS et al., 2002).

As lignanas do tipo dibenzociclooctadieno são conhecidas por apresentarem potente atividade antioxidante e, conseqüentemente, podem demonstrar atividade antitumoral (CHEN et al., 2002). Como exemplo, a gomisina A, a schisandrina A e B e a schisanterina A são capazes de reverter a resistência a múltiplas drogas ou de aumentar o efeito citotóxico de agentes anticâncer (LI et al., 2006; WAN et al., 2006). Estes efeitos podem estar relacionados com a inibição da proliferação celular por meio da modulação de proteínas envolvidas no ciclo celular, resultando na indução da parada do ciclo (KIM et al., 2010).

Alguns estudos sugerem que as lignanas do tipo dibenzilbutirolactona, classe de substâncias isolada neste trabalho, têm um efeito preventivo contra tipos de câncer hormônio-dependentes tais como câncer de mama, de próstata e de cólon (ADLERCREUTZ, 2002). Essas substâncias são agentes citostáticos potentes contra células leucêmicas humanas HL-60 (HIRANO; GOTOH; OKA, 1994) e apresentam atividade antitumoral (MORITANI et al., 1996; TAKASAKI et al., 2000).

A exploração da diversidade química das lignanas e neolignanas tem resultado em diversos compostos interessantes para o tratamento do câncer. Muito ainda pode ser explorado a fim de que novos compostos sejam descobertos e desenvolvidos.

1.8 Relevância e justificativa

Atualmente, o câncer é considerado um problema de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de 12% de todas as causas de óbito no mundo. Segundo a União Internacional Contra o Câncer, a incidência da doença alcançará quase 20 milhões de pessoas em 2020 (BARBOSA, 2009). O câncer é um conjunto de mais de 100 doenças, caracterizado pelo crescimento desordenado de células anormais, capazes de invadir outros tecidos e órgãos. A complexidade da doença e o difícil tratamento tornou essa patologia alvo de pesquisa para o desenvolvimento e descoberta de novos fármacos (KUMAR et al., 2010).

O Brasil possui a maior diversidade vegetal do mundo com cerca de 60 mil espécies de plantas superiores, conferindo ao país uma farmacopeia popular com uma grande variedade de plantas medicinais (ENGELKE, 2003; MELO et al., 2007). A utilização de substâncias derivadas de produtos naturais tem crescido com o passar dos anos devido aos efeitos adversos dos fármacos sintéticos, ao maior conhecimento científico acerca da eficácia e segurança das espécies vegetais, ao aprimoramento de novos métodos de controle de

qualidade, e também ao menor valor de compra em comparação com os fármacos sintéticos (MELO et al., 2007).

As lignanas são moléculas com amplo uso farmacêutico devido a suas atividades antitumorais, antivirais, hepatoprotetoras e antagonistas do fator de ativação plaquetária, dentre outras. A amplitude de atividades biológicas oferecida por esses compostos tem despertado interesse na pesquisa e busca de novos fármacos para o tratamento de doenças. Muito interesse tem sido focado na sua eficácia como agente antineoplásico. A pesquisa nesta área tem revelado vários mecanismos de ação relacionados com o controle do crescimento celular. Do ponto de vista molecular, essa classe de moléculas é conhecida por ligar-se a tubulina de microtúbulos, interromper o transporte de nucleotídeos e a síntese de DNA e por inibir certas enzimas de forma específica, tais como, enzimas associadas com proliferação celular (proteína quinase C), ornitina descarboxilase, DNA topoisomerase (MACRAE; TOWERS, 1984; LEE; XIAO, 2003).

Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito antiproliferativo *in vitro* de compostos isolados a partir do extrato etanólico dos talos da *Combretum fruticosum*, bem como, estudar os possíveis mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa da trachelogenina, uma lignana do tipo dibenzilbutirolactona.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o efeito antiproliferativo *in vitro* de compostos isolados a partir do extrato etanólico dos talos da *Combretum fruticosum*.

2.2 Objetivos Específicos

- Comparar o efeito dos compostos isolados da *C. fruticosum* sobre a proliferação de linhagens de células tumorais;
- Avaliar a atividade antiproliferativa da trachelogenina em linhagens de células tumorais e não tumorais;
- Comparar os efeitos tempo e concentração dependente da trachelogenina em linhagens células de glioblastoma (SF-295) e de câncer colorretal (HCT-116) de origem humana;
- Identificar o possível mecanismo de ação antiproliferativo da trachelogenina por meio de testes de viabilidade celular e análise morfológica em linhagem de células de câncer colorretal de origem humana (HCT-116);
- Determinar o efeito da trachelogenina sobre a progressão do ciclo celular em linhagem de células de câncer colorretal de origem humana (HCT-116);
- Identificar o mecanismo molecular de indução de morte celular pela trachelogenina em linhagem de células de câncer colorretal de origem humana (HCT-116).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

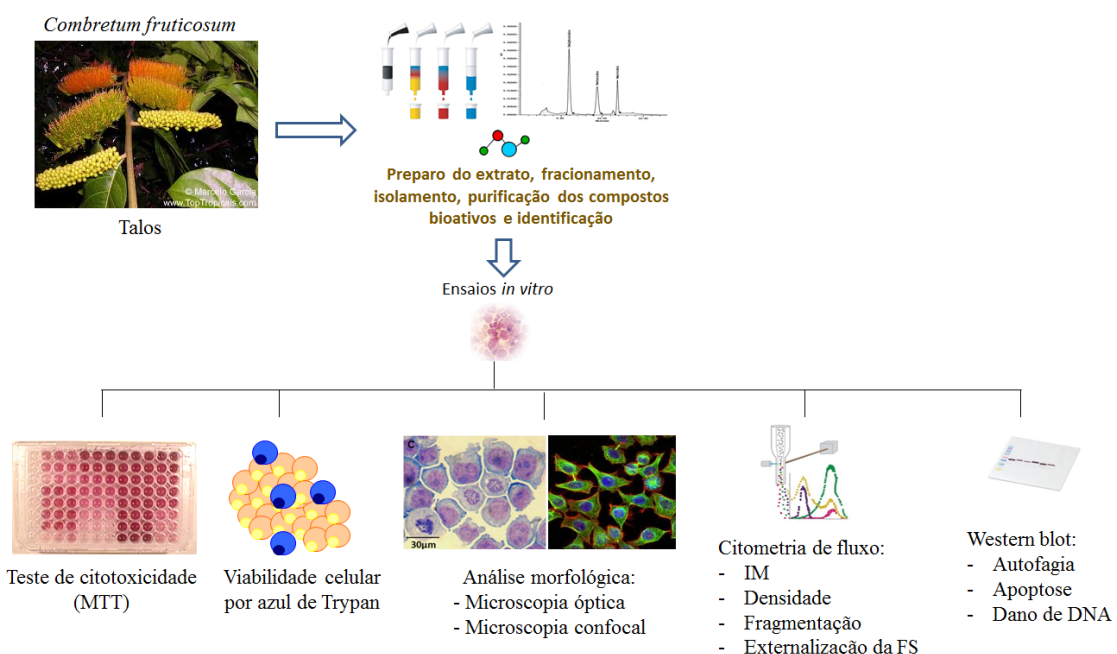
3.1 Materiais utilizados

A descrição dos equipamentos, *softwares* de aquisição e análise de dados, bem como o fabricante dos reagentes utilizados está detalhada no Anexo A. As soluções preparadas e a descrição dos componentes dos kits utilizados estão detalhadas no Anexo B.

3.2 Desenho experimental

Os talos da *C. fruticosum* foram coletados em julho de 2008 no município de Caucaia-CE. A partir dos talos, foi preparado o extrato etanólico, seguido do fracionamento, isolamento, purificação e identificação dos compostos bioativos. A atividade citotóxica destes compostos foi avaliada utilizando o método do MTT. Após a identificação da atividade antiproliferativa da trachelogenina, foi realizado o estudo dos possíveis mecanismos de ação envolvidos nesta atividade, utilizando o ensaio de viabilidade celular por exclusão do azul de Trypan, analisando a morfologia das células por microscopia óptica e confocal, estudando os eventos celulares por citometria de fluxo e a expressão de proteínas por *Western blot*. A figura 11 apresenta o desenho experimental onde está descrito resumidamente todas as etapas deste trabalho.

Figura 11. Desenho experimental.



Legenda: IM – Integridade de membrana; FS - Fosfatidilserina

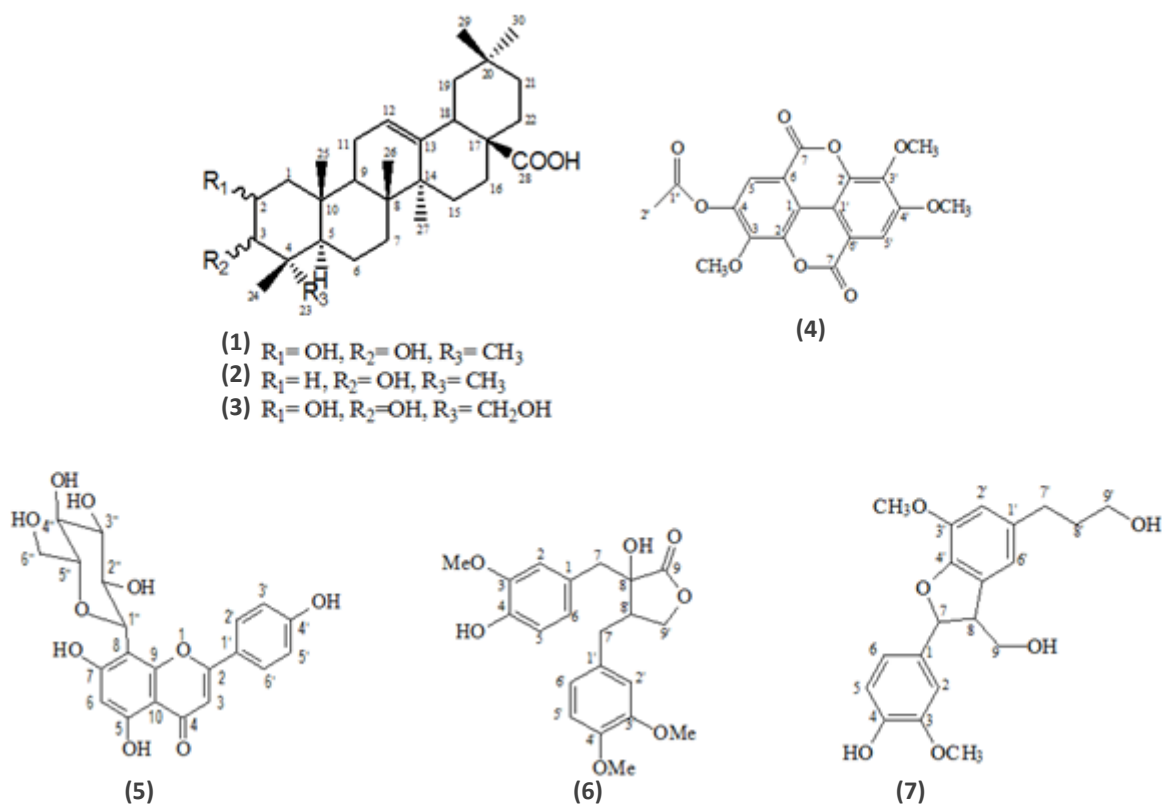
3.3 Metodologia experimental

3.3.1 Isolamento e identificação das amostras

O material vegetal da *Combretum fruticosum* foi coletado em julho de 2008 no quilômetro 15 da BR 020, no município de Caucaia-CE, pelo Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, da Universidade Federal do Ceará (UFC), sendo identificado pela Profa. Dra. Maria Iracema Bezerra Loiola, botânica da mesma instituição. A exsicata referente à coleta da planta encontra-se depositada no Herbário Prisco Bezerra, no Departamento de Biologia da UFC, sob número de registro 43054.

O isolamento e a identificação dos compostos isolados dos talos da *Combretum fruticosum* (Figura 12) foram realizados pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Otilia Deusdênia L. Pessoa e do Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira, com a colaboração da Dra. Thiciana da Silva Sousa, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

Figura 12. Estruturas dos compostos isolados dos talos da *Combretum fruticosum*. (1) ácido maslínico, (2) ácido oleanólico e (3) ácido arjunólico, (4) 4'-O-acetil-3', 3,4-tri-O-metil ellagico, (5) apigenina 8-C- β -D-glucosideo, (6) (-)-trachelogenina, (7) vladinol F.



As substâncias foram obtidas a partir do extrato etanólico dos talos da *C. fruticosum*, resultante da investigação química desta planta. O fracionamento foi guiado pela identificação dos extratos e frações mais ativos para a inibição da proliferação de linhagens de células tumorais, sendo estes estudos de citotoxicidade realizados em parceria com o Laboratório de Oncologia Experimental. As estruturas dos compostos foram determinadas por métodos espectroscópicos, principalmente Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais como COSY (do inglês *Correlation Spectroscopy*), HSQC (do inglês, *Heteronuclear Simple Quantum Correlation*) e HMBC (do inglês, *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*), além de Infra-vermelho (IV). Os compostos identificados foram encaminhados para investigação da atividade antiproliferativa frente a linhagens de células tumorais. Após a triagem inicial, a trachelogenina foi escolhida para dar seguimento ao estudo do mecanismo de ação antiproliferativo desta substância. A molécula apresenta fórmula molecular $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7$ e peso molecular de 388,411 g/mol, sendo relatada pela primeira vez no gênero *Combretum*.

3.3.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

3.3.2.1 Linhagens celulares

As linhagens tumorais utilizadas para a avaliação da atividade antiproliferativa foram obtidas através de doação pelo Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (US-NCI, do inglês *United States – National Cancer Institute*). A linhagem 3T3-L1 foi obtida a partir do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), enquanto as células mononucleadas de sangue periférico (CMSP) foram obtidas de voluntários sadios, sendo utilizadas como modelo para a avaliação da citotoxicidade sobre células não tumorais (Tabela 1).

Tabela 1. Linhagens celulares testadas durante o estudo

Linhagem celular	Tipo histológico	Origem	Concentração de plaqueamento (cél/mL)
HCT-116	Carcinoma colorretal	Humana	7×10^4
HCT- 8	Carcinoma colorretal	Humana	7×10^4
HL -60	Leucemia prómielocítica	Humana	3×10^5
OVCAR-8	Carcinoma ovariano	Humana	1×10^5
PC-3	Adenocarcinoma de próstata	Humana	1×10^5
SF-295	Glioblastoma	Humana	1×10^5
3T3-L1	Fibroblastos não transformados	Murino	7×10^4
CMSP	Células mononucleadas do sangue periférico	Humana	1×10^6

3.3.2.2 Manutenção das linhagens celulares

As linhagens celulares foram manuseadas em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar vertical (VECO, modelo Biosafe 12, classe II) e mantidas em incubadora de CO₂ a 37°C com atmosfera de 5% de CO₂ (NUAIRE, modelo TS Autoflow).

As linhagens tumorais foram cultivadas em garrafas de cultura de células de 25 cm² com volume de 50 mL ou de 75 cm² com volume de 250 mL em meio RPMI 1640 (Gibco), e as células 3T3-L1 foram cultivadas em DMEM (Gibco), ambos suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina/estreptomicina). A manutenção foi feita antes que as células atingissem determinada confluência. O crescimento das linhagens foi acompanhado diariamente por microscópio de inversão (ZEISS, modelo Axiovert 40C).

Para a manutenção de células aderidas, o meio era retirado e a garrafa era lavada 2x com PBS estéril, em seguida, adicionava-se tripsina-EDTA 0,5% (Gibco) diluída 10X em solução tampão (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Solution*), a fim de suspender as células. Depois de suspensas, a ação da tripsina era inibida pela adição de meio suplementado com SBF. Parte das células era removida da garrafa e o volume era preenchido com meio completo. Para manutenção de células suspensas, apenas trocava-se o meio.

3.3.2.3 Obtenção das células mononucleadas do sangue periférico (CMSP)

As células mononucleadas foram obtidas do sangue periférico de voluntários sadios coletado em tubos tipo *Vacutainer* contendo solução de EDTA K₂ (BD Vacutainer®). Após a coleta, 5 mL de sangue total foram diluídos em PBS (1:1) e vagarosamente depositados sobre 2 mL de Ficoll®-Hypaque (Sigma). Posteriormente foi realizada a centrifugação por 30 minutos a 1500 rpm para separação das fases da solução. As células mononucleadas concentram-se na camada localizada na interface entre o plasma (fase clara) e os eritrócitos (fase escura). As CMSP foram transferidas para outro tubo onde foi acrescentado PBS até atingir um volume final de 11 mL, sendo então centrifugado por 20 minutos a 1000 rpm. Esse procedimento foi repetido e o pellet de CMSP foi ressuspensionado em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (para uma concentração final de 100 U/mL penicillina, 100 µg/mL estreptomicina). Para estimular a proliferação dos linfócitos, foi adicionado ao meio 2% do agente mitogênico fito-hemaglutinina (Sigma). As células foram contadas e diluídas para uma concentração final de 1×10^6 células /mL e a citotoxicidade do composto foi testada utilizando o método do MTT (3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio).

