



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

ANTONIO ADAILSON DE SOUSA SILVA

**ESTUDOS TOXICOLÓGICOS E ANTICÂNCER DE UMA FRAÇÃO RICA EM
ACETOGENINAS DAS SEMENTES DE *Annona muricata* L.**

FORTALEZA

2019

ANTONIO ADAILSON DE SOUSA SILVA

**ESTUDOS TOXICOLÓGICOS E ANTICÂNCER DE UMA FRAÇÃO RICA EM
ACETOGENINAS DAS SEMENTES DE *Annona muricata* L.**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

FORTALEZA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S1e SILVA, ANTONIO ADAILSON DE SOUSA.
ESTUDOS TOXICOLÓGICOS E ANTICÂNCER DE UMA FRAÇÃO RICA EM ACETOGENINAS
DAS SEMENTES DE *Annona muricata* L. / ANTONIO ADAILSON DE SOUSA SILVA. – 2019.
141 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação
em Farmacologia, Fortaleza, 2019.
Orientação: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho.
1. *Annona muricata*. 2. Fração rica em acetogeninas. 3. Acetogeninas. 4. Câncer. I. Título.
CDD 615.1
-

ANTONIO ADAILSON DE SOUSA SILVA

**ESTUDOS TOXICOLÓGICOS E ANTICÂNCER DE UMA FRAÇÃO RICA EM
ACETOGENINAS DAS SEMENTES DE *Annona muricata* L.**

Tese submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho

Aprovada em 31.07.2019

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Bruno Coelho Cavalcanti
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar
Universidade Federal do Ceará

Profª. Dra. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Cláudio Costa dos Santos
Universidade Federal Rural do Semi Árido

Epígrafe

“Sonho que se sonha só, é só um sonho
que se sonha e só. Mas sonho que se
sonha junto é realidade.”

Raul Santos Seixas

Dedicatória

À minha família. Em especial, à minha
mãe Domingas Erotildes de Sousa.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, por me receber em seu núcleo de pesquisa, pelos inúmeros ensinamentos, pela sabedoria e exemplo de empenho e determinação.

Ao pesquisador Prof. Dr. Bruno Coelho Cavalcanti por todo incentivo, parceria, sugestões e muita paciência durante todo o desenvolvimento do Doutorado. Grande parte desse trabalho devo a você, seu auxílio está acima de qualquer palavra.

Ao pesquisador Dr. Wesley Lyevertton Ribeiro Correia pela parceria nos estudos *in vivo* e colaborações técnicas que foram essenciais para esse estudo.

À Profa. Dra. Selene Maia de Moraes, que me proporciona relevante e contínuo aprendizado de 2011 (início do mestrado) aos dias atuais.

Ao Prof. Dr. Cláudio Costa dos Santos por estar sempre de portas abertas no Laboratório de Química Medicinal.

A Profa. Dra. Nylane Nunes Alencar, por me despertar ao estudo do metabolismo dos seres vivos. Essa visão me abriu muitas portas, desde a uma melhor compreensão da oncologia à minha atuação clínica.

À Profa. Dra. Geanne Matos de Andrade por disponibilizar seu laboratório (Laboratório de Neurociências e Comportamento).

À Profa. Dra. Ana Paula Nunes, pelos ensinamentos e relevante contribuição nos ensaios de análises de histopatologia dos experimentos *in vivo*.

Aos meus pais, Antonio Germano da Silva e Domingas Erotildes de Sousa, por todos os conselhos e apoio incondicional. Às minhas irmãs, Adriana Silva, Eva Silva e Telma Silva, pelo incentivo e por acreditarem em mim.

À Edilmara Silva, por todo carinho e compreensão, pelos cuidados e apoio incondicional em todos os momentos.

À toda família do Laboratório Nacional de Oncologia Experimental e do Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos da UFC. Em especial, Dr. Stefâncio Barreto e Dra. Andreia Felinto pelo auxílio nos experimentos *in vivo*.

A Dra. Cássia de Fátima, que quando mais precisei de auxílio, lá estava ela disposta a me ajudar. Em número, foi uma pequena colaboração. Mas em nível de importância, foi imensa.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia (PPGFar) da Universidade Federal do Ceará.

A todos do Laboratório de Neurofarmacologia. Em especial, Dr. Arnaldo Viana, Vilani e Jéssica Rabelo.

À Adelânia Roque Marinho, pelo apoio, paciência e ajuda nos momentos burocráticos desta jornada.

À “velha guarda” do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da Universidade Estadual do Ceará, Dr. José Milton (Miltinho Brega), MSc. Alexandre Barros (Mestre Álex), MSc. Pablito Travassos (Pablito Pétersson), Dr. João Campos Filho (João Pimpolho), MSc. Marcelo Araújo (Mr. Crata), MSc. Lúcio Bouty (Menino Bouty) e MSc Fransérgio Américo (Serginho).

Aos químicos e amigos Franklin Conrado Maia e Rosa Helena Andrade Honório pelo auxílio, paciência e pelas longas conversas “jogadas fora” durante os estudos em HPLC na UECE.

Aos meus eternos ICs, Joana Barros de Alexandre, Larissa Guerra Vieira e Clécio Galvão Martins (McNC) por estarem sempre à disposição e pela amizade que construímos nesses anos de convivência.

À aspirante à IC Diana Ferreira por todo auxílio e por estar sempre disponível durante toda essa jornada.

Aos funcionários do Biotério, em especial Erlon, Diego Abreu e Sr. Francisco Francisquini pela recepção e amizade desenvolvidas nos últimos dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia por me proporcionar esta linda e rica experiência de tornar-me Doutor.

À equipe Pharmaceutical School MF, que mesmo a distância me deu grande apoio e tem relevante participação em meu crescimento pessoal e profissional.

Aos órgãos de fomento: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (FUNCAP).

RESUMO

ESTUDOS TOXICOLÓGICOS E ANTICÂNCER DE UMA FRAÇÃO RICA EM ACETOGENINAS DAS SEMENTES DE *Annona muricata* L.

O câncer é uma patologia que apresenta mais de 100 tipos diferentes e é definido como enfermidades complexas de caráter mutacional, proliferativo, de crescimento celular descontrolado, com potencial de invadir os tecidos e órgãos adjacentes, podendo migrar para regiões distantes do organismo, caracterizando a metástase. Apesar do atual arsenal terapêutico contra o câncer, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado e aproximadamente 60% das drogas disponíveis têm origem vegetal. Nas últimas décadas, as acetogeninas das anonáceas têm se destacado na busca por candidatos a fármacos antitumorais por apresentar elevada atividade contra células tumorais. Com isso, o presente estudo objetivou avaliar as propriedades anticâncer de uma fração rica em acetogeninas (FRA) obtida das sementes de *Annona muricata* L. em modelos tumorais *in vitro* e *in vivo*. Foi preparada uma fração rica em acetogeninas (FRA) e testada *in vitro* (linhagem tumoral HCT-116) e *in vivo* (modelos murinos). FRA apresentou citotoxicidade seletiva frente a células HCT-116 em comparação a células de linhagem não tumoral L929, usando o método do MTT, e eritrócitos tratados com FRA não apresentaram hemólise (250 µg/mL). Células HCT-116 tratadas com FRA apresentaram alterações do ciclo, aumentando o número de células na fase G0/G1, resultando em morte celular por apoptose, detectada com o ensaio de externalização de fosfatidilserina (anexina V). Corroborando com dados da literatura, pode-se sugerir que o mecanismo de ação de FRA ocorra principalmente por via mitocondrial, uma vez que o dano ao DNA e a oxidação proteica só surgem após pelo menos 12 h de tratamento com FRA, e que, o pré-tratamento com um agente antioxidante (GSH-OEt) apresenta potente efeito protetor nas células tratadas. Em modelos *in vivo*, FRA apresentou atividade de inibição do crescimento tumoral dose-dependente frente a Sarcoma 180 (modelo *Mus musculus*, albino, linhagem *Swiss*) e tumor Walker 256 (modelo *Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*). Os parâmetros histológicos dos animais tratados não apresentaram diferenças entre os grupos, enquanto parâmetros bioquímicos e hematológicos apresentaram pequenas alterações. Portanto, os dados desses ensaios corroboram com os dados da literatura e FRA surge como um possível candidato a fármaco anticâncer. No entanto, novos estudos são necessários para uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação, farmacocinética e toxicidade a médio e longo prazo.

Palavras-chave: *Annona muricata*, Fração rica em acetogeninas, Acetogeninas, Câncer.

ABSTRACT

TOXICOLOGICAL STUDIES AND ANTICANCER OF A RICA FRACTION IN ACETOGENINS OF THE SEEDS OF *Annona muricata* L.

Cancer is a pathology that presents more than 100 different types and is defined as complex diseases of a mutational, proliferative character, of uncontrolled cellular growth, with the potential to invade the adjacent tissues and organs, being able to migrate to distant regions of the organism, characterizing the metastasis. Despite the current therapeutic armamentarium against cancer, several tumors still do not have adequate treatment and about 60% of the available drugs are of vegetable origin. In recent decades, anonaceous acetogenins have been prominent in the search for candidates for antitumor drugs because they have selective activity against tumor cells. This study aimed to evaluate the anticancer properties of an acetogenin rich fraction (FRA) isolated from *Annona muricata* L. seeds in experimental models in vitro and in vivo. A fraction rich in acetogenins (FRA) were prepared and tested in vitro (tumor line HCT-116) and in vivo (murine models). FRA presented selective cytotoxicity against HCT-116 cells as compared to non-tumor cell lines L929 by the MTT method, and erythrocytes treated with FRA showed no hemolysis (250 µg/mL). FRA-treated HCT-116 cells showed cycle changes, increasing the number of cells in the G0/G1 phase, resulting in apoptosis cell death, detected by the phosphatidylserine (annexin V) externalization assay. Corroborating with literature data, it may be suggested that the mechanism of action of FRA occurs mainly mitochondrial, since DNA damage and protein oxidation only appear after at least 12 hours of FRA treatment, and that pre-treatment with an antioxidant (GSH-OEt) has a potent protective effect on treated cells. In vivo models, FRA showed dose-dependent tumor growth inhibitory activity against Sarcoma 180 (model *Mus musculus*, albino, Swiss) and Walker 256 tumor (*Rattus norvegicus* model, Wistar). The histological parameters of the treated animals presented no difference between the groups, whereas biochemical and hematological parameters presented small alterations. Pontanto, data from these trials corroborate with data from the literature and FRA appears as a possible candidate for anticancer drug. However, further studies are needed for a better understanding of its mechanisms of action, pharmacokinetics and toxicity in the medium and long term.

Keyword: *Annona muricata* L., Acetogenin rich fraction, Acetogenins, Cancer.

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	Câncer.....	22
1.2	Epidemiologia.....	22
1.3	Carcinogênese.....	26
1.4	Ciclo celular e câncer.....	29
1.5	Vias de morte celular e câncer.....	30
1.6	Metabolismo do câncer.....	34
1.7	A função mitocondrial no metabolismo e morte celular	36
1.8	Tratamento convencional.....	40
1.9	Novos alvos para tratamento do câncer.....	41
1.10	Desenvolvimento de drogas anticâncer a partir de produtos naturais.....	42
1.11	Gênero <i>Annona</i>	43
1.11.1	<i>Annona muricata</i>	43
1.11.1.1	Metabólitos secundários de <i>Annona muricata</i>	45
1.11.1.2	Acetogeninas	46
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA.....	51
3	OBJETIVOS.....	52
3.1	Objetivo Geral.....	52
3.2	Objetivos Específicos.....	52
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1	Preparação da Fração Rica em Acetogeninas (FRA)	54
4.2	Isolamento da anonacina.....	55
4.2.1	Identificação da anonacina por RMN e <i>fingerprint</i>	56
4.3	Ensaio de atividade antioxidante de FRA.....	56
4.3.1	Método do radical DPPH.....	57
4.3.2	Método antirradical ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico)	57
4.3.3	Ensaio por meio do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	58
4.4	Potencial de inibição da enzima Acetilcolinesterase.....	59
4.4.1	Ensaio qualitativo de inibição da enzima Acetilcolinesterase.....	59
4.4.2	Ensaio quantitativo de inibição da enzima Acetilcolinesterase.....	59
4.5	Origem e manutenção das linhagens celulares.....	60
4.5.1	Origem das linhagens celulares.....	60
4.5.2	Manutenção das células em cultura.....	61
4.6	Estudo da atividade citotóxica.....	61
4.6.1	Citotoxicidade de FRA em concentração única (<i>screening</i>) frente a células tumorais.....	61
4.6.2	Estudo de citotoxicidade em células humanas tumorais e células murinas não tumorais – determinação da concentração que inibe 50% da cultura	62
4.7	Teste de atividade clonogênica (formação de colônias)	63
4.8	Determinação da atividade hemolítica	63
4.9	Determinação da Integridade de membrana- viabilidade celular.....	64
4.10	Análise do ciclo celular.....	65

4.11	Ensaio de despolarização mitocondrial – Rodamina 123.....	66
4.12	Ensaio de externalização da fosfatidilserina (Anexina V)	67
4.13	Ensaio do cometa <i>in vitro</i>	68
4.14	Ensaio de oxidação protéica (proteínas carboniladas)	71
4.15	Animais.....	71
4.16	Toxicidade aguda – Método <i>Up and Down</i>	72
4.17	Ensaio Antitumoral - Modelo Sarcoma 180	73
4.18	Ensaio Antitumoral – Modelo Carcinossarcoma de Walker 256	76
4.19	Ensaio de coordenação motora em Rato <i>Wistar</i>	77
4.20	Parâmetros toxicológicos avaliados nos ensaios com modelos murinos	78
4.20.1	Avaliação dos parâmetros bioquímicos.....	78
4.20.2	Avaliação dos parâmetros hematológicos	80
4.21	Análise histopatológica	80
4.22	Estudo da atividade genotóxica e mutagênica	81
4.22.1	Ensaio de genotoxicidade <i>in vivo</i> - Dano ao DNA - Ensaio do cometa	81
4.22.2	Avaliação da mutagenicidade em reticulócitos murinos – Teste do micronúcleo <i>in vitro</i>	82
5	RESULTADOS	83
5.1	Preparação das Fração Rica em Acetogeninas (FRA)	83
5.2	Isolamento e identificação da anonacina	83
5.3	Ensaio de atividade antioxidante de FRA	84
5.4	Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)	84
5.5	Estudo da atividade citotóxica de FRA	85
5.5.1	<i>Screening</i> em três linhagens de células tumorais	85
5.5.2	Avaliação da atividade citotóxica de FRA em células tumorais humanas (HCT-116) e células não tumorais murinas (L929)	85
5.6	Teste de formação de colônias (atividade clonogência)	87
5.7	Atividade hemolítica	87
5.8	Permeabilidade de membrana	88
5.9	Ensaio de despolarização mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	89
5.10	Ensaio de Ciclo celular	90
5.11	Ensaio de fragmentação do DNA internucleossomal	91
5.12	Ensaio de externalização da fosfatidilserina – Anexina V	92
5.13	Ensaio do cometa <i>in vitro</i>	93
5.14	Ensaio de Oxidação Protéica - Proteínas carboniladas	95
5.15	Atividades <i>in vivo</i> de FRA	96
5.15.1	Toxicidade aguda pelo método <i>Up-and-down</i>	96
5.15.2	Experimento <i>in vivo</i> 1 – camundongos <i>Swiss</i> com tumor Sarcoma 180 tratados com FRA.....	98
5.15.3	Experimento <i>in vivo</i> 2 – Ratos <i>Wistar</i> com tumor Walker 256 tratados com FRA	103
5.15.3.1	Ensaio de coordenação motora de Ratos <i>Wistar</i> após tratamento com FRA	103
5.15.3.2	Ensaio de inibição do crescimento tumoral	103
6	DISCUSSÃO	110
7	CONCLUSÃO	123
	REFERÊNCIAS	124
	ANEXOS	141

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O processo de transformação da célula tumoral	26
Figura 2	Principais características da célula tumoral por Hanahan e Weinberg (2011)	28
Figura 3	Principais características da célula tumoral por Fouad e Aanei (2017)	28
Figura 4	Etapas do Ciclo celular	30
Figura 5	A: Características moleculares das vias de morte celular: autofagia, apoptose e necrose*. B: 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	31
Figura 6	Ilustração da geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs)	38
Figura 7	Regulação da via Keap1-Nrf2	40
Figura 8	<i>Annona muricata</i> . A) árvore; B) folhas; C) flor; D) fruto e E) sementes	45
Figura 9	Principais acetogeninas anonáceas encontradas na <i>A. muricata</i> . A) Epoximurina A, fruto (MELOT et al., 2009); B) Murisolina, sementes (LI et al., 2008); C) Annonacina, folhas (BARRETO, 2014); D) Bulatacina, folhas (CHIU, 2003); E) R = H: Colossolona, folhas; R = OH: Annonacinona, folhas (VILA-NOVA et al., 2011)	46
Figura 10	Mecanismo de inibição do complexo I mitocondrial (NADH: ubiquinona oxidoredutase) da cadeia transportadora de elétrons, proposto para as acetogeninas citotóxicas em células tumorais	50
Figura 11	Esquema experimental do trabalho com as etapas e metodologias adotadas para a obtenção da Fração Rica em Acetogeninas	55
Figura 12	Tipos de cometa e classificação por categoria de dano: 0 - sem dano (cauda < 5%); 1 - baixo nível de dano (5 - 20%); 2 - médio nível de dano (20 - 40%); 3 - alto nível de dano (40 - 95%) e 4 - dano máximo (> 95%)	70
Figura 13	Foto do aparelho de Rotarod no qual se faz o teste de coordenação motora.	78
Figura 14	Cromatograma de FRA	83
Figura 15	Estrutura química da anonacina	84
Figura 16	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> de FRA sob as linhagens celulares de: A) câncer colorretal (HCT-116); e B) fibroblastos pulmonares murinos (L929) nos tempos de 24, 48 e 72 h.	86
Figura 17	Efeito da fração FRA sobre a membrana de células de cólon HCT-116 após 24 h de exposição nas concentrações de 5 e 10 µg/mL na presença e/ou ausência de 15 mM de glutatona-etil-éter (GSH-OEt). Doxorubicina (Doxo 2 15 µM) e H ₂ O ₂ foram utilizados como controles positivos. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. **p<0,01; ***p<0,001 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por teste de Tukey	89
Figura 18	Efeito da fração FRA sobre a despolarização mitocondrial de células de cólon HCT-116 após 12 h (painéis A e B) e 24 h (painéis C e D) de exposição nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. ***p<0,001 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por teste de Tukey	90
Figura 19	Efeito de FRA nas concentrações de 5 e 10 µg/mL sobre o ciclo celular em células HCT-116 após 24 h de tratamento. Controle positivo: Doxorubicina (Doxo; 2 µM). Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls	91

Figura 20	Efeito da fração FRA sobre a fragmentação de DNA internucleossomal (Sub-G0/G1) em células HCT-116 após 24 h de tratamento nas concentrações de 5 e 10 µg/mL na presença e ausência de 15 mM de GSH-OEt. Doxorubicina (Doxo; 2 µM) e H ₂ O ₂ (150 µM) foram utilizados como controle positivo. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. ***p<0,001 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por teste de Tukey	92
Figura 21	Efeito da fração FRA nas concentrações de 5 e 10 µg/mL sobre a externalização da fosfatidilserina em células HCT-116 após 24 h de tratamento na presença e ausência de 15 mM de GSH-OEt. Doxorubicina (Doxo; 2 µM) e H ₂ O ₂ (150 µM) foram utilizados como controle positivo. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. ***p<0,001 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Teste de Tukey	93
Figura 22	Avaliação dos danos ao DNA (índice de danos), através do ensaio do cometa alcalino (pH>13) na presença e ausência das enzimas 8-oxoguanina DNA glicosilase humana (hOGG1) e endonuclease III (ENDO III), induzidos pela fração FRA (5 e 10 µg/mL) em células de cólon HCT-116 após 12h (painel A) e 24 h painel (B). H ₂ O ₂ (150 µM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. *p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Teste de Tukey	94
Figura 23	Avaliação dos danos ao DNA (índice de danos) induzidos pela fração FRA (5 e 10 µg/mL) em células de cólon HCT-116 após 12 h (painel A) e 24 h painel (B) através do ensaio do cometa neutro. H ₂ O ₂ (150 µM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,01 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Teste de Tukey	95
Figura 24	Avaliação da oxidação protéica induzida pela fração FRA (5 e 10 µg/mL) em células de cólon HCT-116 na presença e ausência de 15 mM de glutathiona-etil-éter (GSH-OEt). H ₂ O ₂ (150 µM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. *p<0,001 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test	96
Figura 25	Diâmetro do tumor sarcoma 180 em Camundongos <i>swiss</i> entre o quarto e o oitavo dia de tratamento com FRA (20, 30 e 40 mg/kg/dia) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg/dia)	98
Figura 26	Peso ponderado do baço de camundongos <i>swiss</i> com Sarcoma 180 após oito dias de tratamento com FRA (20, 30 e 40 mg/kg/dia) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg/dia). Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 8 animais. ***p<0,001 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test	99
Figura 27	Inibição do crescimento tumoral (sarcoma 180) em camundongos <i>swiss</i> após oito dias de tratamento com FRA (20, 30 e 40 mg/kg/dia) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida mg/kg/dia). Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 8 animais. *p<0,05 e ***p<0,001 em relação ao Controle negativo (C-) por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test	100

Figura 28	Avaliação dos danos ao DNA (índice de danos) de células do sangue periférico de camundongos <i>swiss</i> , através do ensaio do cometa alcalino (pH>13), induzidos pela fração FRA (20, 30 e 40 mg/kg) após oito dias de tratamento. Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais. *p<0,05 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls	101
Figura 29	Avaliação de indução de micronúcleos em reticulócitos em camundongos <i>swiss</i> , induzidos pela fração FRA (20, 30 e 40 mg/kg) após oito dias de tratamento. Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais. Comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls. *p<0,05. Obs. RETMN: reticulócitos micronucleados	101
Figura 30	Volume tumoral de Walker 256 em rato <i>wistar</i> mensurado a partir do 5º dia de tratamento com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia) .	104
Figura 31	Inibição do crescimento tumoral de Walker 256 em rato <i>wistar</i> após sete dias de tratamento com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia). Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais. **p<0,01 e ***p<0,001 em relação ao Controle negativo (C-) por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test	105
Figura 32	Peso ponderado do baço de rato <i>wistar</i> com tumor Walker 256 tratamento por sete dias com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia). Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais. ***p<0,001 em relação ao Controle negativo (C-) por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma no Brasil	24
Tabela 2	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma na região Nordeste do Brasil..	25
Tabela 3	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma no estado do Ceará, Brasil ...	25
Tabela 4	Classificação taxonômica de <i>Annona muricata</i> L.	44
Tabela 5	Acetogeninas encontradas nas sementes de <i>Annona muricata</i> L.	47
Tabela 6	Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade <i>in vitro</i>	60
Tabela 7	Células utilizadas nos ensaios antitumorais e genotoxicidade <i>in vivo</i>	60
Tabela 8	Potential de FRA para inibição da enzima acetilcolinesterase por método qualitativo (CCD) e quantitativo (ELISA)	85
Tabela 9	Atividade citotóxica <i>in vitro</i> de FRA frente a linhagem HCT-116 (câncer colorretal) e L929 (fibroblastos pulmonares murinos) nos tempos de 24, 48 e 72h	86
Tabela 10	Avaliação da atividade clonogênica após exposição das células HCT-116 e L929 a fração FRA nas concentrações de 1, 5 e 10 e 20 µg/mL por 12 h. Controle positivo: MMS (4×10^{-5})	87
Tabela 11	Relatório contendo os dados dos ensaios do teste de toxicidade aguda pelo método Up and Down	97
Tabela 12	Toxicidade aguda de FRA pelo método do <i>up-and-down</i> (OECD 425). Onde: X = morreu; O = sobreviveu	97
Tabela 13	Peso dos órgãos de camundongos (<i>Mus musculus</i>) linhagem <i>Swiss</i> tratados com FRA (20, 30 e 40 mg/kg/dia) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg/dia)	100
Tabela 14	Peso relativo dos órgãos de ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) linhagem <i>Wistar</i> (g/100g de tecido) tratamento com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia). **P<0,01; ***P<0,001 em relação ao controle negativo.....	104
Tabela 15	Parâmetros bioquímicos de ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) linhagem <i>Wistar</i> tratamento com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia)....	106
Tabela 16	Parâmetros hematológicos de ratos (<i>Rattus norvegicus</i>) linhagem <i>Wistar</i> tratamento com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia).....	107

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABTS	-	Ácido 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico
AChE	-	Enzima acetilcolinesterase
AcOEt	-	Acetato de etila
AAI	-	Índice de atividade antioxidante
Akt	-	Serina/Treonina Quinase
ALT/ALAT/TGP	-	Alanina transaminase / alanina aminotransferase / transaminase glutâmica pirúvica sérica.
ANOVA	-	Analisy of variance (Análise de variância)
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
Apaf-1	-	Fator apoptótico ativado por protease
AST/SGOT ou TGO	-	Aspartato transaminase/transaminase glutâmica oxalacética - sérica/aspartato aminotransferase
AICI	-	Iodeto de acetilcolina
ATG	-	Proteínas relacionadas à autofagia
ATP	-	Adenosina trifosfato
BAX	-	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	-	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BCRP	-	<i>Breast cancer resistance protein</i>
Beclin-1	-	<i>Mammalian orthologue of yeast Atg6</i>
B-raf	-	Oncogene
CASPASE	-	<i>Cysteine-dependent- aspartate-direct proteases</i>
CAT	-	Enzima catalase peroxissomal
CCD	-	Cromatografia em camada delgada
CDCl₃	-	Clorofórmio deuterado
CDKs	-	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CEUA	-	Comitê de Ética na Utilização de Animais
CI₅₀	-	Concentração inibitória média
CHCM	-	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CKI	-	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CLAE	-	Cromatografia líquida de alta eficiência
CTE	-	Cadeia transportadora de elétrons

- CTE-Mito** - Elétrons liberados da Cadeia Transportadora de Elétrons mitocondrial
- CMSP** - Células mononucleares do sangue periférico
- CONCEA** - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CrP** - Creatininaa plasmática
- Cullin** - Família de proteínas que regulam a ubiquitina.
- DAMPs** - *Damage-associated molecular-pattern*
- DL₅₀** - Dose letal para metade da população
- DMEM** - *Dubecco's Modified Eagle Medium*
- DNA** - *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)
- DNPH** - 2,4-dinitrofenilhidrazina
- DOXO** - Doxorubicina
- DPM** - Desvio padrão da média
- DPPH** - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
- DTNB** - ácido 2-nitrobenzóico (5,5'- ditiobis) ou reagente de Ellman's
- EDTA** - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EESAM** - Extrato etanólico das sementes de *Annona muricata*
- EESAM(CHCl₃)** - Fração clorofórmica de EESAM
- EM** - Espectrometria de massa
- Endo III** - Endonuclease III (uma timina-glicol-DNA-glicosilase)
- EPM** - Erro Padrão da Média
- ERK1/2** - *Extracellular signal-regulated kinases 1 and 2*
- EROs** - Espécies Reativas de Oxigênio
- Fas/Fas-L** - Sistema de sinalização de morte celular
- FD** - Frequência de dano
- FDA** - *Food and Drug Administration* (EUA)
- FDG-PET** - *Fluoro-2-deoxyglucose positron emission tomography*
- FITC** - Fluoresceína
- FRA** - Fração rica em acetogeninas
- GPX** - Glutathione peroxidase
- GSH** - Glutathione monomérica
- GSH-OEt** - Glutathione-etil-éter
- GSSH** - Dissulfeto de glutathione

- GR** - Glutathione redutase
- GST** - Glutathione S-transferase
- H/E** - Hematoxilina e eosina
- HCT-116** - Linhagem de câncer colorretal humana
- Hep G2** - Linhagem de hepatoma humano
- HL-60** - Linhagem de Leucemia Mieloide Humana
- HO-1** - Heme oxigenase-1
- hOGG-1** - *8-oxoguanina DNA glycosilase humana*
- HPLC** - *High Performance Liquid Chromatography*
- IAP** - Proteínas inibidoras de apoptose
- IC 95** - Intervalo de confiança de 95%
- INCA** - Instituto Nacional do Câncer
- IT** - Inibição do crescimento tumoral
- IV** - Índice de varredura
- JNK** - Janus Kinase
- Keap1** - Sensor celular de estresse oxidativo e eletrofílico.
- K-Ras** - Oncogene
- L929** - Linhagem de fibroblasto pulmonar murinho não cancerígeno
- LC3** - *Microtubule-associated protein light chain 3*
- MAPK** - *Mitogen-activated protein kinases*
- MIM** - Membrana interna mitocondrial
- MLKL** - *Mixed lineage kinase domain-like protein*
- MMS** - Metilmetanosulfonato
- MN** - Micronúcleos
- MOM** - *Mitochondrial outer membrane permeabilization*
- mTOR** - *Mechanistic target of rapamycin*
- MTT** - 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) -2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazólio
- MRP2** - Multidrug resistance-associated protein 2
- mtPTP** - Permeabilidade do poro de transição mitocondrial.
- Myc** - Oncogene
- NADH** - Nicotinamida adenina dinucleótido
- Nm** - Nanômetro
- NaOH** - Hidróxido de sódio

- NCCD** - *Nomenclature Committee on Cell Death*
- NOX** - Enzima NADPH oxidases
- NPDM** - Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos
- NQO1** - NAD(P)H-quinona oxidoredutase
- Nrf2** - Fator de transcrição de proteínas de defesa
- O₂⁻** - Ânion superóxido
- OH** - Radical hidroxila
- OONO-** - Peroxinitrito
- OMS** - Organização mundial da saúde
- OVCAR-8** - Linhagem de câncer de ovário humana
- P38** - Proteína membro da via relacionada com MAPK (mamífero).
- p53** - Proteína tumoral 53
- PARP** - Poli (ADP-Ribose) Polimerase
- PBS** - *Phosphate Buffer Solution*
- PC-3** - Linhagem de câncer de ovário humana
- pH** - Potencial Hidrogeniônico
- PI** - Iodeto de propídio
- PI3K** - *Phosphoinositide 3-kinase*
- PI3K/Akt** - Fosfoinositídeo-3-quinase/serina-treonina quinase
- PKB/C** - Proteínas quinases B/C
- PML** - *Promyelocytic leukemia*
- PRX** - Peroxidases envolvidas no turnover da tioredoxina
- PS** - *Phosphatidylserine*
- RETMN** - Reticulócitos micronucleados
- Rbx1** - *RING box protein1*
- RIPK1** - *Receptor-interacting protein kinase*
- RMN** - Ressonância Magnética Nuclear
- RPM** - Rotações por minuto
- RPMI 1640** - Meio de cultura de células de mamíferos.
- SCGE** - *Single-cell gel electrophoresis*
- SF-295** - Linhagem de glioblastoma
- SFB** - Soro fetal bovino
- SNB-19** - Linhagem celular de glioblastoma humano

SOD	-	Superóxido dismutase
THF	-	Anel tetraidrofurânico
Txr_{ox}	-	Tiorredoxina oxidada
Txr_{red}	-	Tiorredoxina reduzida
TNF	-	<i>Tumor necrosis fator</i>
Ub	-	Ubiquinona
UGT	-	<i>UDP-glucuronosil transferase</i>
UNIFAC	-	Unidade de Farmacologia Clínica
VCM	-	Volume corpuscular médio
VDAC	-	<i>Voltage-dependent anion channel</i>
$\Delta\Psi_m$	-	Potencial transmembrânico mitocondrial
γGCS	-	<i>γ-glutamylcisteína sintetase</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é representado por um conjunto de mais de 100 doenças e é definido como enfermidades complexas de caráter mutacional, proliferativo, de crescimento celular aberrante e descontrolado, em que células invadem os tecidos e órgãos adjacentes, podendo migrar para regiões distantes do organismo, evento este denominado metástase (KUMAR et al., 2016; INCA, 2017). Atualmente, as mortes causadas por câncer ultrapassaram as mortes causadas por doenças cardiovasculares em países desenvolvidos, e representam nestes, a principal causa de morte, enquanto, em países em desenvolvimento, representa a segunda causa de morte (JEMAL et al., 2017).

O termo câncer tem origem no latim: “*cancer*”, que significa “caranguejo”, no qual, a referida analogia deve-se ao modo de crescimento infiltrante do tumor, que pode ser comparado às pernas do crustáceo, que as introduz na areia ou lama para se fixar e dificultar sua remoção (ALMEIDA et al., 2005). O câncer representa doenças de difícil tratamento, caracterizado por alterações genéticas e/ou epigenéticas, e apresenta características peculiares como crescimento desordenado de células cancerígenas e potencial invasivo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Entretanto, apesar do avanço nas pesquisas para o combate ao câncer e o crescente acervo na terapia destas doenças, a incidência de câncer vem crescendo nas últimas décadas (BRAY, 2014).

Além disso, mudanças demográficas e epidemiológicas globais contínuas sinalizam uma carga crescente de câncer nas próximas décadas, particularmente em países de baixa e média renda (LMIC), com mais de 20 milhões de novos casos de câncer esperados anualmente já em 2025 (BRAY, 2014).

1.2 Epidemiologia

Estimou-se que em 2012, ocorreram 14,1 milhões de casos novos de câncer e 8,2 milhões de óbitos. Houve um discreto predomínio do sexo masculino tanto na incidência (53%) quanto na mortalidade (57%). De modo geral, as maiores taxas de incidência foram observadas nos países desenvolvidos na América do Norte, Europa Ocidental, Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia. Taxas intermediárias são vistas na América do Sul e

Central, no Leste Europeu e em grande parte do Sudeste Asiático, incluindo a China. As menores taxas são vistas em grande parte da África e no Sul e Oeste da Ásia, incluindo a Índia. Enquanto, nos países desenvolvidos, predominam os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento (pulmão, próstata, mama feminina, cólon e reto), nos países de baixo e médio desenvolvimento, ainda é alta a ocorrência de tipos de câncer associados a infecções (colo do útero, estômago, esôfago, fígado). Além disso, apesar da baixa incidência em países africanos e no sul e oeste da Ásia, a mortalidade nesses países representa quase 80% dos óbitos de câncer no mundo (FERLAY et al., 2015).

Os tipos de câncer mais incidentes no mundo em 2012 foram pulmão (1,8 milhão), mama (1,7 milhão), intestino (1,4 milhão) e próstata (1,1 milhão). Nos homens, os mais frequentes foram pulmão (16,7%), próstata (15,0%), intestino (10,0%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Em mulheres, as maiores frequências foram encontradas na mama (25,2%), intestino (9,2%), pulmão (8,7%), colo do útero (7,9%) e estômago (4,8%) (FERLAY et al., 2015). No Brasil, estimou-se que nesse mesmo período, surgiram cerca de 520 mil novos casos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, que representa a maior incidência para ambos os sexos (134 mil casos novos), seguido de próstata (60 mil), mama feminina (53 mil), cólon e reto (30 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (18 mil) (INCA, 2012).

Nessa mesma perspectiva, estima-se, para o Brasil, no biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano (Tabela 1). Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 430 mil casos novos de câncer. Destes, os tipos de câncer mais frequentes serão os cânceres de próstata (68.220 casos novos) em homens, e mama (59.700) em mulheres. Além dos citados, completam a lista dos dez tipos de câncer mais incidentes: cólon e reto (intestino: 36.360), pulmão (31.270), estômago (21.290), colo do útero (16.370), cavidade oral (14.700), sistema nervoso central (11.320), leucemias (10.800) e esôfago (10.970) (INCA, 2017).

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma no Brasil*

Homem			Mulher		
Localização Primária	Nº Casos	%	Localização Primária	Nº Casos	%
Próstata	68.220	31,7	Mama Feminina	57.700	29,5
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7	Cólon e Reto	18.980	9,4
Cólon e Reto	17.380	8,1	Colo do Útero	16.370	8,1
Estômago	13.540	6,3	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2
Cavidade Oral	11.200	5,2	Glândula Tireóide	8.040	4,0
Esôfago	8.240	3,8	Estômago	7.750	3,8
Bexiga	6.690	3,1	Corpo do útero	6.600	3,3
Laringe	6.390	3,0	Ovário	6.150	3,0
Leucemias	5.940	2,8	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7	Leucemias	4.860	2,4

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2017).

A incidência de câncer no Brasil difere do padrão internacional citado por Ferlay (et al., 2015), que correlaciona uma maior ocorrência de tipos de câncer associados a infecções, como colo do útero, estômago, esôfago e fígado a países de baixo e médio desenvolvimento, como dos demais países da América do Sul. Pois, segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer - INCA (2017) (Tabela 1), o câncer de fígado sequer aparece entre os 10 mais ocorrentes em ambos os sexos, enquanto que o de esôfago aparece apenas na sexta posição do sexo masculino (ausente entre os 10 em mulheres), o de estômago, representa 6º e 4º colocado respectivamente para mulheres e homens, enquanto que o câncer de colon uterino, aparece em sétima posição do tipo de câncer de maior ocorrência.

A distribuição da incidência de câncer por regiões do Brasil, mostra que o Norte e o Nordeste apesar de apresentarem os cânceres de próstata e de mama como os principais, surgem como incidências de relevantes impactos os cânceres de colon do útero e o de estômago. Para o Nordeste, a estimativa para este biênio é de 15.820, 3.140 e 2.920 novos casos de câncer de próstata, de estômago e de traqueia, brônquios e pulmão respectivamente para homens e, 11.860, 6.030 e 2.800 novos casos de câncer de mama, de colo e reto e colo do útero respectivamente para mulheres (Tabela 2) (INCA, 2017).