3.3.2.4 Avaliação da atividade antiproliferativa *in vitro* - método do MTT

O ensaio do MTT é um método colorimétrico que tem como objetivo quantificar a atividade mitocondrial por meio da redução do sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT), de cor amarela, resultando na formação de cristais de formazan, de cor púrpura, em células metabolicamente ativas. Os metabólitos primários envolvidos do ciclo de Krebs, NADH₂, NADPH e Succinato são os principais envolvidos nesta reação, em que a atividade metabólica da célula é dependente do número de células e está diretamente relacionada com a quantidade de MTT metabolizada, sendo a quantificação realizada por absorvância em espectrofotômetro (MOSMANN, 1983).

As células em suspensão ou monocamadas foram plaqueadas em multiplacas de 96 cavidades, sendo a concentração de plaqueamento determinada de acordo com as linhagens a serem testadas descritas na Tabela 1. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C a 5% CO₂, 100 µL de amostra teste diluídas em meio completo foram adicionadas e as placas foram novamente incubadas por 72 horas. As placas foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 min e, em seguida, o sobrenadante foi retirado. Foi adicionado em cada poço 150 µL de

solução de MTT (0,5 mg/mL), diluído em meio RPMI 1640, e as placas foram reincubadas por 3 horas. Após o período de incubação, as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm por 10 min e o sobrenadante retirado. Para realização da leitura em espectrofotômetro de placa (Beckman Coulter Inc., modelo DTX-880) com absorvância de 595 nm, o formazan foi ressuspenso em 150 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado em cada poço. Para leitura foi utilizado o programa *Multimode Detection Software* (Beckman Coulter Inc.).

Para a análise dos dados, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0. Os valores das absorvâncias, resultantes dos testes das frações em concentração única, foram transformados em porcentagem de inibição, sendo comparado ao controle negativo. Estes dados foram analisados com base na média \pm erro padrão da média da triplicata de no mínimo três experimentos. Quando testadas em diluição seriada, foi feita a determinação da concentração inibitória média (CI₅₀) com os respectivos intervalos de confiança (IC 95%), obtidos por regressão não linear.

3.3.2.5 Avaliação da atividade antiproliferativa pelo método de exclusão por azul de Trypan

A exclusão por azul de Trypan é um método quantitativo de avaliação da viabilidade celular, que permite quantificar separadamente células viáveis e células não viáveis. O corante penetra em todas as células, no entanto, apenas as células metabolicamente ativas (viáveis) conseguem expulsar o Trypan para fora, enquanto que nas não viáveis é observada uma coloração azulada (PERES; CURI, 2005).

Para a realização do teste, as células HCT-116 em suspensão foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 7×10^4 células/mL e incubadas por 24 e 48 h com a trachelogenina nas concentrações de 2,5, 5 e 10 µM. Estas concentrações foram utilizadas nos demais métodos realizados, sendo baseada na concentração inibitória média (CI₅₀) determinada pelo método do MTT, após 48 horas de incubação. A doxorubicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,4 µM. Após os períodos de incubação as células foram transferidas para tubos eppendorf, que em seguida foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm. O pellet foi ressuspenso em 1 mL de PBS. Em uma alíquota de 90 µL de suspensão de células, foram adicionados 10 µL de azul de Trypan 0,4%. As células viáveis e não viáveis foram contadas em câmara de Neubauer.

Os dados foram analisados com base na média \pm erro padrão da média da triplicata de de quatro experimentos. Para verificação da ocorrência de diferença estatística significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por teste Student Newman-Keuls para comparação entre grupos, com significância de 5% ($p < 0,05$).

3.3.2.6 Análise morfológica – Coloração diferencial com panótico rápido

A coloração com kit panótico rápido (Laborclin®) permite a visualização das características morfológicas das células por meio da coloração diferenciada da membrana celular, do citoplasma e do núcleo, sendo utilizado para sugerir o possível mecanismo de morte celular, seja por apoptose, necrose ou autofagia.

As células HCT-116 em suspensão foram plaqueadas em placas de 24 poços na concentração de 7×10^4 células/mL e incubadas por 24 e 48 h com trachelogenina nas concentrações de 2,5, 5 e 10 μ M. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,4 μ M, e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo. Após os períodos de incubação, as células foram transferidas para tubos eppendorf e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS. As lâminas foram preparadas com o uso de uma Citocentrífuga (modelo CT-2000, Cientec). Em seguida, as lâminas foram fixadas com solução de triarilmetano a 0,1%, coradas com solução a 0,1% de xantenos e com solução de 0,1% de tiazinas (Laborclin®). O tempo de imersão em cada solução foi de aproximadamente 5 segundos. As lâminas foram lavadas com água destilada para remover o excesso de corante. Depois de secas foram montadas com lamínulas fixadas com Entellan® e visualizadas em microscópio óptico.

O efeito da trachelogenina nas células HCT-116 foi observado por análise morfológica do núcleo e do citoplasma usando microscopia óptica com aumento de 200x (Olympus, Tokyo, Japan), comparando com o controle negativo e positivo.

3.3.3 Estudo do mecanismo de ação

3.3.3.1 Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma importante alternativa de estudo dos eventos celulares, caracterizada pela análise destes eventos em condições vitais da célula. No citômetro, as

células são individualmente conduzidas em canal de corrente fluida, em que, ao interceptar o feixe de luz, geralmente proveniente de um laser, causam sua dispersão em várias direções dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e da densidade óptica de cada célula. A detecção de um feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionada com o tamanho celular, que se dá por dispersão linear (FSC, *Forward Scatter*), enquanto que a captação de um desvio ortogonal está relacionada com a complexidade da célula, em particular sua granulosidade, que ocorre por dispersão lateral (SSC, *Side Scatter*). Além disso, é capaz de detectar a fluorescência emitida por marcadores utilizados, classificando cada célula com um evento (SHAPIRO, 1995).

As células HCT-116 do controle foram tratadas com o veículo da amostra teste (DMSO). Como controle positivo foi utilizado a doxorrubicina (0,4 μM). Para a análise do efeito da trachelogenina, as células foram tratadas nas concentrações de 2,5, 5 e 10 μM . As células foram analisadas utilizando o citômetro Guava easyCyte™ 6-2L. Para todos os parâmetros avaliados pela técnica de citometria de fluxo, 5 mil eventos foram adquiridos por cada replicada de cada amostra. Os debris foram omitidos da análise. Cada experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.

A análise dos dados da citometria de fluxo foi feita com base na média \pm erro padrão da média; e para a verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste Student Newman-Keuls, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.3.3.1.1 Avaliação da integridade da membrana, da densidade de células e da morfologia celular

O teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo (PI, do inglês, *Propidium Iodide*) de penetrar nas células, cuja membrana esteja rompida (não-viáveis), e se ligar ao DNA, emitindo alta fluorescência vermelha quando é excitado pelo laser. As células com membrana íntegra emitem baixa fluorescência (SHAPIRO, 1995).

Após 48 horas de tratamento, uma alíquota de 100 μL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 μL de uma solução de PI a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (diluído em tampão fosfato). Após 5 minutos as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. Foram obtidas informações sobre densidade, morfologia (espalhamento frontal e lateral da luz, o que

corresponde ao tamanho e granulosidade relativa entre as células, respectivamente) e integridade de membrana celular utilizando-se o filtro para o espectro do vermelho (DARZYNKIEWICZ et al., 1992).

3.3.3.1.2 Análise de conteúdo e fragmentação de DNA

Esse teste baseia-se na capacidade do PI se ligar ao DNA. Inicialmente, a membrana plasmática das células foi permeabilizada por um detergente, permitindo que o iodeto de propídeo ligue-se ao DNA de todas as células. Células com o núcleo íntegro emitirão alta fluorescência, e aquelas que apresentam núcleos com condensação da cromatina e DNA fragmentado incorporam menos o iodeto de propídeo e por isso emitem menor fluorescência. Além disso, o PI se intercala proporcionalmente à quantidade de DNA da célula, permitindo mensurar as fases do ciclo celular por meio da quantidade de DNA presente em cada fase do ciclo.

Uma alíquota de 100 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 µL de uma solução de lise (0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de Triton X-100 e 2 µg/mL iodeto de propídeo em PBS). Após o período de incubação por 40 minutos no escuro, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo.

Os gráficos do ciclo celular foram analisados no programa ModFit LT (Verity Software House).

3.3.3.1.3 Avaliação da Externalização da Fosfatidilserina – Anexina V

A translocação da fosfatidilserina (PS, do inglês *phosphatidylserine*), um fosfolípido normalmente localizado na face interna da membrana plasmática, para a face externa da célula é um evento associado aos primeiros estágios do processo de apoptose. Este ensaio permite diferenciar células viáveis, apoptóticas e necróticas pela coloração diferencial por fluorescência. Anexina-V é uma proteína com alta afinidade por PS e que, conjugada à ficoeritrina (PE, do inglês *Phycoerythrin*), emite fluorescência amarela quando ligada, possibilitando a identificação de células em apoptose. O corante 7-AAD penetra as membranas celulares desintegradas e se liga ao núcleo, emitindo fluorescência vermelha. A estratégia da coloração dupla fornecida pelo reagente Guava® Nexin permite a identificação de quatro populações distintas: células sem marcação são consideradas normais (ou viáveis); células com coloração amarela são tidas como em apoptose inicial; células vermelhas são

consideradas necróticas; e células reconhecidas pelos dois corantes são identificadas como em apoptose tardia, pois, nos estágios finais, as membranas das células apoptóticas perdem a integridade.

Após o tratamento por 48 horas, uma alíquota de 100 μL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi incubada com 100 μL da solução de Guava Nexin® (Guava Technologies). Após 20 minutos de incubação à temperatura ambiente no escuro, as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo. A fluorescência da anexina V conjugada com a ficoeritrina foi mensurada por fluorescência amarela a 583nm e o 7AAD na fluorescência vermelha a 680nm. As percentagens de células viáveis e de células em apoptose inicial e tardia foram calculadas.

3.3.3.2 Detecção de organelas de vesículas ácidas por coloração com laranja de acridina

A laranja de acridina é um corante acidotrópico que se acumula em organelas ácidas de maneira dependente de pH. Em pH neutro, a laranja de acridina é uma molécula verde fluorescente hidrofóbica que cora o citoplasma e núcleo das células emitindo fluorescência verde. Em ambientes ácidos, a laranja de acridina sofre modificações físico-químicas e passa a emitir fluorescência no espectro laranja.

Para visualizar a presença de células autofágicas, as células HCT-116 foram plaqueadas e tratadas com a amostra teste por 48 horas nas concentrações de 5 μM e 10 μM . Após o período de incubação, as células foram coradas com uma solução de laranja de acridina (1 mg/mL) e de Hoechst 33342 (10 $\mu\text{g/mL}$) e mantidas no escuro a 37°C por 15 minutos. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com tampão de solução salina (PBS) e foram analisadas utilizando microscopia confocal com comprimentos de onda de excitação de 543 e 560-620 nm, respectivamente (ZEISS, modelo LSM 710). A solução de Hoechst 33342 (10 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada para corar o núcleo das células, com comprimento de onda de excitação e emissão de 350 e 461 nm, respectivamente.

Todas as imagens obtidas no microscópio confocal foram processadas utilizando o programa ZEN 2008, sendo apresentadas com a mesma ampliação.

3.3.3.3 Avaliação da expressão proteica por *Western blot*

O *Western blot*, também chamado de *immunoblot*, é um método bioquímico e molecular utilizado para detectar a expressão proteica de uma determinada proteína em uma amostra, usando um anticorpo mono ou policlonal específico para a proteína de interesse (SIVIERO, 2013).

O procedimento de realização do ensaio do *Western blot* consiste em várias etapas: extração e quantificação de proteínas totais das células submetidas ao tratamento com o composto, separação das proteínas desnaturadas por peso molecular em eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, eletrotransferência das proteínas para uma membrana capaz de ligar proteínas e a revelação de proteínas específicas por meio de sondas do anticorpo respectivo por um método colorimétrico que se baseia na reação da enzima fosfatase alcalina sobre o substrato NBT/BCIP, resultando em uma marcação de cor púrpura na membrana (TOWBIN; STAEBELIN; GORDON, 1979).

Os anticorpos primários utilizados no experimento foram PARP íntegro e clivado, γ H2AX, Bcl2, LC3-A, LC3-B e Beclina 1. O anticorpo β -actina (Cell Signaling Technology®) foi utilizado como referência experimental. Os anticorpos secundários *anti-mouse* IGg (Cell Signaling Technology®) e *anti-rabbit* IGg (Cell Signaling Technology®) ligados a fosfatase alcalina foram utilizados na detecção final das proteínas. Todos os anticorpos foram solubilizados em BSA 5%, diluídos de 1:1000, exceto a β -actina e os anticorpos secundários que foram preparados em diluição de 1:2000.

3.3.3.3.1 Extração de proteínas

As células HCT-116 foram tratadas com o veículo (DMSO), com Trachelogenina nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M e com a doxorrubicina na concentração de 0,4 μ M, utilizado controle positivo do estudo, durante 24 e 48 horas de incubação. Para o processo de extração, as células foram tripsinizadas e centrifugadas e o pellet lavado duas vezes com PBS. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado em tampão RIPA *Lysis Buffer* (Milipore) 1X acrescido de um coquetel de inibidores de proteases (1:100 v/v), ortovanodato de sódio (1:100 v/v) e PMSF (1:100 v/v). As amostras foram colocadas em gelo por duas horas, sendo sonicadas a cada 20 minutos. Ao final, as amostras foram centrifugadas a 13000

rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado, separado em alíquotas e armazenado a -20°C.

3.3.3.2 Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas totais extraídas das células foi realizada por meio de método colorimétrico com o kit *DC Protein Assay* (BioRad Laboratories), utilizando o método de Lowry. Para isso, uma curva padrão de BSA (0,2-2 mg/mL; Sigma) diluída em tampão RIPA completo foi utilizada para a calibração do método. O tampão RIPA completo foi utilizado para marcar o branco experimental. Em seguida, 5 µL de cada amostra foi plaqueado em triplicata em placa de 96 poços. Foram adicionados em todos os poços 25 µL de reagente A' (20 µL de reagente S + 1 mL de reagente A) seguido de 200 µL de reagente B (BioRad Laboratories). As amostras foram incubadas por 10 minutos no escuro sob agitação leve e lidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 620 nm.

A curva de BSA foi gerada por regressão linear no programa GraphPad Prism 5.0, sendo plotado um gráfico da absorbância *versus* quantidade de proteínas. Os valores de absorbância obtidos de cada amostra foram aplicados a equação da curva para determinar as concentrações de proteína.

3.3.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A separação das proteínas totais baseada no peso molecular foi realizada por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida em um sistema vertical (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). Após a montagem do sistema vertical (BioRad, modelo mini-PROTEAN® Tetra Cell), o gel de resolução foi confeccionado para uma concentração final de 12,5% em tampão Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8 (BioRad Laboratories). O gel de concentração foi colocado sobre o gel de 12,5%, com concentração final de 5% de poliacrilamida em tampão Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 (BioRad Laboratories). O detalhamento das soluções utilizadas e o preparo dos géis estão apresentados no Anexo B.

O marcador de peso molecular *Full-Range Rainbow Marker* (12-225 kDa; GE Healthcare) foi usado sempre no primeiro poço da esquerda para monitorar a separação das proteínas. Foi aplicado nos poços do gel de concentração 15 µg de proteína total de cada amostra, carregada com o tampão *Blue Juice 5X* (5:1 v/v; Invitrogen). A corrida de eletroforese foi realizada sob voltagem constante de 100 V e amperagem livre

(para duas placas; fonte elétrica PowerPac™, modelo HCPower Supply) à temperatura ambiente, utilizando um tampão de corrida para eletroforese. O tempo de corrida variou entre 1h e 40 minutos a 2 horas.

3.3.3.3.4 Eletrotransferência

As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de PVDF Hybond-P (GE Healthcare). Para isso, o gel foi colocado em contato com a membrana previamente lavada em metanol entre esponjas e papéis de filtro banhados na solução de transferência (detalhado no Anexo B). A eletrotransferência foi realizada pelo modo de imersão (BioRad, modelo MiniTrans Plot Modulo) sob voltagem livre e amperagem de 400 mA por 1h e 20 minutos a 4°C (fonte elétrica PowerPac™, modelo HCPower Supply).

3.3.3.3.5 Imunodeteção

Após a transferência, as membranas foram incubadas em solução de leite desnatado 3% em TBS por uma hora sob agitação constante, a fim de bloquear ligações proteicas inespecíficas. Após o período de incubação, foram realizadas três lavagens com TBS-Tween 0,1% (TBS-T) de 5 minutos e mais uma lavagem com TBS. As membranas foram, então, incubadas *overnight* a 4°C com os anticorpos primários diluídos em solução de BSA 5% em TBS. Após o mesmo processo de lavagens realizadas anteriormente com TBS-T e TBS, as membranas foram incubadas por uma hora com o anticorpo secundário acoplado à enzima fosfatase alcalina diluído em solução de leite desnatado 5% em TBS por 1 hora, sob agitação. Em seguida, as membranas foram novamente lavadas para a revelação com aproximadamente 1 mL de solução reveladora (BCIP®/NBT solution, premixed-Sigma) e incubadas no escuro até a indicação colorimétrica desejada. Após a revelação, as membranas foram lavadas em água destilada.

3.3.3.3.6 Análise de dados

As membranas foram fotografadas por um captador de imagens (GE Healthcare, modelo ImageQuant® 300), utilizando para aquisição e edição o programa ImageQuant®300 (GE Healthcare).

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade citotóxica dos compostos isolados dos talos da *Combretum fruticosum*

O fracionamento do extrato etanólico dos talos da *C. fruticosum* resultou no isolamento de sete metabólitos secundários: três triterpenos de esqueleto oleano, (1) ácido maslínico, (2) ácido oleanólico e (3) ácido arjunólico, duas misturas de esteroides, (4) 4'-O-acetil-3', 3,4-tri-O-metil ellagico e (5) apigenina 8-C- β -D-glicosídeo e duas lignanas, (6) (-)-trachelogenina e (7) vladinol F. Os compostos isolados foram encaminhados ao Laboratório de Oncologia Experimental para a investigação da atividade antitumoral. O efeito antiproliferativo dos compostos foi avaliado *in vitro* contra as linhagens celulares tumorais HL-60, OVCAR-8, HCT-116 e SF-295, utilizando o método colorimétrico do MTT. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo no estudo. Os valores de CI_{50} após 72 horas de tratamento estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Avaliação da atividade citotóxica dos compostos isolados dos talos da *Combretum fruticosum* frente a linhagens de células tumorais avaliados pelo ensaio do MTT após 72 horas de incubação. (1) ácido maslínico, (2) ácido oleanólico e (3) ácido arjunólico, (4) 4'-O-acetil-3', 3,4-tri-O-metil ellagico, (5) apigenina 8-C- β -D-glicosídeo, (6) (-)-trachelogenina e (7) vladinol F.

Compostos	CI_{50} (μ M)			
	Intervalo de confiança de 95%			
	HL-60	OVCAR-8	HCT-116	SF-295
1	11,2 (8,2-14,8)	22,8 (18,4-28,7)	17,9 (15,6-20,5)	20,3 (17,3-23,7)
2	-	-	-	-
3	25,3 (14,3-45,0)	23,1 (20,4-26,2)	19,8 (17,6-22,3)	30,2 (22,9-40,1)
4	> 55	> 55	> 55	> 55
5	> 55	> 55	> 55	> 55
6	32,4 (18,5-57,1)	3,5 (2,6-4,6)	1,9 (1,6-2,3)	0,8 (0,67-0,95)
7	> 55	> 55	> 55	> 55
Doxorrubicina	0,03 (0,02-0,03)	0,45 (0,29-0,53)	0,21 (0,16-0,29)	0,41 (0,21-0,47)

Os valores de CI_{50} estão apresentados em μ M e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa GraphPad Software versão 5.0. Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses.

Dentre os compostos testados, 1, 3 e 6 foram citotóxicos frente às linhagens tumorais testadas. No entanto, o composto 6, identificado como trachelogenina, apresentou maior citotoxicidade contra as linhagens OVCAR-8, HCT-116 e SF-295, sendo este composto escolhido para o estudo dos possíveis mecanismos de ação envolvidos na sua atividade antiproliferativa. Os demais compostos não apresentaram atividade citotóxica até a concentração de 55 μM (Tabela 2).

4.2 Avaliação da atividade citotóxica da trachelogenina

O efeito antiproliferativo da trachelogenina foi avaliado em outras linhagens de células tumorais e não tumorais, a fim de expandir o painel de linhagem testadas, utilizando o método colorimétrico do MTT em concentrações que variaram de 0,2 a 64,3 μM , após 72 horas de incubação. Os valores de concentração inibitória média (CI_{50}) estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Potencial antiproliferativo da trachelogenina em linhagens tumorais e não tumorais avaliado pelo ensaio do MTT, após 72 h de incubação.

LINHAGENS		CI_{50} (μM) Intervalo de confiança de 95%
Tumorais	HCT-116	1,9 (1,6-2,3)
	HCT-8	5,2 (4,1-6,8)
	HL-60	32,4 (18,5-57,1)
	OVCAR-8	3,5 (2,6-4,6)
	PC-3	15,02 (10,9-20,8)
	SF-295	0,8 (0,67-0,95)
Não-tumorais	3T3-L1	> 64,3
	CMSP	> 64,3

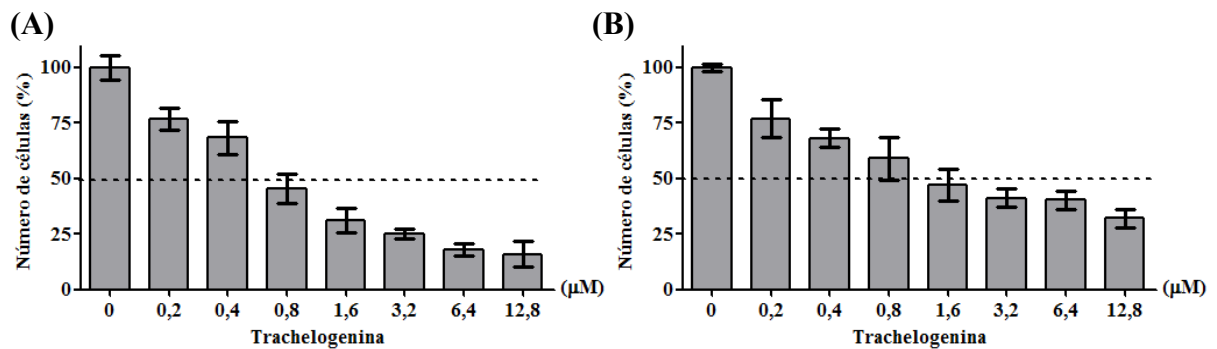
Os valores de CI_{50} estão apresentados em μM e foram calculados a partir de regressão não linear utilizando o programa Prism versão 5.0 (GraphPad Software). Os intervalos de confiança (IC 95%) foram obtidos por meio de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata, sendo mostrados entre parênteses.

O estudo do perfil antiproliferativo da Trachelogenina mostrou potente atividade citotóxica em algumas linhagens de células tumorais, com valores de CI_{50} que variaram de 0,8 μM a 32,4 μM para linhagens de glioblastoma (SF-295) e leucêmica (HL-60), respectivamente. Não foi possível mensurar os valores de CI_{50} do composto contra linhagem de células não tumorais de fibroblastos murino (3T3-L1) e em células mononucleadas do

sangue periférico humano (CMSP), visto que os valores de CI_{50} foram maiores que a maior concentração testada (64,3 μ M).

Além disso, pode ser observado que não há um padrão evidente de seletividade por uma determinada origem histológica. Entretanto, deve-se ressaltar que a trachelogenina exibiu maior atividade frente às linhagens de glioblastoma (SF-295) e de carcinoma colorretal (HCT-116), apresentando diferente perfil de inibição entre as linhagens após 72 horas de tratamento (Figura 13).

Figura 13. Perfil do potencial antiproliferativo da trachelogenina frente às linhagens SF-295 (A) e HCT-116 (B) após 72 horas de tratamento determinado pelo método MTT.



Diante dos resultados acima descritos, foi realizada uma análise temporal da atividade antiproliferativa do composto frente a estas linhagens, utilizando concentrações seriadas, após 24 e 48 horas de tratamento. Os valores de CI_{50} foram determinados pelo teste do MTT e estão exibidos na Tabela 4.

Tabela 4. Potencial antiproliferativo da trachelogenina frente às linhagens SF-295 e HCT-116 após 24, 48 e 72 horas de incubação determinado pelo método MTT.

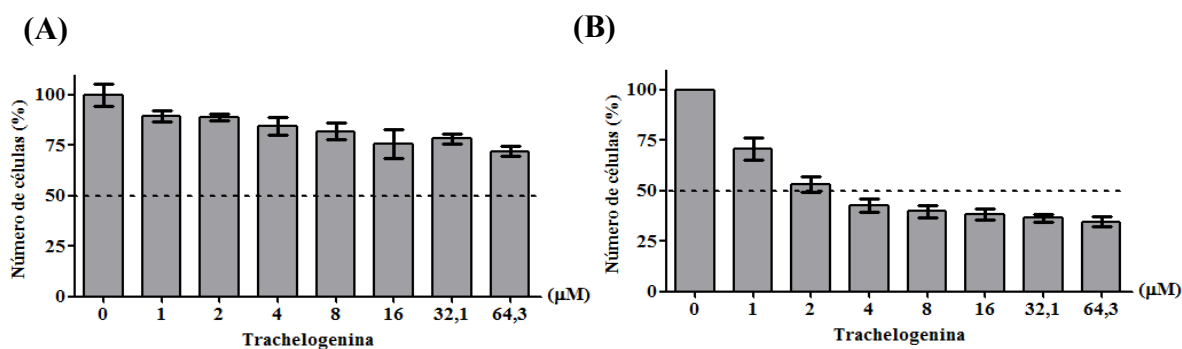
LINHAGEM	CI_{50} (μ M)		
	Intervalo de confiança de 95%		
	24 h	48 h	72 h
SF-295	> 64,3	> 64,3	0,8 (0,67-0,95)
HCT-116	> 64,3	4,8 (3,6-6,2)	1,9 (1,6-2,3)

Os valores de CI_{50} estão apresentados em μ M 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, sendo mostrados entre parênteses.

Como apresentado na Tabela 4, a trachelogenina não apresentou efeito citotóxico em ambas as linhagens tumorais testadas após tratamento por 24 horas até a concentração de 64,3 μM , não sendo possível calcular valores de CI_{50} . Em células da linhagem HCT-116, o composto testado apresentou efeito citotóxico de maneira tempo-dependente, com valores de CI_{50} de 4,8 μM , após 48 horas de tratamento, com intensificação do efeito após 72h de incubação. Entretanto, em células SF-295, somente foram observados efeitos após 72 horas de incubação, mostrando um efeito tempo-dependente distinto.

A Figura 14A e 14B representa graficamente o perfil antiproliferativo da trachelogenina frente à linhagem HCT-116 nos períodos de 24 e 48 horas, respectivamente.

Figura 14. Perfil antiproliferativo da trachelogenina frente à linhagem HCT-116 após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento determinado pelo método MTT.



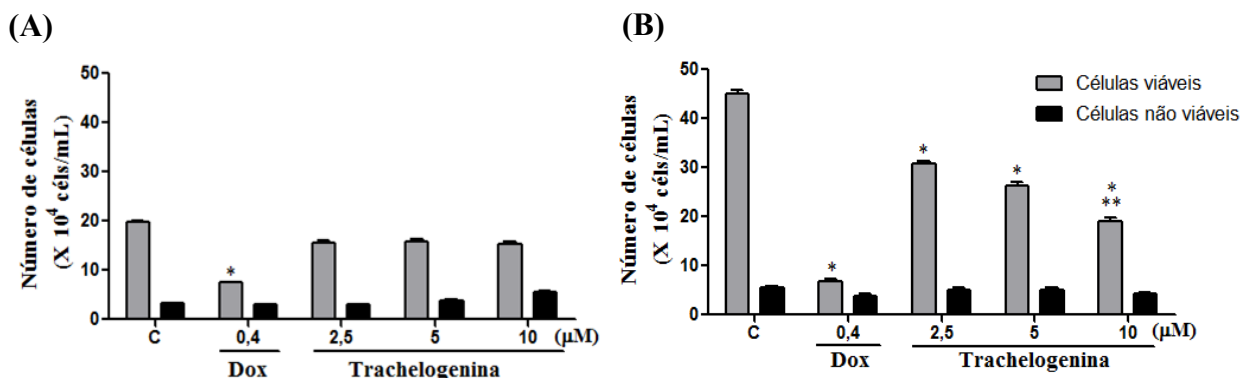
Após 48 horas de incubação, para as concentrações entre 4 e 64,3 μM foram encontrados percentuais de inibição do crescimento semelhantes, com discreta variação de 58% a 66%, respectivamente (Figura 14B). Diante dos resultados acima, e considerando que o câncer colorretal é um dos mais incidentes em homens e mulheres, a linhagem HCT-116 foi escolhida para dar seguimento ao estudo do mecanismo de ação da trachelogenina.

4.3 Avaliação da atividade antiproliferativa da trachelogenina frente à linhagem HCT-116 pelo método de exclusão do corante azul de Trypan

O ensaio de viabilidade celular por exclusão do azul de Trypan foi realizado para quantificar individualmente células viáveis e não viáveis, após 24 e 48 horas de incubação com a trachelogenina (Figura 15). As concentrações de 2,5 μM , 5 μM e 10 μM foram utilizadas no ensaio baseadas no valor de CI_{50} obtido pelo teste do MTT após 48 horas de incubação na linhagem HCT-116. Para esse e demais experimentos, a doxorubicina (Dox) foi

utilizada na concentração de 0,4 μM como controle positivo. O controle negativo recebeu apenas o veículo da amostra, dimetilsulfóxido (DMSO).

Figura 15. Efeito da trachelogenina na viabilidade de HCT-116 determinado pelo ensaio por exclusão de azul de Trypan após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento.



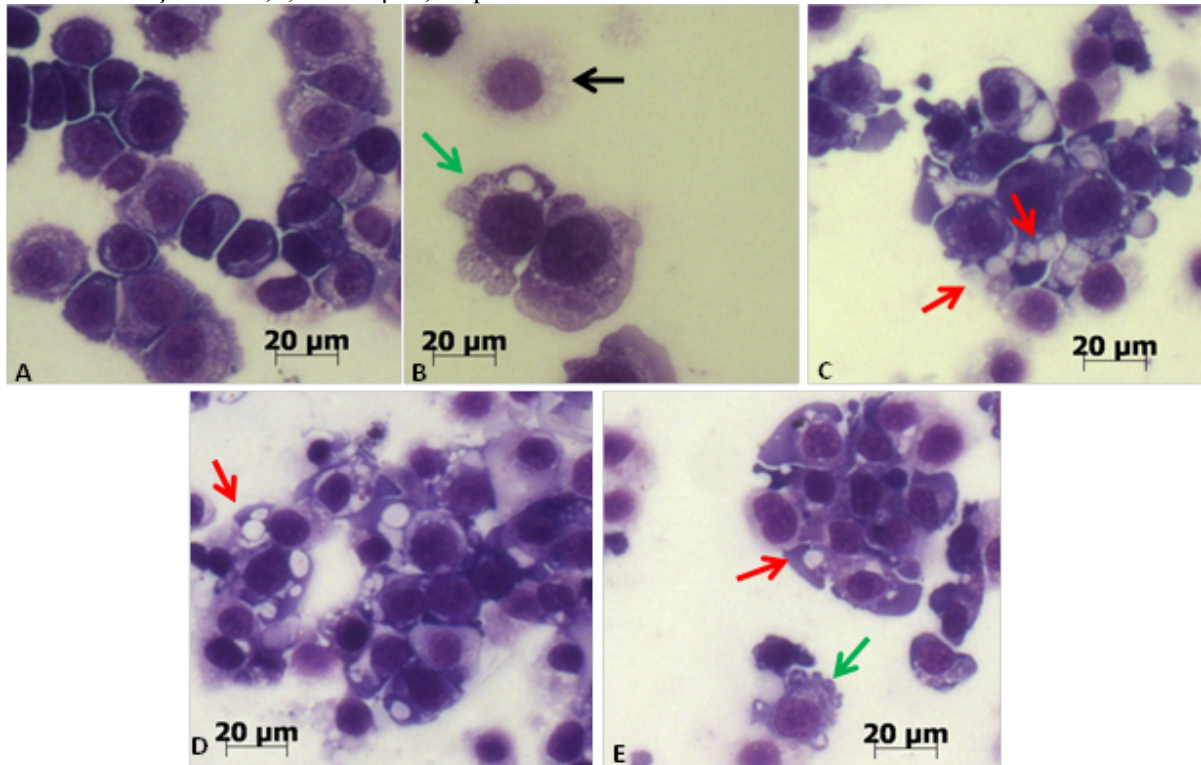
Os dados correspondem à média \pm E.P.M. de no mínimo três experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado ao controle negativo, ** $p < 0,05$ comparado a concentração de 5 μM por ANOVA, seguido de teste de Newman Keuls.

No período de 24 horas, não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de células viáveis e não viáveis para as diferentes concentrações testadas de trachelogenina (Figura 15A). Esses dados corroboram com os resultados prévios, visto que não foi observado efeito antiproliferativo neste período no ensaio do MTT. A avaliação da viabilidade celular na linhagem HCT-116, após 48 horas de tratamento, mostrou uma redução estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do número de células viáveis em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle. Além disso, foi observada uma diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$) ao comparar o número de células viáveis nas concentrações de 5 μM e 10 μM após 48 horas de tratamento (Figura 15B). Apenas a maior concentração testada foi capaz de reduzir em aproximadamente 50% o número de células viáveis. Esses dados sugerem que possivelmente a trachelogenina atue de forma citostática, inibindo da proliferação celular frente às células HCT-116, uma vez que o número de células não viáveis foi semelhante ao controle.