Tabela 2. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma na região Nordeste do Brasil*

Homem			Mulher		
Localização Primária	Nº Casos	%	Localização Primária	Nº Casos	%
Próstata	15.820	26,9	Mama Feminina	11.860	20,3
Estômago	3.140	5,3	Cólon e Reto	6.030	10,3
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.920	5,0	Colo do Útero	2.800	4,8
Cólon e Reto	2.260	3,8	Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.310	3,9
Cavidade Oral	1.890	3,2	Glândula Tireóide	2.220	3,8
Laringe	1.550	2,6	Estômago	2.110	3,6
Esôfago	1.460	2,5	Corpo do útero	1.480	2,5
Leucemias	1.380	2,3	Ovário	1.470	2,5
Sistema Nervoso Central	1.290	2,2	Sistema Nervoso Central	1.100	1,9
Linfoma não Hodgkin	1.000	1,7	Leucemias	1.090	1,9

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA (2017).

Ao avaliar esse mesmo período no estado do Ceará, para o sexo masculino, o câncer de próstata (2.730), o de estômago (800) e o de traqueia, brônquios e pulmão (600) nas primeiras colocações, assim como na região Nordeste. No sexo feminino, assim como na região nordeste, o câncer de mama aparece como o tipo de maior incidência (2.200), enquanto que o câncer do colo do útero aparece em segundo, com 990 novos casos e os tipos “traqueia, brônquios e pulmão” surgem como o terceiro de maior incidência com 540 novos casos (Tabela 3) (INCA, 2017).

Tabela 3. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma no estado do Ceará, Brasil*

Homem			Mulher		
Localização Primária	Nº Casos	%	Localização Primária	Nº Casos	%
Próstata	2.730		Mama Feminina	2.200	
Estômago	800		Colo do Útero	990	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	600		Traqueia, Brônquio e Pulmão	540	
Cólon e Reto	440		Estômago	520	
Esôfago	320		Cólon e Reto	500	
Laringe	310		Glândula Tireóide	490	
Cavidade Oral Esôfago	290		Ovário	280	
Leucemias	260		Corpo do Útero	240	
Sistema Nervoso Central	240		Sistema Nervoso Central	200	
Bexiga	130		Leucemias	200	

*Números arredondados para múltiplos de 10.

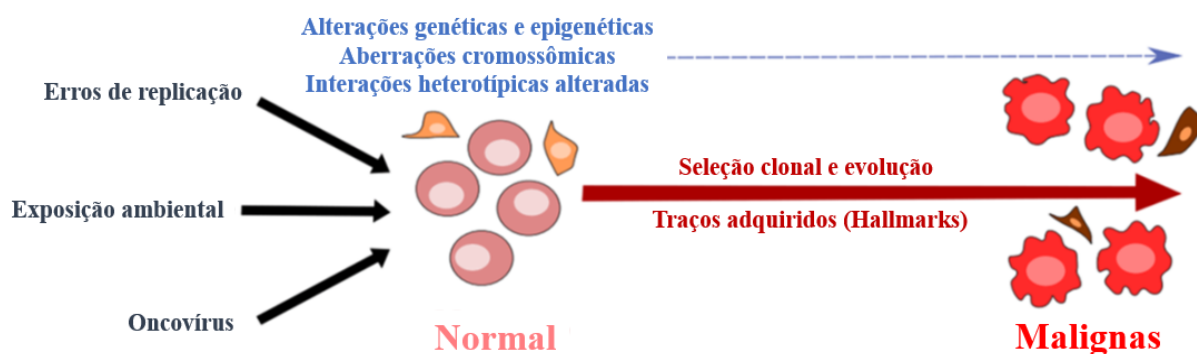
Fonte: INCA (2017).

1.3 Carcinogênese

A carcinogênese é um processo que acontece lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável (como é o caso do câncer colorretal, que pode levar de cinco a quinze anos para seu desenvolvimento). A formação do câncer ocorre em 3 estágios: 1 - iniciação, 2 - promoção e 3 - progressão. No primeiro estágio (iniciação), agentes carcinogênicos causam mutações no material genético, que ainda não são detectáveis; no segundo estágio (promoção), o contínuo contato com carcinógenos promove a formação de células malignas e, terceiro estágio (progressão), caracterizado por multiplicação descontrolada, evolui até o surgimento das manifestações clínicas (ALMEIDA et al., 2005).

O processo de transformações que origina a célula tumoral, é representado por diferentes agressões que atuam continuamente nas células, levando a alterações transformadoras na (epi) genética, números cromossômicos e arranjos, e interações heterotípicas que, ao longo dos avanços para a malignidade (Figura 1), passam por ciclos de seleção clonal evolucionária que levam à aquisição de traços competentes para os *hallmarks* do câncer (FOUAD; AANEI, 2017). Estudos constantes, estão sempre revelando novos mecanismos de carcinogênese, assim como novas características das células tumorais.

Figura 1. O processo de transformação da célula tumoral



Fonte: Adaptado de Fouad e Aanei (2017).

Em 2000, Hanahan e Weinberg publicaram uma revisão de literatura, na qual destacavam as seis principais características do câncer (*The hallmarks of cancer*): autossuficiência em sinais de crescimento (autonomia para crescimento), insensibilidade a sinais anti-crescimento (crescimento contínuo), evasão da apoptose (evitando a morte por apoptose), potencial replicativo ilimitado (proporcionando crescimento contínuo),

angiogênese sustentada (para suprir a demanda energética das células tumorais) e invasão de tecidos e metástase.

Dez anos depois, Lazebnik (2010) publica suas considerações sobre os seis *hallmarks* do câncer, intitulada “What are the hallmarks of cancer?”. Nesta análise, é posto em questão se *hallmarks* deveriam ser características exclusivas do câncer ou não. No caso do câncer, sabe-se que tumores benignos apresentam cinco das 6 principais marcas registradas propostas por Hanahan e Weinberg (2000), excetuando-se apenas “invasão e metástase”. No entanto, até mesmo o único *hallmark* considerado exclusivo de células malignas por Lazebnik (2010), “invasão e metástase”, Fouad e Aanei (2017), em seu texto de revisão, lembram que “a capacidade de invasão e disseminação” não são características exclusivas de células malignas, ao citarem por exemplo, a endometriose, condição benigna que ocorre entre 5 a 15% das mulheres (WILBUR et al., 2017).

No entanto, independente das críticas de Lazebnik a “The hallmarks of cancer”, em 2011, Hanahan e Weinberg publicam uma nova revisão, intitulada *Hallmarks of Cancer: The Next Generation*, na qual, além dos seis *hallmarks* já postulados em 2000, acrescentam outros quatro: “reprogramação do metabolismo energético”, “evasão da resposta imune”, “instabilidade e mutação do genoma” e “inflamação promotora de tumor” (Figura 2). De acordo com os autores, os *Hallmarks* do câncer, constituem-se de capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de múltiplos tumores humanos. Tais características constituem um princípio organizador para racionalizar as complexidades da doença neoplásica.

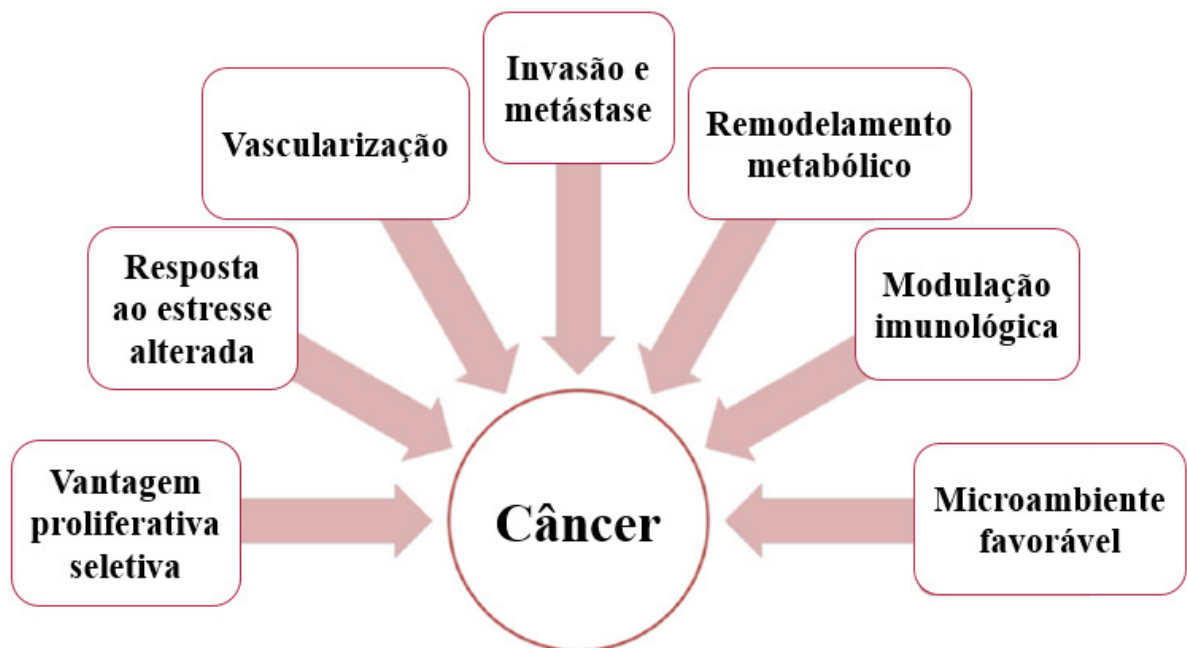
Diante do exposto, seis anos depois, Fouad e Aanei (2017) publicam um artigo de revisão intitulado *Revisiting the hallmarks of cancer*, no qual apresentam uma versão de forma mais simplificada dos *hallmarks* do câncer (Figura 3).

Figura 2. Principais características da célula tumoral por Hanahan e Weinberg (2011)



Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011).

Figura 3. Principais características da célula tumoral por Fouad e Aanei (2017).



Fonte: Adaptado de Fouad e Aanei (2017).

1.4 Ciclo celular e câncer

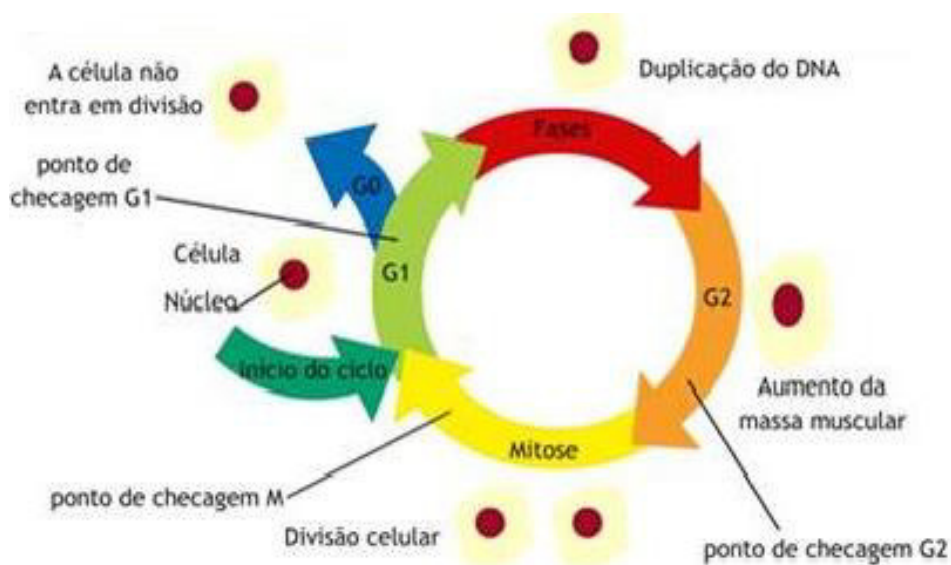
O ciclo celular em células normais, é controlado de forma autônoma por uma série complexa de vias de sinalização pelas quais uma célula cresce, replica seu DNA e se divide, e é operado por um conjunto de enzimas, principalmente as quinases dependentes de ciclina (CDKs), que controlam as duas etapas fundamentais do ciclo: a replicação do DNA e a segregação cromossômica (RASTOGI; MISHRA, 2012, BENDRIS et al., 2015). A desregulação deste ciclo é uma das alterações mais frequentes durante o desenvolvimento do tumor, o que qualifica o câncer como uma doença do ciclo celular (PARK; LEE, 2003).

As CDKs e as ciclinas são reguladores positivos que induzem a progressão do ciclo celular. Para equilibrar esta ação, os inibidores das CDKs (CKI), funcionam regulando negativamente a progressão do ciclo celular. Portanto, a ativação anormal das CDKs e a supressão funcional dos CKI, desregulam positivamente o ciclo celular, constituindo-se fatores primordiais para originar o câncer (PARK; LEE, 2003).

Essas alterações na atividade das CDKs em diferentes fases do ciclo celular são resultantes de eventos reversíveis de fosforilação e de sua associação transitória com cofatores específicos, como ciclinas e CKIs. As ciclinas por sua vez, desempenham papel como ativadores e agentes direcionadores em relação a substratos específicos, enquanto os CKIs atuam como componentes arquitetônicos e inibitórios. A complexidade deste regulamento resulta da existência de controles de pontos de checagem (*checkpoints*) que asseguram que cada etapa do ciclo de divisão celular seja concluída antes que o próximo se inicie (Figura 4). Além disso, informações externas, como adesão de célula-célula ou célula-matriz, ou exposição a fusos mitóticos ou agentes danificadores de DNA, geram sinais que modulam a atividade da maquinaria celular autônoma através de *checkpoints* específicos (BENDRIS et al., 2015).

O processo de checagem, portanto, tem mecanismos que garantem que quaisquer erros sejam corrigidos e, caso contrário, as células cometem suicídio de forma sistemática sem danificar o tecido subjacente. Ou seja, um processo de morte celular programada (apoptose). Na célula tumoral, como resultado de mutações genéticas, esse processo regulatório não funciona, resultando em descontrole e proliferação celular. Alterações nesses mecanismos comumente afetam a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular, causando superexpressão de ciclinas e perda de expressão de CKIs (RASTOGI; MISHRA, 2012).

Figura 4. Etapas do Ciclo celular



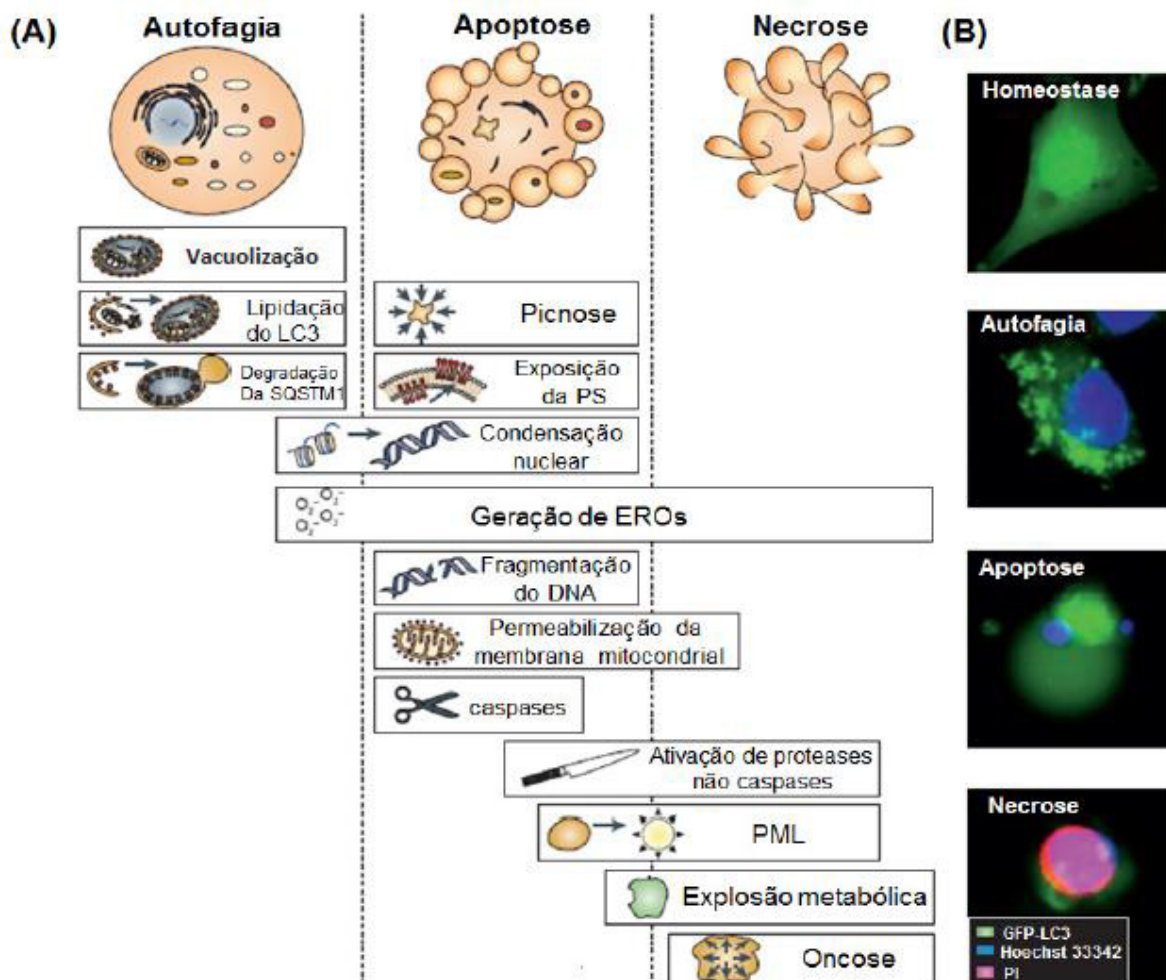
Fonte: Adaptado de Rastogi e Mishra (2012).

1.5 Vias de morte celular e câncer

A vida dos organismos multicelulares está diretamente interligada com a morte celular. O equilíbrio entre a diferenciação, a proliferação e a morte celular, é o responsável pela manutenção da homeostase do organismo. A morte celular programada faz parte de muitos processos fisiológicos, como a formação de órgãos e renovação de tecidos epiteliais, assim como na eliminação de células indesejadas e prejudiciais em alguns processos patológicos. No entanto, em caso de estresse, injúria ou algum tipo de agressão celular ou tecidual, poderá ocorrer morte celular não programada, resultando em dano ao tecido circunvizinho (PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015).

Quando ocorre mutações ou alguma lesão celular que torna a células inviável ao organismo, as vias de morte celular são ativadas para impedir a propagação desta célula. No caso do câncer, ocorre um desequilíbrio ou desativação no processo de morte celular, o que possibilita a propagação de células tumorais. Os principais tipos de morte celular são apoptose, autofagia e necrose, facilmente distinguidas por suas diferenças morfológicas, bioquímicas e moleculares (Figura 5). Apoptose e necrose, invariavelmente contribuem para a morte celular, enquanto a autofagia pode desempenhar papéis pró-sobrevivência ou pró-morte (OUYANG et al., 2012).

Figura 5. A: Características moleculares das vias de morte celular: autofagia, apoptose e necrose*. B: 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.



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*).

*Detecção simultânea de múltiplos parâmetros relacionados à morte celular: células de osteosarcoma U2OS estável expressando a proteína químera 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).

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

A autofagia é um processo catabólico evolutivamente conservado, que se inicia com a formação de autofagossomos, estruturas duplamente ligadas à membrana, circundando macromoléculas e organelas citoplasmáticas, destinadas à reciclagem (LIU et al., 2011, OUYANG et al., 2012). Apresenta importante papel na regulação de inúmeras vias de

sinalização de sobrevivência e morte celular, que determinam o sucesso ou fracasso do câncer. Evidências substanciais demonstraram que mediadores autofágicos chave, como os genes relacionados à autofagia (ATGs, PI3K, mTOR, *p53*, Bcl2 e Beclin-1), podem desempenhar papéis cruciais na modulação da atividade autofágica na iniciação e progressão do câncer (LIU et al., 2013). Existem três formas de autofagia: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (SHINTANI; KLIONSKY, 2004; MIZUSHIMA et al., 2011).

A macroautofagia (autofagia propriamente dita), é considerada complexa e possui diferentes estágios: 1 - a indução ou iniciação; 2 – a nucleação (caracterizada pela formação da vesícula que será o fagóforo); 3 – a maturação (ocorre o alongamento, com o crescimento da vesícula, corresponde ao fechamento do autofagossomo); 4 - a fusão (do autossomo com os lisossomos formando os autofagolisossomos); 5 - a degradação; 6 – a reciclagem. Sendo estas duas últimas as fases finais. Já na microautofagia, parte do citoplasma é sequestrado pela membrana lisossomal. No terceiro tipo de autofagia, mediada por chaperonas, as proteínas que possuem uma sequência pentapeptídica específica que se ligam ao seu substrato alvo no citosol, depois a um receptor na membrana lisossômica e, na sequência, são descartadas por meio de translocação direta para o lúmen do lisossomo, onde serão degradadas (MIZUSHIMA et al., 2011; XIA et al., 2013; VIJAYAKURUP et al., 2014).

A apoptose por sua vez, também conhecida como morte celular programada (embora não seja o único tipo de morte celular programada), é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas característacas, como perda de aderência com células vizinhas e a matriz extracelular, picnositose (condensação da cromatina), fragmentação internucleossômica do DNA e formação dos corpos apoptóticos. Diversas moléculas chaves estão envolvidas no processo de apoptose, que englobam desde as caspases, às proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas (GRIVICICH et al., 2007).

A indução do processo de apoptose pode ocorrer por duas principais vias: a via intrínseca, que emerge a partir da mitocôndria, e a via extrínseca, que é ativada por meio de ligação à receptores de morte (GALLUZZI et al., 2018; WAJANT, 2002).

A apoptose intrínseca é iniciada a partir de diversas alterações microambientais, incluindo retirada do fator de crescimento, dano ao DNA, estresse do retículo endoplasmático, sobrecarga de espécies reativas de oxigênio (EROs), estresse de replicação, alterações microtubulares ou/e defeitos mitóticos (GALLUZZI et al., 2018). O controle desta via, é realizado por pro-enzimas mitocondriais. Quando a célula é estimulada a iniciar o processo de apoptose pelos sinais intracelulares (ou extracelulares, no caso da via extrínseca), as membranas desta tornam-se permeáveis ao citocromo c, que é liberado no citosol e, por sua vez, recruta o Apaf-1 e a pró-caspase-9 para compor o apoptossomo, desencadeando uma cascata de sinalização da caspase-9 e progredindo para a apoptose (OUYANG et al., 2012).

A apoptose extrínseca, é iniciada por alterações do microambiente extracelular, sendo causada principalmente por um dos dois tipos de receptores de membrana plasmática: (1) receptores de morte, cuja ativação depende da ligação do (s) ligante (s) cognato (s), e (2) receptores de dependência, cuja ativação ocorre quando os níveis de seus ligandos específicos caem abaixo de um determinado limiar (GALLUZZI et al., 2018). Tais receptores de morte incluem: receptor de morte na superfície celular FAS (CD95 ou APO-1) e membro da superfamília do receptor TNF 1A (conhecido TNFRSF1A ou TNFR1), 10A (conhecido como TNFRSF10A, TRAILR1 ou DR4) e 10B (conhecido como TNFRSF10B, TRAILR2 ou DR5) (WAJANT, 2002; von KARSTEDT et al., 2017).

Quando o receptor Fas é ativado pelo seu ligante extracelular (Fas-L), forma-se o complexo Fas/Fas-L, que ativa a pro caspase-8, resultando na ativação da pró-caspase-3 (OUYANG et al., 2012). As pró-caspases apresentam uma pequena atividade de protease, e assim, ao entrar no complexo, sua proximidade faz com que uma clive a outra, desencadeando uma cascata de amplificação proteolítica (ALBERTS et al., 2010).

A necrose por sua vez, até recentemente, era considerada o tipo de morte celular não programado e não regulado. Porém, diversos estudos vêm demonstrando que a necrose compartilha alguns mecanismos com a apoptose, desafiando assim, o conceito de “morte não regulada”. No ano de 2005, o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (NCCD, do inglês *Nomenclature Committee on Cell Death*) propôs o termo “Necrose regulada” para classificar esses mecanismos “recém descobertos” (GALLUZZI et al., 2018).

A necrose regulada é, portanto, um tipo de morte celular controlada que eventualmente apresenta extravasamento celular, granulação e inchaço celular (oncoses). Nos

últimos anos, vários subtipos de necrose regulada tem sido estudado: necroptose, piroptose, parthanatos, ferroptose, autose e netose. Esses subtipos compartilham as mesmas características básicas, no entanto, os estímulos que os desencadeiam, assim como as vias moleculares envolvidas nesses processos, são diferentes. Sendo os dois primeiros os que melhor representam a necrose regulada (VANDEN BERGHE et al., 2014).

A piroptose, é caracterizada por ser um tipo de morte celular inflamatória, induzida por meio da ativação de um complexo proteico oligomérico do sistema imunológico inato, o inflamassoma e por ter papel importante na defesa contra parasitas (LAMKANFI; DIXIT, 2014).

A necroptose por sua vez, é a forma mais bem caracterizada de necrose regulada e apresenta rápida permeabilização da membrana plasmática, fator este associado com a liberação do conteúdo celular e subsequente exposição de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e citocinas/quimiocinas (KRYSKO et al., 2017). A sinalização necroptótica converge na montagem de uma plataforma de sinalização citosólica, o necrossoma, com a ativação de seu efetor, o MLKL. Os componentes-chave do necrossoma (RIPK1 e RIPK3), atuam como intermediários de sinalização para a ativação de MLKL (WEBER et al., 2018). Estudos recentes sugerem que a necroptose tem importantes funções na patogênese de diversas doenças humanas (PASPARAKIS; VANDENABEELE, 2015). Tornando-se especialmente importante em tratamentos experimentais de câncer como uma alternativa ao desencadeamento da apoptose, uma vez que uma das características do câncer é o bloqueio ou a evasão da apoptose (KRYSKO et al., 2017).

1.6 Metabolismo do câncer

O metabolismo do câncer é uma das mais antigas áreas de pesquisa em oncologia, antecendendo por algumas décadas a descoberta de supressores tumorais e oncogenes (DeBERARDINIS; CHANDEL, 2016). Há quase um século atrás (década de 1920), Warburg e colaboradores mostraram que em condições aeróbicas, células tumorais metabolizam cerca de dez vezes mais glicose (fermentação láctica) do que células saudáveis nas mesmas condições. Esse fenômeno ficou conhecido como “Efeito Warburg” (KOPPENOL et al., 2011).

Atualmente, está bem estabelecido, que as atividades metabólicas são alteradas em células tumorais, e que estas, contribuem diretamente para aquisição de novas características celulares, e consequentemente, para a malignidade (DeBERARDINIS; CHANDEL, 2016). A partir de 2011, as alterações metabólicas tumorais, passaram a constituir um dos principais marcadores do câncer (HANAHA; WEINBERG, 2011). Sendo assim, a reprogramação metabólica pode ser descrita como uma característica emergente da biologia do tumor e um alvo para o desenvolvimento de drogas anticâncer (MOLINA et al., 2018).

Tamãha é sua relevância, que a tumorigênese é dependente da reprogramação do metabolismo celular, que por sua vez, ocorre por consequência direta e indireta de mutações oncogênicas. As células tumorais são capazes de conseguir nutrientes necessários, mesmo num ambiente pobre em nutrientes. As alterações nos metabólitos intracelulares e extracelulares que podem acompanhar a reprogramação metabólica associada ao câncer têm efeitos profundos na expressão gênica, na diferenciação celular e no microambiente tumoral (PAVLOVA; THOMPSON, 2016).

Um grande obstáculo ao crescimento tumoral, é a perfusão inadequada do tumor, que muitas vezes tornam escassos, nutrientes essenciais como a glicose, os aminoácidos e os lipídios. Para driblar essa dificuldade, muitas estratégias são usadas. As células tumorais obtêm macromoléculas do microambiente tumoral e as quebram no lisossomo, obtendo através desse processo, substratos para a geração de ATP. Atualmente, quatro mecanismos apoiam o desenvolvimento de células tumorais em ambientes pobres em nutrientes: 1 - eliminação de proteínas da matriz extracelular através de integrinas; 2 - captação de albumina mediada por receptores; 3 - consumo macropinocítico de múltiplos componentes do microambiente tumoral e; 4 - englobamento e degradação de células vivas inteiras via entosis (FINICLE et al., 2018).

Quanto ao metabolismo da via glicolítica, esforços extensivos para melhor compreendê-lo, ocorrem continuamente. Por outro lado, a fosforilação oxidativa mitocondrial, permanece praticamente inexplorada, possivelmente, em parte, justificável pelo fato de pouco compreendermos os contextos dos tumores nos quais a fosfolilação oxidativa mitocondrial é essencial. Atualmente, a elevação da glicólise está sendo muito explorada clinicamente através de tomografia por emissão de pósitrons com 2-desoxi-2-fluoro-d-glicose (FDG-PET) para detectar tumores metabolicamente ativos. Paralelamente, o desenvolvimento de enzimas essenciais para o metabolismo da glicólise está sendo testado terapeuticamente, e, relatórios

recentes enfatizam que, além de uma forte dependência da glicólise, muitos tumores ou subpopulações de células tumorais dependem da via de fosforilação oxidativa mitocondrial para processos bioenergéticos e biossintéticos. Portanto, a reprogramação metabólica tumoral é um campo riquíssimo para o estudo e desenvolvimento de drogas antitumorais (MOLINA et al., 2018).

1.7 A função mitocondrial no metabolismo e morte celular

A função bioenergética mitocondrial é quem comanda se a célula vive ou morre. Pois as células precisam de energia para manter suas funções vitais e morrer de forma a não causar dano ao tecido adjacente (apoptose). Na membrana interna mitocondrial (MIM) ocorrem as reações redox mais importantes que convertem a energia dos nutrientes na molécula de ATP, no processo denominado Cadeia Transportadores de Elétrons (CTE), que transporta elétrons do NADH (ou outros substratos) para o oxigênio (respiração mitocondrial). A respiração mitocondrial, gera um potencial transmembrânico ($\Delta\psi$) através da membrana interna, na qual a enzima ATP sintase fosforila o ADP, formando um ATP. A MIM é normalmente impermeável aos prótons e outros íons. Esta função de barreira da MIM é essencial para a transdução de energia. Portanto, quando ocorre permeabilização da MIM, dissipa o $\Delta\psi$, ocasionando o desacoplamento do processo de respiração da ATP sintase, processo que resulta na interrupção da produção de ATP mitocondrial (KUSHNAREVA; NEWMAYER, 2010).

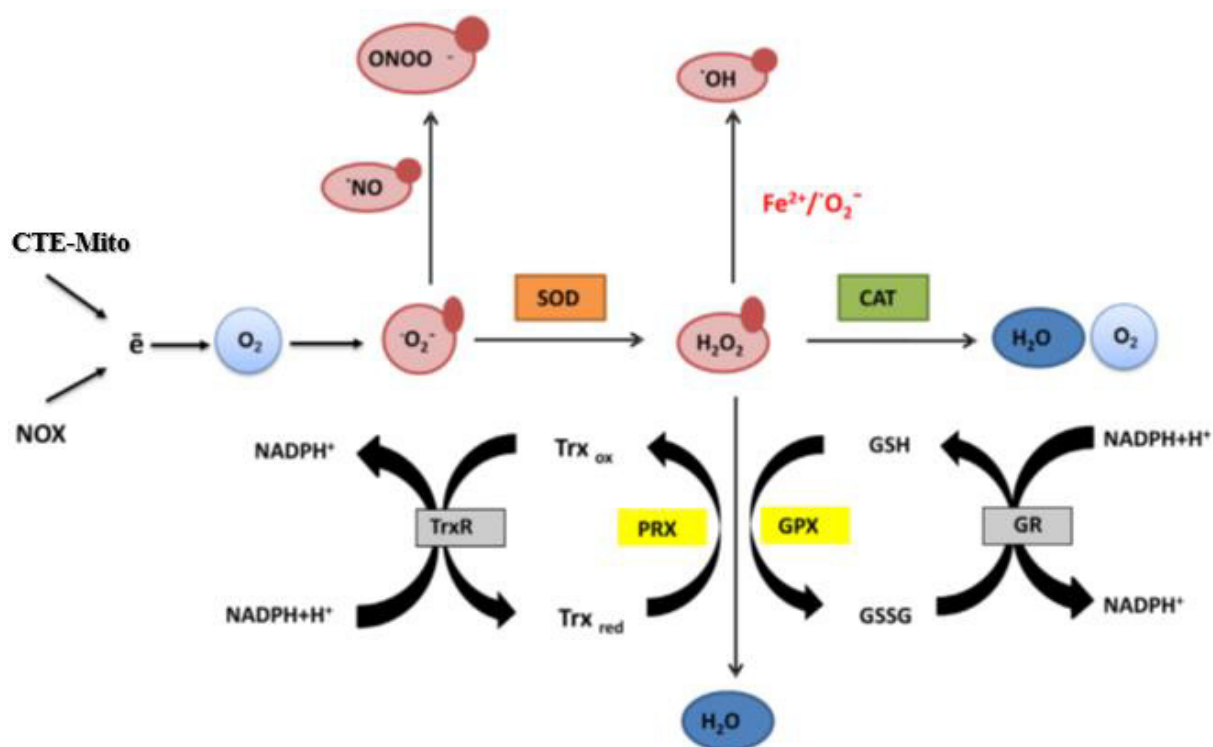
Já a membrana externa mitocondrial (MOM, do inglês: *mitochondrial outer membrane permeabilization*) é constitutivamente permeável a pequenas moléculas, devido a presença de canais não seletivos formados por uma família de porinas mitocondriais, conhecidas como proteínas do canal aniônico voltagem-dependente (VDAC, do inglês: *voltage-dependent anion channel*). Mas é impermeável às proteínas, como o citocromo c, e essa função de barreira protéica é essencial para a sobrevivência celular. Portanto, a permeabilização da MOM (MOMP) é um evento decisivo em muitas formas de morte celular apoptótica, uma vez que MOMP permite o escape para o citoplasma, do citocromo c e outras proteínas apoptogênicas mitocondriais, e a consequente ativação da caspase e morte celular (RICCI et al., 2004). Portanto, o processo apoptótico, inclui passos dependentes de energia, como sinalização de quinase, formação do apoptossoma e ativação de caspases efetoras. Sob déficit bioenergético, as células são desviadas para necrose. A MOMP é um evento decisivo

na execução do processo apoptótico. O déficit bioenergético induzido por MOMP, geralmente é irreversível e induz a morte celular, mesmo quando as caspases são inativas (KUSHNAREVA; NEWMAYER, 2010). Pois a função bioenergética mitocondrial ao sofrer MOMP, pode até ser temporariamente evitada se a atividade da caspase for suprimida, mas normalmente, isso não é suficiente para resgatar as células da depleção progressiva de ATP e perda de sobrevivência clonogênica (LARTIGUE et al., 2009).

Outra importante correlação mitocôndria/morte celular, é por meio da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs). As EROs mitocondriais são os principais indutores de autofagia. No entanto, quando há comprometimento crônico da função mitocondrial, pode ocorrer o processo de mitofagia (remoção da mitocôndria defeituosa). Esse delicado mecanismo permite a eliminação da fonte de estresse oxidativo, fornecendo assim, proteção às células, dos danos oxidativos (MARINI et al., 2015).

As duas maiores fontes de EROs são CTE e enzima NADPH oxidases (NOX) respectivamente (SZNARKOWSKA et al., 2017). A maioria das EROs é produzida durante a respiração aeróbia por elétrons liberados pela CTE na mitocôndria. Quando ocorre oxirredução incompleta origina-se o ânion superóxido (O_2^-), precursor de três espécies restantes: hidroxila ($OH\cdot$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxinitrito ($OONO\cdot$) (CRAWFORD, 2014). A segunda maior fonte de EROs celular são as NOX, que estão no citoplasma, catalisando a produção de superóxido de O_2 e NADPH (ROY et al., 2015) (Figura 6).

Figura 6. Ilustração da geração e eliminação de espécies reativas de oxigênio (EROs)*



Fonte: Sznarkowska et al. (2017).

*Elétrons liberados da Cadeia Transportadora de Elétrons mitocondrial (CTE-Mito) e produzidos por NADPH oxidases (NOX) são as principais fontes de EROs endógenos. Quando um elétron se acopla ao oxigênio molecular (O_2), origina-se o radical livre primário, precursor das EROs remanescentes, o superóxido ($\cdot O_2^-$). Na reação com óxido nítrico de vida curta ($\cdot NO$), o superóxido forma um peroxinitrato altamente reativo ($ONOO^-$) capaz de modificar a estrutura e função das proteínas. Alternativamente, a enzima superóxido dismutase (SOD) converte o superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que pode ser transformado de várias maneiras. Na presença de íons de metais de transição como Fe^{2+} (reação de Fenton) ou em reação com superóxido, o H_2O_2 forma um radical hidroxila altamente reativo ($\cdot OH$) que danifica lipídios, proteínas e DNA. A enzima catalase peroxissomal (CAT) neutraliza o H_2O_2 em água e oxigênio. O H_2O_2 também pode ser utilizado na reação de oxidação da glutatona monomérica (GSH) ao dissulfeto de glutatona (GSSG) ou redução da tiorredoxina (Trx_{red}) à tiorredoxina oxidada (Trx_{ox}) catalisada pela glutatona peroxidase (GPX) ou peroxidases envolvidas no turnover da tiorredoxina (PRX). O *pool* reduzido de glutatona é restaurado pela glutatona redutase (GR), que reduz a glutatona oxidada com o uso de NADPH. Da mesma forma, a tiorredoxina redutase (TrxR) equilibra a quantidade de Trx reduzida pela transferência de elétrons do NADPH para sítios catalíticos oxidados. Graças aos grupos tiol nos resíduos Cys, tanto a GSH como a Trx participam na redução de proteínas oxidadas. Sua síntese (quantidade e velocidade de produção), está sob rígido controle homeostático, criando um sistema responsável pela redução de proteínas sensíveis ao redox no estresse oxidativo.