4.4 Avaliação das alterações morfológicas da linhagem HCT-116 após o tratamento com trachelogenina

As células HCT-116 são caracterizadas pela sua morfologia poligonal, com citoplasma visível e de forma irregular, núcleo bem definido e com muitos nucléolos. A análise morfológica das células tratadas com trachelogenina foi realizada por coloração com o kit panótico rápido utilizando microscopia óptica (Figura 16).

Figura 16. Imagens da morfologia das células HCT-116 após 48 horas de tratamento com trachelogenina, coradas com kit panótico rápido. Células visualizadas por microscopia óptica. (A e B) controle negativo e doxorrubicina, respectivamente, (C, D e E) células tratadas com trachelogenina nas concentrações de 2,5; 5 e 10 μM , respectivamente.



Células com presença de “blebs” estão representadas pelas setas verdes; células com aumento do tamanho de vacúolos estão representadas pelas setas vermelhas; células em necrose estão representadas com seta preta.

Na análise das imagens foi possível visualizar um aumento do número e do tamanho dos vacúolos em todas as concentrações testadas, sendo mantida a morfologia do núcleo e o formato do citoplasma das células nas concentrações de 2,5 μM e 5 μM , sugerindo a indução de processo de morte celular. Apenas na maior concentração testada foi possível visualizar algumas alterações morfológicas de membrana, como a formação de prolongamentos da membrana plasmática (“blebs”), o que pode indicar o início de um processo de apoptose, embora essas características tenham sido pouco observadas. Em células tratadas com doxorrubicina (Figura 16B), utilizada como controle positivo, foi observada rarefação celular acompanhada por alterações na morfologia de grande parte das células, que combinadas com a presença de “blebs” e de picnose são modificações compatíveis com morte celular por apoptose.

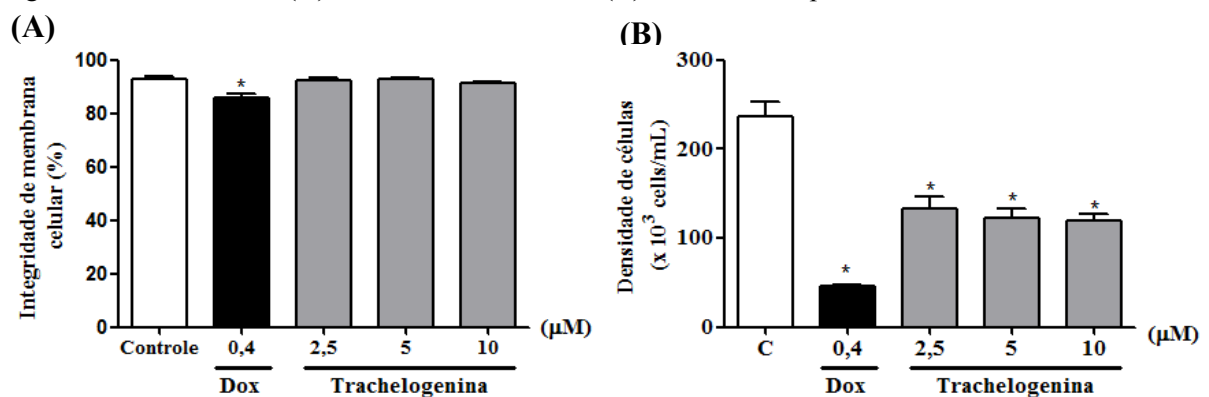
4.5 Estudo do mecanismo de ação da trachelogenina

4.5.1 Avaliação da integridade da membrana, da densidade das células e do ciclo celular de células HCT-116 tratadas com trachelogenina

Para o estudo do mecanismo de ação da trachelogenina sobre as células HCT-116, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo para avaliar a integridade da membrana e a densidade de células, bem como o perfil do ciclo celular após o tratamento por 48 horas. As concentrações utilizadas nesses testes basearam-se no valor de CI_{50} obtido pelo teste do MTT após 48 horas de incubação. Assim, as células foram tratadas com o veículo (controle negativo), doxorrubicina (Dox, $0,4\mu\text{M}$) ou trachelogenina ($2,5\mu\text{M}$; $5\mu\text{M}$ e $10\mu\text{M}$).

Para a análise da integridade de membrana das células tratadas, foi utilizado o iodeto de propídeo, um corante hidrofílico permeável apenas em células com membrana rompida, sendo capaz de distinguir células viáveis, com membrana íntegra, das células não viáveis, com membrana rompida. Como observado na Figura 17A, não foram encontradas alterações estatisticamente significativas na integridade da membrana das células tratadas com trachelogenina, sendo possível observar que a amostra teste não causou dano na membrana das células. Por outro lado, ao avaliar a densidade celular (Figura 17B), foi observada uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) do número de células nas diferentes concentrações testadas quando comparado com o controle, sugerindo que a trachelogenina proporciona uma inibição da proliferação de células HCT-116. A doxorrubicina (Dox) alterou a integridade de membrana das células de forma significativa ($p < 0,05$), além de reduzir a densidade de células.

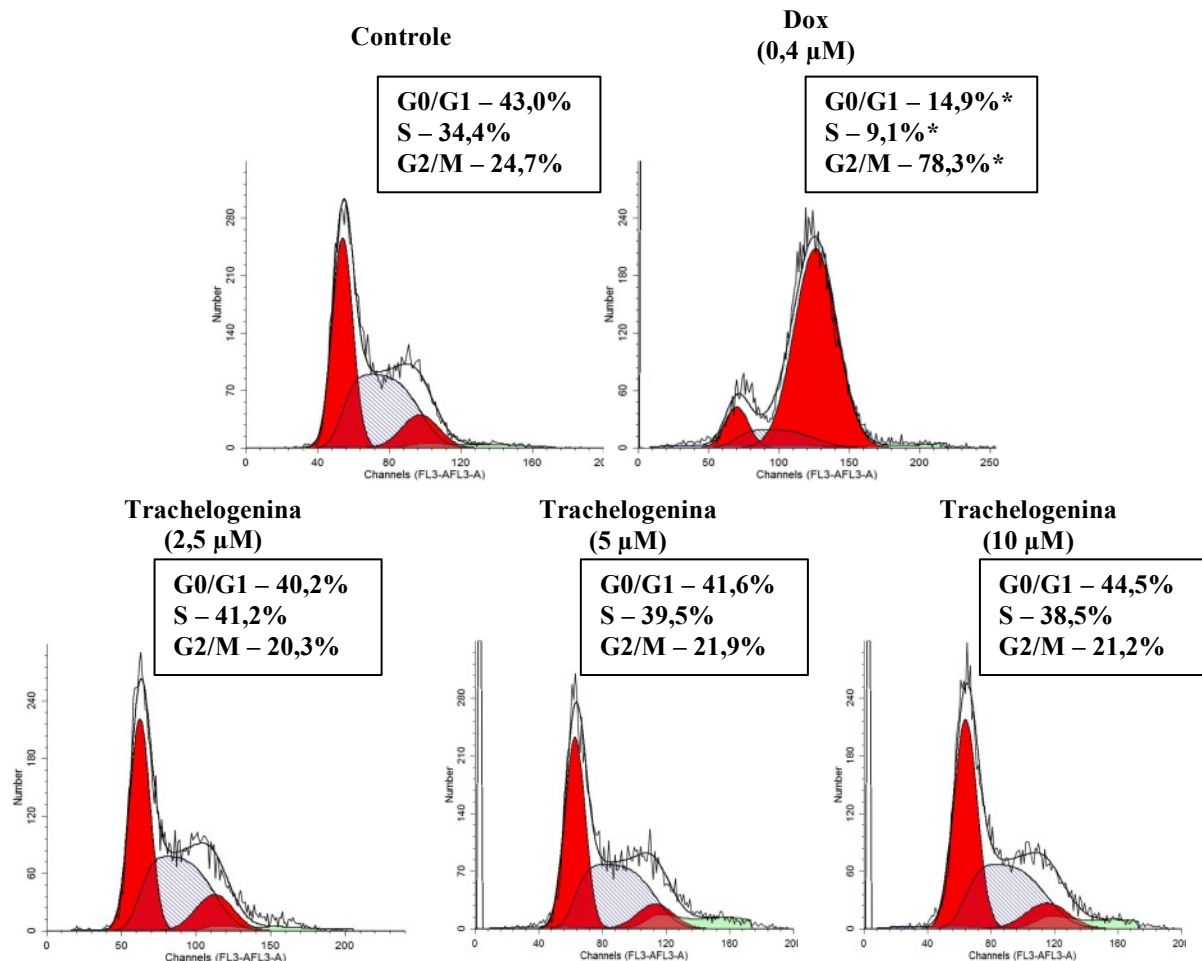
Figura 17. Efeito da trachelogenina sobre a proliferação celular das células HCT-116, avaliado pela integridade de membrana (A) e densidade de células (B), determinada por citometria de fluxo.



Os dados estão apresentados como os valores da média \pm E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido de teste de Newman Keuls.

Na análise do perfil ciclo celular das células HCT-116 tratadas com trachelogenina por 48 horas, foi possível verificar que a trachelogenina aparentemente não interferiu no ciclo das células tratadas, quando comparadas com o controle. De modo diferente, a doxorubicina (Dox) induziu a diminuição do número de células em fase G₀/G₁ e S e aumento da fase G₂/M, de forma significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo (Figura 18).

Figura 18. Efeito da trachelogenina na distribuição das fases do ciclo celular.



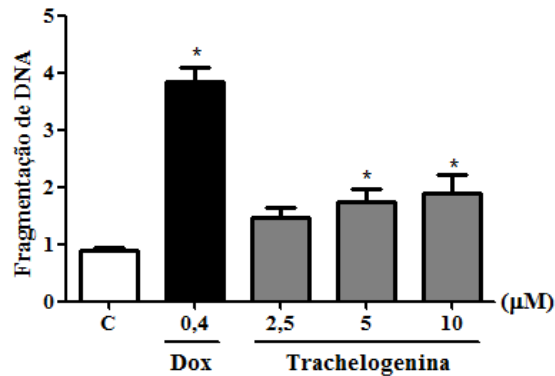
Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o programa ModFit LT. *, $p < 0.05$, comparado como controle por ANOVA seguido de teste de Newman Keuls. Ilustração de uma replicata representativa de cada experimento.

4.5.2 Avaliação do padrão de morte celular

A fragmentação do DNA é uma característica presente em vários processos de morte celular. Para avaliar a capacidade da trachelogenina de induzir fragmentação de DNA, foi utilizado o mesmo princípio da análise do perfil do ciclo celular. As células com a cromatina condensada e/ou DNA fragmentado (sub-G₁) incorporam menor quantidade de iodeto de propídeo, e dessa forma, emitem fluorescência mais baixa. Os resultados apresentados na

figura 19 mostraram que a trachelogenina induziu uma discreta fragmentação internucleossomal do DNA de forma significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de 5 μM e 10 μM quando comparado com o controle negativo, sugerindo que a trachelogenina possivelmente pode causar dano ao DNA.

Figura 19. Efeito da trachelogenina sobre a fragmentação de DNA, por citometria de fluxo, após 48 horas de incubação.



Os dados estão apresentados como os valores da média \pm E.P.M., obtidos por pelo menos três experimentos realizados em triplicata. * $p < 0,05$ comparado com o controle, por ANOVA seguido pelo teste Newman Keuls.

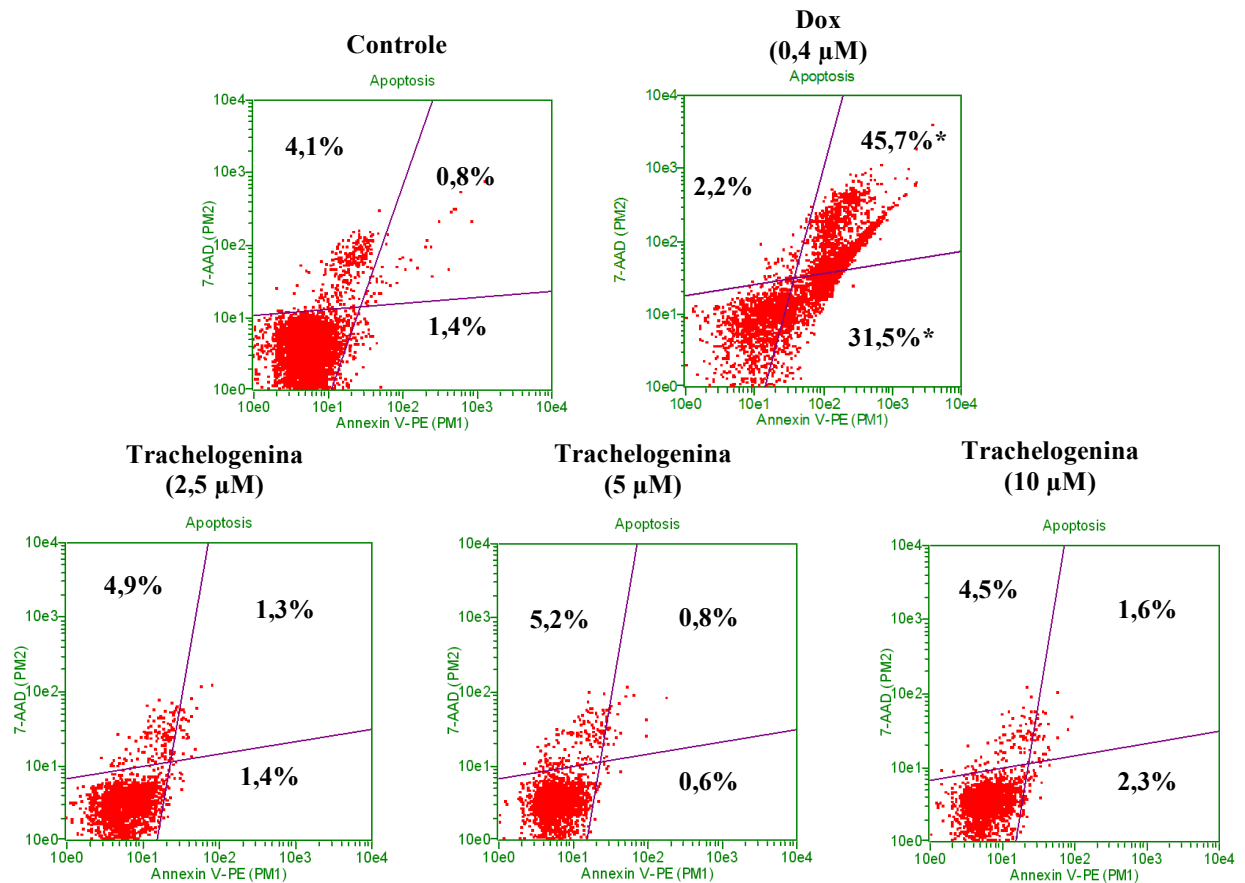
Outra forma avaliação do padrão de morte celular é a indentificação da externalização da fosfatidilserina. A externalização da fosfatidilserina é uma das primeiras alterações que ocorrem na via de morte celular apoptótica. A fim de analisar um possível envolvimento do mecanismo de morte celular por apoptose no mecanismo de ação da trachelogenina, a externalização da fosfatidilserina foi avaliada por citometria de fluxo após 48 horas de tratamento nas concentrações de 2,5 μM , 5 μM e 10 μM (Figura 20). A doxorrubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo, na concentração de 0,4 μM . Os resultados foram analisados e, como observado na figura 20A menos de 3% das células tratadas nas três concentrações testadas foram marcadas com Anexina V após 48 horas de tratamento, resultado semelhante ao obtido no controle negativo. Já a doxorrubicina induziu apoptose em 31,5% das células tratadas após 48 horas.

O PARP e a histona H2AX são enzimas com funções bem descritas no reparo de danos ao DNA. O PARP, quando clivado, e o H2AX fosforilado funcionam como marcadores de alguns processos de morte celular, como apoptose e necrose. Outra proteína envolvida no processo de apoptose é a família de proteínas Bcl2 anti-apoptóticas. Durante a apoptose, a função desses mediadores anti-apoptóticos é inibida. No presente estudo, por meio da avaliação subjetiva por *Western blot*, foi possível observar que as células tratadas com

trachelogenina não expressaram a histona γ H2AX, nem a clivagem do PARP, sendo observada apenas uma discreta diminuição da expressão do Bcl-2 na concentração de 5 μ M e um discreto aumento na concentração de 10 μ M, após 48 horas de tratamento. Apenas as células tratadas com doxorubicina expressaram a clivagem do PARP, aumentaram a expressão de γ H2AX e reduziram a expressão do Bcl-2, sugerindo a indução de morte celular por apoptose (Figura 20B). Esses resultados sugerem que, possivelmente, a apoptose não é a principal via de morte celular envolvida no efeito antiproliferativo da trachelogenina.