Níveis excessivos de EROs podem danificar gravemente a célula e induzir a morte celular, dentre outras vias, por meio de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial que resultam na liberação de citocromo *c* no citoplasma e indução da morte por apoptose (GOMEZ et al., 2016). Entretanto, níveis baixos de EROs têm demonstrado induzir

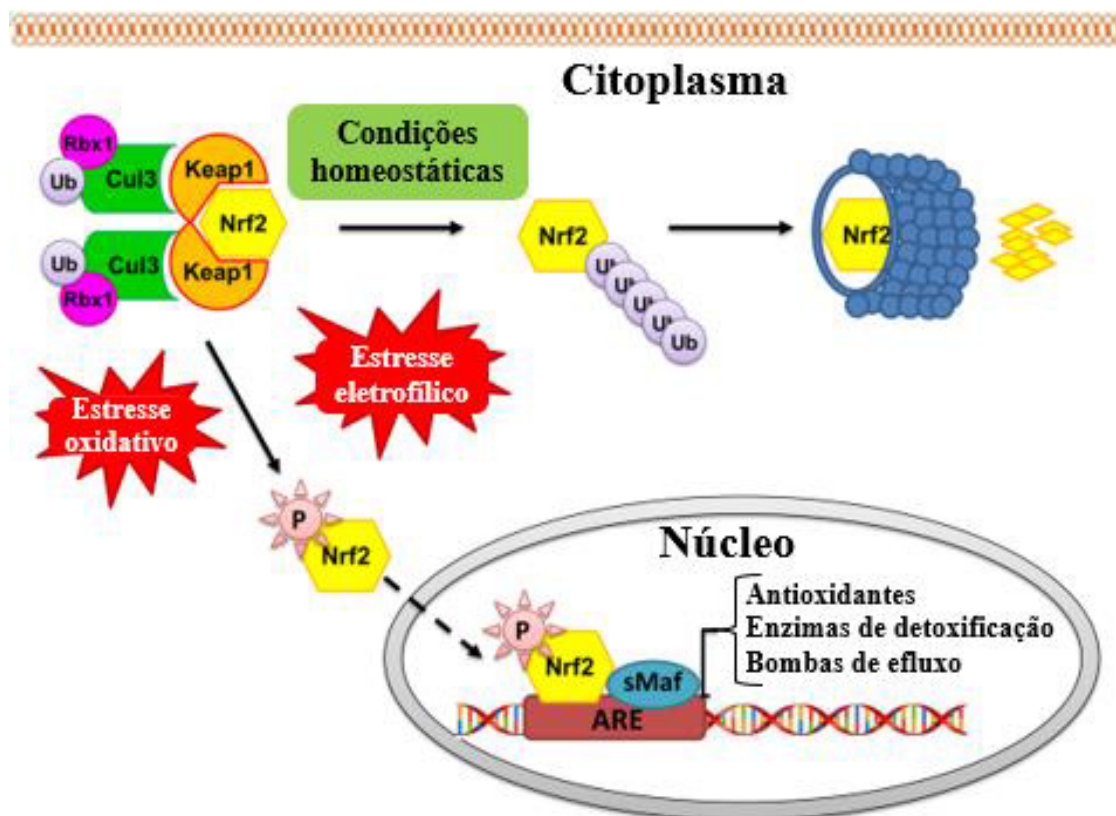
a proliferação celular e diferenciação, estimulando várias vias de sinalização, tais como fosfoinositídeo-3-quinase/serina-treonina quinase (PI3K/Akt), proteínas quinases B/C (PKB/C), ERK1/2, p38 MAPK e Janus Quinase (JNK), que contribuem para a carcinogênese (MARENGO et al., 2016).

Apesar de as células tumorais apresentarem níveis elevados de EROs em comparação com células normais, apresentam também níveis elevados de enzimas antioxidantes e moléculas que protegem células tumorais do dano celular induzido por EROs e morte. Assim, parece razoável que a prevenção do excesso de EROs em células normais pode prevenir danos celulares, enquanto bloqueando o sistema de defesa antioxidante em células tumorais pode promover danos celulares e induzir a morte celular (QAZI et al., 2018).

Os altos níveis intracelulares de EROs nas células tumorais levam ao crescimento e metástase, mas também podem representar um grande risco de dano oxidativo e morte (SZNARKOWSKA et al., 2017). Com isso, os altos níveis de EROs induzem a ativação de vias de defesa do tumor, como a transcrição de Nrf2, que potencializam os mecanismos de defesa antioxidante da célula tumoral. Além disso, a alteração genética da via Nrf2 prejudica a proliferação e tumorigênese induzida pelo K-Ras (G12D) *in vivo*, indicando que a via Nrf2 representa um mediador da oncogênese anteriormente pouco apreciado (DeNICOLA et al., 2011). E, a ativação da via Nrf2 permite a adaptação e a sobrevivência celular regulando a expressão das enzimas antioxidantes, antiinflamatórias e de desintoxicação fase II (Figura 7).

O principal regulador da atividade de Nrf2 em células é o inibidor citosólico Keap1, responsável por sua ubiquitinação e degradação protéica (ITOH et al., 1999). No entanto, Nrf2 também pode ser regulado por oncogenes como o K-Ras (G12D), o B-Raf (V619E) e o Myc (ERT2) e as proteínas antioxidantes induzem resistência tumoral à droga (DiNícola et al., 2011). Diversos tipos de câncer humano, incluindo câncer de pulmão, mama, esôfago, ovário, próstata, pâncreas, colo-retal, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, vesícula biliar e pele, superexpressam Nrf2, o que pode indicar, que realmente, as propriedades citoprotetoras do câncer por meio da via Nrf2, são exploradas pelas células tumorais de modo a promover sua sobrevivência (GEISMANN et al., 2014).

Figura 7. Regulação da via Keap1-Nrf2*



Fonte: Adaptado de Sznarkowska et al. (2017).

*Em condições basais, o repressor citosólico proteína 1 associado ao ECH tipo Kelch (Keap1), uma proteína adaptadora de substrato para Cullin 3 (Cul3)/ubiquitina ligase Rbx1, contém Nrf2 no citoplasma e promove sua ubiquitinação seguida por degradação protéica. Na presença de estímulo eletrofílico e/ou oxidativo, o Nrf2 é liberado do Keap1 e transloca-se para o núcleo onde recruta a proteína Maf pequena (sMaf) e liga-se ao elemento de resposta (ARE) nas regiões promotoras de seus genes alvos, induzindo a sua expressão. A ativação da via Nrf2 permite a adaptação e sobrevivência celular regulando a expressão de enzimas antioxidantes, antiinflamatórias e de desintoxicação de fase II, como superóxido dismutase (SOD), glutatona S-transferase (GST), heme oxigenase-1 (HO-1), NAD(P)H-quinona oxidoredutase (NQO1), UDP-glucuronosil transferase (UGT), γ -glutamylcisteína sintetase (γ GCS) e bombas de efluxo como proteína 2 associada à resistência a múltiplas drogas (MRP2) e proteína de resistência ao câncer de mama (BCRP). Proteínas transcricionalmente controladas por Nrf2 participam da biossíntese, utilização e regeneração de glutatona, tioredoxina e NADPH, resultando na restauração da homeostase redox celular.

1.8 Tratamento convencional

Atualmente, existem vários tipos de tratamento para o câncer. O tratamento convencional, no entanto, baseia-se principalmente em terapia cirúrgica, radioterapia ou quimioterapia. Outras terapias mais modernas são: imunoterapia, terapia alvo, terapia hormonal, transplantes de células tronco e tratamentos personalizados (ou medicina de

precisão). O tipo de tratamento é determinado pela equipe médica e baseado no tipo de tumor, estágio e região do corpo acometida pela neoplasia. Alguns pacientes oncológicos, terão apenas um tratamento, enquanto a maioria destes será tratada por uma combinação de técnicas, como cirurgia e quimioterapia e/ou radioterapia (JEMAL et al., 2017).

A quimioterapia antineoplásica é realizada com a utilização de agentes químicos, isolados ou em combinação com o objetivo de tratar tumores malignos e diferentemente da radioterapia e da terapia cirúrgica, apresenta efeito sistêmico e cada vez mais tem se tornado uma das mais importantes e promissoras ferramentas de combate ao câncer no mundo. A quimioterapia oncológica surgiu na década de 1940, quando se iniciou o uso de mostardas nitrogenadas e inibidores de folato. A partir de então, houve imenso avanço no tratamento contra o câncer, permitindo tratar diversos tipos de cânceres que eram considerados fatais. Além disso, a quimioterapia adjuvante e a terapia hormonal podem prolongar a vida e prevenir a recorrência da doença após a ressecção cirúrgica de diferentes tipos de neoplasias malignas (NEUSS et al., 2013).

Paralelamente ao desenvolvimento de diversos agentes quimioterápicos, houve grande avanço científico e tecnológico, o que permitiu uma melhor compreensão da biologia celular do câncer, surgindo então, as drogas direcionadas ao tipo específico de cada câncer. No entanto, essas terapias inovadoras provavelmente não substituirão os agentes citotóxicos clássicos, pelo menos num futuro próximo. Mas em associação, tem mostrado um sinergismo potente entre moléculas específicas e drogas citotóxicas tradicionais (CORRIE, 2008).

1.9 Novos alvos para tratamento do câncer

Apesar do relevante avanço científico e tecnológico durante as últimas décadas, que permitiu considerável evolução no tratamento do câncer, o número de mortes por esta doença ainda é assustador (INCA, 2017). O tratamento do câncer tem por objetivo a cura, e quando esta não é mais possível, objetiva-se prolongar a sobrevida do paciente e melhorar a qualidade de vida deste. Portanto, diversas vias metabólicas das células tumorais têm sido estudadas na busca por novos alvos para o tratamento de neoplasias.

E, como citado anteriormente, devido a perfusão inadequada do tumor, a célula tumoral apresenta quatro vias alternativas para evitar a escassez de diversos nutrientes

essenciais (1 - eliminação de proteínas da matriz extracelular através de integrinas; 2 - captação de albumina mediada por receptores; 3 - consumo macropinocítico de múltiplos componentes do microambiente tumoral e; 4 - englobamento e degradação de células vivas inteiras via entosis). Novas evidências sugerem que o bloqueio dessas vias isoladamente ou em combinação poderia fornecer benefícios substanciais para pacientes com tumores sólidos incuráveis. As drogas aprovadas pela Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e vários agentes no desenvolvimento pré-clínico ou clínico interromperam vias individuais ou múltiplas. Estas terapias podem aumentar a extensão e a durabilidade da inibição do crescimento tumoral e/ou prevenir o desenvolvimento de resistência quando utilizadas em combinação com os tratamentos existentes (FINICLE et al., 2018).

Outra linha de pesquisa que se mostra muito promissora, é a inibição direta de antioxidantes celulares ou a supressão de vias que levam à sua produção. Com isso, a sensibilização do tumor à quimioterapia poderá potencializar os protocolos de tratamento atuais. O que justifica essa linha, é o fato de existir diferença significativa entre células normais e tumorais. Células normais são sensíveis a alterações do equilíbrio redox, pois seu crescimento e proliferação são muito dependentes das EROs. No caso das células tumorais, estas operam sob estresse oxidativo constante e são muito mais sensíveis as alterações do equilíbrio redox. Portanto, o bloqueio dos mecanismos de antioxidação do tumor surge como uma boa estratégia para o combate ao câncer. Em especial, a inibição da via Nrf2 (Figura 7), parece uma abordagem muito promissora, uma vez que a Nrf2 controla a expressão de antioxidantes celulares cruciais, bombas de fluxo de drogas e enzimas de desintoxicação. Entretanto, é importante lembrar que o efeito de induzir dano oxidativo nas células tumorais depende da dose aplicada, do tipo de célula, da duração e das condições ambientais (SZNARKOWSKA et al., 2017).

1.10 Desenvolvimento de drogas anticâncer a partir de produtos naturais

Do arsenal quimioterápico existente contra o câncer, a maioria (60%) dos fármacos introduzidos nas últimas décadas tem sua origem nos produtos naturais (COSTA-LOTUFO et al., 2010). Entre os compostos derivados de plantas de maior relevância no tratamento do câncer destacam-se, os alcaloides da vinca: vincristina e vinblastina, os derivados da camptotecina, topotecano e irinotecano, etoposido e tenoposídeo, derivados da epipodofilotoxina, paclitaxel (taxol®) e docetaxel (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Por outro lado, o Brasil tem a maior diversidade vegetal do mundo (LEÃO et al., 2007) e com o avanço da tecnologia, o isolamento de compostos biologicamente ativos de plantas vem fornecendo a base molecular para o desenvolvimento de muitas drogas atualmente em uso clínico, especialmente contra o câncer e doenças infecciosas (MESQUITA et al., 2009). Portanto, metabólitos secundários de plantas e seus derivados sintéticos são importantes fontes de drogas antitumorais.

Nesta conjuntura, a Família vegetal Annonaceae, que é composta por cerca de 128 gêneros e inclui mais de 2.300 espécies (MAAS et al., 2001), apresenta diversos compostos com atividade anticâncer, com destaque para as acetogeninas, grupo de compostos químicos exclusivos desta família. A maioria das espécies de Annonaceae são de áreas tropicais ou subtropicais, como exemplo, a *Annona muricata* (BARRETO et al., 2015).

1.11 Gênero *Annona*

Das mais de 2.300 espécies pertencentes à família Annonaceae, mais 120 destas pertencem ao gênero *Annona* (MAAS et al., 2001), que por sua vez, têm sido bastante estudado nas últimas décadas devido a presença de diversos grupos químicos que apresentam inúmeras atividades biológicas, com destaque para as acetogeninas anonáceas e os alcaloides. As acetogeninas (ou policetídeos), apresentam relevantes atividades antineoplásica, leishmanicida, citotóxica, pesticida, vermicida, antimalárica, imunossupressora, antimicrobiana e até abortiva (YUAN et al., 2003; LEBOEUF et al., 1981). Enquanto que os alcalóides isoquinolínicos, como exemplo a cherianoine (*A. cherimola*), o salsolinol (*A. reticulata*) e glaucina (*A. hypoglauca*), apresentam atividades antifúngicas, antibacteriana e ansiolítica, e têm elevada toxicidade frente a diversas linhagens de células tumorais, como câncer de pulmão, cólon e leucemia (GUINAUDEAU et al., 1988; CHEN et al., 2001; RINALDI, 2007). No Brasil, apenas as espécies do gênero *Annona* são de interesse comercial, sendo a *Annona muricata* L., a mais importante destas (BARRETO et al., 2015).

1.11.1 *Annona muricata* L.

Annona muricata L. (Annonaceae), conhecida popularmente como gravioleira (em português) ou soursop (inglês) é uma das espécies mais estudadas do gênero quanto à

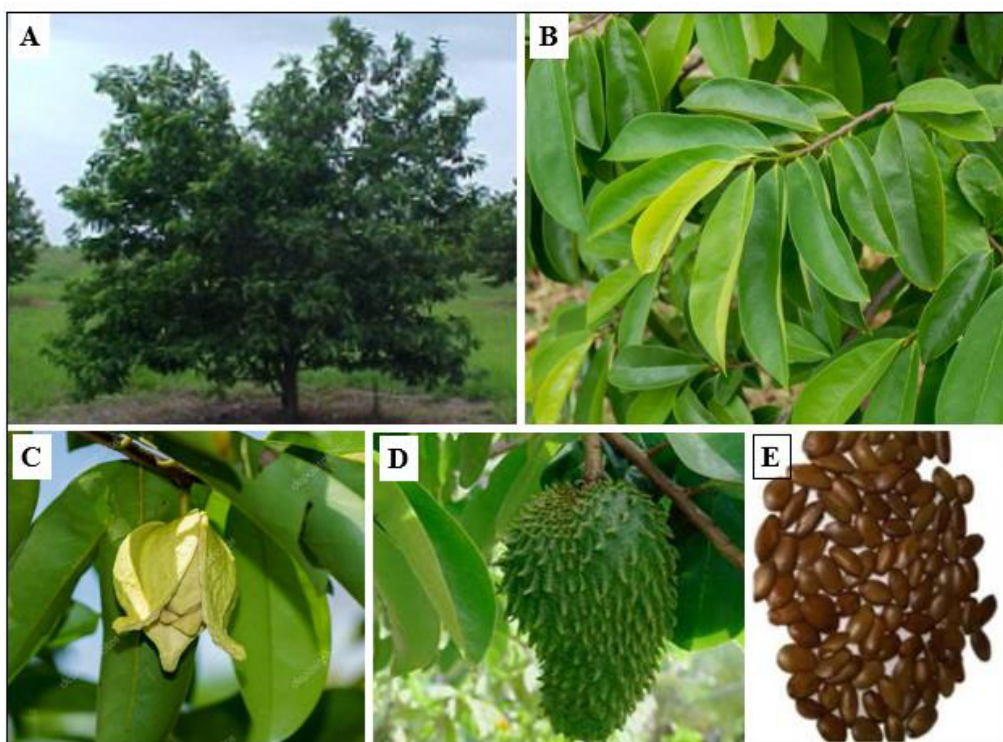
atividade citotóxica e antitumoral (BARRETO et al., 2015). Planta tropical popularmente conhecida por seu fruto comestível que tem alguns méritos medicinais, mas também alguns efeitos tóxicos (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018). É originária das Américas Central e do Sul, pertencente à família Annonaceae (Tabela 4, Figura 8).

Tabela 4. Classificação taxonômica de *Annona muricata* L.

Reino	Plantae
Divisão	Spermatophyta
Sub-Divisão	Angiospermae
Classe	Dicotyledoneae (Magnoliatae)
Ordem	Ranales
Sub-Ordem	Magnoliales
Família	Annonaceae
Gênero	<i>Annona</i>
Espécie	<i>Annona muricata</i> L.
Sinonímia	<i>Annona macrocarpa</i> ; <i>Annona bonplandiana</i> ; <i>Annona cearensis</i> ; <i>Guanabanus muricatus</i> (L) M. Gómez.
Nome Científico	<i>Annona muricata</i> L.
Nome Popular	Gravioleira (a árvore); Graviola (o fruto).

É comumente usada na medicina popular, principalmente suas folhas, como infusão ou liofilizadas (em cápsulas) empregadas no combate ao diabetes, tosse, gripe, hipertensão (YUAN et al., 2003) e anticâncer (CASSILETH, 2008). Extratos de *A. muricata* são usados para tratar o câncer em vários países. Estudos *in vitro*, demonstraram a indução de morte por apoptose de várias células tumorais, enquanto ensaios *in vivo* inibem o crescimento de tumores em diversos modelos animais. No entanto, os mecanismos moleculares de suas referidas ações anticâncer e apoptóticas ainda não estão devidamente esclarecidos (LIU et al., 2016).

Figura 8. *Annona muricata*. A) árvore; B) folhas; C) flor; D) fruto e E) sementes.



Fonte: Google imagens.

1.11.1.1 Metabólitos secundários de *Annona muricata*

Duzentos e doze compostos bioativos foram encontrados em *A. muricata*. Os compostos predominantes são as acetogeninas, seguidas por alcalóides, fenóis e outros compostos. Folhas e sementes são os principais órgãos estudados, provavelmente por serem os mais tradicionalmente utilizados na medicina popular (GAVAMUKULYA et al., 2017; CORIA-TÉLLEZ et al., 2018). A atividade antitumoral dessa espécie está relacionada com a presença de dois grupos de compostos químicos, as acetogeninas anonáceas, que apresentam seletividade frente às células tumorais sem afetar significativamente as células normais (BARRETO et al., 2015) e alcaloides (CHEN et al., 2012; CHEN et al., 2013), sendo que as acetogeninas, frequentemente são apontadas como principais responsáveis pela atividade antitumoral das anonáceas (COOTHANKANDASWAMY et al., 2010; LIAW et al., 2010).

1.11.1.2 Acetogeninas

Acetogeninas são compostos derivados de ácidos graxos de cadeia longa (C35 ou C37 e mais raramente, C39), caracterizados pela presença de uma cadeia alifática longa, com a presença de grupos hidroxilas, carbonila, acetila e um anel γ -lactona terminal, originados pela condensação de unidades do acetil-CoA através da rota biossintética do acilpolimalonato (CHAMPY, 2004; GUPTA et al., 2011).

Acetogeninas são classificadas, com base na quantidade de anéis tetraidrofurânicos (THF) e de suas subunidades de γ -lactonas, podendo apresentar um (mono-THF) ou dois (bis-THF, que podem ser adjacentes: lado a lado ou não adjacentes). Existem ainda outros dois tipos de acetogeninas: as que não possuem anéis THF e as “não clássicas”, que possuem anel tetrahidropirânico. As estruturas das acetogeninas podem variar de acordo com o padrão do anel lactônico. Eles são classificados em γ -lactonas substituídas, cetolactonas (*cis* ou *trans*) ou anel hidroxilado (RUPPRECHT et al., 1990).

Segundo Gavamukulya e colaboradores (2017), mais de 120 acetogeninas foram identificadas em extratos etanólicos, metanólicos ou outros extratos orgânicos de diferentes órgãos e tecidos de *A. muricata*, como folhas, caules, casca, sementes, polpa e casca do fruto. Somente das sementes já foram isoladas 65 acetogeninas (Tabela 5). As principais acetogeninas da *A. muricata* são anonacina (acetogenina majoritária em *A. muricata*), anonacinona, corossolona, murisolina, epoximurina e bulatacina (Figura 9).

Figura 9. Principais acetogeninas anonáceas encontradas na *A. muricata*. A) Epoximurina A, fruto (MELOT et al., 2009); B) Murisolina, sementes (LI et al., 2008); C) Anonacina, folhas (BARRETO, 2014); D) Bulatacina, folhas (CHIU, 2003); E) R = H: Colossolona, folhas; R = OH: Anonacinona, folhas (VILA-NOVA et al., 2011).

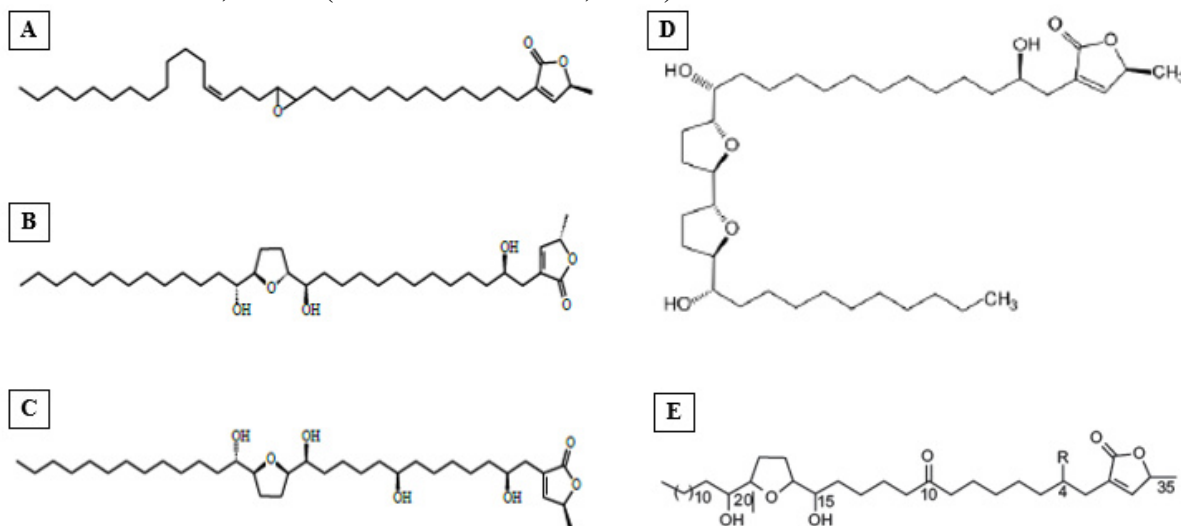


Tabela 5. Acetogeninas encontradas nas sementes de *Annona muricata* L.

Acetogenina	Tipo	Bioatividade	Referências
Coibina A	Linear, instaura, 2OH	NR	Alali et al., 1999; Gleye et al., 2000.
Coibina B			
Coibina C			Gleye et al., 2000.
Coibina D			
Donhexocina	Linear, 6OH		Yu et al., 1997.
Muricatenol	Linear, instaura, 4OH		Li et al., 2000.
Murihexol	Linear, 6OH		Yu et al., 1997.
Epomuricenina A	Monoepóxi, insaturada		Zafra-Polo et al., 1996; Melot et al., 2009.
Epoximurina			
Rolina B	Monoepóxi		TDRG, 2002.
Corepoxilona	Diepoxi, 1 carbonila		Gromek et al., 1993.
Diepomuricanina A	Diepoxi		Zafra-Polo et al., 1996.
Epoxirolina B			
Anoglaxina	Mono THF, 4OH, 1 carbonila		Yang et al., 2010.
Anomontacina	Mono THF, 4OH	Citotoxicidade, inseticida.	Liaw et al., 2002; Castillo-Sanchez et al., 2010.
Anomontacina cis		Citotoxicidade.	Liaw et al., 2002; Nakanishi et al., 2003.
Anonacina		Citotoxicidade, Inseticida, Antimicrobiana, Antitumoral, Neurotoxicidade e Neurodegenerativa.	Wu et al., 1995; Guadaño et al., 2000; Jaramillo et al., 2000; Liaw et al., 2002; Nakanishi et al., 2003; Champy et al., 2004 e 2009; Castillo-Sánchez et al., 2010; Ko et al., 2011.
Anonacina A		NR	Jaramillo et al., 2000; Wu et al., 1995.
Cis-anonacin-10-ona		Citotoxicidade.	Rieser et al., 1996.
Anonacin-10-ona		Leishmanicida.	Liaw et al., 2002; Nakanishi et al., 2003; Champy et al., 2009; Vila-Nova et al., 2011.
Anoreticuín-9-ona	Mono THF, 3OH, 1 carbonila	Citotoxicidade	Ragasa et al., 2012.
Arianacina	Mono THF, 4OH		Alali et al., 1999.
Corossolina			Chang e Wu, 2001; Nakanishi et al., 2003; Champy et al., 2009.
Corossolona	Mono THF, 2OH, 1 Carbonila.	Citotoxicidade, Leishmanicida.	Zafra-Polo et al., 1996; Liaw et al., 2002; Nakanishi et al., 2003; Champy et al., 2009; Vila-Nova et al., 2011.
Gigantetrocina A	Mono THF, 4OH	Citotoxicidade, inseticida.	Alali et al., 1999.
Gigantetrocina B		Citotoxicidade.	
2,4 Cis Gigantetrocinona	Mono THF, 3OH, Cetolactona.	NR	Li et al., 2001.
Trans Gigantetrocinona			

Gigantetronenina	Mono THF, 4OH, 1 Dupla ligação.	NR	Wu et al., 1995.
Goniotalamicina			
Cis-Goniotalamicina	Mono THF, 4OH	Citotoxicidade.	Rieser et al., 1996.
2,4-trans-isoanonacina	Mono THF	NR	Wu et al., 1995; Li et al., 2001.
Cis-isoanonacina			
2,4-trans-isoanonacin-10-ona	Mono THF, 3OH, Cetolactona.	NR	Li et al., 2001.
Javoricina	Mono THF, 4OH	Citotoxicidade.	Rieser et al., 1996.
Longifolicina	Mono THF, 3OH		
Muricatetrocina A	Mono THF, 4OH	Citotoxicidade.	Chang e Wu, 2001; Nakanishi et al., 2003.
Muricatetrocina B			
Muricatina A			
Muricatina B	Mono THF, 5OH	NR	Zafra-Polo et al., 1996
Muricatina D		NR	TDRG, 2002.
Muricina A			
Muricina B	Mono THF, 4OH	Citotoxicidade.	Chang a Wu, 2001; Nakanishi et al., 2003.
Muricina C			
Muricina D			
Muricina F	Mono THF, 4OH, Insaturado	Citotoxicidade.	Chang e Wu; 2001.
Muricina G			
Muricina H	Mono THF, 3OH	Citotoxicidade.	Liaw et al., 2002; Quispe et al., 2006.
Muricina I	Mono THF, 3OH, insaturado.	Citotoxicidade.	Liaw et al., 2002; Lannuzel et al., 2006.
Murisolina	Mono THF, 3OH	Citotoxicidade.	Nakanishi et al., 2003; Yang et al., 2010.
Solamina		Citotoxicidade.	Zafra-Polo et al., 1996; Nakanishi et al., 2003.
Cis-solamina A	Mono THF, 2OH	NR	Konno et al., 2008.
Xilomaticina		Citotoxicidade.	Liaw et al., 2002; Nakanishi et al., 2003.
Bulatalicina		Citotoxicidade.	Alali et al., 1999.
Gigantecina	Bis THF não adjacente, 4OH	Citotoxicidade.	Champy et al., 2009.
Cis-esquamostatina A		Citotoxicidade.	
Cis-esquamostatina D	Bis THF não adjacente, 3OH	Citotoxicidade.	Yang et al., 2010.
Anocatacina A	Bis THF adjacente, 2OH	Citotoxicidade.	Chang et al., 2003; Nakanishi et al., 2003.
Asiminecina		Citotoxicidade.	Yang et al., 2010.
Bulatacina	Bis THF adjacent, 3OH	Citotoxicidade e neurotóxico.	Landolt et al., 1995; Wang et al., 2002; Nakanishi et al., 2003; Yang et al., 2010.
Desacetilavaricina	Bis THF adjacent, 2OH	NR	Yang et al., 2010.
Isodesacetilavaricina		NR	
Robustocina	Bis THF adjacent, 1OH	NR	Gleye et al., 2000.
Roliniastatina 1,		Citotoxicidade.	Gromek et al., 1994.
Squamocina	Bis THF adjacent, 3OH	Citotoxicidade e inseticida.	Guadaño et al., 2000; Nakanishi et al., 2003.

NS: não reportado.

Fonte: adaptado de Coria-Téllez et al. (2018).

Quanto aos seus mecanismos de ação, mais de trinta anos depois do isolamento e identificação da primeira acetogenina (uvaricina, por JOLAD et al., 1982), ainda permanecem incertos (McLAUGHLIN, 2008). Diversas vias moleculares têm sido propostas, como a inibição do complexo mitocondrial I (LONDERSHAUSEN et al., 1991; ESCOBAR-KHONDIKER et al., 2007), a geração do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio (PELICANO et al., 2004), redução nos níveis de cAMPc e cGMP (CHIU et al., 2003), indução de parada do ciclo celular (KO et al., 2011), ou morte celular apoptótica induzida por elevação do Ca^{2+} citosólico (LIAW et al., 2008). Porém, Juang e colaboradores (2016) afirmam que as atividades antitumorais apresentadas pelas acetogeninas não estão claras o suficiente e que nenhum destes mecanismos são capazes de explicar as referidas propriedades destas moléculas.

Nesta conjuntura, o mecanismo de citotoxicidade das acetogeninas bem mais estabelecido, é seu potente efeito inibidor do complexo I mitocondrial (NADH: ubiquinona oxidoreductase) da cadeia transportadora de elétrons (CTE) (Figura 10), assim como inibição da produção de trifosfato de adenosina (ATP) citoplasmático (anaeróbico) e os nucleotídeos relacionados (WOLVETANG et al., 1994; GUPTA et al., 2011), portanto, causam inibição de células tumorais principalmente por bloquear a fosforilação oxidativa, reduzindo significativamente o nível de ATP, e assim, privando as células tumorais de energia (GUPTA et al., 2011). Outro mecanismo demonstrado por Morré e colaboradores (1995), foi a inibição do complexo enzimático NADH oxidase, que é prevalente nas membranas plasmáticas das células tumorais.

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O câncer representa um conjunto de mais de cem doenças, com alta incidência e elevadas taxas de mortalidade, o que o torna uma das doenças mais temidas pela população de todo o mundo. Atualmente, o câncer passou a ser a primeira e segunda causa de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento respectivamente. E, apesar dos avanços da ciência e tecnologia que permitiram uma melhor compreensão sobre a doença e o desenvolvimento de novos tratamentos e o aprimoramento dos já existentes, estima-se que as mortes por câncer em todo o mundo continuem aumentando, alcançando um número de 13,1 milhões de mortes e 20 milhões de novos casos em 2025.

As ferramentas de enfrentamento à essa grave doença, após o diagnóstico, continuam baseados na remoção cirúrgica, quimioterapia e/ou radioterapia (isoladamente ou associadas), dependendo do tipo de câncer, estágio de desenvolvimento, órgão atingido e quadro geral do paciente. A quimioterapia por sua vez, tem efeitos sistêmicos e baixo índice de seletividade, resultando em elevados níveis de toxicidade. Portanto, o desenvolvimento de drogas mais eficazes e mais seletivas é urgentemente necessário.

Por outro lado, diversos estudos relatam a atividade anticâncer de acetogeninas anonáceas, como guanaconetinas isoladas das folhas de *Annona spraguei* (Annonaceae) que apresentou atividade frente a várias linhagens de células tumorais (CHAHBOUNE et al., 2006), anonacina (*A. muricata*) contra célula MCF-7 (câncer de mama) (KO et al., 2011), HCT-116, PC-3M, SF-295 e OVCAR-8 (BARRETO, 2014) e muricina H, muricina I, e *cis*-anomontacina, *cis*-corossolona e anocatalina isoladas das folhas de *A. muricata* que apresentaram significativa citotoxicidade *in vitro* contra duas linhagens de células tumorais: hep G2 (hepatoma humano) e hep 2,2,15 (LIAW et al., 2002).

Diante deste cenário, esse estudo investigou *in vitro* e *in vivo* a atividade citotóxica e anticâncer de uma fração rica em acetogeninas (FRA) extraída das sementes de *A. muricata* devido a necessidade de estudos mais aprofundados das propriedades farmacológicas destes compostos químicos, objetivando estabelecer o potencial citotóxico e antitumoral, assim como determinar possíveis mecanismos de ação de compostos a base de acetogeninas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Estabelecer o potencial citotóxico e antitumoral e determinar possíveis mecanismos de ação de uma fração rica em acetogeninas a partir das sementes de *Annona muricata* em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos Específicos

- ✓ Preparar uma fração rica em acetogeninas (FRA) a partir do extrato etanólico das sementes de *Annona muricata*;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante de FRA;
- ✓ Avaliar a atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) de FRA;
- ✓ Avaliar o efeito citotóxico da FRA frente a HCT-116 (côlon - humano), SNB-19 (Glioblastoma) e HL-60 (Leucemia Mieloide Humana);
- ✓ Determinar a CI_{50} de FRA frente a HCT-116 e L929 (fibroblasto pulmonar murino – não tumoral);
- ✓ Avaliar mecanismos de ação de FRA frente a HCT-116 (côlon - humano);
- ✓ Determinar o potencial hemolítico de FRA em eritrócitos de camundongos albinos (*Mus musculus*, linhagem: *Swis*);
- ✓ Determinar a DL_{50} de FRA através do método *Up and Down* em camundongos albinos (*Mus musculus*, linhagem: *Swis*);
- ✓ Verificar se FRA apresenta ação genotóxica *in vitro* (linhagem HCT-116) e *in vivo* (camundongos);
- ✓ Determinar a atividade inibidora do crescimento tumoral da FRA em modelos experimentais com camundongos albinos (*Mus musculus*, linhagem: *Swis*) transplantados com tumor Sarcoma 180;
- ✓ Avaliar os parâmetros bioquímicos de ratos após administração oral de doses repetidas de FRA;

- ✓ Avaliar os parâmetros hematológicos de ratos após administração oral de doses repetidas de FRA;
- ✓ Determinar a atividade inibidora do crescimento tumoral da FRA em modelos experimentais murinos - ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*) transplantados com tumor Walker 256;
- ✓ Determinar se o tratamento com doses repetidas de FRA por sete dias causa alterações comportamentais pelo modelo de Rotaroid.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Preparação da Fração Rica em Acetogeninas (FRA)

As sementes de *Annona muricata* foram doadas pela empresa “Fruta Boa”, localizada no município de Limoeiro do Norte, Ceará, Brasil.

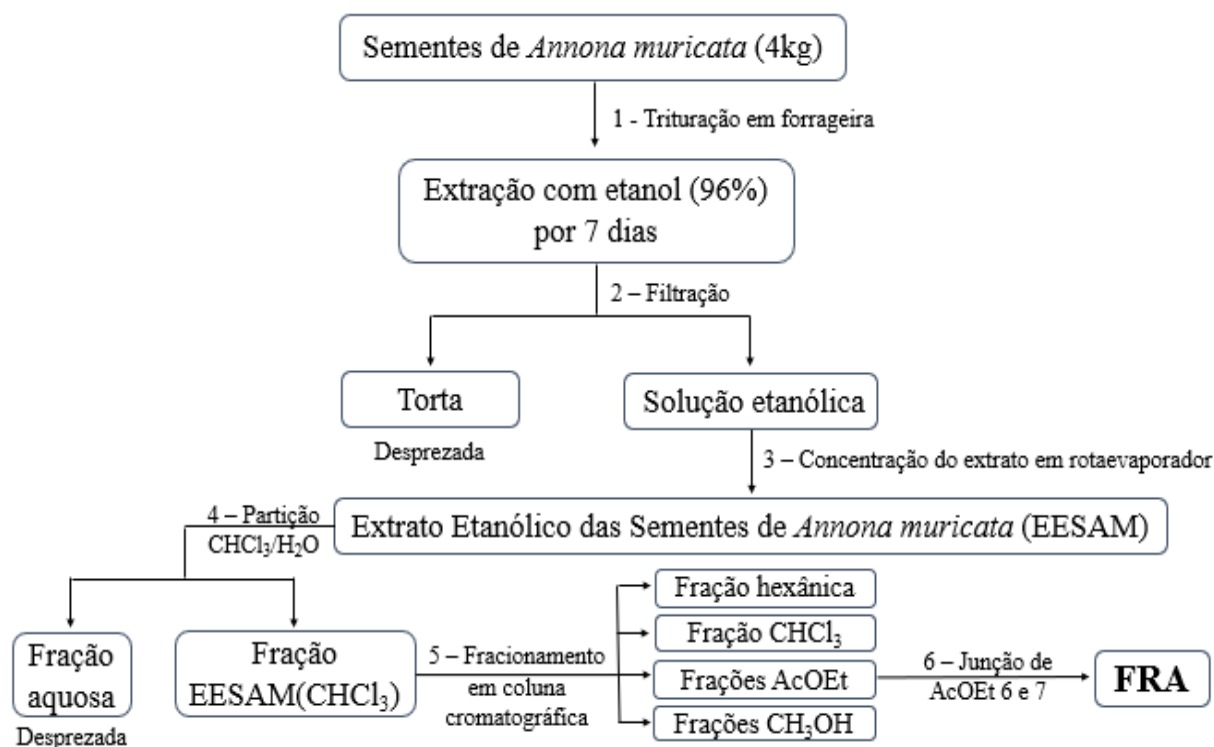
Sementes de *A. muricata* (4 kg) foram secas, trituradas e acondicionadas em etanol 96% (7 L) por 7 dias. Posteriormente concentrou-se o extrato em evaporador rotativo, obtendo-se um material consistente e viscoso (179 g), a qual deu-se o nome de extrato etanólico das sementes de *A. muricata* (EESAM). Em seguida, fez-se partição com clorofórmio (CHCl_3 , 400 mL) e água (400 mL) em funil de separação de 1.000 mL. A fração aquosa foi lavada por 3 vezes com CHCl_3 (400 mL) e descartada, obtendo 1.600 mL de solução clorofórmica, que após evaporar o solvente, obteve-se 123 g de EESAM fração clorofórmica (EESAM[CHCl_3]).

O EESAM(CHCl_3) (120 g) foi misturado com 150 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm, 70 – 230 mesh) e acondicionou-se no topo de uma coluna cromatográfica contendo 300 g de sílica gel para fracionamento com solventes orgânicos de polaridade crescente – hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, sendo acompanhado por cromatografia de camada delgada (CCD) reveladas com reagente Kedde (Figura 11).

O reagente Kedde é preparado da seguinte forma: 5 mL de uma solução etanólica recém preparada de ácido 3,5-dinitro-benzoico é misturado com 5 mL de uma solução 2M de NaOH.

Numa placa de cromatografia em camada delgada (CCD) é aplicada uma gota de amostra dissolvida em clorofórmio. Deixa secar e mergulha-se numa placa de Petri contendo a solução de Kedde. A formação de coloração rosa indica a presença de acetogeninas com anel lactônica (WAGNER; BLADT, 1996).

Figura 11. Esquema experimental do trabalho com as etapas e metodologias adotadas para a obtenção da Fração Rica em Acetogeninas.



4.2 Isolamento da anonacina

O isolamento de anonacina a partir de FRA, foi realizado com o auxílio de um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; em inglês: *High performance liquid chromatography*, HPLC) Shimadzu analítico em fase reversa, com sistema controlador SCL-10Avp, detector SPD-10Avp UV-Vis e bomba de gradiente LC-10Atvp, sob as seguintes condições cromatográficas:

- ✓ Coluna: Supelcosil LC 18 – 25 cm – 10 mm – 5 μm ;
- ✓ Comprimento de onda: 214 nm;
- ✓ Vazão: 5 mL/min;
- ✓ Tempo de retenção/corrida: 25 min;
- ✓ Fase móvel: 0,87/0,13 metanol para HPLC/água deionizada;
- ✓ Pressão do equipamento: 198 kgf/cm².
- ✓ Concentração de FRA: 30 mg/mL;
- ✓ Volume médio de injeção: 250 μL .

Para separar a anonacina, 600 mg de FRA foi dissolvido em 20 mL de metanol para HPLC e em seguida, feito injeções de 250 µL no cromatógrafo, coletando o pico principal, com RT de 10 min (anonacina) assim como as frações pré e pós anonacina para posterior isolamento e identificação. Em seguida, as frações coletadas foram concentradas em um evaporador rotativo e liofilizadas para obtenção de anonacina, cuja estrutura química foi caracterizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

4.2.1 Identificação da anonacina por RMN e *fingerprint*

A determinação estrutural da principal acetogenina encontrada e isolada de FRA foi realizada por análise espectroscópica e posteriormente, por ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C .

A partir dos dados de RMN, a elucidação estrutural da molécula foi confirmada pela Prof.^a Dra. Selene Maia de Moraes, da Universidade Estadual do Ceará. Para a análise de RMN ^1H e de ^{13}C , foi utilizado clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetros Bruker modelo Avance DRX-500 operando na frequência de hidrogênio a 500,13 MHz e na frequência do carbono 125,77 MHz em um campo de 11.7440 Tesla, equipado com sonda dual de 5 mm, para experimentos unidimensionais (^1H , ^{13}C). Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrômetro da PerkinElmer, Spectrum 100 FTIR, equipado com acessório UATR.

4.3 Ensaios de atividade antioxidante de FRA

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de produtos derivados de espécies vegetais, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico (WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999) e o método de sequestro de radicais livres, tais como DPPH• - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) e ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico) (RE et al., 1999).

4.3.1 Método do radical DPPH

Na avaliação da atividade antioxidante pelo método de varredura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), foi utilizada a metodologia descrita por (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) com pequenas modificações. Dissolveu-se 15 mg de FRA em 1,5 mL de metanol, a partir desta solução de 10.000 µg/mL, foram preparadas as concentrações de 5.000, 1.000, 500, 100, 50, 10 e 5 µg/mL. Preparou-se uma solução metanólica de DPPH• (2,6 g de DPPH• em 100 mL de metanol), ajustado para absorvância entre 600-700 nm em um espectrofotômetro. Em um tubo de ensaio colocou-se 0,1 mL de cada concentração e adicionou-se 3,9 mL da solução metanólica com DPPH•. O teste foi realizado em triplicata para cada concentração. Após 1 h de descanso em ambiente escuro, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, sendo o “branco” o metanol. As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 515 nm. O índice de varredura (IV₅₀) foi calculado a partir da Equação:

$$IV = \frac{ABS\ DPPH - ABS\ AMOSTRA}{ABS\ DPPH} \times 100$$

A_{DPPH} é a absorvância encontrada para a solução metanólica com DPPH e A_{amostra} é a absorvância encontrada para cada nova concentração da amostra 250; 12,5; 25; 12,5; 2,5; 1,25; 0,25; 0,25; 0,125 µg/mL. A partir desses resultados, foi obtido a concentração que inibe 50% do radical DPPH (CI₅₀) por meio da equação da reta que correlaciona as concentrações e seus respectivos índices de varredura (YEPEZ et al., 2002), através do uso do programa estatístico Microsoft Office Excel.

O Índice de atividade antioxidante (AAI) foi calculado de acordo com Scherer e Godoy (2009), um método de avaliação da capacidade antioxidante, correlacionando a concentração metanólica de DPPH ([DPPH]) e a capacidade antioxidante em 50% em µg/mL (CI₅₀[DPPH•]). A capacidade antioxidante foi avaliada por classificação de AAI <0,5 (fraca), 0,5 a 1,0 (moderada), 1,0 a 2,0 (forte) e > 2,0 (muito forte).

4.3.2 Método antirradical ABTS (2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina)-6-ácido sulfônico)

A solução de ABTS⁺ (7 mM, 5 mL) foi misturado a 88 µL de persulfato de potássio (140 mM). A mistura foi homogeneizada e mantida no escuro a temperatura ambiente por 16

h. Posteriormente, 1 mL desta solução foi adicionado em 99 mL de etanol, até obtenção de uma absorbância de 715 a 734 nm em espectrofotometria.

A concentração mãe foi preparada com 15 mg de FRA diluída em 1,5 mL de etanol, obtendo a concentração de 10.000 µg/mL e as outras concentrações de 5.000 a 5 µg/mL. Em seguida, alíquotas de 30 µL das concentrações foram transferidas em 3,0 mL da solução de ABTS para leituras das absorbâncias em 734 nm por espectrofotometria após decorrido 6 min (RE et al., 1999). O índice de varredura (IV%) de cada concentração foi calculado mediante a equação do item 4.4.1.

A partir desses resultados, foi obtido a CI_{50} por meio de uma regressão linear com equação da reta que correlaciona as concentrações e seus respectivos índices de varredura.

4.3.3 Ensaio por meio do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Este método de avaliação da atividade antioxidante foi baseado na inibição da reação de auto-oxidação do β -caroteno, a qual é provocada pela adição de ácido linoleico e aeração do meio, levando à formação do agente oxidante radicalar. Nesse método, o ácido linoleico libera um radical livre que reage com o β -caroteno, levando-o a perder o seu cromóforo e sua coloração laranja original, com diminuição da absorbância. Substâncias antioxidantes impedem essa reação por reagirem com o radical livre.

Utilizou-se o método de Wettasinghe e Shahidi (1999), onde pesou-se 1 mg de β -caroteno e dissolveu-se em 5 mL de clorofórmio. No preparo da solução de β -caroteno utilizou-se água aerada, 200 µL de Tween 40, 20 µL de ácido linoleico e 2 mL da solução de β -caroteno. Ajustou-se o espectrofotômetro para o comprimento de onda 470 nm. Após isso, ajustou-se a solução de β -caroteno entre 0,6 e 0,7 nm.

Para a solução mãe, pesou-se 12,5 mg de FRA e diluiu-se em 25 mL de metanol. Após as concentrações estarem feitas colocou-se a solução de β -caroteno em recipientes de vidro cobertos, com as concentrações de 19,23, 9,61, 3,84, 1,92 e 0,96 µg/mL, mais o branco. O teste foi realizado em duplicata. Fez-se novamente a leitura no espectrofotômetro e colocou-se as amostras mais o branco por em banho maria 2 h. Após esse período, foi feita outra leitura. O cálculo foi feito usando a fórmula abaixo.

$$IV\% = 1 - \frac{ABS\ Amostra - ABS\ Amostra\ 2h}{ABS\ Branco - ABS\ Branco\ 2h} \times 100$$

Os valores encontrados foram aplicados no programa Excel para o cálculo da CI_{50} dos radicais livres da solução. Para comparação, foi usada a quercetina como padrão nas mesmas concentrações de FRA.

4.4 Potencial de inibição da enzima Acetilcolinesterase

O potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado de forma qualitativa e quantitativa. A atividade inibidora da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi avaliada pelo método de Ellman et al. (1961), utilizando soluções de ácido 2-nitrobenzóico (5,5'- ditiobis, reagente de Ellman's, DTNB) e iodeto de acetilcolina (ATCI) em tampão.

4.4.1 Ensaio qualitativo de inibição da enzima Acetilcolinesterase

Na análise qualitativamente, foi usado o método de Ellman et al. (1961) adaptado para cromatografia em camada fina por Rhee et al. (2001). As amostras foram aplicadas na cromatoplaça. Após a evaporação do solvente, pulverizou-se o material (ATCI, 1mM em tampão) e o reagente de Ellman (DTNB, 1 mM em tampão). Após 3 min borrifou-se a enzima (3 U/mL) e em 10 min a placa desenvolveu cor amarela, com isso houve surgimento de halos brancos em torno dos “spots” aplicados na cromatoplaça indicando a inibição da enzima sendo comparados com o padrão, o alcaloide fisostigmina.

4.4.2 Ensaio quantitativo de inibição da enzima Acetilcolinesterase

Na análise quantitativa, as amostras foram analisadas num leitor de microplacas Elisa BIOTEK (modelo ELX 800 com software Gen5 V2.04.11), com base também no método de Ellman et al. (1961) modificado por Feitosa et al. (2011). 25 µg de FRA foram diluídas em 25 µL de iodeto de acetilcolina (15 mM), 125 µL de 5,5'-ditiobis- [2-nitrobenzóico] em solução de Tris/HCl (50 nM, pH = 8 com 0,1 M NaCl e 0,02 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (3 mM, DTNB ou reagente Ellman's)), solução de 50 µl Tris/HCL (50 nM, pH = 8, com 0,1% soro de abumina

bovina (BSA)), lidos antes e depois da adição de 25 µL da enzima de acetilcolinesterase a 405 nm em Elisa BIOTEK (RHEE et al., 2001). A fisiostigmina foi usada como padrão.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão. As diferenças entre os valores foram examinadas com análise de variância (ANOVA) e os resultados foram comparados usando o teste de Tukey a um nível de confiança de 95%. O software GraphPad Prism versão 5.01.

4.5 Origem e manutenção das linhagens celulares

4.5.1 Origem das linhagens celulares

As células utilizadas nos ensaios *in vitro* (de citotoxicidade e genotoxicidade) e *in vivo* (antitumoral e genotoxicidade) estão listadas quanto ao tipo histológico, origem e fonte nas tabelas 6 e 7 respectivamente.

Tabela 6. Células utilizadas nos ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*

Linhagem*	Tipo Histológico	Origem	Fonte
HL-60	Leucemia promielocítica	Humana	<i>Children's Mercy Hospital</i> – EUA
HCT-116	Carcinoma de cólon	Humana	<i>Children's Mercy Hospital</i> – EUA
SNB-19	Glioblastoma	Humana	<i>National Cancer Institute</i> – EUA
L929	Fibroblasto pulmonar	Murina – hamster	Banco de células do Rio de Janeiro (UFRJ)

*Linhagens mantidas pelo Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará usadas em ensaios *in vivo*.

Tabela 7. Células utilizadas nos ensaios antitumorais e genotoxicidade *in vivo*

Linhagem ⁺	Tipo Histológico	Origem	Fonte
Sarcoma 180	Sarcoma	Murina – camundongos swiss	Laboratório Nacional de Oncologia Experimental, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos – UFC.
Walker 256	Carcinossarcoma	Murina – Rato <i>Wistar</i>	Laboratório Nacional de Oncologia Experimental, Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos – UFC.

⁺Linhagens mantidas pelo Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, usadas em ensaios *in vivo*.

4.5.2 Manutenção das células em cultura

As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (linhagens tumorais) e DMEM (linhagem L929), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. Diariamente foi acompanhado o crescimento celular com a utilização de microscópio de luz invertida. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células foi utilizada tripsina (0,25%) para que as células despregassem das paredes da garrafa (PESSOA, 2000).

4.6 Estudo da atividade citotóxica

A avaliação do potencial citotóxico de FRA teste foi realizada em células tumorais humanas e células murinas não tumorais através do método do MTT. Este é um ensaio quantitativo *in vitro* que foi desenvolvido por Mossman (1983) para estimar a proliferação e sobrevivência celular. É definido na literatura como apropriado para estimava de citotoxicidade (PESSOA et al., 2000; COSTA-LOTUFO et al., 2004) e basea-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do Ciclo de Krebs que é ativa em mitocôndrias de células viáveis, em converter o sal de tetrazólio (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, ou MTT), que é hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, que são de cor azul escura. Essa técnica tem a capacidade de analisar a viabilidade e o estado metabólico da célula, sendo assim, bastante útil para avaliar a citotoxicidade.

4.6.1 Citotoxicidade de FRA em concentração única (*screening*) frente a células tumorais

As células foram plaqueadas nas concentrações de $0,7 \times 10^5$, $0,1 \times 10^6$ e $0,3 \times 10^6$ céls/mL para as linhagens HCT-116, SNB-19 e HL-60 respectivamente. As placas foram incubadas com FRA 25 µg/mL por 72 h em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C. Ao término deste, as mesmas foram centrifugadas e o sobrenadante removido. Em seguida, foram adicionados 150

μL da solução de MTT (sal de tetrazólio) a 5%, e as placas foram incubadas por 3 h. Após a incubação, as placas foram novamente centrifugadas para retirada da solução de MTT. A absorbância foi lida após dissolução do precipitado de formazan com 150 μL de DMSO puro em espectrofotômetro de placa a 595 nm.

4.6.2 Estudo de citotoxicidade em células humanas tumorais e células murinas não tumorais – determinação da concentração que inibe 50% da cultura

A concentração de FRA que inibe 50% da cultura (CI_{50}) foi determinada frente as linhagens celulares HCT-116 e (L929), utilizando o método do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Procedimento experimental

As células foram distribuídas em multiplacas de 96 cavidades nas densidades de $0,7 \times 10^5$ (HCT-116) e $0,1 \times 10^6$ células/mL (L929). Após 24 h de incubação, FRA dissolvida em DMSO foi adicionada nas concentrações de 0,19 a 25 $\mu\text{g/mL}$ e incubadas por 24, 48 e 72 h. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo com concentrações variando de 0,09 a 5 $\mu\text{g/mL}$. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Após o período de incubação, a placa foi centrifugada (1500 rpm/15 min), e o sobrenadante descartado. Cada cavidade recebeu 200 μL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio RPMI 1640) e foi reincubada durante 3 h, em estufa a 37 °C a 5% de CO_2 . Após esse período, a placa foi novamente centrifugada (3.000 rpm/10 min), o sobrenadante desprezado, e o precipitado ressuspensionado em 150 μL de DMSO. Para a quantificação do sal reduzido nas células vivas, as absorbâncias foram lidas com o auxílio do espectrofotômetro de placa, no comprimento de onda de 595 nm (MOSSMAN et al., 1983).

Análise dos dados

FRA foi testada em diluições seriadas, em duplicata. Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos Erro Padrão das Médias (EPMs) e determinado suas CI_{50} (concentração inibitória média capaz de provocar 50% do efeito máximo) e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 6.0 (GraphPad Software).

4.7 Teste de atividade clonogênica (formação de colônias)

A eficiência de plaqueamento e a fração de sobrevivência celular foram determinadas pelo teste convencional de formação de colônias. Neste teste as células semeadas viáveis se dividem várias vezes e formam colônias que são visíveis a olho nu. Todas as células que formam cada uma das colônias são provenientes de uma única célula ancestral e são chamadas de sobreviventes porque mantêm sua integridade reprodutiva.

Procedimento experimental

As células (HCT-116 e L929) em cultura foram tratadas com FRA nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/mL por 12 h. Após o período de tratamento, as células foram semeadas em placa de Petri de 60 mm de diâmetro, contendo 100 células/placa. As placas foram incubadas sob a atmosfera de 5% de CO₂, a 37 °C por 10 dias após o tratamento. Após esse período, as células foram lavadas com PBS, fixadas com formol a 10% por 30 min e coradas com cristal violeta (0,2%; m/v em água destilada) por 15 min. O número de colônias foi analisado com o auxílio de um estereomicroscópio sob aumento de 20x. As colônias com menos de 50 células foram desprezadas. Foram executados três ensaios independentes para cada concentração e cada ensaio foi realizado em triplicata. O agente alquilante metilmetanosulfonato (MMS) foi utilizado como controle positivo na concentração de 4×10^{-5} M dissolvido em DMSO (0,1%).

4.8 Determinação da atividade hemolítica

Este ensaio é um método simples que permite avaliar o potencial das substâncias em causar lesões na membrana plasmática da célula, seja pela formação de poros ou pela ruptura total (BERLINCK et al., 1996; COSTA-LOTUFO et al., 2002).

Procedimento experimental

Foi coletado sangue de três camundongos Swiss (*Mus musculus*) por via orbital, sendo diluído em 150 mL de solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl₂ 10 mM). Os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução salina por centrifugação (1500 rpm/3 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2%. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço da 1ª fileira recebeu 100 µL da solução salina. Na 2ª fileira, os poços receberam 50 µL da solução salina e

50 µl do veículo de diluição da substância teste, neste caso, DMSO 10%. Aos poços da 3ª fileira, foram adicionados 100 µl de solução salina e 100 µl da substância teste (FRA). Da 4ª fileira em diante os poços receberam 100 µl da solução salina, excetuando-se os da última fileira, que receberam 80 µl de solução salina e 20 µl de Triton X-100 1% (controle positivo). As diluições foram feitas da 3ª à 11ª cavidade, retirando-se 100 µl da solução da cavidade anterior e transferindo para a seguinte de modo que as concentrações sempre fossem diluídas pela metade, variando de 1,56 a 200 µg/mL. Em seguida, 100 µl da suspensão de eritrócitos foram plaqueados em todos os poços. Após incubação por 1 h, sob agitação constante à temperatura ambiente (26 ± 2 °C), as amostras foram centrifugadas (5.000 rpm/3 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no espectrofotômetro de placas a 540 nm.

Análise dos dados

Os experimentos foram analisados segundo suas médias e respectivos erros padrões da média (EPMs) e determinado suas CI_{50} e seus respectivos IC 95% realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 6.0 (GraphPad Software).

4.9 Determinação da Integridade de membrana - viabilidade celular

A análise da integridade da membrana plasmática é uma importante ferramenta para estudar o tipo de morte celular, visto que apenas na necrose ela apresenta-se precocemente alterada. O teste se baseia na capacidade do iodeto de propídeo (PI), agente hidrofílico, penetrar em célula cuja membrana esteja rompida e após a ligação ao DNA emitir alta fluorescência quando é excitado pelo laser de argônio (488 nm). A célula com membrana íntegra emite baixa fluorescência. Deste modo, este método permite avaliar a viabilidade celular através da verificação da integridade da membrana plasmática (MACKLIS; MADISON, 1990).

Procedimento experimental

A determinação da integridade da membrana celular foi avaliada por citometria de fluxo utilizando o PI como agente fluorogênico. A doxorubicina (0,5 µM) ou H_2O_2 (150 µM)

foram usadas como controles positivo em todos os experimentos. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO) usado para diluir a substância.

As células HCT-116 foram plaqueadas na densidade de $0,3 \times 10^6$ células/mL com diferentes concentrações da FRA (1, 5, 10 e 20 $\mu\text{g/mL}$) na presença ou ausência de 15 mM de glutathiona-etil-éter (GSH-OEt). Uma alíquota de 50 μL foi recolhida 24 h após a incubação com FRA. As células foram diluídas com a solução de PI (2 $\mu\text{g/mL}$ em PBS), na ausência de luz a 37° C, e, após 5 min, analisadas por citometria de fluxo (CAVALCANTI et al., 2012). Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes (ambos em triplicata). 10.000 eventos foram analisados em cada amostra.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos. Para verificar a ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 6.0.

4.10 Análise do ciclo celular

O ciclo celular é constituído pelas seguintes fases: G1, S, G2 e M. Durante o período de crescimento celular (fase G1) uma célula diplóide apresenta um conteúdo $2n$ (n – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos) em DNA nuclear, i.e., possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do genoma nuclear ($2-4n$) e na fase seguinte (fase G2) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível $4n$. Em seguida ocorre a mitose (fase M, $4n$) durante a qual a célula se divide, formando-se duas células filhas, cada uma com um conteúdo $2n$ em DNA. As células que não se encontram em divisão celular (G0) apresentam um conteúdo $2n$ em DNA. Assim, as diferentes fases do ciclo celular podem ser determinadas a partir do conteúdo de DNA que elas apresentam. Deste modo, o resultado da distribuição do conteúdo em DNA nuclear de uma população de células pode dar-se em G0/G1, S e G2/M. Adicionalmente, o DNA fragmentado (hipodiplóide) pode ser detectado (por baixa fluorescência) devido a diferenças na emissão de fluorescência quando comparados ao DNA íntegro (SHAPIRO, 1995; CIBAS, 1995).

Para determinação do conteúdo de DNA nuclear da célula foi utilizado o PI como agente fluorogênico. Esse teste baseia-se na capacidade do PI se ligar ao DNA. Inicialmente a membrana plasmática das células é lisada por um detergente para que o PI possa se ligar ao núcleo. Assim, as fases do ciclo celular foram determinadas através do conteúdo do DNA que elas apresentavam (SHAPIRO, 1995; CIBAS, 1995).

Procedimento experimental

Células HCT-116 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com FRA nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/mL na presença ou ausência de 15 mM de glutathiona-etil-éter (GSH-OEt). A doxorubicina (0,5 µM) ou H₂O₂ (150 µM) foram usadas como controles positivos. Após o período de incubação uma alíquota de 50 µL da suspensão de células foi transferida para um tubo eppendorff e incubada por mais 30 min com 100 µL de uma solução de lise contendo PI (50 µg/mL), Triton X-100 (0,1%) e citrato de sódio (0,1%). Em seguida as amostras foram analisadas através do programa Guava Express Plus (Guava Technologies), onde foram obtidos histogramas representando a quantidade de células em cada fase do ciclo celular (G1, S e G2/M) e a quantidade de células com DNA fragmentado.

Análise dos dados

Em cada experimento foram contados 10.000 eventos. Os dados foram expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) de três experimentos independentes ($n = 3$). Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Dunnet, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$).

4.11 Ensaio de despolarização mitocondrial – Rodamina 123

A rodamina 123 é um corante fluorescente nucleofílico que, quando em contato com a célula, é sequestrado para dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado, emitindo, assim, alta fluorescência quando atingidas pelo laser. Alterações no potencial mitocondrial transmembrânico levam ao efluxo da rodamina, gerando

eventos que emitem menor fluorescência quando comparado com as células que possuem mitocôndrias íntegras (FERLINI; SCAMBIA, 2007).

Procedimento experimental

Para realização do ensaio, uma alíquota de 200 µL de suspensão de células tratadas e não tratadas foi centrifugada e o *pellet* foi ressuspensão em 200 µL de solução de rodamina 123 (1 µg/mL). Após 15 min de incubação em incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C no escuro, as amostras foram centrifugadas a 2.000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS e reincubadas por mais 30 min no escuro em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram analisadas por citometria de fluxo (CURY-BOAVENTURA; POMPEIA; CURI, 2004).

4.12 Ensaio de externalização da fosfatidilserina (Anexina V)

Durante o processo apoptótico, a fosfatidilserina (PS), um fosfolípídeo de membrana interna, é externalizado para a superfície da membrana celular, servindo como marcação para que a célula seja fagocitada por macrófagos (VERMES et al., 1995). A anexina V é uma proteína cálcio-dependente que possui uma alta afinidade por PS e, portanto, pode se ligar à PS externalizada na célula em apoptose (KRYSKO et al., 2008).

Procedimento experimental

A detecção da externalização da PS foi avaliada por citometria de fluxo utilizando anexina V conjugada com fluoresceína (FITC) (Guava Nexin kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, EUA) e IP (indicador de células necróticas).

Células HCT-116 foram plaqueadas em placas de 24 poços, na concentração de $0,3 \times 10^6$ células/mL, e incubadas por 24 h com FRA nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/mL na presença ou ausência de 15 mM de glutatona-etil-éter (GSH-OEt). A doxorubicina (0,5 µM) ou H₂O₂ (150 µM) foram usadas como controles positivos. Após o período de incubação, uma alíquota de 50 µL da suspensão celular foi transferida para um tubo eppendorf, lavadas com PBS e ressuspensas em uma solução contendo anexina V-FITC e IP na ausência de luz, a 37 °C e, após 20 min, analisadas por citometria de fluxo. Os ensaios foram realizados em três

experimentos independentes realizados em triplicatas. 10.000 eventos foram analisados em cada amostra.

4.13 Ensaio do cometa *in vitro*

O ensaio do cometa, também conhecido como *single-cell gel electrophoresis* (SCGE), é utilizado para detecção de dano genotóxico induzido por compostos químicos. Existem dois protocolos principais para a execução deste teste. A versão alcalina, mais utilizada por ser mais abrangente, é realizada em pH maior que 13, afim de induzir a desnaturação da molécula de DNA e detectar lesões de diversas naturezas, como quebras de fita simples e dupla, sítios álcali-lábeis, sítios de reparo por excisão incompletos e ligações cruzadas. A versão neutra, por sua vez, é realizada em pH entre 7,0 e 8,5 para detectar apenas quebras de fita dupla de DNA ou ligações cruzadas entre DNA e DNA, DNA e proteína ou DNA e xenobióticos (OLIVE, 1989; OSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH et al., 1988).

Procedimento experimental

Para avaliação de possível dano genotóxico induzido por FRA em células HCT-116, foi utilizado os testes do cometa neutro e alcalino. As células HCT-116 foram plaqueadas na concentração de 5×10^4 células/mL em placas de 24 poços e, após 24 h, foram tratadas com FRA nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, sendo incubadas por 1, 3, 6, 12 e 24 h em incubadora com 5% de CO_2 a 37 °C. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2 ; 150 μM) foi utilizado como controle positivo, e o controle negativo foi tratado apenas com o veículo (DMSO). Após cada período de incubação, as células foram transferidas para tubos eppendorf, que em seguida foram centrifugados por 5 min a 1.500 rpm.

Preparo das lâminas

Lâminas de vidro foram previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (Gibco) diluída a 0,5% em solução de PBS livre de Ca^{2+} e Mg^{2+} à temperatura de 60 °C e, em seguida, mantidas em temperatura ambiente até completa solidificação. O *pellet* de células tratadas e não tratadas foi ressuspenso em 200 μL de solução de agarose de baixo ponto de fusão (1,5%; Gibco) a 37 °C, e 100 μL foi adicionado em cada lâmina pré-coberta com agarose, sendo obtidas duas lâminas de cada replicata. Para uniformizar a distribuição do

material, as lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a 4 °C para solidificação da agarose.

Lise celular

Após solidificação da agarose a lamínula foi delicadamente removida e as lâminas imersas na solução de lise (5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, 1% N-Lauroyl sarcosina; a pH 10,0; 1% Triton X 100; 10% DMSO), protegida da luz, e deixada à baixa temperatura (4 °C) por no mínimo 1 h.

Modificações do ensaio do cometa alcalino foram realizadas de modo a permitir análises de possíveis lesões oxidativas no DNA. Para isso, logo após o procedimento de lise celular, as lâminas foram incubadas com diferentes endonucleases capazes de reconhecer bases nitrogenadas (purínicas ou pirimídicas) no DNA. Cada lâmina foi incubada com apenas uma única enzima por vez. As endonucleases utilizadas foram: Endonuclease III (Endo III), uma timina-glicol-DNA-glicosilase que age via excisão de bases removendo bases pirimídicas oxidadas, em especial timinas, no DNA e 8-hidroxiguanina glicosilase (hOGG-1) que age via excisão de bases removendo guaninas oxidadas no DNA.

Sucintamente, após a lise celular, as lâminas foram lavadas por 3 vezes com solução tampão (40 mM HEPES, 100 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 0,2 mg/mL BSA, pH 8,0). Após a lavagem, as lâminas foram secadas em ambiente abrigado de luz e em seguida incubadas com as enzimas Endo III (50 µL, 35 °C, 30 min) e hOGG-1 (1:500, 37 °C, 40 min) de acordo com as recomendações do fabricante (New England Biolabs Inc., EUA), com pequenas modificações.

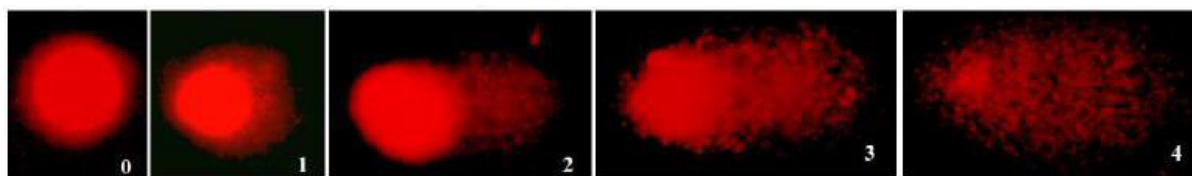
Neutralização e eletroforese

Ainda sobre proteção da luz, as lâminas foram imersas em uma solução de neutralização (0,4 M Tris, pH 7,5) por 15 min. Em seguida, as lâminas foram dispostas horizontalmente na cuba de eletroforese que, por sua vez, foi preenchida com o tampão de corrida alcalino a 4 °C. Após 60 min, a eletroforese (cuba BioRad, modelo *DNA Sub Cell Gel*) foi conduzida a 20 V e 300 mA (fonte *Life Technologies*, modelo 250) por 20 min a 4 °C. Após a eletroforese, as lâminas foram novamente neutralizadas por 5 min e fixadas em etanol a 100%.

Coloração e análise das lâminas

A coloração das lâminas foi realizada com solução de brometo de etídio (Sigma) a 20 µg/mL. As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência e classificadas de acordo com os escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (Figura 12). Foram contados 100 cometas por lâmina e atribuídos, por análise visual, a uma das cinco categorias - sem dano (0), baixo nível de dano (1), médio nível de dano (2), alto nível de dano (3) e dano máximo (4) - que relacionam a percentagem de DNA na cauda do cometa ao grau da lesão sofrida pela célula (LOVELL; THOMAS; DUBOW, 1999).

Figura 12. Tipos de cometa e classificação por categoria de dano: 0 - sem dano (cauda < 5%); 1 - baixo nível de dano (5 - 20%); 2 - médio nível de dano (20 - 40%); 3 - alto nível de dano (40 - 95%) e 4 - dano máximo (> 95%).



Fonte: adaptado de Lovell, Thomas e Dubow (1999).

O índice de dano (ID) foi obtido pela seguinte fórmula:

$$ID = \sum_{i=0}^4 n_i \times i ,$$

Onde n_i é o número de células com nível de dano i (0, 1, 2, 3 ou 4). A frequência de dano (FD) representa a porcentagem de células que sofreram danos no DNA.

Análise de dados

A análise dos dados foi feita com base na média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos independentes (n=8) e para a verificação da ocorrência de diferença estatística entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey's, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0.

4.14 Ensaio de oxidação protéica (proteínas carboniladas)

A oxidação de proteínas intracelulares foi determinada através da quantificação dos grupamentos carbonilos gerados em cadeias laterais de alguns aminoácidos, utilizando 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (BUSS et al., 1997). Após os tratamentos na presença ou ausência de 15 mM de glutatona-etil-éter (GSH-OEt), as células foram lisadas com auxílio de ultrassom e, posteriormente, as proteínas presentes no lisado celular foram quantificadas através do método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2 ; 150 μ M) foi utilizado como controle positivo. As amostras de proteína (500 μ l; 1mg/mL) foram incubadas com ou sem solução com DNPH durante 60 min a 37 °C no escuro. Posteriormente, foi adicionado 1 mL de ácido tricloroacético a 10% (4 °C) e incubado por 25 min. Logo após, a suspensão foi centrifugada à 5.000 rpm por 30 min (4 °C); sendo o sobrenadante descartado. O *pellet* foi lavado três vezes com etanol/acetato de etila (1:1, v/v), ressuspenso em solução tampão de 45 mM de Tris-HCl (pH 7,4) e incubado por 10 min a 37 °C. As proteínas solubilizadas no tampão foram normalizadas pelo teor de proteína (LOWRY et al., 1951) e a absorbância medida com auxílio de espectrofotômetro, utilizando comprimento de onda de 375 nm (Spectra Count, Packard, Ontario, Canada). O teor total de proteínas carboniladas foi determinado em nmol/mg de proteína.

Análise dos dados

A análise dos dados foi feita com base na média $\pm$ erro padrão da média de dois experimentos independentes (n=8) e para verificação da ocorrência de diferença estatística entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Tukey's multiple comparisons, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$), utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0.

4.15 Animais

Os experimentos *in vivo* foram realizados após aprovação do projeto pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal do Ceará, sob Protocolo CEUA 13/2017 (Anexo I).

Nos experimentos de estudo antitumoral, foram utilizados os seguintes modelos murinos: Camundongos (*Mus musculus*, linhagem: *Swiss*) - linhagem tumoral: Sarcoma 180 e Ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem: *Wistar*) – linhagem tumoral: carcinosarcoma Walker 256.

Os Ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem *Wistar*) e os camundongos (*Mus musculus*, linhagens *Swiss*) foram oriundos do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará e mantidos no Biotério do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), da Universidade Federal do Ceará.

Nos estudos de toxicidade aguda (*Up-and-Down*, OECD 425) e hemólise (coleta de eritrócitos), foram utilizados camundongos albinos linhagem *Swiss* (*Mus musculus*).

Os animais foram alojados dentro de caixas de polipropileno e grades metálicas apropriadas em pequenos grupos do mesmo sexo e mesma linhagem (não excedendo 4 ou 8 ratos e camundongos respectivamente por caixa). A temperatura do local foi mantida em cerca de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. A iluminação artificial, com uma alternância de 12 h de luz e 12 h de escuro. Os animais tiveram livre acesso a alimentação (ração específica) e água. Foram utilizados animais adultos (fêmeas para coleta de eritrócitos e machos para os demais experimentos), jovens, saudáveis e que não tinham sido anteriormente submetidos a processos experimentais.

Os animais foram identificados de forma inequívoca, e aclimatados às condições do biotério durante pelo menos cinco dias. A dor e o sofrimento dos animais no decurso dos ensaios foram minimizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal). Todos os experimentos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal preconizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Ceará (Protocolo do CEUA: 13/2017).

4.16 Toxicidade aguda – Método *Up and Down*

Para o teste de toxicidade oral aguda - *Up and Down* (OECD 425, 1997) – utilizou-se camundongos albinos *Swiss* fêmeas (n=7), pesando entre 25-35g. Os animais foram mantidos

em jejum alimentar por 2 h antes da administração de FRA (dissolvida em DMSO 3% e diluída em soro fisiológico).