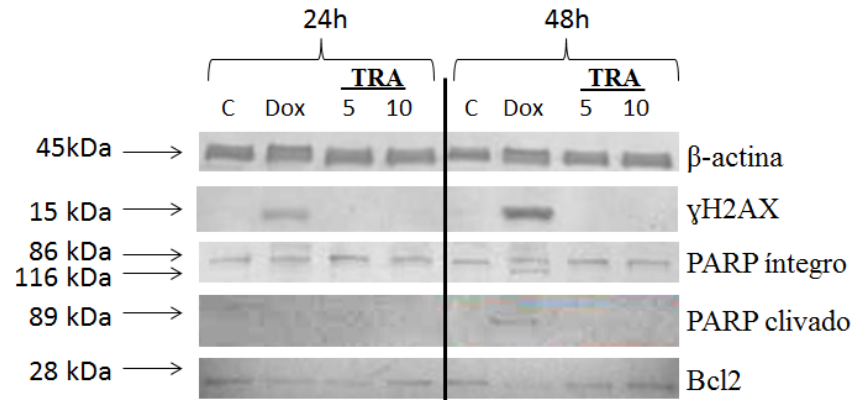
Figura 20. Avaliação de indução de apoptose por citometria de fluxo e *Western blot*. (A) Efeito da trachelogenina em células HCT-116 sobre a externalização da fosfatidilserina avaliada por citometria de fluxo após 48 horas de tratamento e (B) Expressão de γ H2AX, PARP íntegro, PARP clivado, Bcl-2 e β -actina após o tratamento de 24 e 48 horas avaliada por *western blot*. A doxorubicina (Dox) foi utilizada como controle positivo.

(A)



Os gráficos apresentados foram obtidos utilizando o Guava easyCyte. *, $p < 0.05$, comparado como controle por ANOVA seguido de teste de Newman Keuls. Ilustração de uma replicata representativa de cada experimento.

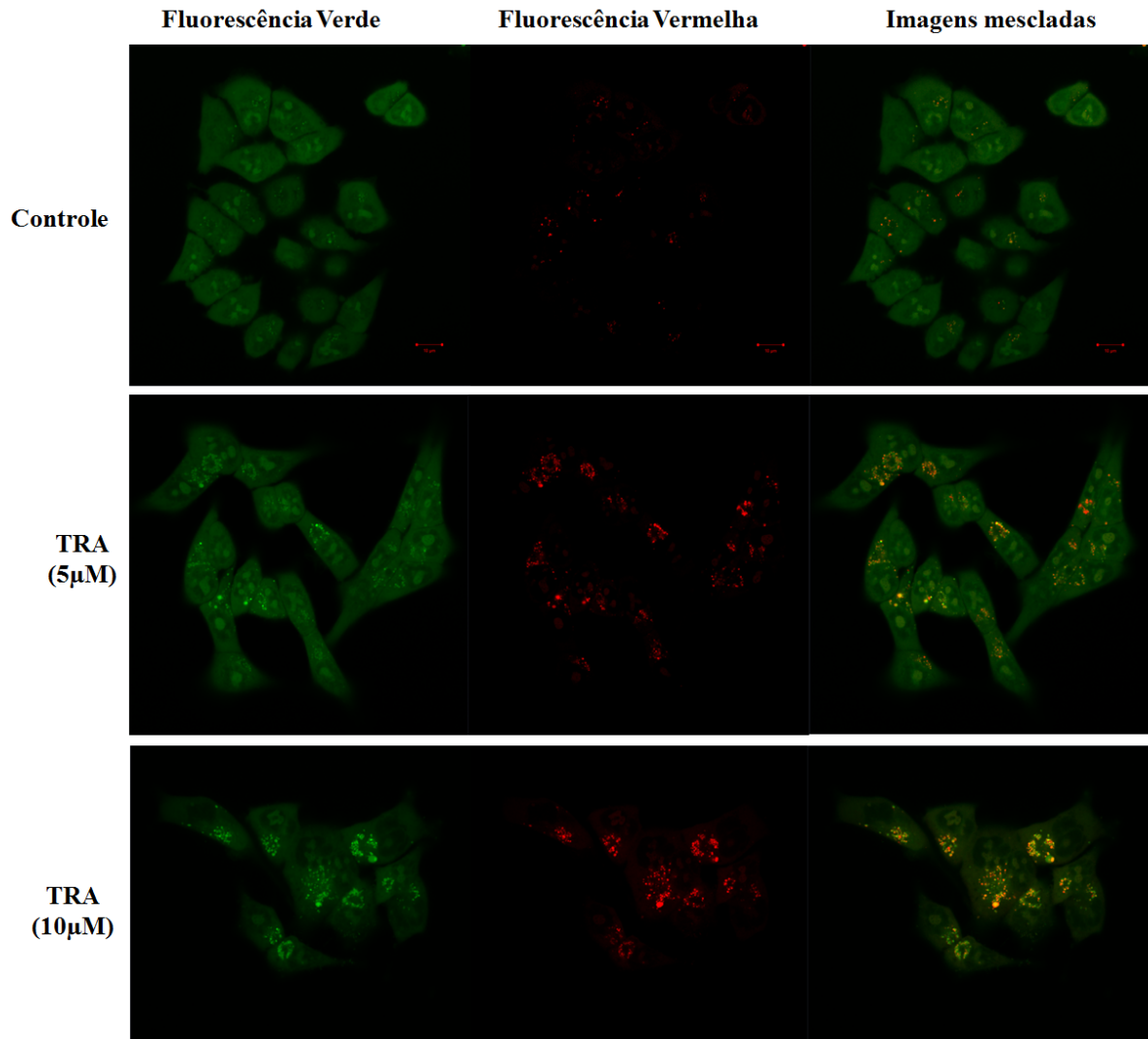
(B)



Dentre os tipos de morte celular, a autofagia (morte celular programada do tipo II) é um processo celular de degradação e reciclagem de componentes do citosol e organelas celulares danificadas. Corantes fluorescentes como o laranja de acridina, com propriedades acidotrópicas, podem ser utilizados para marcar organelas de vesículas ácidas (AVOs) ou autofagossomos maduros ou autofagolisossomos, presentes durante a autofagia. Logo, essas células podem ser detectadas em microscópio de fluorescência.

Para detectar a presença de compartimentos ácidos, as células foram tratadas por 48 horas com a amostra teste e, em seguida, coradas com laranja de acridina e observadas em microscópio confocal. O corante laranja de acridina penetra no citoplasma e emite fluorescência verde. Na presença de compartimentos ácidos ocorre a emissão de fluorescência laranja-avermelhado. Por meio da análise visual das imagens foi possível verificar um aumento da fluorescência vermelha nas células tratadas com trachelogenina nas concentrações de 5 μM e 10 μM após 48 horas quando comparado às células não tratadas. Isso sugere que essa lignana pode induzir o aumento do número de compartimentos ácidos nas células tratadas (Figura 21).

Figura 21. Avaliação da presença de compartimentos ácidos por microscopia confocal de células HCT-116 tratadas com o veículo de diluição da trachelogenina (DMSO-Controle) e com trachelogenina (TRA) nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, respectivamente, após 48 horas de incubação. Observa-se em verde o citoplasma e o núcleo e em vermelho os compartimentos ácidos das células coradas com laranja de acridina.

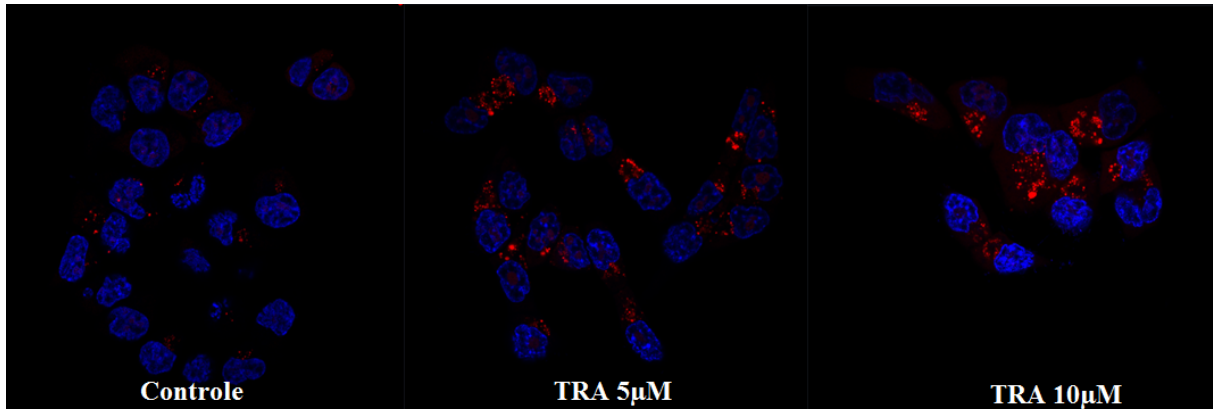


A fim de localizar essas vesículas ácidas dentro da célula, o núcleo das células tratadas ou não com a trachelogenina nas concentrações de 5 e 10 μ M, por 48 horas, foi marcado com Hoechst 33342 e as AVOs marcadas com laranja de acridina. Como observado na figura 22A, houve um aumento da quantidade e do tamanho das AVOs próximo ao núcleo após o tratamento com a trachelogenina, apresentando maior intensidade na concentração de 10 μ M.

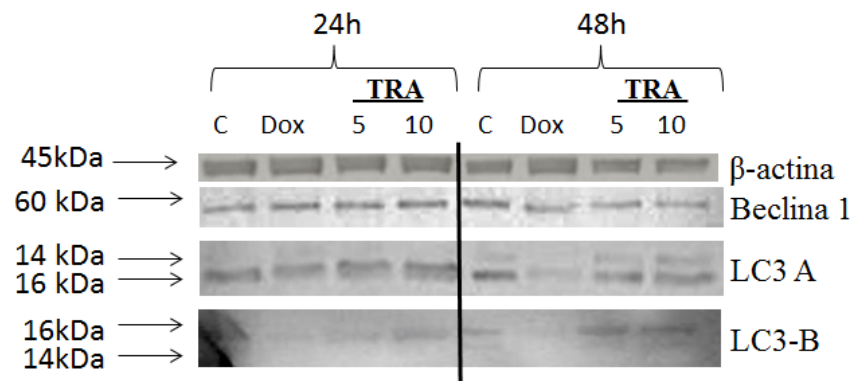
Após a análise morfológica por meio de microscopia confocal, foi realizada a avaliação da expressão de proteínas relacionadas com a autofagia (LC3-A, LC3-B, Beclina-1), utilizando o ensaio de *Western Blot*. (Figura 22B). A β -actina foi utilizada como proteína padrão.

Figura 22. Avaliação de indução de autofagia por microscopia confocal e *Western blot*. **(A)** Análise por microscopia confocal de células HCT-116 tratadas com o veículo de diluição da trachelogenina (DMSO-Controle) e com trachelogenina nas concentrações de 5 μ M e 10 μ M, respectivamente, após 48 horas de incubação. Observa-se em azul o núcleo, corado por Hoechst 33342, e em vermelho os compartimentos ácidos das células coradas com laranja de acridina. **(B)** Determinação da expressão de proteínas LC3 A e B e Beclina 1 após 24 ou 48 horas tratamento com Trachelogenina (5 e 10 μ M). Doxorrubicina (Dox, 0,4 μ M) foi utilizada como controle positivo.

(A)



(B)



O LC3 é um dos marcadores de autofagia, pois está envolvido na formação dos autofagossomos quando convertido em LC3 II. Com base nos resultados do *Western blot*, foi possível verificar um aumento da expressão de LC3-A e LC3-B nas células tratadas com trachelogenina em ambas as concentrações testadas com relação ao controle, após 48 horas de tratamento, sendo observado um aumento da expressão de LC3 na sua forma lipídica (LC3 II). Enquanto que, as células tratadas com doxorrubicina, por 48 horas, apresentaram uma diminuição na expressão de LC3. A expressão da proteína Beclina-1 esteve presente em todos os grupos testados em 24 horas, não apresentando diferença na expressão entre as amostras avaliadas. Em 48 horas, foi possível observar uma discreta diminuição da expressão dessa

proteína nas células tratadas com doxorrubicina e com a amostra teste, quando comparado com o controle negativo.

Diante dos resultados obtidos, podemos sugerir que o mecanismo de ação antiproliferativo da trachelogenina ocorre por meio da indução de um processo autofágico de maneira independente do processo de morte por apoptose, apesar de causar discreta fragmentação internucleossomal do DNA.

5. DISCUSSÃO

O câncer é um conjunto de doenças de origem multifatorial com fundo genético e epigenético, de difícil tratamento, sendo o principal causador de morte em países em desenvolvimento (KUMAR, et al., 2010). Os produtos naturais têm sido amplamente estudados a fim de descobrir novas drogas, principalmente quando relacionado ao estudo de drogas anticâncer, visto que a maioria dos fármacos em uso é de origem natural ou derivada de um protótipo natural (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2012).

Dentre as moléculas já estudadas, as lignanas têm tido destaque devido a sua diversidade estrutural, conferindo a elas um rico potencial de atividades biológicas, dentre elas, uma potente atividade antitumoral contra diversas linhagens de células cancerígenas. Vários compostos interessantes para o tratamento do câncer tem sido resultado da exploração da diversidade química das lignanas. Essa classe de moléculas ainda pode ser muito explorada a fim de que novos compostos sejam descobertos e desenvolvidos (MACRAE; TOWERS, 1984; LEE; XIAO, 2003).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial antiproliferativo de compostos isolados dos talos da *Combretum fruticosum* em diversas linhagens tumorais, bem como determinar o possível mecanismo de ação citotóxico da trachelogenina em células de câncer colorretal humana (HCT-116).

No presente trabalho, foi realizado um estudo fitoquímico do extrato etanólico dos talos da *Combretum fruticosum*. O fracionamento do extrato resultou no isolamento de sete metabólitos secundários, sendo três triterpenos de esqueleto oleanano, ácido maslínico, ácido oleanólico e ácido arjunólico, duas misturas dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol e duas lignanas, (-)-trachelogenina e vladinol F. Esses compostos foram testados em linhagens de células tumorais a fim de identificar o perfil antitumoral dessas moléculas. Apenas o ácido maslínico, o ácido arjunólico e a trachelogenina foram citotóxicos frente às linhagens de células tumorais HL-60, OVCAR-8, HCT-116 e SF-295.

Vários estudos tem relatado o efeito citotóxico moderado do ácido maslínico sobre linhagens de células tumorais, tais como as células de glioma de rato (WU, et al., 2009), as células leucêmicas (HL-60) (KHIEV et al., 2009) e as células de adenocarcinoma de cólon (HT-29) (REYES-ZURITA et al., 2011). O efeito antitumoral do ácido arjunólico também foi

relatado frente às linhagens de carcinoma ascítico de Ehrlich e linfoma de Dalton (RAMESH et al., 2012). No presente estudo, foi possível verificar que o ácido maslínico e o ácido arjunólico também foram citotóxico frente a outras linhagens de células tumorais.

A trachelogenina, entretanto, apresentou maior citotoxicidade frente às linhagens OVCAR-8, HCT-116 e SF-295, demonstrando menor valor de CI_{50} quando comparados com os demais compostos. Com isso, a lignana do tipo dibenzilbutirolactona, trachelogenina, foi utilizada para o estudo do mecanismo de ação dessa molécula.

As lignanas com esqueleto do tipo dibenzilbutirolactona, como a trachelogenina e a arctigenina, tiveram suas primeiras atividades biológicas descritas como inibidores *in vitro* da replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1; cepas HTLVIII B) (TRUMM; EICH, 1989; SCHRODER et al., 1990), e também como antagonista de Ca^{2+} , com efeito anti-hipertensivo em modelos de ratos hipertensos (CHIKAWA et al., 1986), além de apresentarem atividade antitumoral frente a algumas linhagens de células tumorais (PÁSKA et al., 1996; TRUMM; EICH, 1989). Apesar das atividades descritas, a atividade biológica e o mecanismo de ação da trachelogenina frente ao seu potencial antiproliferativo ainda não foram explorados.

Como descrito anteriormente, algumas lignanas têm sido utilizadas para o tratamento do câncer, incluindo os análogos da podofilotoxina, etoposídeo e tenoposídeo (LEE; XIAO, 2003). O potencial antitumoral de lignanas do tipo dibenzilbutirolactona, como a atividade antitumoral do hidroximatairesinol em modelos de câncer de próstata (SAARINEN et al., 2000; BYLUND et al., 2005) e a atividade antiproliferativa e citostática da arctigenina em células leucêmicas (HIRANO et al., 1994; MATSUMOTO; HOSONO-NISHIYAMA; YAMADA, 2006) foram relatados em alguns estudos.

A trachelogenina foi isolada anteriormente das folhas de *Glycydendron amazonicum* pertencente à família Euphorbiaceae e de outras plantas das famílias Apocynaceae, Asteraceae, Convolvulaceae e Taxaceae (UMEZAWA, 2003), sendo isolada pela primeira vez neste estudo no gênero *Combretum*. São poucos os estudos que relatam a atividade antitumoral desse composto. Portanto, foi realizado um estudo do perfil antiproliferativo da trachelogenina frente a diversas linhagens celulares tumorais e não tumorais, em que o composto apresentou potente atividade citotóxica em algumas linhagens de células tumorais. Essa lignana apresentou diferentes valores de CI_{50} dependendo da célula tumoral testada, que

variaram de 0,8 μM a 32,4 μM em linhagens de glioblastoma (SF-295) e leucêmicas (HL-60), respectivamente, após 72 horas de incubação. No entanto, não foi possível observar um padrão evidente de seletividade entre as linhagens tumorais testadas.