O programa estatístico preconizado pela OECD 425 (AOT425StatPgm), indica qual a dose deve ser administrada ao animal seguinte de acordo com desfecho (morte ou sobrevida) do animal anteriormente tratado com as substâncias em estudo. Após a administração de cada dose, foram observados os efeitos tóxicos que poderiam ser manifestados devido à administração de FRA, tais como alterações de pêlo, pele e mucosas, comportamento, taquicardia, ptose, convulsões, diarreia, letargia e coma nos tempos de 15, 30, 60 e 120 min e 24 h após o tratamento. Todos os animais sobreviventes foram observados diariamente, durante um período de 14 dias após a primeira administração, sendo posteriormente sacrificados.

De acordo com os procedimentos estabelecidos pela OECD 425, a dose de partida depende de algumas variáveis. Se a droga não for conhecida, é recomendável que se utilize como dose de partida, 175 mg/kg para o primeiro animal tratado, por via oral. Caso o animal morra com a dose de 175 mg/kg, ao próximo animal deve ser administrado a dose de 55 mg/kg. Mas, se ele sobrevive, a dose do animal subsequente deve ser 550 mg/kg.

No caso de FRA, com base na DL_{50} (42,5 mg/kg) de uma fração semelhante testada anteriormente (dados não mostrados), optou-se por iniciar o teste com a dose de 70 mg/kg. Portanto, as recomendações do programa, de uma dose acima ou abaixo de acordo com o desfecho do animal anterior foram seguidas.

Análise Estatística

Para análise dos dados obtidos após 24 h e 14 dias da administração de FRA, os mesmos foram plotados no programa AOT425StatPgm. O intervalo de confiança aceito foi de 95%.

4.17 Ensaio Antitumoral - Modelo Sarcoma 180

O sarcoma 180, ou tumor de Crocker, é um tumor indiferenciado que foi descrito pela primeira vez em camundongos em 1914. Este tumor foi encontrado na região axilar direita e diagnosticado na época como carcinoma, mas o tecido de origem não foi

especificado, de forma que não se sabe se era uma neoplasia cutânea ou mamária. Estudos posteriores demonstraram que suas células não produzem laminina, o que não permite sua caracterização como de origem epitelial. O tumor invade músculo esquelético, tecido adiposo, nervos e vasos sanguíneos (STEWART et al., 1959). O Sarcoma 180 pode ser transplantado por inoculação subcutânea, intramuscular ou intraperitoneal e cresce rapidamente em 90 a 100% dos animais inoculados, havendo uma taxa de regressão natural de 8 a 10% (ZUCKERBERG, 1973). Apesar de seu comportamento agressivo local, esse tumor não produz metástases (KURASHIGE; MITSUHASHI, 1982).

O Sarcoma 180 tem sido utilizado no estudo da ação de componentes químicos, físicos e biológicos sobre o crescimento, patogênese, imunologia, citogenética e terapêutica de células tumorais. A vantagem da utilização de neoplasias transplantáveis, em comparação às demais, recai sobre o conhecimento prévio da quantidade e das características iniciais das células tumorais a serem inoculadas e sobre o desenvolvimento rápido da neoplasia, que restringe o tempo de estudo (STEWART et al., 1959).

A mensuração da atividade antitumoral está relacionada à regressão total de tumores nos animais, à redução no crescimento dos tumores sensíveis aos compostos ou ao aumento da expectativa de vida durante o tratamento, comparado com os não-tratados. O tratamento deve ser iniciado 24 h após o transplante, pois, as células tumorais iniciam a formação do nódulo tumoral antes de 48 h após o transplante (SCHABEL et al., 1977).

Procedimento experimental

Para o teste de atividade antitumoral, foi utilizado o tumor sólido do tipo Sarcoma 180, com oito dias de implantação na região axilar esquerda. O animal doador, foi sacrificado por overdose anestésica (30 mg/kg de Cloridrato de Xilasina e 270 mg/kg de Cloridrato de Cetamina), sendo realizada assepsia com álcool iodado. Em seguida, foi retirado o líquido ascítico da cavidade abdominal, tendo sido preparado uma suspensão de células com 4,3 mL de ringer lactato, 0,2 mL de gentamicina (5 mg/mL) e 0,5 mL do líquido ascítico, para posterior contagem de células. Nos animais receptores (*Mus musculus*, linhagem *Swiss*), foram injetadas 2×10^6 céls/0,5 mL na região axilar esquerda.

Após a inoculação das células tumorais, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 8 animais (Experimento 1), sendo identificados e armazenados em gaiolas

de polipropileno e grades metálicas apropriadas em grupos de 8 camundongos por gaiola. Vinte e quatro h após a inoculação das células tumorais, iniciou-se o tratamento dos animais da seguinte forma:

Experimento 1:

- ✓ **Grupo 1:** controle negativo: 0,5 mL de solução fisiológica (SF) e DMSO a 3%, via oral;
- ✓ **Grupo 2:** controle positivo: Ciclofosfamida 25 mg/kg/dia, via intraperitoneal (0,3 mL);
- ✓ **Grupo 3:** FRA (20 mg/kg/dia), DMSO (3% em SF), via oral (0,5 mL);
- ✓ **Grupo 4:** FRA (30 mg/kg/dia), DMSO (3% em SF), via oral (0,5 mL);
- ✓ **Grupo 5:** FRA (40 mg/kg/dia), DMSO (3% em SF), via oral (0,5 mL);

Todos os grupos foram tratados por via oral, exceto o controle positivo, que foi usada a via intraperitoneal. Vinte e quatro horas após o término do tratamento, os animais foram sacrificados, sendo em seguida retirados o tumor, rins, fígado, baço, estômago e pulmões para pesagem e análise histológica.

O percentual de inibição do crescimento tumoral (IT) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$IT (\%) = [(A-B)/A] \times 100$$

Onde:

A = média dos pesos dos tumores no grupo controle.

B = média dos pesos dos tumores nos animais tratados.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média $\pm$ desvio padrão da média, utilizando o método estatístico de Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste Tukey, com o auxílio do programa Prism 6.0. Para todos os grupos foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$.

4.18 Ensaio Antitumoral – Modelo Carcinossarcoma de Walker 256

Os testes para avaliação da atividade antitumoral contra Carcinossarcoma de Walker 256 *in vivo* foram realizados utilizando ratos (*Ratus norvegicus* Wistar) machos, pesando entre 100 a 150 g, mantidos com água e alimento *ad libitum*. O manejo dos animais foi realizado de acordo com os princípios éticos, de forma a amenizar ao máximo o sofrimento dos animais. O tumor sólido do tipo Carcinossarcoma de Walker 256, com 8 dias de implante foi utilizado para determinar a atividade antitumoral de FRA.

O rato doador foi sacrificado por meio de overdose anestésica (30 mg/kg de cloridrato de xilasina e 270 mg/kg de cloridrato de ketamina). A assepsia da região tumoral foi feita com álcool iodado. Em seguida, foram realizadas incisões na epiderme do animal e posteriormente, a retirada do tumor com o auxílio de pinça e tesoura. O tumor foi colocado em uma placa de Petri contendo solução de Ringer-lactato (gentamicina 1%). Após a retirada das partes necrosadas, foram selecionados fragmentos tumorais de aproximadamente 2-3 mm de diâmetro, sendo estes transferidos para outra placa de Petri contendo a mesma solução. Os fragmentos tumorais foram triturados com tesoura, peneirados e a suspensão restante submetida ao teste de viabilidade celular por azul de tripan e colocado em câmara de Neubauer para avaliar a viabilidade celular e fazer a contagem celular. A suspensão foi diluída para a concentração de $1,0 \times 10^6$ células tumorais/mL e inoculado 0,5 mL por via subcutânea na região axilar esquerda de ratos *wistar*. Após 10 dias de evolução, o tumor foi retirado dos animais doadores e o procedimento acima referido repetido.

Procedimento experimental

Quatro grupos de ratos *wistar* foram inoculados com $0,5 \times 10^6$ células tumorais por via subcutânea na região axilar. Vinte e quatro horas após a inoculação das células tumorais, os animais foram tratados com 20 e 40 mg/kg de FRA, 25 mg/Kg de ciclofosfamida (controle positivo) e Tween 80 a 3% (controle negativo) durante sete dias consecutivos por via oral, exceto o controle positivo, que foi usada a via intraperitoneal. Oito dias após o início do tratamento (D9), foi coletado sangue por via orbital dos animais para análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos e ensaio de cometa e micronúcleos (*in vivo*). Posteriormente, os animais foram sacrificados por guilhotina e foram removidos o tumor e os órgãos: fígado, rins, baço, estômago e pulmões para pesagem e análises histológicas. Os grupos foram divididos da seguinte forma:

Experimento 2:

- ✓ **Grupo 1:** Controle negativo: 0,5 mL de solução fisiológica (SF) e DMSO a 3%, via oral;
- ✓ **Grupo 2:** Controle positivo: ciclofosfamida 25 mg/kg/dia, via intraperitoneal (0,5 mL);
- ✓ **Grupo 3:** FRA (20 mg/kg/dia), DMSO a 3%, via oral (0,5 mL);
- ✓ **Grupo 4:** FRA (40 mg/kg/dia), DMSO a 3%, via oral (0,5 mL);

O percentual de inibição do crescimento tumoral foi realizado de acordo com a fórmula descrita para o Modelo Sarcoma 180.

4.19 Ensaio de coordenação motora em Rato *Wistar*

Para verificar a possível neurotoxicidade e respectiva coordenação motora de animais tratados com FRA, os animais do Experimento 2, ao final do tratamento, foram testados quanto à coordenação motora (Rotarod) duas horas antes da eutanásia.

O protocolo utilizado consiste na avaliação de possíveis déficits de coordenação motora através da observação do desempenho no rotarod após sete dias de tratamento com FRA. O aparelho consiste de uma haste estriada (diâmetro: 3 cm) separados em quatro compartimentos (largura: 5 cm), com 20 cm de altura a partir de quatro pranchas de inclinação. Foi utilizado o equipamento rotarod (Figura 13), para avaliar a coordenação motora e alterações de equilíbrio no roedor. O protocolo utilizado foi descrito por Padovan-Neto e colaboradores (2009). Baseia-se na habilidade de roedores em manter o equilíbrio e a caminhada em um cilindro em rotação.

Figura 13. Foto do aparelho de Rotarod no qual se faz o teste de coordenação motora



Fonte: Google imagens.

Procedimento experimental - Ensaio de coordenação motora - Rotarod

Os animais foram treinados em duas sessões nos dois últimos dias que antecederam a inoculação do tumor e o tratamento. Os animais foram colocados sobre a haste rotativa em condições de aceleração 16-38 rpm durante 300 s em cada sessão. No dia do teste foram realizados dois testes com intervalo de 120 min entre eles e foi registrado o tempo (latência) que o animal foi capaz de andar sobre a haste em rotação constante (20 rpm) antes da queda (tempo máximo: 120 s). Após a queda ou 120 s, os animais foram removidos do aparelho e colocados em suas caixas para descanso.

4.20 Parâmetros toxicológicos avaliados nos ensaios com modelos murinos

4.20.1 Avaliação dos parâmetros bioquímicos

Foram avaliados possíveis danos hepáticos e renais. A alanina transaminase (ALT), também chamada transaminase glutâmica pirúvica sérica (SGPT ou TGP) ou alanina aminotransferase (ALAT), é uma enzima presente nos mamíferos, encontrada principalmente nos hepatócitos. Quando uma célula é danificada, ela libera esta enzima no sangue. A ALT aumenta drasticamente em lesões hepáticas agudas. A aspartato transaminase (AST), também

chamada de transaminase glutâmica oxalacética sérica (SGOT ou TGO) ou aspartato aminotransferase (ASAT) é similar à ALT de modo que é outra enzima associada às células parenquimais do fígado. Está aumentada na lesão hepática aguda, mas também está presente nas hemácias e músculos esqueléticos e cardíacos, não sendo então uma enzima específica do fígado (GAW et al., 2004).

Como parâmetro da função renal, foi avaliada a concentração de úreia plasmática, uma substância que provém dos alimentos que contém proteínas e que devem ser quase totalmente eliminada do organismo através da urina. Quando os rins estão com a sua função de filtração prejudicada, a uréia fica acumulada no sangue, provocando alterações em vários órgãos, estabelecendo a uremia (GAW et al., 2004).

A creatinina é utilizada como índice de função renal devido à constância da formação e excreção da creatinina. A avaliação inicial da função renal na prática clínica diária costuma ser realizada através da dosagem de creatinina plasmática (CrP). A concentração sérica e excreção de creatinina urinária estão aumentadas significativamente pela necrose muscular esquelética, miastenia grave e fome. Como também, em hipertiroidismo e acidose diabética. Por ocasião de ter independência a fatores como dieta (ingestão de proteína), grau de hidratação e do metabolismo de proteínas, a creatinina plasmática é um índice de função renal mais confiável do que a uréia (LOPES, 1998; BURMEISTER et al., 2007).

Para avaliar os parâmetros bioquímicos, sangue periférico foi coletado através do plexo orbital, em tubos heparinizados, onde o plasma foi utilizado para avaliar a função renal e danos hepáticos. Para investigação de dano hepático foram determinados os níveis séricos das transaminases: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Para tanto, utilizaram-se kits da LABTEST® sistemas para diagnostico. A função renal foi avaliada pelos parâmetros séricos clássicos da integridade renal: a uréia e a creatinina. Para tanto, também foi utilizado o kit da LABTEST® sistemas para diagnostico.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média $\pm$ E.P.M. dos animais testados. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 6.0.

4.20.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos

A análise dos parâmetros hematológicos consta de uma série de provas que possibilitam detectar anormalidades que se apresentam em certos fenômenos fisiopatológicos importantes nos animais e no homem e que se refletem no sangue (LORENZI, 2006). Foram realizados: dosagem de hemoglobina e contagem de plaquetas e leucócitos realizada em hemocítmetro. A contagem diferencial leucocitária foi realizada por meio de esfregaços sanguíneos e foram determinados valores relativos e absolutos de linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos. O sangue foi coletado por meio do plexo orbital dos animais dos grupos tratados para estas análises.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média $\pm$ E.P.M. dos animais. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 6.0.

4.21 Análise histopatológica

A técnica de coloração hematoxilina e eosina (H/E) permite diferenciar o citoplasma do núcleo, possibilitando, assim, a análise de algumas estruturas celulares. A análise morfológica e histopatológica de tecidos de animais tratados permite identificar alterações que possam estar ocorrendo e fornecer subsídios para sugerir os efeitos tóxicos causados pela droga.

Os animais foram sacrificados e, posteriormente, retirados e pesados os órgãos e tumores, os quais foram armazenados em formol a 10%. As peças foram retiradas do formol e seccionadas em pequenas fatias para posterior preparação das lâminas. O material foi fixado em formol a 10% por 24 h, desparafinado em xilol por 15 min, e desidratado em concentrações crescentes de álcool até 70% (mergulhando-se rapidamente as lâminas), sendo posteriormente lavado em água destilada até ter sido removido todo o álcool. Posteriormente as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. As lâminas foram levadas ao

microscópio para avaliação das suas características morfológicas e comparadas aos controles negativo e positivo.

4.22 Estudo da atividade genotóxica e mutagênica

4.22.1 Ensaio de genotoxicidade *in vivo* - Dano ao DNA - Ensaio do cometa

O ensaio do cometa ou SCGE (*Single Cell Gel Electrophoresis Assay*) foi desenvolvido por Singh et al. (1988) para detectar quebra de fitas simples e duplas na molécula de DNA induzidas por substâncias com potencial genotóxico, tais como agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Sendo muito utilizado em estudo de genética toxicológica, a fim de um biomonitoramento ambiental ou no monitoramento populacional em humanos. Entretanto, este teste é utilizado como um indicativo e não um teste mutagênico. Este pode ser utilizado tanto em células de animais quanto vegetais *in vitro* e *in vivo* (SILVA et al., 2003).

Nesse ensaio, a atividade genotóxica de FRA foi testada *in vivo*, em modelos murinos, para avaliar possíveis danos à fita simples e à fita dupla do DNA induzidos por esta fração. Para isso, a partir dos camundongos *Swiss* machos (25-30 g) do experimento 2, foi coletado sangue por via orbital e acondicionado em microtubos heparinizados, diluído com agarose LMP (agarose de baixo peso molecular) e colocado em uma lâmina previamente coberta com uma película de agarose NMP (agarose de peso molecular normal). As lâminas foram mantidas na solução de lise por cerca de 2 h e, em seguida, foi realizada a eletroforese. Após a corrida, as lâminas foram fixadas em álcool 100%, coradas com brometo de etídio 10% e contadas no microscópio de fluorescência.

A análise foi realizada de acordo com o padrão de escores previamente determinados pelo tamanho e intensidade da cauda do cometa (BURLINSON et al., 2007). Foram contados 50 cometas/lâmina e classificados, de acordo com a percentagem de DNA na cauda do cometa, indicando o grau de quebra do DNA. Onde 0 = sem danos (<5%), 1 = baixo nível de danos (5-20%), 2 = médio nível de danos (20-40%), 3 = alto nível de danos (40-95%) e 4 = dano total (95%). Foram calculados o índice (ID) e a frequência (FD) de danos. O ID foi

obtido através da fórmula: $ID = 400 - \sum \text{Escores}$. A FD representa a porcentagem de células que sofrem danos no DNA.

Análise dos dados

Os dados foram analisados a partir da média $\pm$ E.P.M. dos experimentos. Para verificação da ocorrência de diferenças significativas entre os diferentes grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey com a utilização do programa GraphPad Prisma versão 6.0

4.22.2 Avaliação da mutagenicidade em reticulócitos murinos – Teste do micronúcleo *in vitro*

Micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos compostos de material cromossômico. Após a separação das cromátides no processo mitótico, dois núcleos são reconstituídos, um em cada pólo. A membrana nuclear é refeita ao redor destes dois conjuntos cromossômicos. Mas se um cromossomo inteiro ou um fragmento cromossômico acêntrico não se integra ao novo núcleo, este também pode ser considerado um micronúcleo. Os micronúcleos são estruturalmente, pequenos núcleos representados por material genético que foi perdido pelo núcleo principal como consequência de um dano genético. O teste de micronúcleo detecta genotoxicidade cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese e danos ao fuso mitótico (SILVA et al., 2003).

O efeito genotóxico da FRA foi avaliado em reticulócitos murinos. O ensaio foi realizado de acordo com Hayashi et al. (1990), em uma lâmina pré-tratada com o corante fluorescente acridina laranja (1 mg/mL), foram adicionados 20 μ L de sangue periférico dos animais. As lâminas foram cobertas com lamínulas para posterior análise. As preparações celulares foram examinadas com o auxílio de um microscópio de fluorescência com filtro de excitação azul (488 nm) e filtro de emissão (barreira) amarelo (575 nm), usando a objetiva de imersão. Duas mil células (reticulócitos) foram analisadas por animal.

5 RESULTADOS

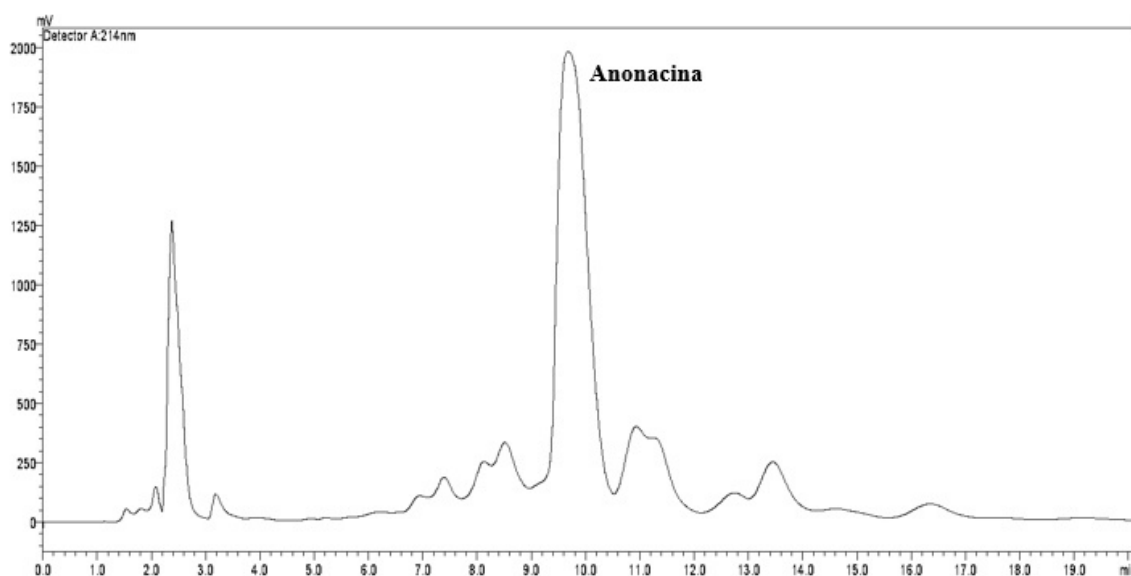
5.1 Preparação da Fração Rica em Acetogeninas (FRA)

A partir de 4 kg de sementes de *Annona muricata*, obteve-se 179 g de extrato etanólico das sementes de *Annona muricata* (EESAM), que após processo de bipartição água/clorofórmio, obteve-se 123 g de EESAM(CHCl₃). A partir de então, foi fracionado em coluna cromatográfica de sílica gel, obtendo-se uma fração hexânica (F1, 1.000 mL), duas frações clorofórmicas (F2 e F3), 500 mL cada, oito frações acetato de etila (AcOEt1 – AcOEt8), 250 mL cada e uma fração metanólica (1000 mL). Após testes em CCD com reagente de Kedde, as frações AcOEt 6 e 7 foram reunidas e denominadas FRA (12,9 g) e selecionada para os estudos *in vitro* e *in vivo*.

5.2 Isolamento e identificação da anonacina

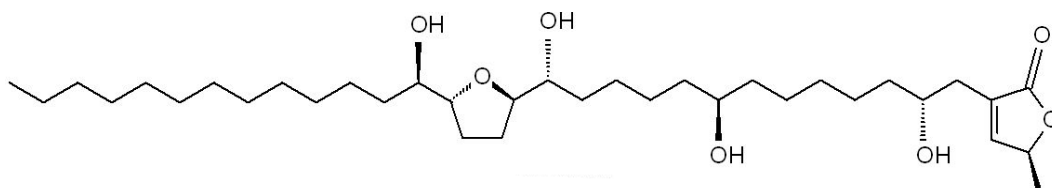
A partir de 600 mg de FRA (Figura 14), obteve-se com o auxílio de um aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE; em inglês: *High performance liquid chromatography*, HPLC), 157,7 mg da acetogenina majoritária no EESAM, que após a realização de *fingerprint* em HPLC, foi identificada como anonacina. Posteriormente, foi enviada uma amostra de 25 mg para análises de ressonância magnética nuclear de ¹³C e ¹H.

Figura 14. Cromatograma de FRA.



Dentro das condições cromatográficas usadas nesse processo de isolamento em HPLC, obteve-se um excelente rendimento de anonacina: 157,7 mg / 600 mg: 26,8%, que após separada, foi analisada por ressonância magnética nuclear, confirmando sua identidade: anonacina (Figura 15), por comparação com dados espectrais relatados na literatura para esta substância (RIESER et al., 1996).

Figura 15. Estrutura química da anonacina.



Fonte: Yiallouris et al. (2018).

5.3 Ensaios de atividade antioxidante de FRA

O potencial antioxidante é um dos fatores de grande relevância em estudo de produtos naturais. Sendo assim, verificou-se se FRA apresentaria potencial antioxidante a partir dos métodos DPPH, ABTS e beta caroteno, testada nas concentrações de 0,0125 a 125 µg/mL (para os dois primeiros) e 0,96 a 19,23 µg/mL, para o último, não demonstrando atividade antioxidantes nas concentrações testadas.

5.4 Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Produtos naturais são cada vez mais explorados na tentativa de desenvolver ou isolar novas moléculas com funções farmacológicas, inclusive de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE). Moléculas inibidoras da AChE são utilizadas principalmente no combate sintomático da Doença de Alzheimer. No entanto, a participação da AChE pode ir além da função neurológica e estar correlacionada ao desenvolvimento tumoral (PÉREZ-AGUILAR et al., 2015). No teste qualitativo, FRA apresentou-se positivo para atividade de inibição da AChE. No entanto, o teste qualitativo mostrou que a referida ação é muito fraca (Tabela 8).

Tabela 8. Potencial de FRA para inibição da enzima acetilcolinesterase por método qualitativo (CCD) e quantitativo (ELISA).

Droga	Método	
	CCD*	ELISA** CI ₅₀ (µg/mL)
FRA	+	22,66
Fisiostigmina	+	1,15

*Ensaio de inibição qualitativo da enzima AChE: formação de halo branco = +; não formação = -.

**Capacidade de inibição de 50% da enzima - AChE.

5.5 Estudo da atividade citotóxica de FRA

Os estudos biológicos da fração FRA partiram de ensaios iniciais frente a três tipo de células tumorais, com amostras em concentrações únicas.

5.5.1 Screening em três linhagens de células tumorais

FRA foi testada frente a três linhagens de células tumorais humanas: HCT-116 (cólon - humano), SNB-19 (Glioblastoma) e HL-60 (Leucemia Mieloide Humana), em concentração única de 25 µg/mL. Após 72 h, observou-se que FRA inibiu 100% das linhagens testadas.

Com base em estudos anteriores com extratos, frações e anonacina derivados de *A. muricata* (BARRETO, 2014), nos quais demonstraram melhor efeito sobre a linhagem HCT-116, selecionou-se então, HCT-116 para dar continuação aos estudos.

5.5.2 Avaliação da atividade citotóxica de FRA em células tumorais humanas (HCT-116) e células não tumorais murinas (L929)

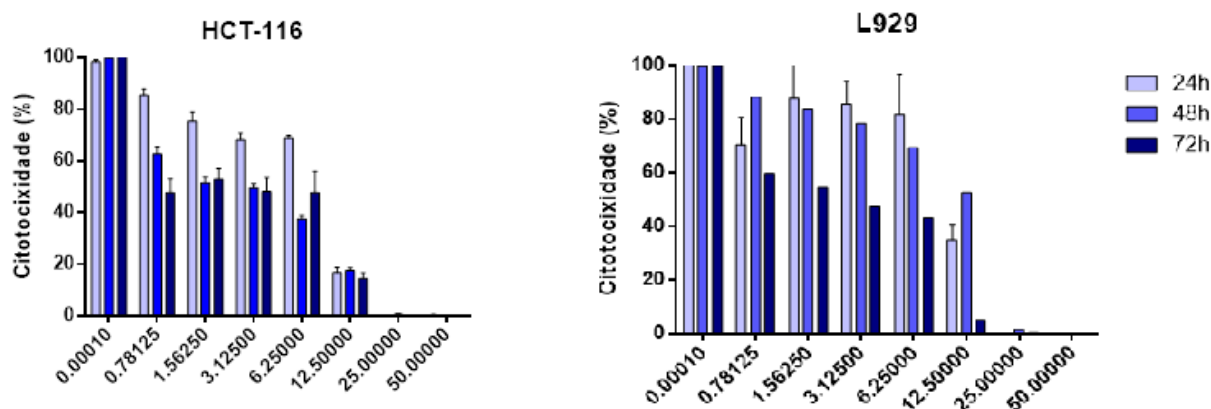
O próximo passo, foi determinar a concentração de FRA que inibe 50% do crescimento tumoral (CI₅₀) em células da linhagem HCT-116 e o crescimento celular da linhagem L929 (células murinas não tumorais) nos tempos de 24, 48 e 72 h (Tabela 9).

Tabela 9. Atividade citotóxica *in vitro* de FRA frente a linhagem HCT-116 (câncer colorretal) e L929 (fibroblastos pulmonares murinos) nos tempos de 24, 48 e 72 h.

Tempo do estudo	CI ₅₀ (intervalo de confiança de 95%) µg/mL	
	HCT-116	L929
24 horas	5,82 (5,04 - 6,73)	10,04 (6,47 – 15,56)
48 horas	1,91 (1,64 - 2,23)	9,27 (7,51 – 11,45)
72 horas	1,35 (0,65 - 2,78)	1,90 (1,26 – 2,87)

Confirmando os resultados do *screening*, FRA na concentração de 25 µg/mL inibiu 100% do crescimento celular de HCT-116 no período de 24 h (Figura 16).

Figura 16. Atividade citotóxica *in vitro* de FRA sob as linhagens celulares de: A) câncer colorretal (HCT-116); e B) fibroblastos pulmonares murinos (L929) nos tempos de 24, 48 e 72 h.



No entanto, apenas na menor concentração testada (0,78 µg/mL), houve diferença significativa na inibição do crescimento celular de HCT-116 nos três tempos testados. Houve diferença significativa entre os tempos de incubação de 24 h e 48 h, mostrando correlação citotoxicidade versus tempo. Quanto a linhagem murina não tumoral L929, FRA mostrou citotoxicidade bem inferior ao efeito citotóxico apresentado frente a HCT-116, apresentando citotoxicidade só a partir do tempo de 72 h.

5.6 Teste de formação de colônias (atividade clonogênica)

A análise da atividade clonogênica após a exposição das células a diferentes concentrações da fração FRA corrobora com os resultados de citotoxicidade avaliados pelo método do MTT. A fração FRA, nas concentrações de 5, 10 e 20 µg/mL, reduziu a capacidade das células de cólon HCT-116 em formar colônias (Tabela 10). De modo interessante, a linhagem murina L929 (não tumoral), mostrou-se menos sensível aos efeitos citotóxicos induzidos pela fração FRA, uma vez que apenas culturas de fibroblastos tratadas com as duas maiores concentrações de FRA (10 e 20 µg/mL) tiveram a sua capacidade clonogênica reduzida.

Tabela 10. Avaliação da atividade clonogênica após exposição das células HCT-116 e L929 a fração FRA nas concentrações de 1, 5 e 10 e 20 µg/mL por 12 h. Controle positivo: MMS (4×10^{-5}).

Linhagens	Tratamento	Eficiência de plaqueamento	Fração sobrevivente
HCT-116	C	$0,78 \pm 0,01$	1
	MMS	$0,33 \pm 0,04^*$	$0,34 \pm 0,02^*$
	1 µg/mL	$0,74 \pm 0,03$	$0,97 \pm 0,03$
	5 µg/mL	$0,55 \pm 0,03^*$	$0,55 \pm 0,02^*$
	10 µg/mL	$0,25 \pm 0,04^*$	$0,25 \pm 0,03^*$
	20 µg/mL	$0,02 \pm 0,01^*$	$0,01 \pm 0,01^*$
L929	C	$0,73 \pm 0,02$	1
	MMS	$0,25 \pm 0,01^*$	$0,27 \pm 0,03^*$
	1 µg/mL	$0,72 \pm 0,01$	$0,98 \pm 0,02$
	5 µg/mL	$0,70 \pm 0,01$	$0,97 \pm 0,01$
	10 µg/mL	$0,48 \pm 0,03^*$	$0,47 \pm 0,03^*$
	20 µg/mL	$0,01 \pm 0,01^*$	$0,01 \pm 0,01^*$

*P<0,05

5.7 Atividade hemolítica

Após determinar a CI_{50} de FRA em três tempos diferentes sobre HCT-116 e fibroblastos murinos L929, e a respectiva atividade clonogênica destas mesmas células após 12 h de exposição a FRA, verificou-se se a fração FRA apresentava ação hemolítica frente a hemácias de camundongos *swiss* em 8 diferentes concentrações (1,95; 3,9; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250 µg/mL). Após 4 h de exposição, não foi possível detectar atividade hemolítica.

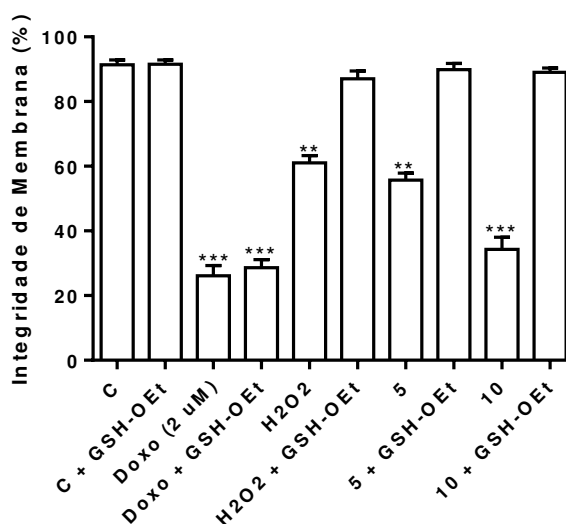
Portanto, esta fração não apresenta potencial hemolítico dentro dos parâmetros testados, sugerindo que a atividade citotóxica de FRA seja através de mecanismos mais específicos, uma vez que esta fração não foi capaz de romper membranas eritrocitárias (hemólise) mesmo em altas concentrações (250 µg/mL).

Os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos antitumorais de compostos derivados de *A. muricata* ainda não estão totalmente elucidados (LIU et al., 2016). Para tanto, realizou-se alguns ensaios na tentativa de determinar possíveis mecanismos de ação de FRA frente à HCT-116.

5.8 Permeabilidade de membrana

A integridade da membrana celular da linhagem HCT-116 foi avaliada após a exposição a FRA por 24 h, pelo método de exclusão do iodeto de propídio (PI). FRA reduziu significativamente ($p < 0,05$) e dose-dependente o número de células com membranas íntegras, ou seja, sem lesões ou rupturas que permitam a entrada do PI para o interior celular, em comparação ao grupo controle negativo ($91,33 \pm 0,52\%$). Em ambas concentrações, quando as células são expostas a GSH-OEt, o dano a membrana é totalmente inibido. Na menor concentração (5 µg/mL), o percentual de células com membranas íntegras foi de $55,66 \pm 1,11\%$, e quando as células eram expostas previamente a GSH-OEt, esse percentual subia para $89,83 \pm 1,19\%$. Na maior concentração (10 µg/mL), o percentual de células íntegras foi de apenas $34,33 \pm 0,48\%$. No entanto, quando as células eram expostas previamente a GSH-OEt, o percentual subia para $89,00 \pm 1,16\%$. Doxorubicina (2 µM) e H_2O_2 na presença e/ou ausência de GSH-OEt foram utilizadas como controle positivo, ambas inibindo o percentual de células viáveis. No entanto, a exposição das células ao antioxidante GSH-OEt, inibiu o dano a membrana celular apenas das células tratadas com H_2O_2 , enquanto o dano à membrana causado por doxorubicina não sofre alteração quando as células são expostas a GSH-OEt (Figura 17).

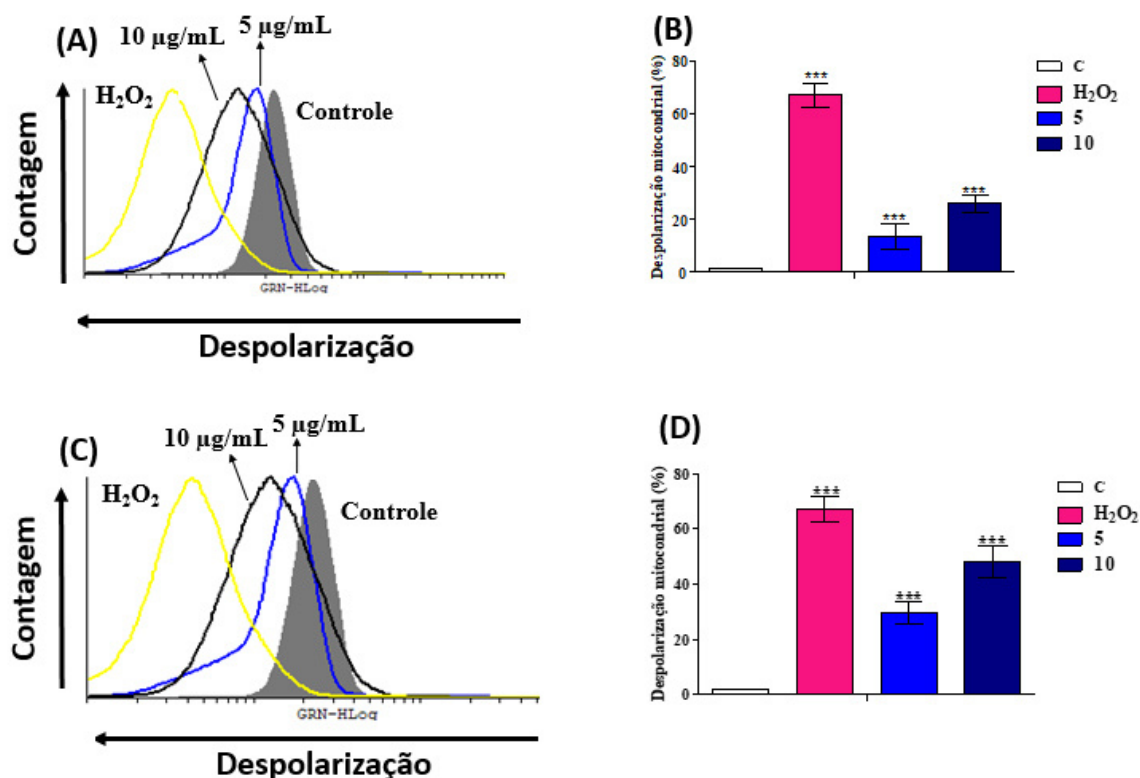
Figura 17. Efeito da fração FRA sobre a membrana de células de cólon HCT-116 após 24 h de exposição nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ na presença e/ou ausência de 15 mM de glutathiona-etil-éter (GSH-OEt). Doxorrubicina (Doxo 2 15 μM) e H_2O_2 foram utilizados como controles positivos. Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos independentes. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por teste de Tukey.



5.9 Ensaio de despolarização mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)

O potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) foi mensurado após o tratamento com FRA em diferentes tempos de exposição. Cultura de células HCT-116 expostas a fração rica em anonacina entre 1 e 6 h de tratamento não demonstrou alteração sobre o $\Delta\Psi\text{m}$ (dados não mostrados) em relação ao controle negativo. Porém, com o passar do tempo de exposição (12 e 24 h), alterações significativas da função mitocondrial foram observadas (Figura 18). Após 12 h de exposição, a fração FRA nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ induziu um aumento na frequência de células com baixo $\Delta\Psi\text{m}$ em torno de 13% e 26%, respectivamente (Figura 18A). Como previsto, o percentual de células de câncer colorretal com baixo $\Delta\Psi\text{m}$ aumentou em ambas as concentrações avaliadas de FRA após 24 h de tratamento (Figura 18B): 5 $\mu\text{g/mL}$ (~30%) e 10 $\mu\text{g/mL}$ (~48%).

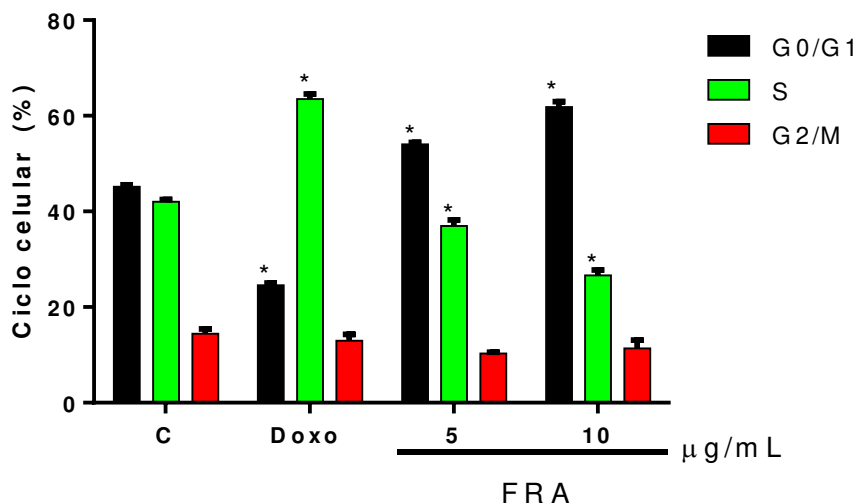
Figura 18. Efeito da fração FRA sobre a despolarização mitocondrial de células de cólon HCT-116 após 12 h (painéis A e B) e 24 h (painéis C e D) de exposição nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por teste de Tukey.



5.10 Ensaio de Ciclo celular

Dentre os diversos mecanismos de ação das drogas antitumorais, a inibição da proliferação e respectiva indução de morte celular do tecido tumoral figura entre as principais abordagens em quimioterapia. Objetivando avaliar se há correlação entre a atividade anticâncer de FRA e inibição do ciclo celular, foi realizado um ensaio com base na análise do conteúdo de DNA de células HCT-116 tratadas com FRA por 24 h e analisadas por citometria de fluxo. Observou-se que houve aumento significativo de células em G0/G1 em ambas as concentrações (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 19). A cultura tratada com doxorrubicina (2 μM), apresentou-se em sua maioria na fase S.

Figura 19. Efeito de FRA nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ sobre o ciclo celular em células HCT-116 após 24 h de tratamento. Controle positivo: Doxorrubicina (Doxo; 2 μM). Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.

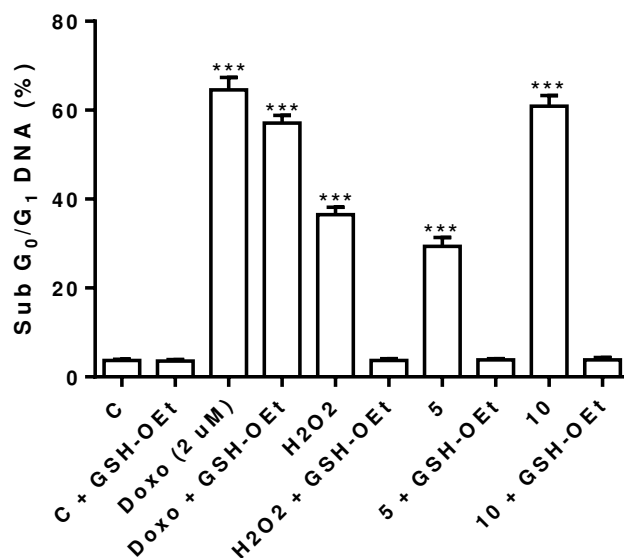


5.11 Ensaio de fragmentação do DNA internucleossomal

Após o tratamento (24 h) de células de câncer de cólon HCT-116, observou-se que a fração FRA nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ induziu um aumento significativo e dose-dependente na fragmentação de DNA das células tratadas (Figura 20), ou seja, células que após o tratamento com a fração rica em anonacina apresentaram fragmentação do DNA, significa que estão morrendo e isso corrobora muito bem com a apoptose.

No entanto, o pré-tratamento com GSH-OEt exerceu um grande efeito protetor sobre as células HCT-116 (Figura 20), impedindo a fragmentação do DNA induzida pela fração FRA em ambas as concentrações avaliadas.

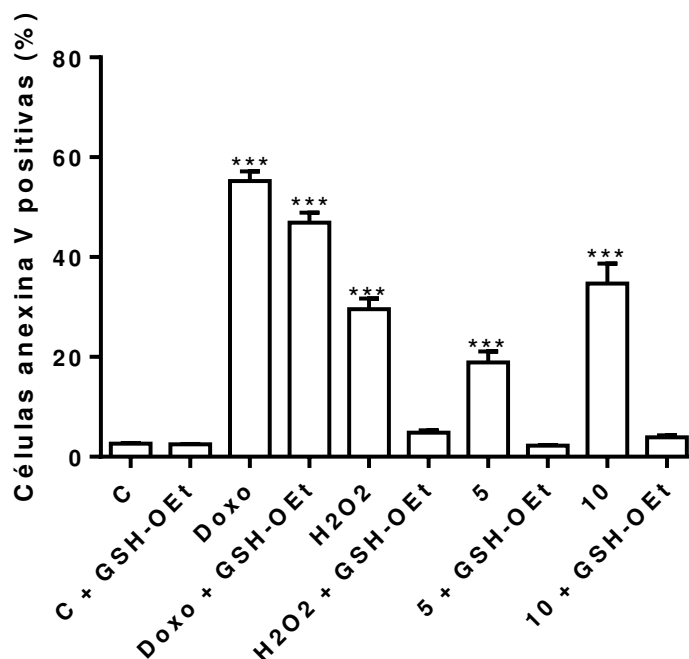
Figura 20. Efeito da fração FRA sobre a fragmetação de DNA internucleossomal (Sub-G0/G1) em células HCT-116 após 24 h de tratamento nas concentrações de 5 e 10 µg/mL na presença e ausência de 15 mM de GSH-OEt. Doxorubicina (Doxo; 2 µM) e H₂O₂ (150 µM) foram utilizados como controle positivo. Os dados correspondem a média ± E.P.M. de 3 experimentos independentes. ***p<0,001 comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por teste de Tukey.



5.12 Ensaio de externalização da fosfatidilserina – Anexina V

Após o tratamento (24 h) de células de câncer de cólon HCT-116, observou-se que a fração FRA nas concentrações de 5 e 10 µg/mL induziu um aumento significativo da população celular positiva para a marcação com anexina V (Figura 21), ou seja, células que após o tratamento com a fração rica em anonacina mantiveram a fosfatidilserina externalizada como sinalizador de que o processo apoptótico foi ativado nestas células após o tratamento. O pré-tratamento com GSH-OEt exerceu um grande efeito protetor sobre as células HCT-116 (Figura 21) impedindo a ativação da apoptose induzida pela fração FRA em ambas as concentrações avaliadas.

Figura 21. Efeito da fração FRA nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ sobre a externalização da fosfatidilserina em células HCT-116 após 24 h de tratamento na presença e ausência de 15 mM de GSH-OEt. Doxorubicina (Doxo; 2 μM) e H_2O_2 (150 μM) foram utilizados como controle positivo. Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos independentes. *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Teste de Tukey.



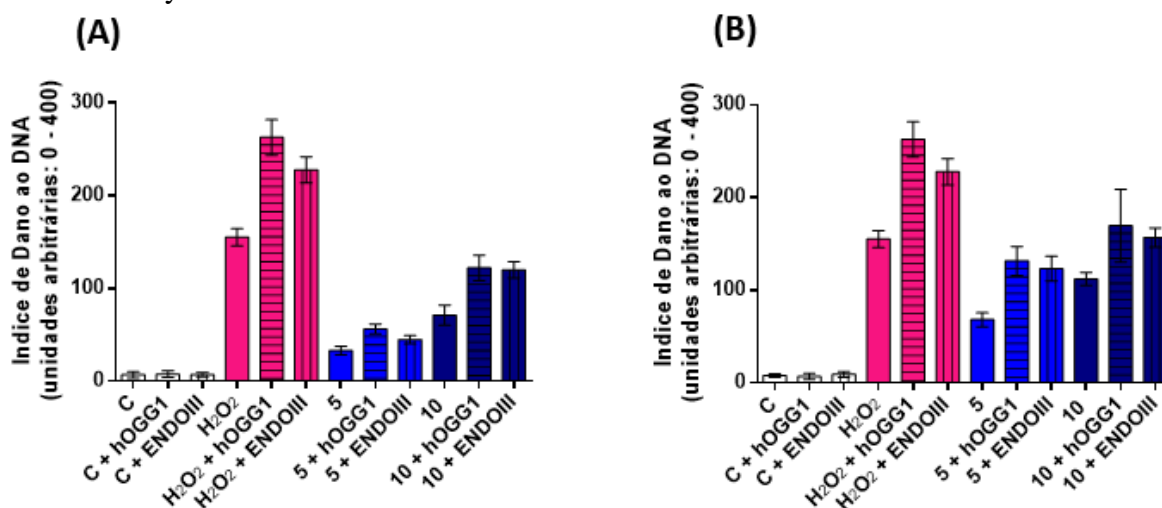
5.13 Ensaio do cometa *in vitro*

Células HCT-116 tratadas com FRA nos tempos de 1, 3 e 6 h não apresentaram lesões de DNA quando analisadas pelo ensaio do cometa na versão alcalina (dados não mostrados). Contudo, conforme a Figura 22A, em culturas expostas a FRA durante 12 h, observou-se um aumento significativo de danos ao DNA (Índice de Dano – ID) em culturas tratadas com 5 $\mu\text{g/mL}$ (ID, $32,89 \pm 4,42$) e 10 $\mu\text{g/mL}$ (ID, $71,00 \pm 10,81$). E com o passar do tempo (24 h), as lesões detectadas no DNA foram maiores, nos quais os valores de ID para culturas celulares tratadas com FRA a 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ foram iguais a $68,22 \pm 7,56$ e $112,22 \pm 6,99$ respectivamente (Figura 22B).

Com o objetivo de caracterizar os tipos de lesões induzidas pela FRA sobre o DNA, foram utilizadas duas enzimas de restrição específicas para a detecção de lesões oxidativas: hOGG1 (8-oxoguanina DNA glicosilase humana) e ENDO III (endonuclease III). Após 12 e

24 h de incubação com FRA na presença de hOGG1 e ENDO III, as células HCT-116 tratadas com 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram valores de ID significativamente superiores aos experimentos conduzidos na ausência das enzimas. Tais resultados, indicam que FRA foi capaz de oxidar bases purínicas como a guanina (detectadas pela hOGG1) e pirimídicas como citosina e timidina (detectadas pela ENDO III), reforçando o perfil pró-oxidante da fração avaliada (Figura 22).

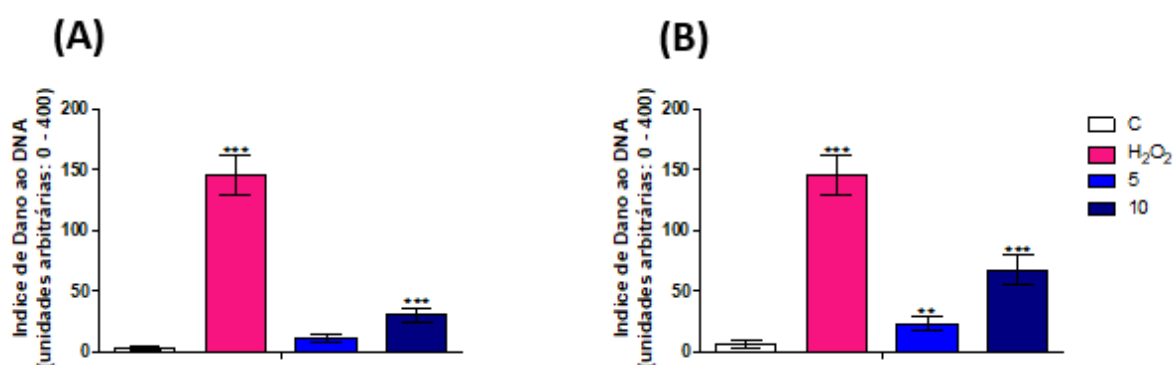
Figura 22. Avaliação dos danos ao DNA (índice de danos), através do ensaio do cometa alcalino ($\text{pH} > 13$) na presença e ausência das enzimas 8-oxoguanina DNA glicosilase humana (hOGG1) e endonuclease III (ENDO III), induzidos pela fração FRA (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) em células de cólon HCT-116 após 12h (painel A) e 24 h painel (B). H_2O_2 (150 μM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Teste de Tukey.



Uma vez constatada que a fração FRA induz lesões oxidativas no genoma de células de câncer colorretal HCT-116 e que radicais livres possuem a capacidade de gerar lesões mais severas no DNA (ex: quebras de fita dupla), o ensaio do cometa foi conduzido em condições de pH neutro a fim de verificar a ocorrência de quebras de fita dupla sobre a molécula de DNA. A figura 23 mostra que após 12 h de exposição, apenas na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, a fração FRA induziu quebras em ambas as fitas da molécula de DNA, de forma significativa em relação ao controle negativo (ID, $2,88 \pm 1,36$), cujo valor de ID igual a $30,44 \pm 2,03$. Já no tempo de 24 h, a fração FRA nas duas concentrações estudadas foi capaz de induzir lesões de dupla fita no DNA de modo significativo em relação ao controle negativo (ID, $5,88 \pm 3,48$),

cujos valores de ID foram iguais a $23,44 \pm 2,08$ e $67,44 \pm 4,10$ para as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

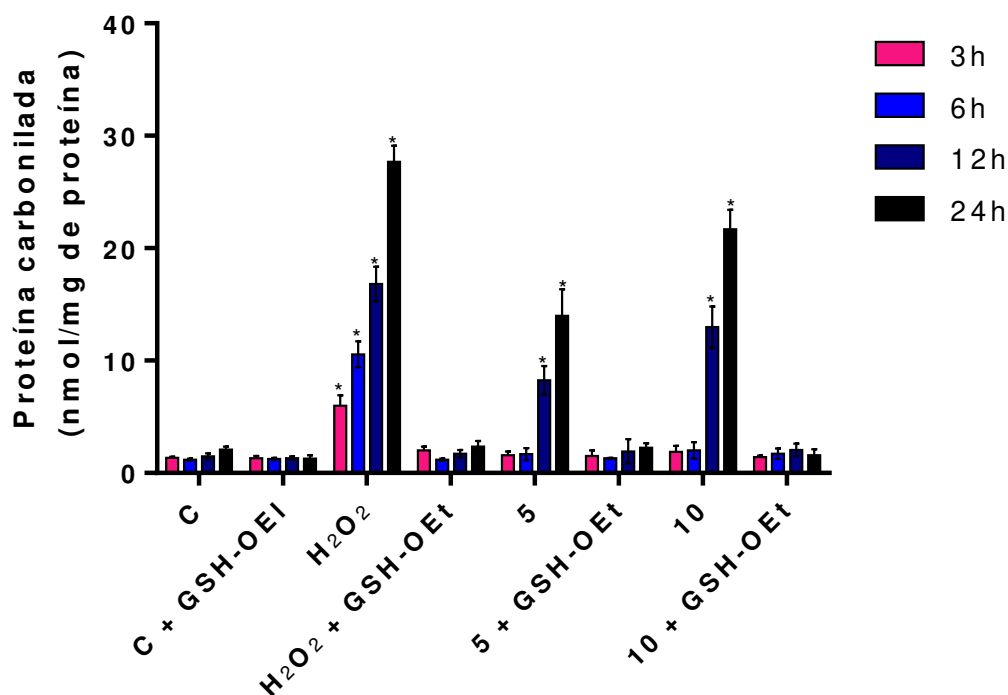
Figura 23. Avaliação dos danos ao DNA (índice de danos) induzidos pela fração FRA (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) em células de cólon HCT-116 após 12 h (painel A) e 24 h (painel B) através do ensaio do cometa neutro. H_2O_2 (150 μM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Teste de Tukey.



5.14 Ensaio de Oxidação Protéica - Proteínas carboniladas

Para melhor caracterizar o perfil pró-oxidativo da fração FRA sobre as células HCT-116, foi analisado o *pool* de proteínas intracelulares carboniladas. A carbonilação de proteínas é um forte marcador bioquímico de oxidação protéica. A figura 24, mostra que o *pool* de proteínas carboniladas das células HCT-116 tratadas com a fração FRA nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ durante os períodos de 3 e 6 h não diferiram do controle negativo. Porém, a oxidação protéica foi observada com o prolongamento do tempo de exposição à fração rica em acetogeninas. Após 12 h de exposição, os teores de proteínas oxidadas foram 5,5 (5 $\mu\text{g/mL}$) e 8,7 (10 $\mu\text{g/mL}$) vezes maiores do que os encontrados nas culturas celulares não tratadas com a fração FRA. Já após 24 h, os níveis de proteínas oxidadas foram 6,7 e 10,4 vezes superiores em relação ao controle negativo. Com a finalidade de ressaltar a contribuição das espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre a oxidação direta das proteínas, as células HCT-116 foram pré-tratadas (2 h) com 15 mM de glutathiona-etil-éter (GSH-OEt) antes da exposição à fração FRA. Conforme se observa na figura 24, a presença de GSH-OEt protege consideravelmente as células de câncer colorretal contra a ação oxidante da fração FRA.

Figura 24. Avaliação da oxidação protéica induzida pela fração FRA (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) em células de cólon HCT-116 na presença e ausência de 15 mM de glutathiona-etil-éter (GSH-OEt). H_2O_2 (150 μM) foi utilizado como controle positivo. Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 3 experimentos independentes. * $p < 0,001$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test.



5.15 Atividades *in vivo* de FRA

Os estudos *in vivo* foram realizados em dois modelos experimentais murinos: Experimento 1 – Tumor Sarcoma 180 inoculado em camundongo *Swiss* (*Mus musculus*) e Experimento 2 – Tumor Walker 256 inoculado em rato *Wistar* (*Rattus norvegicus*). E, para determinar as doses de FRA usadas nos experimentos *in vivo*, foi realizado um estudo de toxicidade aguda através do método *up-and-down* – OECD 425 (Tabela 11).

5.15.1 Toxicidade aguda pelo método *Up-and-down*

Foram utilizados 7 camundongos fêmeas para estimativa da DL_{50} de FRA. O programa estatístico recomendou iniciar com a dose de 175 mg/kg. No entanto, baseado na DL_{50} de outra fração semelhante a FRA (42,5 mg/kg, dados não mostrados), optou-se por iniciar os ensaios com a dose de 70 mg/kg (Tabela 12).

Tabela 11. Relatório contendo os dados dos ensaios do teste de toxicidade aguda pelo método *Up-and-Down*.

Relatório DL ₅₀ de FRA	
Programa Estatístico	AOT425statpgm (Versão: 1.0)
Resultados dos Testes e recomendações	Toxicidade Oral Aguda (Teste Guia OECD 425)
Data	30.02.2017
Dados de preenchimento da amostra	DL ₅₀ FRA.dat
Última modificação	
Teste/Substância	FRA DL ₅₀
Tipo de teste	Teste principal
Dose limite (mg/kg)	2000
DL ₅₀ assumida (mg/kg)	Desconhecida
Valor de sigma assumido (mg/kg)	0,5
Progressão de doses recomendadas	2000, 550, 175, 55, 17.5, 5.5, 1.75
Critério de parada	5 reversões em 6 testes

Tabela 12. Toxicidade aguda de FRA pelo método do *up-and-down* (OECD 425). Onde: X = morreu; O = sobreviveu.

Sequência do teste	Identificação do animal	Dose mg/kg	Desfecho a curto prazo	Desfecho a longo prazo	Mensagens de entrada de dados do programa
1	1	70	O	O	
2	2	120	X		
3	3	70	O	O	
4	4	120	X		
5	5	70	O	O	
6	6	120	X		
7	7	70	O	O	

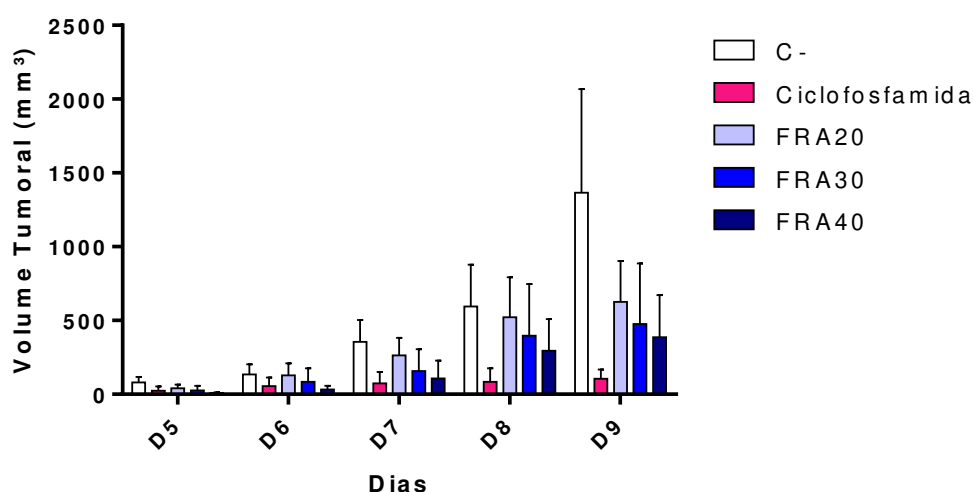
O animal 1 sobreviveu. Para o animal 2, o programa recomendou uma dose de 120 mg/kg. Cerca de 20 min após a gavagem, o animal 2 começou a agonizar e morreu algumas horas depois. Na sequência, houve mais cinco testes com as doses alternando entre 70 (animais 3, 5 e 7) e 120 mg/kg (animais 4 e 6). Os animais 3, 5 e 7 sobreviveram, enquanto os animais 4 e 6 morreram cerca de duas horas depois (Tabela 12).

A partir desses dados, o Software estimou valores de DL_{50} de FRA em camundongo em 95 (70 - 120) mg/kg.

5.15.2 Experimento *in vivo* 1 – camundongos *Swiss* com tumor Sarcoma 180 tratados com FRA

Após a inoculação das células tumorais (D0), os animais foram tratados por oito dias consecutivos (D1-D8). A partir do 5º dia, o tumor tornou-se palpável. A partir de então (D5), o diâmetro tumoral foi mensurado diariamente até o dia do sacrifício dos animais (D9) (Figura 25). No entanto, apesar da visível diferença do volume tumoral entre os grupos tratados, estatisticamente, não houve diferença significativa.

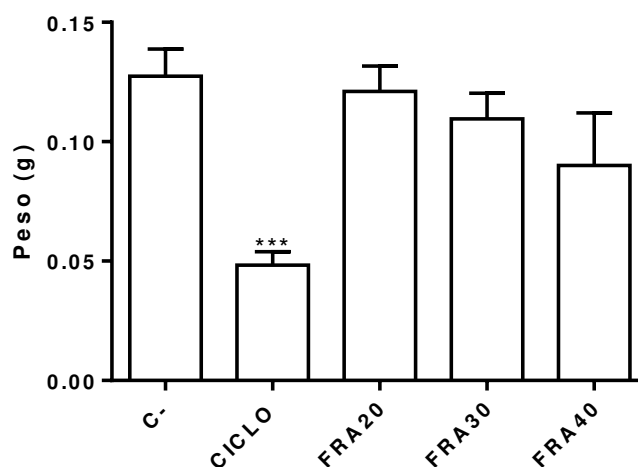
Figura 25. Diâmetro do tumor sarcoma 180 em Camundongos *swiss* entre o quarto e o oitavo dia de tratamento com FRA (20, 30 e 40 mg/kg/dia) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg/dia).



No nono dia do experimento (D9), os animais foram levados para a sala de necrópsia do Biotério do NPDM, na qual foi coletado sangue por via orbital para análises bioquímicas e coleta de células de sangue periférico para avaliar a toxicidade genética (ensaio do cometa e micronúcleos em reticulócitos). Em seguida, os animais foram sacrificados por guilhotina para a retirada do tumor, baço, fígado, rins, estômago e pulmões.

Verificou-se que o grupo tratado com ciclofosfamida (25 mg/kg/dia), apresentou significativa redução do baço. Enquanto, os grupos tratados com FRA (20, 30 e 40 mg/kg/dia), também apresentaram uma leve redução do baço dose-dependente, no entanto, sem diferenças estatísticas significativas (Figura 26).

Figura 26. Peso ponderado do baço de camundongos *swiss* com Sarcoma 180 após oito dias de tratamento com FRA (20, 30 e 40 mg/kg/dia) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg/dia). Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais. *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test.



Quanto ao crescimento tumoral, verificou-se que os animais dos grupos tratados, apresentaram inibição tumoral estatisticamente significativa em comparação com o Controle negativo (1,53 g), exceto o grupo FRA20 (20 mg/kg/dia), que inibiu apenas 10,59% (com média tumoral de 1,37 g). O grupo controle positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg/dia) apresentou inibição de 75,63% (média tumoral: 0,37 g). Enquanto os grupos FRA30 e FRA40 (30 e 40 mg/kg/dia respectivamente) inibiram 41,97% (média de peso tumoral: 0,88 g) e 58,54 % (média de peso tumoral: 0,66 g) (Figura 27, Tabela 13).

Figura 27. Inibição do crescimento tumoral (sarcoma 180) em camundongos *swiss* após oito dias de tratamento com FRA (20, 30 e 40 mg/kg/dia) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida mg/kg/dia). Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao Controle negativo (C-) por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test.

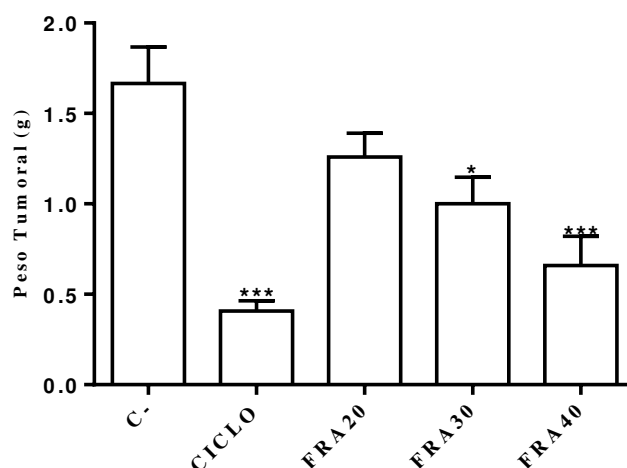


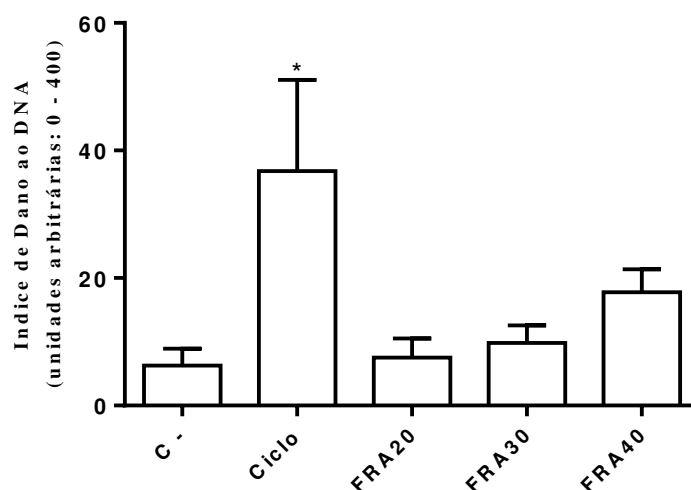
Tabela 13. Peso dos órgãos de camundongos (*Mus musculus*) linhagem *Swiss* tratados com FRA (20, 30 e 40 mg/kg/dia) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg/dia).

Tumor/ Órgão (g)	C -	Ciclofosfamida	FRA20	FRA30	FRA40
Tumor	1,67 $\pm$ 0,45 ^A	0,41 $\pm$ 0,16 ^B	1,26 $\pm$ 0,37 ^A	1,00 $\pm$ 0,36 ^C	0,66 $\pm$ 0,36 ^D
Baço	0,35 $\pm$ 0,08 ^A	0,14 $\pm$ 0,03 ^B	0,35 $\pm$ 0,06 ^A	0,28 $\pm$ 0,05 ^A	0,27 $\pm$ 0,10 ^A
Fígado	3,65 $\pm$ 0,23 ^A	3,81 $\pm$ 0,14 ^A	4,20 $\pm$ 0,43 ^B	4,48 $\pm$ 0,32 ^B	4,68 $\pm$ 0,46 ^B
Rins	1,20 $\pm$ 0,10 ^A	1,37 $\pm$ 0,07 ^B	1,19 $\pm$ 0,15 ^A	1,35 $\pm$ 0,06 ^A	1,30 $\pm$ 0,08 ^A
Estômago	0,58 $\pm$ 0,11 ^A	0,70 $\pm$ 0,08 ^A	0,73 $\pm$ 0,08 ^B	0,73 $\pm$ 0,08 ^B	0,77 $\pm$ 0,10 ^B
Pulmões	0,56 $\pm$ 0,11 ^A	0,62 $\pm$ 0,14 ^A	0,48 $\pm$ 0,12 ^A	0,56 $\pm$ 0,05 ^A	0,55 $\pm$ 0,15 ^A

Letras comparam médias entre os todos os grupos tratados. Letras iguais, indicam valores sem diferenças estatísticas entre os grupos. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$). Grupos FRA20, FRA30 e FRA40 foram tratados respectivamente com FRA 20mg/kg/dia; 30mg/kg/dia e 40mg/kg/dia.

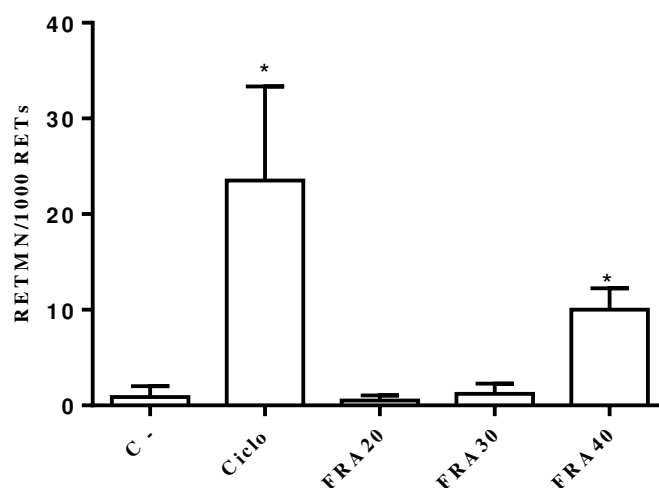
Ao término dos experimentos, a fração FRA não induziu, em nenhuma das doses avaliadas, alterações significativas estatisticamente, na incidência de lesões de DNA quando comparadas com o grupo dos animais não tratados com FRA (Figura 28).

Figura 28. Avaliação dos danos ao DNA (índice de danos) de células do sangue periférico de camundongos *swiss*, através do ensaio do cometa alcalino (pH>13), induzidos pela fração FRA (20, 30 e 40 mg/kg) após oito dias de tratamento. Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais. * $p<0,05$ comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls.



Já a análise de micronúcleos em reticulócitos (Figura 29), revelou que apenas o grupo de animais tratados com a fração FRA na dose de 40 mg/kg apresentou um aumento significativamente maior de reticulócitos micronucleados (RETMN) quando comparado ao grupo controle negativo.

Figura 29. Avaliação de indução de micronúcleos em reticulócitos em camundongos *swiss*, induzidos pela fração FRA (20, 30 e 40 mg/kg) após oito dias de tratamento. Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais. Comparado com o grupo controle negativo por ANOVA seguido por student Newman-Keuls. * $p<0,05$. Obs. RETMN: reticulócitos micronucleados.



Análise histopatológica do tumor Sarcoma 180 e dos órgãos dos animais tratados por oito dias com FRA nas doses de 20, 30 e 40 mg/kg/dia.

Tumor

Na análise microscópica, os tumores não apresentaram modificação sob o aspecto morfológico entre os cinco grupos.

Fígado

O fígado dos animais tratados com ciclofosfamida apresentou características histopatológicas com leve a moderada tumefação celular de hepatócitos e preservação da estrutura hepática, enquanto os animais tratados com FRA e o Controle negativo, apresentaram as alterações anteriores, mas acrescentando a esteatose microvesicular em metade dos animais de cada grupo, além de maior número de áreas circunscritas de edema. As alterações microscópicas visualizadas são de natureza reversível, não sendo identificada área de necrose focal dos hepatócitos. No entanto, a presença de esteatose em todos os grupos sugere maior alteração no fígado dos animais tratados por via oral.

Pulmões

Quanto aos pulmões, os animais tratados com FRA30 mostraram espaços alveolares vazios com pleura íntegra e presença de células mononucleares e hemácias nas paredes alveolares. Nos demais grupos (FRA20, FRA40 e controle negativo) os pulmões apresentavam áreas semelhantes ao grupo FRA30, mas em outras áreas havia intenso acúmulo de células mononucleares nos septos além de denso extravasamento de hemácias com pigmentos de hemossiderina podendo corresponder a pneumonite. O número de animais com estas alterações variava entre 2 e 5 de cada grupo.

Rins

Todos os grupos apresentaram rins com preservação das estruturas glomerulares e tubulares além de córtex e medula com distribuição normal. Havia ausência de inflamação e necrose. A presença de material proteináceo intratubular descrito é consistente com cilindrohialino, alteração que pode estar relacionada com a alimentação. Células epiteliais com citoplasma eosinofílico também foram vistas, contudo sem associação com nenhuma

alteração de toxicidade. Alguns animais apresentaram hemorragias, mas sem significado morfológico de toxicidade.

Estômago e baço

Estômago e baço de ambos os grupos não apresentaram nenhuma alteração histopatológica.

5.15.3 Experimento *in vivo* 2 – Ratos *Wistar* com tumor Walker 256 tratados com FRA

A partir dos resultados do Experimento 1, montou-se um protocolo para testar FRA contra tumor Walker 256 em modelo com rato *Wistar*. Após sete dias de tratamento, os animais foram expostos ao ensaio de rotaroid e não apresentaram alterações motores. Posteriormente, foi coletado sangue por via orbital e os animais foram anestesiados e sacrificados de acordo com o experimento 1.

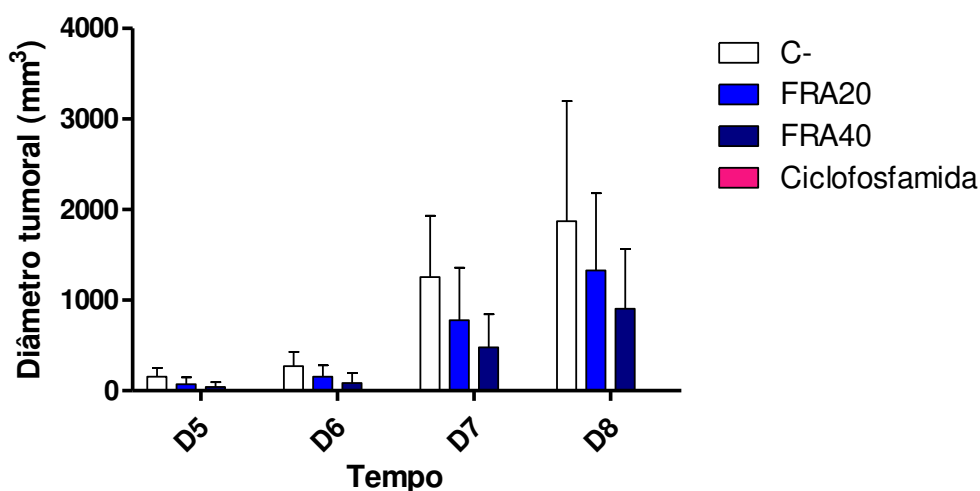
5.15.3.1 Ensaio de coordenação motora de Ratos *Wistar* após tratamento com FRA

Após sete dias de tratamento com os controles negativo (soro fisiológico 0,9 + Tween 80 3%) e positivo (Ciclofosfamida 25 mg/kg/dia – via intraperitoneal) e FRA nas concentrações de 20 e 40 mg/kg/dia, os animais de ambos os grupos não apresentaram qualquer alteração de comportamento através do método do rotarod.

5.15.3.2 Ensaio de inibição do crescimento tumoral

Entre o 5º e o 8º dia do experimento, foi mensurado o diâmetro tumoral (Figura 30). O grupo tratado com ciclofosfamida não desenvolveu tumor. Os demais grupos, apresentaram diferentes médias de volume tumoral, perceptíveis a partir do 5º dia. No entanto, possivelmente devido a imprecisão da análise, os grupos não apresentaram diferenças estatísticas (Figura 30).