A utilização de quimioterápicos no tratamento do câncer resulta no aparecimento de diversos efeitos colaterais, como náuseas, vômitos, perda de peso, alopecia, úlceras gástricas, dentre outras. Uma das principais causas desses efeitos é a baixa seletividade desses fármacos por células tumorais, afetando também células normais de elevada taxa de proliferação, como as células da pele, do trato gastrointestinal e do sangue (ANAZETTI et al., 2003). A descoberta de novos fármacos antineoplásicos com poucos ou insignificantes efeitos colaterais é um dos principais objetivos buscados por pesquisadores. Por isso, é de grande importância verificar o efeito de um determinado composto sobre células com atividade proliferativa normal (ZUCO et al., 2002; ANAZETTI et al., 2003).

No presente estudo, as células mononucleadas de sangue periférico humano (CMSP) e uma linhagem de origem fibroblástica murina não transformada (3T3-L1) foram escolhidas para avaliar a citotoxicidade da trachelogenina frente a células não tumorais. A partir de teste de citotoxicidade, utilizando o método do MTT foi possível perceber uma seletividade da amostra para linhagens de células tumorais quando comparadas com as linhagens não tumorais testadas, em que os valores de CI_{50} apresentados foram maiores que a maior concentração testada (64,3 μM).

Em um estudo realizado com lignanas aglicosadas (trachelogenina, arctigenina e cartamogenina), isoladas do fruto da *Leuzea carthamoides*, foi observado efeito citotóxico dessas amostras frente à linhagem de adenocarcinoma de cólon (SW480), com valores de CI_{50} que variaram de 22-185 μM após 48 horas de incubação, sendo a trachelogenina a mais citotóxica com intervalo de valor de CI_{50} entre 22-66 μM (SÓLYÓMVARY et al., 2014).

Outro estudo realizado com a trachelogenina isolada do extrato etanólico da *Saussurea salicifolia* demonstrou uma citotoxicidade moderada e um aumento na indução da enzima quinona redutase frente às linhagens de adenocarcinoma gástrico humano (AGS) e de hepatoma de rato (Hepa 1c1c7), após 24 horas de incubação, sendo considerada quimiopreventiva e não citotóxica (KANG et al., 2007). Os agentes quimiopreventivos são conhecidos por inibir a transformação de células normais em células pré-malignas ou a progressão de células pré-malignas em células malignas. Esses agentes são responsáveis por

modular os processos celulares associados com a biotransformação xenobiótica ou com a proteção contra o dano oxidativo e a promoção da diferenciação (KANG et al., 2007).

Por outro lado, em um trabalho realizado por FORGO et al. (2012), a trachelogenina isolada a partir do extrato clorofórmico da *Centaurea jacea L.* não apresentou citotoxicidade significativa frente às linhagens celulares de câncer cervical (HeLa), de câncer de mama (MCF-7) e de carcinoma epidermóide (A431). Porém, o autor não esclarece o período de incubação, nem mesmo o possível mecanismo de ação do composto.

No presente estudo, a trachelogenina exibiu maior citotoxicidade frente às linhagens de glioblastoma (SF-295) e adenocarcinoma de cólon (HCT-116), com valores de CI_{50} de 0,8 e 1,93 μM , respectivamente. O perfil antiproliferativo da trachelogenina em células SF-295 e HCT-116 foi avaliado em diferentes tempos de tratamento por meio do método do MTT, mostrando efeito distinto dependendo da linhagem e do tempo de incubação. Apesar da maior citotoxicidade frente à linhagem SF-295 após 72 horas de incubação, a trachelogenina não exibiu efeito citotóxico nos períodos de 24 e 48 horas, apresentando valores de CI_{50} maiores que 64,3 μM . Em contrapartida, as células HCT-116 foram mais sensíveis ao composto, apresentando valor de CI_{50} de 4,8 μM após 48 horas, enquanto que, após 24 horas, não exibiu efeito citotóxico. Logo, é possível perceber que dependendo do contexto celular de cada linhagem e do tempo de incubação, a trachelogenina pode apresentar perfil citotóxico distinto.

Visto que o câncer colorretal é o terceiro tipo mais incidente em homens e o segundo mais incidente em mulheres (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2014), aliado aos dados apresentados, em que o efeito da trachelogenina foi iniciado em um menor tempo de incubação na linhagem de carcinoma colorretal (HCT-116), a linhagem foi escolhida para dar continuidade aos estudos de mecanismo de ação do composto. A partir do valor de CI_{50} apresentado no período de 48 horas de tratamento, as concentrações de 2,5 μM , 5 μM e 10 μM foram escolhidas para verificar os possíveis mecanismos de ação da trachelogenina sobre as células HCT-116.

A doxorubicina foi utilizada como controle positivo no estudo, visto que essa substância é bastante utilizada na clínica para tratamentos de tumores. A doxorubicina é cerca de 50 vezes mais ativa para células tumorais leucêmicas HL-60 e de cólon HCT-8 quando comparadas com as CMSP, com valores de CI_{50} de 0,03 μM , 0,02 μM e 1,7 μM , respectivamente. Para a linhagem HCT-116, essa seletividade é reduzida, com valores de CI_{50}

de 0,21 μM , após 72 horas de incubação (MARINHO-FILHO et al., 2010; CARDOSO et al., 2013). Para o estudo, foi utilizado o valor de CI_{50} de 0,4 μM referente ao valor de CI_{50} após o período de 48 horas de incubação em células HCT-116.

Por meio do ensaio de viabilidade por exclusão do corante azul de Trypan foi possível observar que a trachelogenina foi capaz de reduzir a proliferação de células HCT-116, reduzindo o número de células viáveis de forma concentração-dependente, após 48 horas de tratamento. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa quanto ao número de células não viáveis quando comparado com os controles.

A fim de verificar a morfologia celular após o tratamento com a trachelogenina, foi realizada uma coloração diferencial com kit panótico. Diferente do controle positivo, não foi possível verificar alterações morfológicas na membrana e no núcleo das células tratadas com trachelogenina, sendo observado apenas um aumento na vacuolização, com visível aumento do número e do tamanho dos vacúolos nas células tratadas quando comparadas com as células do controle negativo. Isto sugere que o composto pode causar algum tipo de estresse sobre as células, induzindo, desta forma, um processo de morte celular.

Dando seguimento ao estudo do mecanismo de ação da trachelogenina frente à linhagem HCT-116, os resultados da citometria de fluxo mostraram uma redução significativa do número de células tratadas com trachelogenina quando comparado com o controle negativo, dados que corroboram com o teste do Trypan. Não houve diferença significativa entre as concentrações testadas (2,5 μM ; 5 μM e 10 μM) quanto a densidade de células, o que está de acordo com o ensaio do MTT, em que o percentual de inibição do crescimento celular foi semelhante entre a CI_{50} calculada e a maior concentração testada (4,8 a 64,3 μM). Além disso, a amostra testada não causou dano na integridade da membrana celular. Estes achados sugerem uma possível atividade citostática do composto após 48 horas de incubação, visto que a trachelogenina reduziu a proliferação das células HCT-116, sem alterar a viabilidade das mesmas.

O mecanismo de citotoxicidade de muitos agentes anticâncer convencionais é baseado no dano de DNA e subsequente indução de apoptose. No entanto, as células tumorais também podem responder a agentes capazes de desacelerar o ciclo celular, sendo conhecidos como agentes citostáticos. Estes compostos não matam células cancerosas, mas impedem que essas células se proliferem (RIXE; FOJO, 2007). A maioria dos agentes anticâncer convencionais

tem potencial citostático e citotóxico. A citostaticidade pode ser o passo inicial para diferentes mecanismos de morte celular em que a duração da parada da mitose não está necessariamente correlacionada com a probabilidade de morte (WEISSENSTEIN et al., 2014).

Os agentes citostáticos atuam, muitas vezes, inibindo a progressão da carcinogênese. Existem proteínas reguladoras chave no controle do ciclo celular, que são atualmente alvos para a terapia do câncer. Algumas proteínas são responsáveis por acelerar o ciclo celular e se tornam oncogênicas se permanentemente ativas ou expressas em altas taxas, como as proteínas Ras, Raf, CDK 4/6 e myc. Em contraste, outras proteínas desaceleram ou interrompem o ciclo celular e, assim, suprimem a oncogênese, a menos que estejam inativadas ou mutadas, como p53, p21, p16 e pRb (KLAASSEN; WATKINS, 2012). O sorafenib, por exemplo, é um inibidor de multiquinases responsável pela inibição da expressão da proteína Raf e dos receptores de fator de crescimento, sendo considerado um agente citostático devido seus efeitos sobre a proliferação celular e a angiogênese (RIXE; FOJO, 2007).

O paclitaxel, por exemplo, pode atuar de forma citostática ou citotóxica dependendo da concentração testada. Em baixas concentrações, o paclitaxel exibe um perfil de citostaticidade, inibindo a proliferação celular, induzindo a hiperpolarização mitocondrial, mas não induz a apoptose. Esse efeito está relacionado com a desaceleração do ciclo celular ao invés de uma parada em uma fase específica do ciclo. Em concentrações mais altas, o paclitaxel apresenta um perfil citotóxico, induzindo a morte celular por apoptose e a despolarização mitocondrial, com parada do ciclo celular na fase G₂/M (PASQUIER et al., 2004). Logo, a determinação da citostaticidade ou da citotoxicidade *in vitro* depende de diversos fatores, como as concentrações testadas, o tempo de incubação e o contexto celular (WEISSENSTEIN et al., 2014).

Na análise do efeito da trachelogenina sobre o ciclo celular das células HCT-116, por meio da análise do conteúdo de DNA, não foi possível verificar alterações estatisticamente significativas no ciclo celular de células tratadas com a amostra teste, quando comparado com o controle negativo, o que não exclui a possibilidade da molécula estar atuando sobre o ciclo. Como relatado anteriormente, o perfil citostático do paclitaxel, por exemplo, está relacionado com uma desaceleração do ciclo celular ao invés de uma parada em uma fase específica do ciclo (PASQUIER et al., 2004). Logo, outros ensaios devem ser realizados a fim de analisar outras possíveis modificações que podem ocorrer na progressão do ciclo celular induzida pela trachelogenina.

Em um estudo realizado por JEONG et al. (2011), a arctigenina, uma lignana do tipo dibenzilbutirolactona, com 93,2% de similaridade com a trachelogenina, demonstrou efeito citotóxico frente a linhagens de câncer gástrico após 48 horas de incubação com CI_{50} , semelhante ao efeito da trachelogenina sobre a linhagem HCT-116, testada neste estudo. O mecanismo de ação antiproliferativo da arctigenina está relacionado com a indução da apoptose e a parada no ciclo celular. A arctigenina bloqueia o ciclo celular na fase de G_1 para S por meio da regulação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, como Rb, ciclinas D e E, CDK4, CDK2, dentre outras. No entanto, no presente estudo, a trachelogenina parece não interferir em fases específicas do ciclo celular.

A associação entre o ciclo celular e o câncer tem sido mostrada em vários estudos, sendo a inibição do ciclo celular alvo para o tratamento do câncer. Os complexos ciclinas-CDK são um dos maiores alvos, sendo a proteína Rb que controla a progressão do ciclo celular da fase G_1 (JEONG et al., 2011). Com isso, a influência do ciclo celular no efeito antiproliferativo da trachelogenina necessita de um estudo mais aprofundado que permitam avaliar os marcadores bioquímicos de proliferação celular envolvidos no mecanismo de ação dessa molécula.

A apoptose, ou morte celular programada do tipo I, é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas específicas. Dentre as alterações morfológicas pode-se citar a redução do volume celular, condensação e fragmentação nuclear, formação de corpos apoptóticos e “*blebs*” e perda de adesão a células vizinhas ou à matriz extracelular (NISHIDA; YAMAGUCHI; OTSU, 2008). Enquanto que, as alterações bioquímicas envolvem a clivagem do DNA cromossômico em fragmentos internucleossomais, externalização de fosfatidilserina e clivagem de um número de substratos intracelulares por proteases específicas (MARTIN; GREEN, 1995; COHEN et al., 1994).

A fragmentação do DNA é uma característica presente em vários processos de morte celular. Além disso, a perda da assimetria da membrana fosfolipídica com a translocação da fosfatidilserina da membrana interna da bicamada lipídica para a superfície celular é uma das principais características do processo de apoptose. A fosfatidilserina é um fosfolípido localizado na face interna da membrana plasmática. Durante os primeiros estágios do processo de apoptose esse fosfolípido é externalizado, permitindo o rápido reconhecimento das células apoptóticas pelos macrófagos e demais células circundantes, marcando-as para fagocitose antes da perda da integridade da membrana celular (VERMES et al., 1995;

ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001; LEE; LIU; YEUNG; 2009). A Anexina-V é uma proteína com alta afinidade pela fosfatidilserina, sendo um marcador específico de apoptose (VERMES et al., 1995).

A fim de avaliar o possível envolvimento do processo de apoptose no mecanismo de ação da trachelogenina, foram realizados métodos de avaliação da fragmentação do DNA e a externalização da fosfatidilserina por citometria de fluxo. Por meio dos resultados obtidos, foi observado que a trachelogenina promoveu uma discreta fragmentação de DNA e não induziu a externalização da fosfatidilserina, sugerindo que, possivelmente, a trachelogenina tem mecanismo de ação independente do processo de morte por apoptose em células HCT-116.

Além disso, algumas proteínas relacionadas ao processo de morte por apoptose foram analisadas no ensaio de *Western blot*. Durante a apoptose, a caspase ativa o poli (ADP-Ribose) polimerase (PARP), que é clivado no fragmento C-terminal, sendo considerado um importante biomarcador de apoptose. No presente estudo, a análise da expressão de proteína PARP mostrou que apenas as células tratadas com doxorrubina, após 48 horas de incubação, expressaram a clivagem desta proteína. A expressão da histona γ H2AX também foi analisada neste estudo. A histona H2AX é requerida na parada do ciclo-celular, mediada pelos “*checkpoints*”, com importante papel no reparo do DNA, sendo um dos principais sinalizadores de proteínas de resposta ao dano de DNA. O dano de DNA causado pela radiação iônica, ultravioleta ou por agentes quimioterápicos resultam em uma rápida fosforilação do H2AX. Este dano ocorre também no estágio final da apoptose, quando o DNA cromossomal é clivado em pedaços oligonucleossomais (MUKHERJEE, et al., 2006; YUAN; ADAMSKI; CHEN, 2010).

Em nossos resultados não foi observada expressão de γ H2AX fosforilado nas células tratadas com trachelogenina em ambos os períodos de incubação, enquanto que apenas aquelas tratadas com doxorubicina expressaram essa proteína, sendo esta, tempo-dependente. Isso sugere que a trachelogenina não induz dano no DNA da célula, apesar de ter sido observado discreta fragmentação internucleossomal do DNA por citometria de fluxo nas células tratadas com o composto. Além disso, não foi possível verificar perda da integridade de membrana das células tratadas com trachelogenina. Logo, os resultados obtidos indicam que possivelmente o efeito antiproliferativo do composto não está relacionado com mecanismos de morte celular, por apoptose e/ou necrose.

Outro mecanismo de morte celular é a autofagia. A autofagia é uma via catabólica que permite que as células eucarióticas degradem e reciclem componentes celulares por via lisossomal. Em condições de privação de nutrientes ou de fatores de crescimento, por exemplo, por meio da autofagia, a célula consegue gerar substratos oxidáveis e outras moléculas, como os aminoácidos, que são essenciais para a sobrevivência celular. No entanto, quando o estresse celular continua, a morte celular pode ocorrer isoladamente por autofagia ou em associação a outros tipos de morte celular, como apoptose ou necrose, dependendo do estímulo. Quando a autofagia é excessivamente induzida, ocorre o que chamamos de morte celular do tipo 2 (KONDO et al., 2005; REGGIORI et al., 2012; SIVIERO, 2013).

Quanto às alterações bioquímicas durante a autofagia, este processo é independente da ativação de caspases e a degradação do DNA ou a fragmentação nuclear não são aparentes. Quanto às alterações morfológicas, há um aumento do número de vesículas autofágicas, da atividade dos lisossomos e do complexo de Golgi e dilatação do retículo endoplasmático, distinguindo a autofagia dos demais tipos de morte. Além disso, há o aparecimento de vesículas na membrana plasmática, mas não ocorrem danos à integridade da membrana. Em estágios finais, é possível observar uma condensação parcial da cromatina, no entanto, na maioria das vezes o núcleo permanece intacto (KONDO et al., 2005; SIVIERO, 2013).

Durante a autofagia, partes do citoplasma e de várias organelas são sequestradas para dentro de vacúolos autofágicos de dupla membrana, chamados autofagossomos, que se fundem aos lisossomos, onde são degradadas. A vacuolização celular é uma das características do processo de autofagia, onde há o surgimento de compartimentos ácidos denominados vacúolos autofágicos (GENG et al., 2010). Com o objetivo de verificar possível envolvimento da autofagia na atividade antitumoral da trachelogenina, foram realizados outros métodos que detectassem características celulares e proteínas específicas do processo autofágico, dentre elas a formação de organelas de vesículas ácidas (AVOs), conhecidas como autofagossomos maduros ou autofagolisossomos, e a expressão de proteínas, como Beclina 1, LC3A e LC3B (CHEN; KARANTZA-WADSWORTH, 2009).

Dentre os corantes fluorescentes utilizados para verificar a presença do processo autofágico, pode-se destacar a laranja de acridina. Em pH ácido, esse corante sofre modificações físico-químicas, se acumulando em organelas ácidas, como as AVOs, emitindo fluorescência laranja-avermelhada. A intensidade da coloração é proporcional ao grau de

acidez e/ou ao volume dos compartimentos celulares ácidos (PAGLIN et al., 2001; SIVIERO, 2013).

Por meio da análise em microscopia confocal, utilizando os corantes laranja de acridina e Hoechst, foi possível observar um aumento do número e tamanho de AVOs nas células tratadas com a trachelogenina nas concentrações de 5 e 10 μ M quando comparadas com o controle, após 48 horas de incubação, sendo mais perceptível na maior concentração. A presença de vacúolos autofágicos em células em processo de morte após o tratamento pode indicar que a morte celular induzida está relacionada com a autofagia (KONDO et al., 2005). Logo, os dados sugerem um possível envolvimento do processo autofágico no mecanismo de ação da trachelogenina em células HCT-116. Isso pode estar relacionado com a diminuição do número de células viáveis observada nos ensaios do MTT, de azul de Trypan e na densidade de células quantificada por citometria de fluxo.

Cada etapa do processo de autofagia é regulada por diferentes complexos proteicos para a formação dos vacúolos autofágicos, principalmente pelas proteínas Atg. A recente identificação dos genes da família Atg, reguladores da formação dos autofagossomos, permitiu a confirmação do papel da autofagia como sinalizador do processo de morte celular. Essas proteínas formam um complexo funcional distinto nas etapas de formação dos autofagossomos (HØYER-HANSEN; JÄÄTTELÄ, 2008). Os genes Atg apresentam um importante papel em diferentes estágios do processo de autofagia, incluindo a indução, a formação de vesícula e a degradação do autofagossomo. (CHEN; KARANTZA-WADSWORTH, 2009; XIA et al., 2013).

A nível molecular, a expressão de proteínas relacionadas com a formação dos autofagossomos pode ser um marcador específico de autofagia. Com relação às proteínas marcadoras de autofagia utiliza-se, entre outras, a proteína LC3 (cadeia leve 3 da proteína 1 associada a microtúbulos), uma proteína citosólica (LC3-I, 16kDa) que sofre uma clivagem C-terminal quando um sinal pró-autofágico é percebido pela célula, sendo convertida, assim, à sua forma lipidada (LC3-II, 14kDa). Esta sofre modificações e passa a se localizar especificamente na membrana dos autofagossomos (KABEYA et al., 2000; WU et al., 2006; ZHENG et al., 2012).

Além disso, um dos principais mecanismos de controle da autofagia é dada pela interação entre a beclina-1 e os membros da família de proteínas anti-apoptóticas de Bcl-2. A

beclina-1 é uma proteína essencial para a iniciação da autofagia, que tem o papel de recrutar proteínas autofágicas chaves para a estrutura do pré-autofagossomo. A família das proteínas Bcl-2 são mediadores anti-apoptóticos bem conhecidos, apesar do seu papel na inibição da autofagia ainda não é bem entendido (MAIURI et al., 2007; HE; LEVINE, 2010). Sabe-se que, em condições favoráveis, o Bcl-2 sequestra a Beclina-1 do complexo Beclina-1-Vps34 nuclear e inibe a autofagia. Enquanto que em condições de estresse metabólico, essa ligação é desfeita a fim de que o complexo Beclina-1-Vps34 seja ativado, resultando no processo de autofagia (XIA et al., 2013).

Desse modo, a fim de verificar uma possível indução do processo autofágico pela trachelogenina em células HCT-116, foi realizada uma análise da expressão de proteínas relacionadas com a autofagia por meio do ensaio de *Western blot*. A trachelogenina parece induzir autofagia de maneira tempo dependente, visto que na análise do *Western blot* foi observado um aumento da expressão das proteínas LC3A e LC3B II nas células tratadas com trachelogenina durante 48 horas quando comparado com o controle negativo. Além disso, foi observada uma discreta diminuição da expressão da beclina-1, na sua forma não fosforilada, na concentração de 5 e 10 μM , após 48 horas de incubação. Além disso, foi observada uma discreta diminuição da expressão da proteína Bcl-2 na concentração de 5 μM e um aumento da expressão desta proteína na concentração de 10 μM , após 48 horas de tratamento quando comparado com o controle negativo. A expressão de Bcl-2 foi bem menor nas células do controle positivo tratadas com doxorrubicina, como esperado, visto que um dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade desse composto é a apoptose.

Em um estudo realizado por ZHOU et al. (2013), a Vitexina 6, uma lignana da família das Vitexinas, apresentou citotoxicidade frente a vários tipos de células tumorais e induziu apoptose de forma tempo e concentração dependentes, com clivagem do PARP, caspase 3, aumento da expressão de Bax e diminuição da expressão do Bcl-2. Além disso, foi observada uma indução do processo autofágico por essa molécula visto um aumento da expressão da Beclina-1 e do LC3-II (ZHOU et al, 2013).

A análise das características celulares e da expressão de proteínas relacionadas com o processo autofágico sugere que a trachelogenina pode induzir a autofagia nas células HCT-116, visto que houve um aumento de células com AVOs, ativação da forma lipídica do LC3 II essencial para a formação dos autofagossomos e diminuição da Beclina-1, nas células

tratadas por 48 horas. No entanto, é necessário que outras vias relacionadas com a autofagia sejam estudadas.

A desregulação do processo de autofagia resulta em várias doenças humanas, incluindo doenças neurodegenerativas e o câncer. Os genes supressores tumorais, que estão frequentemente mutados em neoplasias humanas, são responsáveis fisiologicamente por ativar a autofagia e inibir os sinais oncogênicos. Isto indica que a autofagia é um dos mecanismos de supressão tumoral, não excluindo a possibilidade do uso de indutores de autofagia no tratamento do câncer (TANABE et al., 2011).

Estes fatos tornam a autofagia induzida em células tumorais um tema de pesquisa interessante, principalmente quando se estuda autofagia induzida durante o tratamento medicamentoso, apesar disto ainda ser controverso. Muitas drogas, incluindo a rapamicina, o tamoxifeno e os inibidores da histona desacetilase (HDAC) induzem a morte celular associada a autofagia em células tumorais. Por outro lado, os inibidores de autofagia, como a cloroquina, aumentam o efeito de quimioterápicos em muitos tipos de tumores malignos (KONDO et al., 2005).

A indução de autofagia em células tumorais pode ser considerada um mecanismo de sobrevivência ou de morte de células tumorais, dependendo do contexto celular, do modo e da intensidade de insultos quimioterapêuticos (VIJAYAKURUP et al., 2014). Da mesma forma que pelo estímulo da privação de nutrientes, outros agentes pró-autofágicos podem induzir a autofagia, pela indução de dano a algum componente celular específico. Os agentes anticâncer indutores de autofagia têm sido considerados mediadores de citotoxicidade, ao invés de causar resistência a drogas. Isso porque, o “auto-consumo” celular por meio da autofagia pode levar a morte celular quando o material citoplasmático e as organelas celulares são consumidos além do ponto crítico para sobrevivência da célula (CHEN; KARANTZA-WADSWORTH, 2009).

Embora a autofagia seja considerada um mecanismo de manutenção da homeostase celular, o papel e a regulação da autofagia no câncer é aparentemente complexo, fazendo da autofagia um desafio e um alvo para a prevenção e tratamento do câncer potencialmente importante. Muitos estudos relatam que as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, bem como a habilidade de inibir a proliferação, invasão e angiogênese e de promover apoptose das lignanas, oferecem a essas moléculas um papel importante na quimioprevenção da

carcinogênese (SUNG; LAUTENS; THOMPSON, 1998; CHEN; THOMPSON, 2003; QU et al, 2005; DANBARA et al., 2005; MIURA et al, 2007; HU; YUAN; KITTS, 2007; HARIKUMAR et al, 2010; LIU et al., 2012; REN et al., 2014).

Poucos são os estudos relacionados com inibição da progressão do ciclo celular e a indução da autofagia pelas lignanas. A autofagia, as alterações lisossomais, o estresse oxidativo e a desaceleração do ciclo celular estão associados a vários tratamentos anticâncer por meio da utilização desses agentes quer isoladamente ou em combinação com outros agentes quimioterapêuticos (SHOEMAKER; DAGHER, 1979; PASQUIER et al., 2004; OSTENFELD et al., 2005; CAREW et al., 2007; FUJIWARA et al., 2007; GROTH-PEDERSEN et al., 2007; RIXE; FOJO, 2007).

Um estudo mais aprofundado dos mecanismos envolvidos na atividade antiproliferativa da trachelogenina, com a avaliação de marcadores bioquímicos e moleculares de proliferação celular e de vias relacionadas com a indução do processo autofágico, bem como, o potencial antitumoral e a toxicidade desta substância em modelos animais de câncer, é de fundamental importância no intuito de verificar o possível papel desta molécula no tratamento do câncer.

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, o fracionamento do extrato etanólico da *C. fruticosum* resultou no isolamento de sete compostos, dentre eles, três triterpenos, duas lignanas e duas misturas dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol em que a lignana do tipo dibenzilbutirolactona, trachelogenina apresentou potente atividade anticâncer *in vitro*, sendo pouco ativa em células não tumorais. Após o período de 48 horas de tratamento, a trachelogenina parece atuar citostaticamente sobre as células HCT-116. Este efeito parece estar relacionado com uma indução de um processo de autofagia. No entanto, outros testes devem ser realizados para confirmar as propostas acima apresentadas e para uma melhor avaliação do mecanismo de ação e do potencial terapêutico desta molécula.

REFERÊNCIAS

- ABARZUA, S. et al. Antiproliferative activity of lignans against the breast carcinoma cell lines MCF 7 and BT 20. **Arch Gynecol Obstet**, v. 285, p. 1145-1151, 2012.
- ADLERCREUTZ, H. Phyto-oestrogens and cancer. **The Lancet oncology**, v. 3, n. 6, p. 364-373, 2002.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is cancer?** Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/cancerbasics/what-is-cancer>>. Acesso em: 28 out. 2014.
- ANAZETTI, M. C. et al. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL-60) and human peripheral blood mononuclear cells. **Toxicology**, v. 188, p. 261-274, 2003.
- APERS, S. et al. Antiangiogenic activity of synthetic dihydrobenzofuran lignans. **J. Nat. Prod.**, v. 65; p. 718-720. 2002.
- AYRES, D. C.; LOIKE, J. D. Lignans. Chemical, Biological and Clinical Properties. **Cambridge University Press**: Cambridge, U.K., 1990.
- BARBOSA, C. V. **Avaliação do potencial antineoplásico de plantas medicinais utilizadas como coadjuvantes no tratamento do câncer pelos pacientes do CACON/UFAL**. 2009. 112 p. Dissertação - Universidade Federal de Alagoas, 2009.
- BELLANCE, N.; LESTIENNE, P.; ROSSIGNOL, R. Mitochondria: from bioenergetics to the metabolic regulation of carcinogenesis. **Front Biosci**, v. 14, p. 4015-4034, 2009.
- BHATTACHARYYA, D. et al. Proteins differentially expressed in elicited cell suspension culture of *Podophyllum hexandrum* with enhanced podophyllotoxin content. **Proteome Science**, v. 10, 2012.
- BLAGOSKLONNY, M. V. **Cell Cycle Checkpoints and Cancer**. U.S.A. Eureka, 2001.
- BOBE, G. et al. Dietary lignan and proanthocyanidin consumption and colorectal adenoma recurrence in the Polyp Prevention Trial. **Int J Cancer**, v. 130, n. 7, p. 1649-59, 2012.
- BRAGA, F. C. et al. A. Angiotensin-converting enzyme inhibition by Brazilian plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 5, p. 353-8, 2007.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 56, p. 1649-1659, 2004.

BRAZ, R. F. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BYLUND, A. et al. Anticancer Effects of a Plant Lignan 7-Hydroxymatairesinol on a Prostate Cancer Model. **Exp Biol Med**. v. 230, p. 217-223, 2005.

CARDOSO, M. F. C. et al. A new approach for the synthesis of 3-substituted cytotoxic nor- β -lapachones. **J Braz Chem Soc**, v. 24, n. 1, p. 12-16, 2013.

CAREW, J. S. et al. Targeting autophagy augments the anticancer activity of the histone deacetylase inhibitor SAHA to overcome Bcr-Abl-mediated drug resistance. **Blood**, v. 110, n. 1, p. 313-322, 2007.

CARVALHO, J. E. Atividade antiulcerogênica e anticâncer de produtos naturais e de síntese. **Revista Multiciência**, Unicamp, n.7, 2006.

CHARLTON, J. L. Antiviral activity of lignans. **J. Nat. Prod.**, v. 61, p.1447-1451, 1998.

CHEN, D. et al. Interiotherins C and D, two new lignans from *Kadsura interior* and antitumor-promoting effects of related neolignans on Epstein-Barr virus activation. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 9, p. 1242-1245, 2002.

CHENG, W. H. et al. Synthesis and evaluation of novel podophyllotoxin derivatives as potential antitumor agents. **Eur J Med Chem**.v. 85, p. 498-507, 2014.

CHEN, J.; THOMPSON, L.U. Lignans and tamoxifen, alone or in combination, reduce human breast cancer cell adhesion, invasion and migration in vitro. **Breast Cancer Res Treat**, v.80, p. 163-70, 2003.

CHEN, N.; KARANTZA-WADSWORTH, V. Role and regulation of autophagy in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, p. 1516-1523, 2009.

CHO, J. Y. et al. Savinin, a lignan from *Pterocarpus santalinus* inhibits tumor necrosis factor- α production and T cell proliferation. **Biol Pharm Bull**, v. 24, n. 2, p.167-71, 2001.

COHEN, G. M. et al. Formation of large molecular weight fragments of DNA is a key committed step of apoptosis in thymocytes. **J Immunol**, v. 153, p. 507-516, 1994.

CORDEIRO, R.; FERNANDES, P. L.; BARBOSA, L. A. Semente de linhaça e o efeito de seus compostos sobre as células mamárias. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.9, p. 727-732, 2009.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev Virtual Quim**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chem. Rev.**, v. 109, p. 3012-3043, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 3670-3695, 2013.

DAMAYANTHI, Y.; LOWN, J. W. Podrophyllotoxins: current status and recent developments. **Curr. Med. Chem.**, v. 5, n. 3, p. 205-252. 1998.

DANBARA, N. et al. Enterolactone induces apoptosis and inhibits growth of Colo 201 human colon cancer cells both *in vitro* and *in vivo*. **Anticancer Res**, v. 25, p. 2269-76, 2005.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**, v. 13, n. 8, p. 795-808, 1992.

DERETIC, V.; KLIONSKY, D. J. How cells clean house. **Sci Am**, v. 298, n. 5, p. 74-81, 2008.

ENGELKE, F. Fitoterápicos e Legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v.1, n., p. 10-15, 2003.

ELOFF, J. N.; KATERERE, D. R.; MCGAW, L. J. The biological activity and chemistry of the southern African Combretaceae. **J Ethnopharmacol**, v. 119, n. 3, p. 686-99, 2008.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p.1829, 2010.

FOSTER, I. Cancer: a cell cycle defect. **Radiography**, v.14, n. 2, p. 144-149, 2008.

FORGO, P. et al. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea jacea* L. **Fitoterapia**, v. 83, n. 5., p. 921-5, 2012.

FUJIWARA, K. et al. Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy. **Int J Oncol**, v. 31, p. 753-760, 2007.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Exploiting death receptor signaling pathways for tumor therapy. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1705, n.1, p. 27-41, 2004.

GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Diff**, v. 14, p. 1237-1266, 2007.

GENG, Y. et al. Chloroquine-induced autophagic vacuole accumulation and cell death in glioma cells is p53 independent. **Neuro-Oncology**, v. 12, n. 5, p. 473-481, 2010.

GROTH-PEDERSEN, L. et al. Vincristine induces dramatic lysosomal changes and sensitizes cancer cells to lysosome-destabilizing siramesine. **Cancer Res**, v. 67, p. 2217-2225, 2007.

GOTTILIEB O. R.; YOSHIDA, M. Lignóides, com atenção especial à química das neolignanas. **Química Nova**, São Paulo, v.7, p. 250-273, 1984.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, 2011.