Figura 30. Volume tumoral de Walker 256 em rato *wistar* mensurado a partir do 5º dia de tratamento com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia).



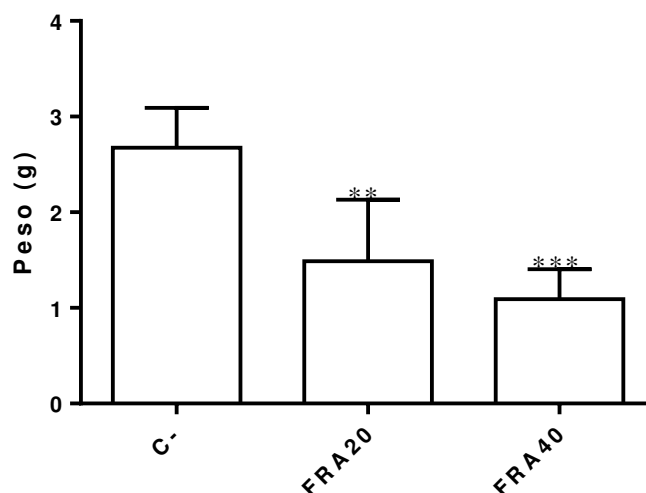
Após sete dias de tratamento (D8), os animais foram pesados e não houve diferença estatísticas entre os quatro grupos experimentais. Quanto ao crescimento tumoral, houve significativa diferença entre os grupos, mostrando que FRA tem ação de inibição tumoral dose-dependente (Tabela 14; Figura 31).

Tabela 14. Peso relativo dos órgãos de ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem *wistar* (g/100g de tecido) após sete dias de tratamento com FRA (20 e 40 mg/kg). C- : controle negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%); C+: controle positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia).

Tumor/ Órgão (g)	C -	Ciclofosfamida	FRA20	FRA40
Tumor	2,67 ± 0,42 ^A	-	1,48 ± 0,64 ^B	1,09 ± 0,31 ^B
Baço	0,4721 ± 0,07 ^A	0,15 ± 0,02 ^B	0,42 ± 0,07 ^A	0,39 ± 0,05 ^A
Fígado	4,84 ± 0,34 ^A	4,30 ± 0,26 ^B	4,75 ± 0,29 ^A	4,80 ± 0,31 ^A
Rins	0,92 ± 0,14 ^A	0,89 ± 0,02 ^A	0,89 ± 0,07 ^A	0,86 ± 0,02 ^A
Estômago	0,78 ± 0,06 ^A	0,97 ± 0,08 ^B	0,77 ± 0,06 ^A	0,88 ± 0,06 ^A
Pulmões	0,68 ± 0,12 ^A	0,62 ± 0,17 ^A	0,78 ± 0,14 ^A	0,74 ± 0,14 ^A

Letras comparam médias entre os grupos. Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes entre os grupos tratados ($p < 0,05$). Grupo controle negativo (C -): tratados apenas com Tween 80 (3%); Grupo Ciclofosfamida (controle positivo) – tratados com ciclofosfamida 25mg/kg/dia; Grupo FRA20 - tratados com FRA 20mg/kg/dia e Grupo FRA40 - tratados com FRA 40mg/kg/dia.

Figura 31. Inibição do crescimento tumoral de Walker 256 em rato *wistar* após sete dias de tratamento com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia). Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais. ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao Controle negativo (C-) por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test.



Assim como no ensaio anterior (Experimento 1), os animais tratados com ciclofosfamida apresentaram redução considerável do baço. Sendo acompanhado por uma discreta redução deste órgão, os animais tratados com FRA (20 e 40 mg/kg/dia), mas sem diferença estatística significativa (Figura 32, Tabela 16).

Os parâmetros bioquímicos não mostraram alterações nos grupos tratados com FRA quando comparados com o controle negativo. As duas únicas alterações, redução da fosfatase alcalina e aumento da albumina, ocorreram no grupo tratado com ciclofosfamida (Tabela 15).

Figura 32. Peso ponderado do baço de rato *wistar* com tumor Walker 256 tratamento por sete dias com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia). Os dados correspondem a média $\pm$ E.P.M. de 8 animais. *** $p < 0,001$ em relação ao Controle negativo (C-) por ANOVA seguido por Tukey's multiple comparisons test.

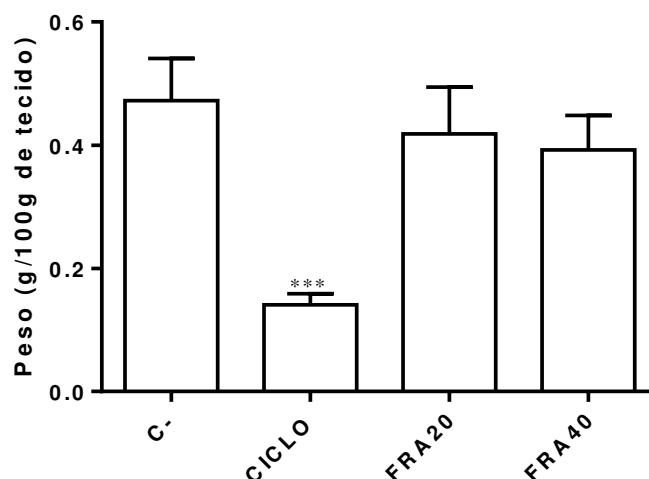


Tabela 15. Parâmetros bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar tratados por sete dias com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia).

Parâmetro (unidade)	C -	Ciclofosfamida	FRA20	FRA40
ALT (U/L)	68,86 $\pm$ 3,08 ^A	61,14 $\pm$ 4,98 ^A	65,88 $\pm$ 7,95 ^A	63,25 $\pm$ 13,05 ^A
AST (U/L)	62,60 $\pm$ 18,45 ^A	91,6 $\pm$ 28,95 ^A	78,67 $\pm$ 14,84 ^A	67,67 $\pm$ 25,47 ^A
Creatinina (mg/dL)	0,47 $\pm$ 0,15 ^A	0,54 $\pm$ 0,18 ^A	0,48 $\pm$ 0,12 ^A	0,48 $\pm$ 0,08 ^A
Ureia (mg/dL)	64,17 $\pm$ 20,93 ^A	89,33 $\pm$ 17,91 ^A	60,5 $\pm$ 17,65 ^A	71,0 $\pm$ 18,14 ^A
Fosfatase Alcalina (U/L)	553,5 $\pm$ 86,82 ^A	311,0 $\pm$ 54,03 ^B	527,4 $\pm$ 51,20 ^A	486,5 $\pm$ 75,02 ^A
Albumina (g/dL)	2,52 $\pm$ 0,17 ^A	3,20 $\pm$ 0,21 ^B	2,48 $\pm$ 0,34 ^A	2,64 $\pm$ 0,16 ^A

Letras comparam médias entre os grupos. Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ($P < 0,05$). Grupo controle negativo (C -): tratados apenas com tween80 (3%); Grupo Ciclofosfamida (controle positivo) – tratados com ciclofosfamida 25mg/kg/dia; Grupo FRA20: tratados com FRA 20mg/kg/dia; Grupo FRA40: tratados com FRA 40mg/kg/dia. ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase).

As análises hematológicas demonstram alterações (redução) apenas de granulócitos e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) nos animais tratados com a maior concentração (FRA40). Os demais marcadores encontravam-se sem alterações (Tabela 16).

Tabela 16. Parâmetros hematológicos de ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar tratados por sete dias com FRA (20 e 40 mg/kg) e controles negativo (solução fisiológica 0,9% + Tween 80 3%) e positivo (ciclofosfamida 25mg/kg/dia).

Parâmetro (unidade)	C -	Ciclo	FRA20	FRA40
Leucócitos Totais ($10^3/\mu\text{L}$)	16,14 $\pm$ 4,68 ^A	0,83 $\pm$ 0,26 ^B	16,95 $\pm$ 3,36 ^A	14,63 $\pm$ 1,73 ^A
Linfócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	7,06 $\pm$ 1,80 ^A	0,60 $\pm$ 0,09 ^B	8,33 $\pm$ 1,19 ^A	7,69 $\pm$ 0,95 ^A
Monócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	0,56 $\pm$ 0,10 ^A	0,017 $\pm$ 0,008 ^B	0,53 $\pm$ 0,02 ^A	0,48 $\pm$ 0,05 ^A
Granulócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	8,51 $\pm$ 1,78 ^A	0,19 $\pm$ 0,04 ^B	8,04 $\pm$ 1,08 ^A	6,44 $\pm$ 0,95 ^C
Hematócrito (%)	42,62 $\pm$ 1,75 ^A	44,49 $\pm$ 9,45 ^A	46,75 $\pm$ 3,23 ^A	48,46 $\pm$ 2,62 ^A
VCM (fl)	65,78 $\pm$ 1,79 ^A	67,29 $\pm$ 1,69 ^A	66,71 $\pm$ 0,92 ^A	67,15 $\pm$ 1,07 ^A
CHCM (%)	29,18 $\pm$ 0,52 ^A	28,5 $\pm$ 0,57 ^A	28,56 $\pm$ 0,22 ^A	28,08 $\pm$ 0,46 ^B
Hemácias (%)	6,49 $\pm$ 0,4 ^A	6,60 $\pm$ 1,25 ^A	7,01 $\pm$ 0,42 ^A	7,22 $\pm$ 0,4 ^A
Plaquetas ($10^9/\text{l}$)	1,09 $\pm$ 0,24 ^A	0,40 $\pm$ 0,22 ^B	1,07 $\pm$ 0,28 ^A	1,34 $\pm$ 0,19 ^A
Hemoglobina (%)	12,46 $\pm$ 0,66 ^A	11,65 $\pm$ 0,98 ^A	13,38 $\pm$ 0,95 ^A	13,88 $\pm$ 0,98 ^A
Proteínas (fl)	6,16 $\pm$ 0,33 ^A	5,60 $\pm$ 0,26 ^A	6,40 $\pm$ 0,44 ^A	6,67 $\pm$ 0,45 ^A

Letras comparam médias entre os grupos. Diferentes letras indicam valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Grupo controle negativo (C -): tratados apenas com tween80 (3%); Grupo Ciclofosfamida (controle positivo): tratados com ciclofosfamida 25mg/kg/dia; Grupo FRA20: tratados com FRA 20mg/kg/dia; e Grupo FRA40: tratados com FRA 40mg/kg/dia. VCM: Volume Corpuscular Médio; CHCM: Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média.

Análises Histológicas

Tumor:

Todos os grupos apresentaram-se compostos por neoplasia maligna de células poligonais exibindo pleomorfismo celular e nuclear, aumento da relação núcleo/citoplasma e hipercromatismo. Nos grupos tratados com FRA viu-se nítida redução do número de figuras de mitoses, sendo rara a sua visualização, como também, certa rarefação celular com dissociação das ilhas tumorais. Em todos os grupos a neoplasia invadia músculo, vasos, nervos e tecido adiposo além de serem observadas extensas áreas de necrose coagulativa.

Pulmão:

Não foram encontradas diferenças importantes entre os grupos tratados com FRA e ciclofosfamida. Presença de vasos ectásicos com visualização de células inflamatórias no interior dos vasos, como também perivascularres foi comum aos três grupos tratados. Por vezes os espaços alveolares e suas paredes estavam parcialmente preenchidos por hemácias, aspectos observados na maioria dos casos dos grupos tratados com FRA40. Nestes mesmos grupos, havia, também, pigmentos de hemossiderina. Estes achados são sugestivos de pneumonite ou induzida pela substância teste ou veículo. Ressalta-se que, no grupo controle negativo, também foram identificados vasos ectásicos com presença de células inflamatórias além de áreas de hemorragia preenchendo parcialmente os espaços alveolares, no entanto sem pigmentos de hemossiderina.

Estômago:

Não foram observadas alterações morfológicas sugestivas de toxicidade. Todos os grupos comportaram-se de forma homogênea apresentando na região da cárdia epitélio pavimentoso estratificado ortoceratinizado com córion fibroso, exibindo ocasionais vasos sanguíneos de diferentes calibres por vezes ectásicos. A camada muscular encontrava-se íntegra. E na região do corpo/fúndica, preservação de células parietais e principais e das camadas mucosa, submucosa e muscular da mucosa. Nas camadas mucosa e submucosa, foi possível observar ocasionais vasos sanguíneos, por vezes, ectásicos.

Baço:

Não foram observadas alterações morfológicas entre os grupos controle negativo e aqueles tratados com FRA, sendo representados por polpa branca constituída por bainha de linfócitos (T) periarteriais situadas excêntrica em relação às artérias centrais com centro germinativo, este último, visto em sua maioria. Em continuidade, havia polpa vermelha composta por eritrócitos, seios esplênicos e trabéculas esplênicas. Somente o grupo tratado com ciclofosfamida mostrou atrofia da polpa branca e vermelha. Na maioria das amostras dos quatro grupos foram observados congestão vascular com presença de células inflamatórias no interior dos vasos além de pigmentos de hemossiderina e megacariócitos ora dispersos ora aglomerados.

Fígado:

Todos os grupos tratados apresentaram alterações morfológicas nos hepatócitos representadas por tumefação celular intensa, por vezes, com áreas de degeneração hidrópica. No entanto, células inflamatórias ora dispersas ora em ninhos ora perivasculares, além de hemorragia sinusoidal, somente nos grupos tratados com FRA. Estes achados são indicativos de lesões celulares reversíveis com possível regressão após ajuste de dose, pois não foi encontrada fibrose em nenhuma das amostras analisadas. Faz-se uma observação adicional em relação ao grupo controle, o qual apresentou muitas alterações de toxicidade não esperada.

Rim:

Todos os grupos apresentaram córtex e medula renal com distribuição normal das estruturas glomerulares e tubulares, no entanto com presença de tumefação do epitélio tubular com áreas de degeneração vacuolar além de vasos congestos e cilindrohialinos. Somente o grupo tratado com ciclofosfamida não apresentou células inflamatórias intersticiais. Estas alterações morfológicas configuram-se como reversíveis pois não havia fibrose intersticial. Porém, deve-se dar importância à presença de células inflamatórias em localização intersticial.

6. DISCUSSÃO

A importância crescente das neoplasias malignas no quadro sanitário do Brasil tem ampliado a discussão sobre o controle desse grupo de doenças, incluindo-as como uma das prioridades do setor de saúde. Apesar de ainda existirem áreas obscuras na compreensão da etiologia do câncer, já se tem, hoje, conhecimentos suficientes para embasar que a quimioterapia utilizada no tratamento do câncer é primordialmente oriunda de recursos naturais (PINKEL, 2000; DREWS, 2000). Muitas drogas correntemente em uso na terapia do câncer foram descobertas de forma racional, baseada no desenho da estrutura, e muitas outras têm sido descobertas por processos empíricos. O sucesso terapêutico dessas substâncias estimula a busca de novos agentes quimioterápicos derivados de produtos naturais. Em países em desenvolvimento, como o Brasil, o uso terapêutico de plantas medicinais e seus manufaturados ajudam a reduzir a importação de drogas, e ainda incrementa o desenvolvimento econômico (FERREIRA, 1998).

Vários estudos sobre o potencial citotóxico *in vitro* de *Annona muricata* (extratos, frações e metabólitos isolados) sobre células tumorais de diversas origens histológicas têm sido exaustivamente documentados (ALALI et al., 1999; ASSARE et al., 2015; CHEN et al., 2013; COOTHANKANDASWAMY et al., 2010; INDRAWATI et al., 2017; KO et al., 2011; McLAUGHLIN et al., 2008; SABAPATI; PALEI; MOLAKPOGU, 2019; YIALLOURIS et al., 2018; YUAN et al., 2003).

As drogas anticâncer naturais têm um baixo custo e vários mecanismos de ação possíveis (BAHMANI et al., 2017). A fisiopatologia do câncer por sua vez, tem ganhado novos enfoques, como a possível participação da enzima acetilcolinesterase (AChE) na modulação de alguns tipos de cânceres (PÉREZ-AGUILAR et al., 2015). Estudos recentes, mostram que, a enzima AChE, classicamente conhecida como uma enzima neurológica do Sistema Colinérgico (Parassimpático) apresenta diversas funções não neurológicas, tais como proliferação, diferenciação, apoptose e interação célula-célula (CASTRO et al., 2008; SHEN et al., 2013; PÉREZ-AGUILAR et al., 2015). E apartir dos anos 2000, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas na busca de uma melhor compreensão da correlação AChE versus câncer (SILMAN; SUSSMAN, 2005; SOREQ; SEIDMAN, 2001; XI et al., 2015; WESSLER; KIRKPATRICK, 2001; WILLIAMS, 2003).

Por essa óptica, um extrato, fração ou molécula isolada, para ser um bom candidato a fármaco anticâncer, é preferível que não apresente atividade de inibição da enzima AChE, uma vez que esta parece estar associada a uma redução da progressão tumoral (PÉREZ-AGUILAR et al., 2015). Nesse estudo, a fração FRA não apresentou atividade significativa de inibição da AChE *in vitro* (Tabela 08), o que pode ser considerado fator positivo para continuidade dos estudos citotóxicos e anticâncer de FRA.

No tocante a composição química, um extrato ou fração, mesmo que apresente algum grupo químico majoritário, é sabido que provavelmente existam outras moléculas, mesmo que em menor quantidade naquele composto (YANG et al., 2015), e que este misto de diversas moléculas podem apresentar diversas atividades biológicas, inclusive ação antioxidante, como a muitas espécies vegetais. Nesse aspecto, os ensaios para verificar o potencial antioxidante de FRA, por meio de três diferentes métodos, mostraram-se negativos nas concentrações testadas. As abordagens antitumorais clássicas (não cirúrgicas) como a quimioterapia, a radioterapia e a terapia fotodinâmica, matam as células tumorais ao induzir grave estresse oxidativo, e, o bloqueio da defesa antioxidante nos tumores diminui sua capacidade de equilibrar o estresse oxidativo e resulta na morte celular (SZNARKOWSKA et al., 2017). E assim, sabendo que o estresse oxidativo pode estar correlacionado com a atividade citotóxica de FRA em células tumorais, a ausência de atividade antioxidante da fração FRA mostra-se como um relevante fator, uma vez que uma possível ação antioxidante poderia reduzir a citotoxicidade da mesma.

Os resultados do presente estudo corroboram com os dados de citotoxicidade relatados na literatura (BARRETO, 2015), uma vez que a fração rica em acetogenina (FRA) de *A. muricata*, na concentração de 25 µg/mL, não apresentou seletividade de ação sobre as três linhagens de células tumorais humanas de origens histológicas diferentes (leucemia, glioblastoma e cólon) utilizadas no processo de triagem de efeitos citotóxicos após 72 h de tratamento.

Baseado na ausência de seletividade, a linhagem de cólon HCT-116 foi elegida para se dar continuidade aos estudos preliminares sobre os prováveis mecanismos de ação inerentes a fração FRA. Ademais, durante as etapas iniciais do processo de desenvolvimento de novos fármacos anticâncer ou congêneres, é importante se avaliar os possíveis efeitos colaterais (citotóxicos) *in vitro* sobre células não tumorais. Logo, o equilíbrio entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos de um candidato a nova droga é fundamental para se estabelecer

a sua aplicabilidade futura. Nesse contexto, as propriedades citotóxicas da fração FRA, também foi avaliada sobre uma linhagem murina de fibroblastos não tumorais (L929).

A tabela 9 e a figura 16 mostram que, embora, a fração FRA exerça efeitos citotóxicos sobre a linhagem L929, a variável tempo de exposição é importante. Culturas de fibroblastos murinos tratadas com a fração FRA por 24 e 48 h apresentaram valores de CI_{50} semelhantes (sem diferenças estatísticas). Já no mesmo período de incubação, células de câncer de cólon foram mais sensíveis aos efeitos citotóxicos da fração FRA. A exemplo, culturas L929 (CI_{50} 9,27 $\mu\text{g/mL}$) foram quase 5 vezes menos sensíveis a fração FRA do que culturas HCT-116 (CI_{50} 1,91 $\mu\text{g/mL}$). Contudo, após um tempo maior de exposição (72 h), a fração FRA foi igualmente citotóxica, em termos de valores de CI_{50} , para ambas as linhagens. Essas diferenças, também foram observadas nos ensaios de atividade clonogênica reportados na tabela 10. A fração FRA inibiu a capacidade de ambas linhagens celulares de formação de colônias (efeitos antiproliferativos). Corroborando com os dados do ensaio colorimétrico do MTT (Tabela 9 e Figura 16), a linhagem de câncer colorretal HCT-116 foi mais sensível aos efeitos citotóxicos da fração FRA a partir de uma concentração igual a 5 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para a linhagem L929, o número de colônias foi reduzido quando as culturas foram expostas a uma concentração duas vezes superior (10 $\mu\text{g/mL}$). Vale ressaltar que no ensaio de atividade clonogênica, as células foram tratadas com a fração FRA por 12 h e, em seguida, as culturas foram incubadas por um período de 10 dias na ausência da fração FRA. Logo, a toxicidade celular induzida pela fração testada (Tabela 9 e Figura 16) atrapalha os mecanismos proliferativos (clonogênicos) de ambas as linhagens utilizadas (Tabela 10), sugerindo um efeito prolongado e persistente da fração rica em acetogenina de *A. muricata* aqui avaliada. A falta de seletividade da fração FRA, para células tumorais e não tumorais, e a ausência de efeitos hemolíticos, sugere que seus efeitos citotóxicos sejam oriundos de mecanismo(s) de ação comum sobre rotas metabólicas ou macromoléculas intracelulares. Contudo, os dados das tabelas 9 e 10 podem refletir a existência de diferenças bioquímicas ou fisiológicas entre as duas linhagens celulares no que tange o modo como cada linhagem lida durante a exposição aos constituintes da fração FRA.

A principal acetogenina identificada e isolada da fração FRA foi a anonacina (Figura 15). Alguns autores têm reportado que a anonacina, de fato, exerce um efeito citotóxico maior sobre células tumorais em relação as não tumorais (BARRETO et al., 2015; YIALLOURIS et al., 2018). Basicamente, tem sido reportado que a anonacina exerce seu efeito citotóxico ao

inibir o complexo I da respiração mitocondrial (BARRETO et al., 2015; ESCOBAR-KHONDIKER et al., 2007; McLAUGHLIN, 2008; ZAFRA-POLO et al., 1996). A disfunção mitocondrial é uma consequência da inibição da cadeia respiratória que pode levar ao estresse oxidativo mediante a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). As células possuem um extenso sistema de defesas antioxidantes (ex: catalase, glutathione peroxidases (GPx), superóxidos dismutases (SOD), tioredoxinas etc) que são capazes de detoxificar as EROs. Dentro de um contexto fisiológico, as defesas antioxidantes intracelulares estão intimamente relacionadas ao estado redox e energético das mitocôndrias. Se estas organelas estão estrutural e funcionalmente preservadas haverá um equilíbrio dinâmico entre a produção e detoxificação de EROs. Por outro lado, em caso de disfunções mitocondriais as defesas antioxidantes são reduzidas e os mecanismos de produção de EROs irão imperar. Quando isso acontece, um ciclo vicioso começa e o excesso de EROs passa a danificar cada vez mais as mitocôndrias, levando a mais geração de radicais livres e perda adicional de capacidade antioxidante. Durante a disfunção da respiração mitocondrial, a disponibilidade de ATP também diminui prejudicando o funcionamento dos mecanismos de correção da respiração mitocondrial após a geração de EROs.

Os resultados ilustrados na figura 18 apontam que a fração FRA (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) provoca uma redução do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) após 12 e 24 h de exposição. A redução do metabolismo energético e o desacoplamento da cadeia transportadora de elétrons, levando a redução da produção de ATP, tem sido corroborada com a redução do $\Delta\Psi\text{m}$ (LINDAHL; OBERG, 1961; PASTORINO et al., 1995; ZAMZAMI et al., 1995). A manutenção do $\Delta\Psi\text{m}$ é necessário para a sobrevivência celular e a ruptura ou o colapso do $\Delta\Psi\text{m}$ é um evento observado em células pré-apoptóticas após a exposição a “venenos” mitocondriais, a exemplo da rotenona (DECKWERTH; JOHNSON, 1993; KROEMER et al., 1995; PETIT et al., 1995). Portanto, estes estudos indicam que os inibidores do metabolismo energético mitocondrial alteram a função mitocondrial (redução do $\Delta\Psi\text{m}$) e essa alteração é um evento importante na ativação da morte celular por apoptose.

Com o intuito de se avaliar o estresse oxidativo induzido após a exposição a FRA, analisamos o perfil de proteínas carboniladas como um marcador para a detecção de oxidação protéica. O gráfico da figura 24 mostra que somente foi possível a detecção de proteínas oxidadas em culturas de células de câncer colorretal após 12 e 24 h de incubação com a fração FRA (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$). A quantidade de proteínas oxidadas é maior quanto maior for a

concentração e o tempo de exposição celular a fração FRA, revelando ser um evento contínuo dependente de tempo e concentração. Interessantemente, os níveis de proteínas carboniladas em células HCT-116 pré-tratadas com glutathiona expostas a fração FRA (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) são próximos aos detectados nos grupos dos controles negativos (Figura 24). Esse fato vem a reforçar a grande importância que os radicais livres exercem sobre os processos de citotoxicidade induzido pela fração FRA e corroboram com os dados sobre disfunção mitocondrial (Figura 18).

Em comparação às células não tumorais, é sabido que o ambiente redox, de uma forma geral, é desregulado no ambiente tumoral. O metabolismo mais intenso de células cancerosas contribui para uma maior produção de radicais livres, a exemplo de EROs (POWIS; BAKER, 1996; PERVAIZ; CLEMENT, 2004). Esse excesso de produção de EROs não é devidamente regulado pelo fato de algumas enzimas antioxidantes (SOD, GPx, glutathiona redutase e catalase) e vitaminas antioxidantes (C e E) estarem presentes em concentrações reduzidas (GUVEN et al., 2000; SENTHIL et al., 2004; BEEVI et al., 2007). Isso talvez explique as diferenças de sensibilidade (Tabela 9 e Figura 16) à exposição da fração FRA entre células de câncer colorretal (HCT-116) e fibroblastos murinos não tumorais (L929).

Em paralelo, para avaliar a participação direta da mitocôndria sobre o processo de citotoxicidade da fração FRA, foi avaliado o padrão de fragmentação internucleossomal do DNA de células HCT-116 tratadas com a fração rica em acetogeninas. Pois uma característica marcante da morte celular por apoptose é a fragmentação internucleossômica do DNA que produz fragmentos de DNA de tamanhos variáveis, mas sempre múltiplos de 200 pares de bases nitrogenadas (SARASTE; PULKKI, 2000). É possível observar na figura 20 que nas duas concentrações avaliadas da fração FRA houve a fragmentação do DNA nuclear (sub-G₀/G₁, hipodiplóide) após o término do tratamento. Contudo, o pré-tratamento com glutathiona exógena conferiu um efeito protetor sobre o genoma celular, uma vez que, praticamente, as populações (%) celulares com DNA sub-G₀/G₁ foram semelhantes as frações populacionais encontradas nos controles negativos (Figura 20). Esses achados ressaltam que o aumento na produção de radicais livres vem atuando como agente importante sobre o processo de morte celular.

A correlação entre a redução do $\Delta\Psi_m$ e a fragmentação internucleossomal do DNA indica que a disfunção mitocondrial é um processo mandatório e irreversível durante o

processo de morte celular via apoptose. A fosfatidilserina é um fosfolípido de membrana interna que sofre externalização para a superfície da membrana plasmática durante o processo apoptótico. A anexina V é uma proteína cálcio-dependente que possui uma alta afinidade pela fosfatidilserina e, portanto, pode se ligar a fosfatidilserina externalizada na célula em apoptose (KRYSKO et al., 2008). Os dados representados na figura 21 mostram que houve um aumento de células em processo de morte por apoptose baseada na detecção de populações (%) celulares marcadas com anexina V. Da mesma forma como observado nos experimentos na presença de glutathione (Figuras 17, 20 e 24), a fração FRA (5 e 10 µg/mL) não foi capaz de induzir morte celular (Figura 21). Como esperado, diferentemente do H₂O₂ (controle positivo), cujo seus efeitos deletérios celulares estão relacionados a oxidação de macromoléculas, a glutathione não foi capaz de proteger as células tratadas com doxorubicina (Figura 17), uma vez que, mesmo que a doxorubicina produza radicais livres ela possui mais de um mecanismo de ação citotóxico. A grande proteção conferida pelo pré-tratamento com glutathione às células de câncer colorretal, de fato, põe luz sobre a participação significativa de radicais livres como principal agente mediador de morte celular.

Alguns autores têm reportado que acetogeninas induzem morte celular via apoptose mediante a produção de radicais livres (FATO et al., 2009; PEDRO et al., 2013a; PEDRO et al., 2013b; HAN et al., 2015). Uma das diversas consequências derivadas do excesso de radicais livres no ambiente intracelular é a oxidação de macromoléculas como proteínas e DNA, por exemplo. As lesões oxidativas do DNA são consideradas como a mais severa alteração de uma macromolécula intracelular. O ensaio do cometa (alcalino e neutro) foi utilizado no presente estudo para averiguar se o tratamento com a fração FRA induziria lesões sobre o material genético.

O ensaio do cometa não tem por finalidade detectar mutações a nível gênico, mas lesões genômicas. Tais lesões, a depender de sua natureza, podem ser reparadas mediante expressão de vários genes envolvidos nos mais variados mecanismos de reparo do DNA (SLUPPHAUG et al., 2003). Verificou-se que a fração FRA, na versão alcalina do ensaio, induziu danos ao DNA de células HCT-116 (Figura 22) nas duas concentrações estudadas (5 e 10 µg/mL) após 12 e 24 h. E que de forma mais específica, na versão neutra do ensaio, também foi capaz de induzir quebras de fita dupla de DNA em células HCT-116 (Figura 23). Ou seja, parte das lesões de DNA detectadas na versão alcalina do ensaio do cometa (Figura 22) eram formadas por lesões de dupla fita (Figura 23).

As lesões de dupla fita da molécula de DNA são lesões difíceis de serem reparadas, podendo ativar mecanismos de morte celular ou induzir mutações deletérias. Além disso, as lesões de fitas simples podem ser convertidas em quebras duplas durante o progresso da forquilha de replicação (KHANNA; JACKSON, 2001; KUZMINOV, 2001). Embora as células mantenham a capacidade de sobreviver a baixos níveis de danos ao DNA, as lesões de dupla fita não corrigidas são, frequentemente letais (RICH; ALLEN; WYLLIE, 2000). A resposta ao estresse genotóxico gira em torno de uma complexa rede de interações, o que inclui a alteração dos níveis de transcritos primários de vários genes levando a ativação ou repressão de vias envolvidas nos processos de reparo das lesões de DNA, na sobrevivência ou morte celular (ELLINGER-ZIEGELBAUER et al., 2009).

As grandes quantidades de radicais livres não neutralizadas pelas defesas antioxidantes intracelulares podem oxidar as bases nitrogenadas do DNA e comprometer a estabilidade genômica. Por exemplo, o excesso de radica hidroxila ($\text{OH}^{\bullet}$) pode reagir (oxidar) com a base purínica guanina no DNA e convertê-la em 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), que constitui um dos principais marcadores de oxidação de bases do DNA induzidas por radicais livres. Um dos principais mecanismos de correção das lesões oxidativas de DNA, é a enzima 8-oxo-guaninaglicosilase humana (hOGG1), que remove a base oxidada 8-OHdG do DNA (MISTRY; HERBERT, 2003). Bases pirimídicas oxidadas, incluindo a timina, uracil e citosina glicol, que são produtos de consecutivas reações com o radical $\text{OH}^{\bullet}$, também podem ser detectadas pelo ensaio do cometa alcalino mediante a ação da enzima endonuclease III (Endo III).

Logo, para avaliar a presença de 8-OHdG e pirimidinas oxidadas, foi realizado o ensaio do cometa alcalino na presença das enzimas h-OGG1 e Endo III. Os resultados mostraram que a migração do DNA após a incubação com as enzimas foi significativamente maior quando comparadas aos experimentos realizados na ausência de h-OGG1 (Figura 22) a partir de 12 h de exposição, devido a conversão dessas bases oxidadas em quebras de fita simples, indicando a presença de bases nitrogenadas oxidadas no DNA de células HCT-116 tratadas com a fração FRA. A análise do conjunto de dados gerados pelas variações de protocolo do ensaio do cometa associados aos resultados discutidos acima, em células de câncer colorretal HCT-116, sugere que a fração rica em acetogeninas FRA não induz lesões diretas (ex; formação de adutos de DNA, alquilação, intercalação etc.) sobre o material

genético. As lesões do DNA detectadas nas células HCT-116 são oriundas da produção exacerbada de radicais livres, provavelmente, geradas a nível mitocondrial.

Mediante os efeitos citotóxicos exercidos pela fração FRA sobre células HCT-116 supracitados (redução do $\Delta\Psi_m$, produção de EROs, oxidação protéica e danos ao DNA), verificou se tais eventos, de certa forma, poderiam implicar em um distúrbio sobre o progresso do ciclo celular, tendo em vista que existem pontos de checagem que controlam a progressão do ciclo celular. Os pontos de checagem são sistemas enzimáticos distribuídos ao longo das fases do ciclo celular (G_1 , S e G_2) que podem influenciar a sobrevivência ou morte celular. A análise do ciclo celular mostrou que a fração FRA (5 e 10 $\mu\text{g/mL}$) induziu um acúmulo de células HCT-116 na fase G_0/G_1 do ciclo celular e uma ligeira redução de células em fase ativa de síntese de DNA (Figura 19).

O controle preciso do ciclo celular requer regulação por muito fatores intrínsecos e extrínsecos. Alguns estudos têm apontado que o estado metabólico celular (concentração de glicose, hipóxia, privação de nutrientes etc.) pode influenciar o controle sobre a progressão do ciclo celular (HOLLEY; KIERNAN, 1974; DIGREGORIO; UBERSAX; O'FARRELL, 2001). A energia celular é em grande parte derivada do processo de fosforilação oxidativa na mitocôndria. Porém, sabe-se relativamente pouco sobre como a demanda energética durante a proliferação celular é utilizada ou coordenada com o metabolismo mitocondrial. Em células de mamíferos, foi demonstrado que a disponibilidade de pequenos nutrientes, como glicose e aminoácidos, bem como variações dos níveis de oxigênio afeta a progressão do ciclo celular (HOLLEY; KIERNAN, 1974; GRAEBER et al., 1994). A limitação de glicose e depleção de ATP também pode levar ao acúmulo de células em G_1 (JONES et al., 2005). O conceito de um ponto de checagem metabólico não implica apenas a integração de estímulos de crescimento externos e disponibilidade de nutrientes, mas também a potencial sincronização do metabolismo mitocondrial intrínseco com a progressão do ciclo celular. No entanto, relativamente pouco se sabe sobre qualquer ligação entre bioenergética mitocondrial e progressão do ciclo celular.

Por outro lado, nem sempre é possível extrapolar os resultados encontrados *in vitro* para modelos *in vivo*, uma vez que o animal tem metabolismo complexo, que, não estão presentes nos ensaios *in vitro*. Portanto, torna-se necessária a realização de estudos em modelos animais, que representam um poderoso sistema experimental para uma melhor compreensão da patologia do câncer em humanos. Os modelos animais mais comuns são os

pequenos roedores (ratos, camundongos e hamsters). Os modelos de desenvolvimento de câncer em camundongos, são muito bem aceitos para esclarecer os conceitos de tumorigênese, uma vez que esses animais possuem sistemas, órgãos e genes muito semelhantes aos humanos (KAMB, 2005). Na oncologia experimental, cada tipo de tumor tem sua especificidade por espécie e/ou linhagem animal.

Nesse aspecto, após realizar estudos *in vitro* com a fração FRA frente a células tumorais da linhagem HCT-116 e células não tumorais da linhagem L929, determinar a citotoxicidade e verificar possíveis mecanismos de ação, a fração FRA foi testada *in vivo* em dois modelos murinos: tumor Sarcoma 180 implantado em camundongos (*Mus musculus*), linhagem *swiss* e tumor Walker 256 implantado em rato (*Rattus norvegicus*), linhagem *wistar*. O Sarcoma 180 é um tumor indiferenciado, originário de camundongo e foi descrito pela primeira vez em 1914 (STEWART et al., 1959). É uma das linhagens celulares mais frequentemente usadas na pesquisa de atividade antitumoral *in vivo* (KAMB, 2005; MAGALHÃES et al., 2006). O carcinosarcoma de Walker 256 é uma linhagem tumoral largamente usada em modelos com rato *wistar*.

Estudos com extratos oriundos de *A. muricata* já foram desenvolvido no LOE. Rios (2013) realizou estudos *in vitro* e *in vivo* do extrato acetônico das sementes de *A. muricata*. O ensaio *in vivo* foi realizado nas doses de 7,5; 15 e 30mg/kg/dia por via oral em camundongos transplantados com Sarcoma 180. O grupo tratado com 30 mg/kg/dia deste extrato, teve redução de 48,41% do crescimento tumoral. O outro estudo, foi desenvolvido por Oliveira (2012), no qual testou o extrato acetônico das folhas de *A. muricata* *in vitro* e *in vivo*. Em seus ensaios *in vivo*, Oliveira (2012) tratou os animais com o referido extrato nas doses de 25 e 50 mg/kg/dia (modelos de Sarcoma 180 em camundongos *swiss* e tumor Walker 256 inoculado em rato *wistar*). Em ambos os modelos, houve inibição do crescimento tumoral. Vale ressaltar, que apesar de os extratos usados por Rios (2013) e Oliveira (2012) e a fração FRA usada nesse experimento serem originários de diferentes partes da planta (sementes e folhas) ou por diferentes métodos de extração, esses três compostos têm em comum, o fato de apresentarem em suas composições, acetogeninas anonáceas.