HARIKUMAR, K. B. et al. Sesamin Manifests Chemopreventive Effects through Suppression of NF- κ B-regulated Cell Survival, Proliferation, Invasion and Angiogenic Gene products. **Mol Cancer Res**, v. 8, n. 5, p. 751-761, 2010.

HE, C.; LEVINE, B. The Beclin 1 interactome. **Curr Opin Cell Biol**, v. 22, p. 140-149, 2010.

HIRANO, T.; GOTOH, M.; OKA, K. Natural flavonoids and lignans are potent cytostatic agents against human leukemic HL-60 cells. **Life Science**, v. 55, p. 1061-1069, 1994.

HØYER-HANSEN, M.; JÄÄTTELÄ, M. Review Series: Autophagy in Higher Eukaryotes - A Matter of Survival or Death. **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 574-580, 2008.

HU, C.; YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. Antioxidant activities of the flaxseed lignan secoisolariciresinol diglucoside, its aglycone secoisolariciresinol and the mammalian lignans enterodiol and enterolactone in vitro. **Food Chem Toxicol**, v. 45, p. 2219-27, 2007.

ICHIKAWA, K.; KINOSHITA, T.; NISHIBE, S.; SANKAWA, U. The Ca²⁺ antagonist activity of lignans. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 8, p. 3514-3517. 1986.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativas de câncer no Brasil, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>. Acesso em: 14 out. 2014.

JEONG, J. B. et al. Arctigenin induces cell cycle arrest by blocking the phosphorylation of Rb via the modulation of cell cycle regulatory proteins in human gastric cancer cells. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1573-1577, 2011.

KABEYA, Y. et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. **EMBO J**, v. 19, n. 21, p. 5720-5728, 2000.

KANG, M. J. et al. Functional Chromatography Reveals Three Natural Products that Target the Same Protein with Distinct Mechanisms of Action. **Chembiochem**, v. 15, p. 2125-2131, 2014.

KANG, K. et al. The chemopreventive effects of *Saussurea salicifolia* through induction of apoptosis and phase II detoxification enzyme. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 12, p. 2352-9, 2007.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, p. 316-323, 2004.

KATO, M. J. Global phytochemistry: the Brazilian approach. **Phytochemistry**, v. 57, n. 5, p. 621-623, 2001.

- KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 10, n. 3, p. 221-237, 2011.
- KIM, S. J. et al. Growth Inhibition and Cell Cycle Arrest in the G0/G1 by Schizandrin, a Dibenzocyclooctadiene Lignan Isolated from *Schisandra chinensis*, on T47D Human Breast Cancer Cells. **Phytother. Res.**, v. 24, p. 193–197, 2010.
- KHIEV, P. et al. Cytotoxic Terpenoids from the Methanolic Extract of *Bridelia cambodiana*. **J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.**, v. 52, n. 6, p. 626-631, 2009.
- KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull**. 2 ed. Mcgraw-Hill Brasil, 2012.
- KONDO, Y. et al. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. **Nat Rev Cancer**, v. 5, p. 726-734, 2005.
- KUMAR, V. et al. **Robbins e Contran. Patologia: bases patológicas da doença**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.
- LAMBLIN, F. et al. Intérêt des lignanes dans la prevention et le traitement de cancers. **Medicine/Sciences**, v. 24, p. 511-9, 2008
- LEE, H. K.; XIAO, Z. Lignans in treatment of cancer and other diseases. **Phytochemistry Reviews**, v. 2, p. 341-362, 2003.
- LEE, J. et al. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up regulated in sertoli cells versus germ cell injury of the testis. **Endocrinology**, v. 140, p. 852-858, 1999.
- LEE, W. Y.; LIU, K. W.; YEUNG, J. H. Reactive oxygen species-mediated kinase activation by dihydrotanshinone in tanshinones-induced apoptosis in HepG2 cells. **Cancer Lett**, v. 285, n. 1, p. 46-57, 2009.
- LI, L. et al. Schisandrin B enhances doxorubicin-induced apoptosis of cancer cells but not normal cells. **Biochem Pharmacol**, v. 71, p. 584–595, 2006.
- LIMA, G. R. M. et al. Bioactivities of the Genus *Combretum* (Combretaceae): A Review. **Molecules**, v. 17, p. 9142-9206, 2012.
- LIU, Z. et al. Schisandrin B Attenuates Cancer Invasion and Metastasis Via Inhibiting Epithelial Mesenchymal Transition. **Plos ONE**, v. 7; n. 7, 2012.
- LOURO, I. D. et al. **Genética molecular do câncer**. 1 ed. São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.
- LOUIS, M. et al. Antibody-based immunotherapy of cancer: new insights, new targets. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1081-1084, 2012.
- MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

- MACRAE, W. D.; TOWERS, G. H. N. Biological activities of lignans. **Phytochemistry**, v. 23, n. 6, p. 1207-1220, 1984.
- MAIURI, M. C. et al. BH3-only proteins and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/BclX_(L). **Autophagy**, v. 3, p. 374-376, 2007.
- MARINHO-FILHO, J. D. B. et al. Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chem Biol Interact**, v.183, p. 369-379, 2010
- MARTIN, S. J.; GREEN, D. R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? **Cell**, v. 82, p. 349-352, 1995.
- MATSUMOTO, T.; HOSONO-NISHIYAMA, K.; YAMADA, H. Antiproliferative e apoptoticeffects of butyrolactone lignans *Arctium lappa* on leukemic cells. **Planta medica**. v. 72, n. 3, p. 276-278, 2006.
- MEIJER, L. Le cycle de division cellulaire et sa régulation Interphase Cycle. **Oncologie**, v. 5, p. 311-326, 2003.
- MELO, J. G. et al. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-india (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (dc.) Stapf) e centela (*Centella asiática* (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira**. V.21, n.1, 2007.
- MIURA, D. et al. Hydroxymatairesinol and its mammalian metabolite enterolactone reduce the growth and metastasis of subcutaneous AH109A hepatomas in rats. **Nutr Cancer**, v. 58, p. 49–59, 2007.
- MORITANI, S. et al. Citotoxic components of bardanae fructus (goboshi). **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 19, n. 11, p. 1515-1517, 1996.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.
- MUKHERJEE, B. et al. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. **DNA repair**, v. 5, p. 575–590, 2006.
- NASCIMENTO, S. C.; MELLO, J. F.; CHIAPPETA, A. A. Cytotoxic agents. Experiments with KB cells. **Rev. Inst. Antibiot. Univ. Fed. Pernambuco**, v. 22, n. 19–26, 1985.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**, v.66, n.7, p.1022-1037, 2003.
- NISHIDA, K.; YAMAGUCHI, O.; OTSU, K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. **Circ Res**, v. 103, p. 343-351, 2008.

OSTENFELD, M. S. et al. Effective tumor cell death by sigma-2 receptor ligand siramesine involves lysosomal leakage and oxidative stress. **Cancer Res**, v. 65, p. 8975-8983, 2005.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.

PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. **Lancet**, v. 133, p. 571-573, 1889

PAGLIN, S. et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles. **Cancer Res**, v. 61, p. 439-444, 2001.

PÁSKA, C. et al. Antitumor compounds from *ipomoea cairica* (L.) sweet cell cultures. **Toxicology Letters**, v. 88, suppl. 1, p. 104, 1996.

PASQUIER, E. et al. Antiangiogenic activity of paclitaxel is associated with its cytostatic effect, mediated by the initiation but not completion of a mitochondrial apoptotic signaling pathway. **Mol Cancer Ther**, v. 3, n. 10, p. 1301-1310, 2004.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PIETERS, L. et al. Synthesis and biological evaluation of dihydrobenzofuran lignans and related compounds as potential antitumor agents that inhibit tubulin polymerization. **J. Med. Chem.**, v. 42, p. 5475-5481, 1999.

PINHO, M. **Biologia Molecular do Câncer: fundamentos para a prática médica**. 1. ed. Revinter Ltda. 2005.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química nova**, v.25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013.

QU, H. et al. Lignans are involved in the antitumor activity of wheat bran in colon cancer SW480 cells. **J Nutr**, v. 135, p. 598-602, 2005.

RAMESH, A.S. et al. Isolation, characterisation and cytotoxicity study of arjunolic acid from *Terminalia arjuna*. **Nat. Prod. Res.**, v. 26, n. 16, p. 1549-1552, 2012.

REGGIORI, F. et al. Selective Types of Autophagy. **Int J Cell Biol**, v. 2012, p. 1-18, 2012.

REN, Y. et al. Potent cytotoxic aryl-naphthalene Lignan Lactones from *Phyllanthus poilanei*. **Journal of natural products**, v. 77, p. 1494-1504, 2014.

REYES-ZURITA, F. J. et al. The natural triterpene maslinic acid induces apoptosis in HT29 colon cancer cells by a JNKp53-dependent mechanism. **BMC Cancer**, v. 11, n. 154, 2011.

ROBBINS, S. L.; CONTRAN, R. S.; KUMAR, V. **Fundamentos da Patologia Estrutural e Funcional**. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1995.

RONINSON, I. B.; BROUDE, E. V.; CHANG, B. D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug Resistance Updates**, v. 4, p. 303-313, 2001.

RIXE, O.; FOJO, T. Is cell death a critical end point for anticancer therapies or is cytostasis sufficient? **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 24, p. 7280-7, 2007.

SAARINEN N. M. et al. Hydroxymatairesinol, a novel enterolactone precursor with antitumor properties from coniferous tree (*Picea abies*). **Nutrition and Cancer**, v. 36, n. 2, p.207-216, 2000.

SALGALLER, M. L.; LODGE, P. A. Use of cellular and cytokine adjuvants in the immunotherapy of cancer. **J. Surg. Oncol.**, v.68, p. 122-138, 1998.

SCHRODER, H. C. et al. Differential in vitro anti-HIV activity of natural lignans. **Zeitschrift für Naturforschung**, n.45, v.11/12, p.1215-21, 1990.

SERRA, C. P. et al. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, v. 12, p. 424–432, 2005.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**, 6. ed. 1º reimpressão. Porto Alegre: Ed-UFSC, 2010.

SIVIERO, F. **Biologia celular: bases moleculares e metodologia de pesquisa**. 1 ed. – São Paulo: Roca, 2013.

SHAPIRO, H. M. **Practical Flow Cytometry**. New York : Ed Wiley-Liss, 1995.

SHOEMAKER , J. P.; DAGHER, R. K. Remissions of mammary adenocarcinoma in hypothyroid mice given 5-fluorouracil and chloroquine phosphate. **J Natl Cancer Inst**, v. 62, n. 6, p. 1575-1578, 1979.

SÓLYOMVÁRY, A. et al. Specific hydrolysis and accumulation of antiproliferative lignans in the fruit of *Leuzea carthamoides*(Willd.) DC. **Nat Prod Res**, v.28, n. 10, p. 732-9, 2014.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Quim. Nova**, v. 27, n.2, p. 308-312, 2004.

SOUZA, M. V. N. et al. Natural products in advance clinical trials applied to cancer. **Rev. Fitos.**, v. 3, p. 25-41, 2007.

SUNG, M. K.; LAUTENS, M.; THOMPSON, L. U. Mammalian lignans inhibit the growth of estrogenin dependent human colon tumor cells. **Anticancer Res**, v. 18, p. 1405–8, 1998.

TANABE, H. et al. Sesamin induces autophagy in colon cancer cells by reducing tyrosine phosphorylation of EphA1 and EphB2. **Int J Oncol.**, v. 39, n. 1, p. 33-40, 2011.

TAKASAKI, M. et al. Antitumor- promoting activity of lignans from the aerial part of *Saussurea medusa*. **Cancer Letters**. v. 158, p. 53-59, 2000

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **PNAS**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TRUMM, S.; EICH, E. Cytostatic activities of lignanoides from *Ipomoea cairica*. **Planta Medica**, v.55, p.658-9, 1989.

TSCHAN, M. P.; SIMON, H. U. The role of autophagy in anticancer therapy: promises and uncertainties. **J Intern Med**, v. 268, n. 5, p. 410-418, 2010.

TULP, M.; BOHLIN, L. Unconventional natural sources for future drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 10, p. 450-458, 2004.

UMEZAWA, T. Phylogenetic distribution of lignan producing plants. *Wood Research*, v. 9, 2003

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

VIJAYAKURUP, V. et al. Phenethyl caffeate benzoxanthene lignan is a derivative of caffeic acid phenethyl ester that induces bystander autophagy in WiDr cells. **Mol Biol Rep.**, v. 41, n. 1, p. 85-94, 2014.

WAN, C. K. et al. Gomisin A alters substrate interaction and reverses P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in HepG2-DR cells. **Biochem Pharmacol**, v. 72, p. 824–837, 2006.

WANI, M. C. et al. Plant antitumor agent.VI.The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **J. Am. Chem. Soc.**, v.93, p.2325-2327, 1971.

WEINBERG, R. A. **A biologia do Câncer**. São Paulo: Ed. Artmed, 2008.

WEISSENSTEIN, U. et al. Interaction of standardized mistletoe (*Viscum album*) extracts with chemotherapeutic drugs regarding cytostatic and cytotoxic effects *in vitro*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 6, 2014.

WU, J. et al. Molecular cloning and characterization of rat LC3A and LC3B--two novel markers of autophagosome. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 339, n. 1, p. 437-442, 2006.

WU, S. B. et al. Chemical constituents from the fruits of *Sonneratia caseolaris* and *Sonneratia ovata* (Sonneratiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 1-5, 2009.

XIA, P. et al. WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. **EMBO J**, v. 32, p. 2685–2696, 2013.

YUAN, J.; ADAMSKI, R.; CHEN, J. Focus on histone variant H2AX: To be or not to be. **FEBS Letters**, v. 584, p. 3717–3724, 2010.

ZHENG, H. et al. Autophagy Enhances the Aggressiveness of Human Colorectal Cancer Cells and Their Ability to Adapt to Apoptotic Stimulus. **Cancer Biol Med**, v. 9, p. 105-110, 2012.

ZHOU, J. et al. Vitexin 6, a novel lignan, induces autophagy and apoptosis by activating the Jun N terminal kinase pathway. **Anticancer Drugs**, v. 24, n. 9, p. 928-36, 2013.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Therap**, v. 92, p. 57-70, 2001.

ZUCO, V. et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. **Cancer Lett**, v. 175, p. 17-25, 2002.

ANEXO A - EQUIPAMENTOS

- Agitador de placa, MLW Modelo Thys 2®
- Banho-maria, DELTA Modelo 105Di®
- Bomba à vácuo, EXIMPUMP®
- Citoentrífuga, CT-2000 CIENTEC®
- Centrífuga refrigerada, SORVALL® Biofuge fresco
- Centrífuga de placas, Eppendorf Modelo Centrifuge 5810R
- Citômetro de fluxo, Guava EasyCyte mini®
- Contador automático de células sanguíneas, Coulter Counter T-530®
- Deonizador de água Milli-Q, Milipore®
- Espectrofotômetro de placa DTX-880, Beckman Coulter®
- Fluxo laminar, VECO®
- Incubadora de células, (CO2 Water-Jacket Incubator) NUAIRE TS Autoflow®
- High Throughput Screening (HTS)/Laboratory Automation Workstation, Biomek 3000, Beckman Coulter®
- Microscópio óptico, Metrimpex Hungary/PZO-Labimex Modelo Studar lab®
- Microscópio óptico de inversão, ZEISS, AXIOVERT 40C
- Mini Protean® tetra cell, Biorad
- Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell, Biorad
- pHmetro, Micronal® B474
- Pipetas automáticas, Gilson®
- PowerPac™ HC High-Current Power Supply, Biorad®
- Shaker, BIOMIXER – TS 2000A
- Sistema de Fotodocumentação, ImageQuant 300 Imager GE Healthcare®
- Sonicador, UNIQUE – ULTRA CLEANER 1600A

ANEXO B - SOLUÇÕES E KITS

Cultura de Células

PBS (Phosphate Buffer Solution; pH 7,2)

NaCl	0,15M
Na ₂ HPO ₄	10mM
KH ₂ PO ₄	2mM

Estudos por Citometria de Fluxo

Solução PI-ciclo

Iodeto de propídeo (Sigma)	50mg/mL em PBS
Citrato de sódio	0,2%
Triton X-100	0,1%

Solução de Laranja de Acridina

Solução estoque:

Laranja de acridina (Sigma) 1mg/mL em EtOH

Solução de uso:

“Solução estoque” 1:1000 em PBS

Western Blot

Tampão de corrida – TGS 10X (pH 8,3), BioRad

Tris	25mM
Glicina	192mM
SDS	0,1%

Tampão de transferência – TG 10X (pH 8,3), BioRad

Tris	25mM
Glicina	192mM
MeOH	20%

Composição do tampão de amostra 5X

Tris-HCl (Tris plus One), pH 6,8	0,5M
Glicerol	50%
B-mercaptoetanol.....	1%
Azul de bromofenol	0,5%
SDS	10%

Componentes do kit para dosagem de proteínas DC *Protein Assay* (Bio-Rad Laboratories)

<i>Reagent A</i>	Solução alcalina de tartarato de Cobre
<i>Reagent B</i>	Reagente de Folin
<i>Reagent S</i>	Solução surfactante