No tocante a estudos farmacológicos, para testar a possível aplicabilidade farmacológica de um composto ou molécula, o índice de seletividade, ou seja, o balanço entre os efeitos terapêuticos e toxicológicos é um parâmetro de grande relevância (ANAZETTI et al., 2003). Nesse trabalho, a toxicidade aguda pelo método *up-and-down* foi realizada e o

programa estatístico extipulou que FRA apresenta DL_{50} com valor de 92 mg/kg/dia em roedores. Portanto, FRA apresentou-se mais tóxica do que os extratos brutos das sementes e folhas de *A. muricata* (RIOS, 2013; OLIVEIRA, 2012).

No estudo de inibição do crescimento tumoral de Sarcoma 180 (Experimento 1), FRA inibiu o volume (Figuras 25) e o crescimento tumoral de Sarcoma 180 após oito dias de tratamento nas três concentrações testadas (20, 30 e 40 mg/kg/dia) (Figuras 27). No entanto, o grupo tratado com FRA 20 mg/kg/dia, apesar de apresentar redução do volume e do peso tumoral, não apresentou diferença estatística quando comparado ao controle negativo. Na maior dose, FRA inibiu 58,54% do crescimento tumoral, o que mostra o potencial de FRA no combate ao câncer. O grupo tratado com 30 mg/kg/dia nesse estudo, inibiu 41,97% do crescimento tumoral, resultado próximo aos valores de inibição tumoral do extrato acetônico das sementes de *A. muricata* encontrados por Rios (2010): 48,41% neste mesmo modelo experimental.

No tocante a toxicidade, um dos aspectos mais simples e fáceis de serem avaliados quando o organismo é submetido a um tratamento é o peso corpóreo (OLIVEIRA, 2013). O peso dos camundongos submetidos à administração de FRA não foi alterado com o passar dos nove dias de tratamento em nenhum dos grupos, indicando que não houve interferência no crescimento dos animais. As análises histopatológicas de tecidos tumoral e dos órgãos dos animais tratados no Experimento 1, não apresentaram sinais de toxicidade associados à FRA.

O fígado dos animais tratados com o controle negativo (apenas com o veículo) e aqueles tratados com FRA, apresentou sinais de esteatose microvesicular e aumento do número de áreas circunscritas de edemas, mas sem sinais de necrose. Como o único grupo a não apresentar tais alterações foi o grupo tratado com Ciclofosfamida, aplicada via intraperitoneal, suspeita-se que tais alterações sejam oriundas do veículo usado (Tween 80 a 3%) e não de FRA. Quanto aos pulmões, os animais dos grupos tratados por via oral (controle negativo e FRA) apresentaram características pulmonares semelhantes: espaços alveolares vazios e com pleura íntegra, mas com presença de células mononucleares e hemácias, o que se pode suspeitar de pneumonite. Assim como as alterações hepáticas, as alterações pulmonares possivelmente também não foram causadas por FRA. Os demais órgãos avaliados (rins, estômago e baço), não apresentaram alterações. Portanto, com ausências de toxicidade, inflamação e/ou necrose.

Um importante parâmetro de efeito indesejável de uma droga, são as avaliações de genotoxicidade. Nesse estudo, nos animais do Experimento 1, não foi detectada índice de dano ao DNA (ensaio do cometa alcalino, Figura 28). No entanto, na avaliação da indução de micronúcleo, o grupo tratado com FRA 40 mg/kg/dia apresentou-se positivo (Figura 29). De acordo com Ribeiro e Marques (2003), o ensaio do micronúcleo (MN) é o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para detectar possíveis agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) e agentes clastogênicos (que quebram cromossomos). MN são estruturas presentes no citoplasma de células que se encontram em divisão, e possuem características cromatínicas semelhantes às do núcleo principal, sendo formados por fragmentos acêntricos ou por cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase. Quando aparecem nas células-filha, é em decorrência de danos induzidos nas células parentais. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem não ser incorporados no núcleo principal das células-filha após a mitose. Nesse caso, uma membrana nuclear se forma em volta do fragmento, que será visível como um pequeno (micro) núcleo separado do núcleo principal da célula, por isso o nome.

Em resumo, os dados encontrados no Experimento 1, indicam que FRA apresenta poucos sinais de toxicidade e significativa atividade inibidora do crescimento tumoral no modelo testado (Sarcoma 180 implantado em camundongos *swiss*).

De acordo com Oliveira (2012), o carcinossarcoma de Walker 256 (tumor de rato), apresenta maior resistência à ação dos agentes antineoplásicos quando comparado ao Sarcoma 180. Para avaliar o potencial de inibição tumoral de FRA, testamos essa fração em modelo de Walker 256 implantado em rato *wistar* (Experimento 2) e encontramos resultados semelhantes aos encontrados no Experimento 1 (Sarcoma 180 implantado em camundongos *swiss*): FRA 40 mg/kg/dia inibiu o crescimento tumoral em 59,17% e 60,47% respectivamente.

No experimento 2, o parâmetro de aferição do volume tumoral, a partir do 5º dia de tratamento, apesar de não apresentar diferença estatística significativa (possivelmente devido a subjetividade da análise), percebe-se que FRA inibiu o volume tumoral (Figura 30). De forma mais precisa, a inibição do crescimento tumoral é apresentada na Figura 31 e Tabela 14. FRA nas doses de 20 e 40 mg/kg/dia inibiu respectivamente 44,56 e 59,17%. Esses resultados são diferentes dos resultados apresentados por Oliveira (2012) neste mesmo modelo de câncer, no qual apenas os animais tratados com a maior dose de extrato acetônico de *A. muricata* (50 mg/kg/dia) apresentou inibição do crescimento tumoral (90,0%).

A espécie *A. muricata* é apontada por alguns estudos como neurotóxica e pode estar associada a causa de um tipo raro de Parkinson em Guadalupe (conjunto de ilhas caribenhas sob domínio francês (LANNUZEL, 2002; 2003; 2006). No entanto, os animais tratados por sete dias consecutivos com FRA (20 e 40 mg/kg/dia) não apresentaram alterações de coordenação motora no teste de Rotarod. Esse dado não descarta a possível atividade neurotóxica de *A. muricata*, mas mostra que, se houver dano dopaminérgico, que resulta na exacerbação colinérgica (sintomas parksonianos) em animais tratados com extrato e/ou frações oriundas desta espécie, ocorre apenas em períodos maiores que sete dias ou ainda, mesmo que de alguma forma FRA tenha causado algum dano no sistema nervoso dos animais tratados, esse dano não foi suficiente para causar alterações motoras.

De forma geral, os animais do Experimento 2 não apresentaram sinais e/ou sintomas de toxicidade. Não houve alteração no tamanho dos órgãos baço (Figura 32), fígado, rins, estômago e pulmões (Tabela 15). A normalidade dos parâmetros bioquímicos estudados (ALT, AST, creatina, ureia, fosfatase alcalina e albumina) nos animais tratados com FRA reforçam a segurança desta fração (Tabela 15). Esses dados bioquímicos, foram diferentes dos resultados encontrados por Oliveira (2012), nos quais os animais tratados com 25 e 50 mg/kg/dia de extrato acetônico de folhas de *A. muricata*, elevaram significativamente a dosagem de ALT e o grupo tratado com a maior dose, redziu a creatina no sangue dos animais tratados durante o ensaio antitumoral.

FRA não causou nenhuma alteração hematológica na dose de 20 mg/kg/dia. Na maior dose, 40 mg/kg/dia, apenas dois parâmetros hematológicos tiveram alterações. A concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) apresentou uma discreta redução nos animais deste grupo, que também reduziu os granulócitos. Os demais parâmetros avaliados apresentaram normalidade (Tabela 16).

Complementando os achados do Experimento 2, análises histológicas dos tumores evidenciaram necrose coagulativa em todos os grupos tratados. No entanto, os grupos tratados com FRA (20 e 40 mg/kg/dia) apresentaram significativa redução de figuras de mitose, corroborando com os achados *in vitro*, que indicam que FRA prende a célula tumoral em G0/G1 (Figura 19). Os achados histológicos dos pulmões dos ratos deste experimento, sugerem a possibilidade de pneumonite em ambos os grupos tratados por via oral, incluindo o controle negativo. Logo, assim como as alterações pulmonares encontradas nos camundongos

(Experimento 1), não se pode associar essas alterações a FRA, uma vez que os animais tratados apenas com o veículo (controle negativo) também apresentaram.

Assim como os camundongos do Experimento 1, os ratos tratados no Experimento 2 também apresentaram alterações hepáticas em todos os grupo, com tumefação de celular intensa, além da presença de células inflamatórias nos grupos tratados com FRA. Dentre as análises histológicas, os achados do fígado dos animais tratados nesse experimento foram as alterações mais acentuadas possivelmente causadas por FRA. A presença de células inflamatórias ora dispersas, ora em ninhos, ora perivasculares, além de hemorragia sinusoidal, somente nos grupos tratados com FRA, são indicativos de lesões celulares reversíveis com possível regressão após ajuste de dose, pois não foi encontrada fibrose em nenhuma das amostras analisadas. Faz-se uma observação adicional em relação ao grupo controle, o qual apresentou muitas alterações de toxicidade não esperada.

Os demais órgãos avaliados (estômago e baço) dos ratos tratados com FRA, assim como os camundongos, não apresentaram alterações. Apenas os animais do grupo controle positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg/dia) apresentaram atrofia da polpa branca e vermelha do baço, corroborando com os achados do peso dos órgãos, no qual o tamanho do baço dos animais desse grupo apresentaram considerável redução (Figura 32; Tabela 14).

Corroborando com os dados encontrados no Experimento 1, os dados encontrados no Experimento 2 reforçam que FRA apresenta poucos (e reversíveis) sinais de toxicidade e considerável atividade inibidora do crescimento tumoral no modelo testado (Walker 256 implantado em ratos *wistar*).

De forma geral, pode-se afirmar que esse estudo permitiu o alcance de uma melhor compreensão dos possíveis mecanismos de ação, assim como toxicidade e atividade antitumoral de uma fração rica em acetogeninas.

7. CONCLUSÃO

Corroborando com a literatura sobre possíveis mecanismos de ação das acetogeninas, pode-se afirmar que o mecanismo de ação de FRA frente a células tumorais ocorra por via mitocondrial e não via nuclear, uma vez que os ensaios de dano ao DNA e oxidação proteica só apresentam alterações após 12 h de tratamento. Reforçando essa teoria, FRA causou despolarização de membrana mitocondrial, o que pode desencadear potente estresse oxidativo, justificando os dados encontrado nesse estudo. Por outro lado, o pré-tratamento com GSH-OEt exerce potente efeito protetor sobre as células tratadas.

Assim como nos ensaios *in vitro*, FRA apresentou inibição do crescimento tumoral em modelos murinos frente às linhagens tumorais Sarcoma 180 e Walker 256, sem causar efeitos tóxicos significativos nos animais durante o período de tratamento. Portanto, FRA surge como um possível candidato a fitofármaco anticâncer, e, novos estudos são necessários para uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação, farmacocinética e toxicidade a médio e longo prazo.

REFERÊNCIAS

- ALALI, F.Q.; LIU, X.-X.; McLAUGHLIN, J.L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. *Journal of Natural Products*, v.62, p.504-540, 1999.
- 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.; LEITÃO, A.; REINA, L.C.B.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que interagem com o DNA: Uma Introdução. *Química Nova*, v.28, p.118-129, 2005.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures, 2017. Atlanta, 2017. Disponível em: <<<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>>>. Acessado em: 13 de setembro de 2017.
- ANAZETTI, M.C.; MELO, P.S.; DURÁN, N.; HAUN, M. Comparative cytotoxicity of dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology*, v.188, p. 261-274, 2003.
- ASSARE, G.A.; AFRIYIE, D.; NGALA, R.A.; ABUTIAE, H.; DOKU, D.; MAHMOOD, S.A.; RAHMAN, H. Antiproliferative Activity of Aqueous Leaf Extract of *Annona muricata* L. on the Prostate, BPH-1 Cells, and Some Target Genes. *Integrative Cancer Therapies*, v.14, n.1, p.65-74, 2015.
- BAHMANI, M.; SHIRZAD, H.; SHAHINFARD, N.; SHEIVANDI, L.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Cancer Phytotherapy: Recent Views on the Role of Antioxidant and Angiogenesis Activities. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v.22, n.2, p.299-309, 2017.
- BARRETO, F.S. Estudo da atividade citotóxica de compostos obtidos do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. por fracionamento bioguiado. 81f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2014.
- BARRETO, F.S.; SANTOS, C.C.; MOURA, A.F.; ARAÚJO, R.M.; WILKE, D.V.; MORAES, M.O. Potencial antitumoral de compostos obtidos de plantas da família Annonaceae. In: ALMEIDA, J.R.G.S.; OLIVEIRA JUNIOR, R.G.; OLIVEIRA, A.P. *Annonaceae: tópicos selecionados*, 1.ed. – Curitiba, PR. Editora CRV, 550p., 2015.
- BEEVI, S.S.; RASHEED, M.H.; GEETHA, A. Evidence of oxidative and nitrosative stress in patients with cervical squamous cell carcinoma. *Clinica Chimica Acta*, v.375, p.119-123, 2007.
- BENDRIS, N.; LEMMERS, B.; BLANCHARD, J.M. Cell cycle, cytoskeleton dynamics and beyond: the many functions of cyclins and CDK inhibitors. *Cell Cycle*, v.14, n.12, p.1786-1798, 2015.

BERLINCK, R.G.S.; OGAWA, C.A.; ALMEIDA, A.M.P.; SANCHEZ, M.A.A.; MALPEZZI, E.L.A.; COSTA, L.V.; HAJDU, E.; FREITAS, J.C. Chemical and pharmacological characterization of halitoxin from *Amphimedon viridis* (Porifera) from the southeastern Brazilian coast. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology.*, v.115, n.2, p.155-163, 1996.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v.28, p.25-30, 1995.

BRAY, F. Transitions in human development and the global cancer burden. *In*: WILD, C.P.; STEWART, B. eds. *World cancer report 2014*. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2014.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the *in vivo* comet assay workgroup. *Mutation Research*, v.627, p.31-35, 2007.

BURMEISTER, J.E.; AGNOLIN, R.; DA COSTA, M.G.; MILTERSTEINER, D.R.; CAMPOS, B.M. Creatinina plasmática normal significa função renal normal? *Revista da AMRIGS*, Porto Alegre, v.51, n.2, p.114-120, 2007.

BUSS, H.; CHAN, T.P.; SLUIS, K.B.; DOMIGAN, N.M.; WINTERBOURN, C.C. Protein carbonyl measurement by a sensitive Elisa method. *Free Radical Biology and Medicine*, v.23, p.361-366, 1997.

CASSILETH, B. Complementary therapies, herbs, and other OTC agents. *Oncology*, v.22, n.10, p.1202-1208, 2008.

CASTRO, A.M.-L.; NIETO-CERÓN, S.; AURELIO, P.-C.; GALBIS-MARTÍNE, L.; LATOUR-PÉREZ, J.; TORRES-LANZAS, J.; TOVAR-ZAPATA, I.; MARTÍNEZ-HERNÁNDEZ, P.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N.; CABEZAS-HERRERA, J. Cancer associated differences in acetylcholinesterase activity in bronchial aspirates from patients with lung câncer. *Clinical Science*, v.115, p.245-253, 2008.

CASTILLO-SÁNCHEZ, L.E.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J.J.; DELGADO-HERRERA, M. Secondary metabolites of the Annonaceae, solanaceae and meliaceae families used as biological control of insects. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, v.12, p.445-462, 2010.

CAVALCANTI, B.C.; COSTA, P.M.; CARVALHO, A.A.; RODRIGUES, F.A.R.; AMORIM, R.C.N.; SILVA, E.C.C.; POHLIT, A.M.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. Involvement of intrinsic mitochondrial pathway in neosergeolide-induced apoptosis of human HL-60 leukemia cells: The role of mitochondrial permeability transition pore and DNA damage. *Pharmaceutical Biology*, v.50, n.8, p.980-993, 2012.

CHAHBOUNE, N.; BARRACHINA, I.; ROYO, I.; ROMERO, V.; SÁEZ, J.; TORMO, J.R.; PEDRO, N.; ESTORNELL, E.; ZAFRA-POLO, M.C.; PELÁEZ, F.; CORTES, D.

Guanaconetins, new antitumoral acetogenins, mitochondrial complex I and tumor cell growth inhibitors. *Bioorganic Medicinal & Chemistry*, Oxford, v.14, p.1089-1094, 2006.

CHAMPY, P.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O. MALDI-TOF MS Profiling of Annonaceous Acetogenins in *Annona muricata* products for human consumption. *Molecules*, v.14, p.5235-5246, 2009.

CHAMPY, P.; HÖGLINGER, G.U.; FEGER, J.; GLEYE, C.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; GUÉRINEAU, V.; LAPRÉVOTE, O.; MEDJA, F.; LOMBÈS, A.; MICHEL, P.P.; LANNUZEL, A.; HIRSCH, E.C.; RUBERG, M. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Journal of Neurochemistry*, v.88, p.63-69, 2004.

CHANG, F.R.; WU, Y.C. Novel cytotoxic Annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, n.64, p.925-931, 2001.

CHEN, Y.; CHEN, J.; WANG, Y.; XU, S.; WANG, S.; LI, X. Antitumor activity and toxicity relationship of annonaceous acetogenins in mice. 2013. Disponível em: <<http://www.paper.edu.cn>>. Acessado em 12.05.2018.

CHEN, C.Y.; CHANG, F.R.; PAN, W.B.; WU, Y.C. Four alkaloids from *Annona cherimola*. *Phytochemistry*, v.56, n.7, p.753-757, 2001.

CHEN, C.Y.; CHEN, S.Y.; CHEN, C.H. Liriodenine induces G1/S cell cycle arrest in human colon cancer cells via nitric oxide- and p53-mediated pathway. *Process Biochemistry*, v.47, p.1460-1468, 2012.

CHEN, C.Y.; WU, H.M.; CHAO, W.Y.; LEE, C.H. Review on pharmacological activities of liriodenine. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, n.7, v.18, p.1067-1070, 2013.

CHIU, H.F.; CHIH, T.T.; HSIAN, Y.M.; TSENG, C.H.; WU, M.J. Bullatacin, a potent antitumor Annonaceous acetogenin, induces apoptosis through a reduction of intracellular cAMP and cGMP levels in human hepatoma 2.2.15 cells. *Biochemical Pharmacology*, v.65, n.3, p.319-327, 2003.

CIBAS, E.S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. *Diagnostic cytopathology*, v.13, p.166-171, 1995.

COOTHANKANDASWAMY, V.; LIU, Y.; MAO, S.C.; MORGAN, J.B.; MAHDI, F.; JEKABSONS, M.B.; NAGLE, D.G.; ZHOU, W.D. The Alternative Medicine Pawpaw and Its Acetogenin Constituents Suppress Tumor Angiogenesis via the HIF-1/VEGF Pathway. *Journal of Natural Products*, v.73, p.956-961, 2010.

CORIA-TÉLLEZ, A.V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E.M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E.N. *Annona muricata*: a comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. *Arabian Journal of Chemistry*, v.11, p.662-691, 2018.

CORRIE, P.G. Cytotoxic chemotherapy: clinical aspects. *Medicine*, v.36, n.1, p.24-28, 2008.

COSTA-LOTUFO, L.V.; ARAUJO, E.E.C.; LIMA, M.A.S.; MORAES, M.E.A.; PESSOA, C.; SILVEIRA, E.R.; MORAES, M.O. Antiproliferative effects of abietane diterpenoids isolated from *Hyptis martiusii* Benth (Labiatae). Die Pharmazie (Berlin), Alemanha, v.59, n.1, p.78-79, 2004.

COSTA-LOTUFO, L.V.; CUNHA, G.M.A.; FARIAS, P.A.M.; VIANA, G.S.B.; CUNHA, K.M.A.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; SILVEIRA, E.R.; GRAMOSA, N.V.; RAO, V.S. The Cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. Toxicon, v.40, n.8, p.1231-1234, 2002.

COSTA-LOTUFO, L.V.; MONTENEGRO, R.C.; ALVES, A.P.N.N.; MADEIRA, S.V.F.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; MORAES, M.O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. Revista Virtual de Química, v.2, n.1, p.47-58, 2010.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. Journal of Ethnopharmacology, v.100, n.1/2, p.72-79, 2005.

CRAWFORD, S. Anti-inflammatory/antioxidant use in long-term maintenance cancer therapy: a new therapeutic approach to disease progression and recurrence. Therapeutic Advances in Medical Oncology, v.6, p.52-68, 2014.

CURY-BOAVENTURA, M.F.; POMPEIA, C.; CURI, R. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on Jurkat cells. Clinical nutrition, v.23, n.4, p.721-732, 2004.

DeBERARDINIS, R.J.; CHANDEL, N.S. Fundamentals of cancer metabolismo. Science Advances, v.2, 2016.

DECKWERTH, T.L.; JOHNSON, E.M. Temporal analysis of events associated with programmed cell death (apoptosis) of sympathetic neurons deprived of nerve growth factor. Journal of Cell Biology, v.123, p.1207-1222, 1993.

DeNICOLA, G.M.; KARRETH, F.A.; HUMPTON, T.J.; GOPINATHAN, A.; WEI, C.; FRESE, K.; MANGAL, D.; YU, K.H.; YEO, C.J.; CALHOUN, E.S.; SCRIMIERY, F.; WINTER, J.M.; HRUBAN, R.H.; IACOBUZIO-DONAHUE, C.; KERN, S.E.; BLAIR, I.A.; TUVESON, D.A. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. Nature, v.475, p.106-109, 2011.

DiGREGORIO, P.J.; UBERSAX, J.A.; O'FARRELL, P.H. Hypoxia and nitric oxide induce a rapid, reversible cell cycle arrest of the *Drosophila* syncytial divisions. Journal of Biological Chemistry, p.276, p.1930-1937, 2001.

DREWS, J. Drug discovery today-& tomorrow. Drug Discovery Today, v.5, n.1, p.2-4, 2000.

ELLINGER-ZIEGELBAUER, H.; AUBRECHT, J.; KLEINJANS, J.C.; AHR, H.J. Application of toxicogenomics to study mechanisms of genotoxicity and carcinogenicity. Toxicology Letters, v.186, p.36-44, 2009.

ELLMAN, G.L.; COURTNEY, K.D.; ANDRES JÚNIOR, V.; FEATHERSTONE, R.M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v.7, n.2, p.88-90, 1961.

ESCOBAR-KHONDIKER, M.; HÖLLERHAGE, M.; MURIEL, M.P.; CHAMPY, P.; BACH, A.; DEPIENNE, C.; RESPONDEK, G.; YAMADA, E.S.; LANNUZEL, A.; YAGI, T.; HIRSCH, E.C.; OERTEL, W.H.; JACOB, R.; MICHEL, P.P.; RUBERG, M.; HÖGLINGER, G.U. Annonacin, a Natural Mitochondrial Complex I Inhibitor, Causes Tau Pathology in Cultured Neurons. *The Journal of Neuroscience*, v.27, n.29, p.7827-7837, 2007.

FATO, F.; BERGAMINI, C.; BORTOLUS, M.; MANIERO, A.L. LEONI, S.; OHNISHI, T.; LENAZ, G. Differential effects of mitochondrial Complex I inhibitors on production of reactive oxygen species. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v.1787, p.384-392, 2009.

FEITOSA, C.M.; FREITAS, R.M.; LUZ, N.N.N.; BEZERRA, M.Z.B.; TREVISAN, M.T.S. Acetylcholinesterase inhibition by some promising Brazilian medicinal plants. *Brazilian Journal of Biology*, v.71, n.3, p.783-789, 2011.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, S.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International Journal of Cancer*, v.136, p.359-386, 2015.

FERLINI, C., SCAMBIA, G. Assay for apoptosis using the mitochondrial probes, Rhodamine123 and 10-N-nonyl acridine orange. *Nature Protocols*, v.2, n.12, p.3111-3114, 2007.

FERREIRA, S.H. Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 132p., 1998.

FINICLE, B.T.; JAYASHANKAR, V.; EDINGER, A.L. Nutrient scavenging in cancer. *Nature Reviews | Cancer*, 2018.

FOUAD, Y.A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. *American Journal of Cancer Research*, v.7, n.5, p.1016-1036, 2017.

FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de própolis. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; KROEMER, G. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death 2018. *Cell Death and Differentiation*, v.25, p.486-541, 2018.

GAW, A.; MURPHY, M.J.; COWAN, R.A.; O'REILLY, D.S.T.J.; STEWART, M.J.; SHEPHERD, J. *Clinical Biochemistry: An Illustrated Colour*. Churchill Livingstone, 3.ed., 2004.

GAVAMUKULYA, Y.; WAMUNYOKOLI, F.; EL-SHEMY, H.A. *Annona muricata*: Is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A

systematic review of its research history and future prospects. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.10, n.9, p.835-848, 2017.

GEISMANN, C.; ARLT, A.; SEBENS, S.; SCHÄFER, H. Cytoprotection “gone astray”: Nrf2 and its role in cancer. *OncoTargets and Therapy*, v.7, p.1497-1518, 2014.

GLEYE, C.; RAYNAUD, S.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; LAPRÉVOTE, O.; SERANI, L.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Cohibins C and D, two important metabolites in the biogenesis of acetogenins from *Annona muricata* and *Annona nutans*. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1192-1196, 2000.

GOMEZ, L.; THIEBAUT, P.-A.; PAILLARD, M.; DUCREUX, S.; ABRIAL, M.; CROLA-DA-SILVA, C.; DURAND, A.; ALAM, M.R.; Van COPPENOLLE, F.; SHEU, S.-S.; OVIZE, M. The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3 β during reperfusion injury. *Cell Death & Differentiation*, v.22, p.313-322, 2016.

GRAEBER, T.G.; PETERSON, J.F.; TSAI, M.; MONICA, K.; FORNACE, A.J.J.R.; GIACCIA, A.J. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Molecular and Cellular Biology*, n.14, p.6264-6277, 1994.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte Celular por Apoptose. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

GROMEK, D.; FIGADÈRE, B.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Corepoxylone, a possible precursor of mono tetrahydrofuran-c lactona acetogenins: biomimetic synthesis of corossolone. *Tetrahedron*, v.49, p.5247-5252, 1993.

GUADAÑO, A., GUTIÉRREZ, C., DE LA PEÑA, E., CORTES, D., GONZÁLEZ-COLOMA, A. Insecticidal and mutagenic evaluation of two annonaceous acetogenins. *Journal of Natural Products*, v.63, p.773-776, 2000.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids IV. *Journal of Natural Products*, v.51, n.3, p.389-474, 1988.

GUPTA, A.; PANDEY, S.; SHAH, D.R.; YADAV, J.S.; SETH, N.R. Annonaceous acetogenins: the unrevealed area for cytotoxic and pesticidal activities. *Systematic Reviews in Pharmacy*, v.2, p.104-109, 2011.

GUVEN, M.; OZTURK, B.; SAYAL, A.; OZET, A. Lipid peroxidation and antioxidant system in blood of patients with Hodgkin's disease. *Clinical Biochemistry*, v.33, p.209-212, 2000.

HAN, B.; WANG, T.-D.; SHEN, S.-M.; YU, Y.; MAO, C.; YAO, Z.-J.; WANG, L.-S. Annonaceous acetogenin mimic AA005 induces cancer cell death via apoptosis inducing factor through a caspase-3-independent mechanism. *BMC Cancer*, v.15, p.139, 2015.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v.144, p.646-674, 2011.

- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v.100, p.57-70, 2000.
- HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, v.245, p.245-249, 1990.
- HOLLEY, R.W.; KIERNAN, J.A. Control of the initiation of DNA synthesis in 3T3 cells: low-molecular weight nutrients. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, n.71, p.2942-2945, 1974.
- HUI-JUN, X.; REN-PEI, W.; JING-JING, L.; LING-JUAN, Z.; ZHAO-SHEN, L. Role of acetylcholinesterase in lung câncer. *Thoracic Cancer*, v.6, p.390-398, 2015.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2017, 128p.
- INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Diretrizes para a vigilância do câncer relacionado ao trabalho. Rio de Janeiro, 2012.
- INDRAWATI, L.; ASCOBAT, P.; BELA, B.; ABDULLAH, M.; SURONO, I.S. The effect of an *Annona muricata* leaf extract on nutritional status and cytotoxicity in colorectal cancer: a randomized controlled trial. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, v.26, n.4, p.606-612, 2017.
- ITOH, K.; WAKABAYASHI, N.; KATOH, Y.; ISHII, T.; IGARASHI, K.; ENGEL, J.D.; YAMAMOTO, M. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & Development*, n.13, p.76-86, 1999.
- JARAMILLO, M.C.; ARANGO, G.; GONZALEZ, M.C.; ROBLEDO, S.M. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*, n.71, p.277-280, 2000.
- JEMAL, D.; WARD, E.M.; JOHNSON, C.J.; CRONIN, K.A.; MA, J.; RYERSON, A.B.; MARIOTTO, A.; LAKE, A.J.; WILSON, R.; SHERMAN, R.L.; ANDERSON, R.N.; HENLEY, S.J.; KOHLER, B.A.; PENBERTHY, L.; FEUER, E.J.; WEIR, H.K. Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, 1975–2014, Featuring Survival. *Journal of the National Cancer Institute*, v.109, n.9, p.1-22, 2017.
- JOLAD, S.D.; HOFFMAN, J.J.; SCHRAM, K.H.; COLE, J.L. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *Journal of Organic Chemistry*, v.16, n.47, p.3151-3153, 1982.
- JONES, R.G.; PLAS, D.R.; KUBEK, S.; BUZZAI, M.; MU, J.; XU, Y.; BIRNBAUM, M.J.; THOMPSON, C.B. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Molecular Cell*, n.18, p.283-293, 2005.
- JUANG, S.H.; CHIANG, C.Y.; LIANG, F.P.; CHAN, H.H.; YANG, J.S.; WANG, S.H.; WU, T-S. Mechanistic Study of Tetrahydrofuran-acetogenins In Triggering Endoplasmic Reticulum Stress Response-apoptosis in Human Nasopharyngeal Carcinoma. *Scientific reports*, v.6, 2016.

KAMB, A. What's wrong with our cancer models? *Nature Review Drug Discovery*, v.4, p.161-165, 2005.

KEPP, O.; GALLUZZI, L.; LIPINSKI, M.; YUAN, J.; KROEMER, G. Cell death assays for drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.10, p.221-237, 2011.

KHANNA, K.K.; JACKSON, S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nature Genetics*, v.27, p.247-254, 2001.

KO, Y-M.; WU, T-Y.; WU, Y-C.; CHANG, F-R.; GUH, J-Y.; CHUANG, L-Y. Annonacin induces cell cycle-dependent growth arrest and apoptosis in estrogen receptor- α -related pathways in MCF-7 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v.137, n.3, p.1283-1290, 2011.

KONNO, H.; OKUNO, Y.; MAKABE, H.; NOSAKAM, K.; ONISHI, A.; ABE, Y.; SUGIMOTO, A.; AKAJI, K. Total synthesis of cis-solamin A, a mono-tetrahydrofuran acetogenin isolated from *Annona muricata*. *Tetrahedron Letters*, n.49, p.782-785, 2008.

KOPPENOL, W.H.; BOUNDS, P.L.; DANG, C.V.; Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, v.11, p.325-337, 2011.

KROEMER, G.; PETIT, P.X.; ZAMZAMI, N.; VAYSSIÈRE, J.-L.; MIGNOTTE, B. The biochemistry of programmed cell death. *The FASEB Journal*, v.9, p.1277-1287, 1995.

KRYSKO, D.V.; BERGHE, T.V.; D'HERDE, K.; VANDENABEELE, P. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, v.44, p.205-221, 2008.

KRYSKO, O.; AAES, T.L.; KAGAN, V.E.; D'HERDE, K.; BACHERT, C.; LEYBAERT, L.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, D.V. Necroptotic cell death in anti-cancer therapy. *Immunological Reviews*, v.280, p.207-219, 2017.

KUSHNAREVA, Y.; NEWMAYER, D.D. Bioenergetics and cell death. *Annals of the New York Academy of Sciences*, n.1201, p.50-57, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; ASTER, J.C. Robbins e Contran. *Patologia: bases patológicas da doença*. 9.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Enhancing effects of mini-cells prepared from *Salmonella typhimurium* on anti-tumor immunity in sarcoma 180-bearing mice. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 1982, v.14, n.1, p.1-3, 1982.

KUZMINOV, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences - USA*, v.98, p.8241-8246, 2001.

LAMKANFI, M.; DIXIT, V.M. Mechanisms and functions of inflammasomes. *Cell*, v.157, n.5, p.1013-1022, 2014.

LANDOLT, J.L.; AHAMMADSAHIB, K.I.; HOLLINGWORTH, R.M.; BARR, R.; CRANE, F.L.; BUERCK, N.L.; MCCABE, G.P. Determination of structure-activity relationships of Annonaceous acetogenins by inhibition of oxygen uptake in rat liver mitochondria. *Chemico-Biological Interactions*, v.98, p.1-13, 1995.

LANNUZEL, A.; HÖGLINGER, G.U.; CHAMPY, P.; MICHEL, P.P.; HIRSCH, E.C.; RUBERG, M. Is atypical Parkinsonism in the Caribbean caused by the consumption of Annonaceae? *Journal of Neural Transmission*, n.70, p.153-157, 2006.

LANNUZEL, A.; MICHEL, P.P.; CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ABAUL, J.; HOCQUEMILLER, R.; RUBERG, M. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Movement Disorders*, v.17, p.84-90, 2002.

LANNUZEL, A.; MICHEL, P.P.; HÖGLINGER, G.U.; CHAMPY, P.; JOUSSET, A.; MEDJA, F.; LOMBÈS, A.; DARIOS, F.; GLEYE, C.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R.; HIRSCH, E.C.; RUBERG, M. The mitochondrial complex I inhibitor annonacin is toxic to mesencephalic dopaminergic neurons by impairment of energy metabolism. *Neuroscience*, n.121, p.287-296, 2003.

LARTIGUE, L.; KUSHNAREVA, Y.; SEONG, Y.; LIN, H.; FAUSTIN, B.; NEWMAYER, D.D. Caspase-independent mitochondrial cell death results from loss of respiration, not cytotoxic protein release. *Molecular Biology of the Cell*. v.20, p.4871-4884, 2009.

LAZEBNIK, Y. What are the hallmarks of cancer? *Nature Reviews Cancer*, n.10, p.232-233, 2010.

LEÃO, R.B.A.; FERREIRA, M.R.C.; JARDIM, M.A.G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.88, 2007.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVÉ, A.; DESCONCLOIS, J.F.; FARGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of Annonaceae XXIX. Alkaloids of *Annona muricata*. *Journal of Medicinal Plant Research*, n.42, p.37-44, 1981.

LI, D.Y.; YU, J.G.; LUO, X.Z.; SUN, L.; YANG, S.L. Muricatenol, a linear acetogenin from *Annona muricata* (Annonaceae). *Chinese Chemical Letters*, v.11, p.239-242, 2000.

LI, D.Y.; YU, J.G.; ZHU, J.X.; YU, D.L.; LUO, X.Z.; SUN, L.; YANG, S.L. Annonaceous acetogenins of the seeds from *Annona muricata*. *Journal of Asian Natural Products Research*, n.3, p.267-276, 2001.

LI, N.; SHI, Z. TANG, Y.; CHEN, J.; LI, X. Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, v.4, n.48, 2008.

LIAW, C.C.; CHANGE, F.R.; LIN, C.Y.; CHON, C.J.; CHIU, H.F.; WU, M.J.; WU, Y.C. New cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. *Journal of Natural Products*, v.65, p.470-475, 2002.

LIAW, C.C.; WU, T.Y.; CHANG, F.R.; WU, Y.C. Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials. *Planta Medica*, v.76, n.13, p.1390-1404, 2010.

LIAW, C.C.; YANG, Y.L.; CHEN, M.; CHANG, F.R.; CHEN, S.L.; WU, S.H.; WU, Y.C. Mono-tetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa* as Cytotoxic Agents and Calcium Ion Chelators. *Journal of Natural Products*, v.5, n.71, p.764-771, 2008.

LINDAHL, P.E.; OBERG, K.E. The effect of rotenone on respiration and its point of attack. *Exp. Cell Res.*, n.23, p.228-237, 1961.

LIU, B.; BAO, J-K.; YANG, J.M.; CHENG, Y. Targeting autophagic pathways for cancer drug discovery. *Chinese Journal of Cancer*, v.32, n.3, p.113-120, 2013.

LIU, J.J.; LIN, M.; YU, J.Y.; LIU, B.; BAO, J.K. Targeting apoptotic and autophagic pathways for cancer therapeutics. *Cancer Letters*, n.300, p.105-114, 2011.

LIU, N.; YANG, H.L.; WANG, P.; LU, Y.C.; YANG, Y.J.; WANG, L.; LEE, S.C. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. *Journal of Ethnopharmacology*, v.89, p.210-217, 2016.

LONDERSHAUSEN, M.; LEICHT, W.; LIEB, F.; MOESCHLER, H.; WEISS, H. Molecular mode of action of annonins. *Pest Management Science*, v.33, n.4, p.427-438, 1991.

LOPES, H.J.J. *Enzimas no Laboratório Clínico - Aplicações Diagnósticas*. Belo Horizonte-MG, 29 p., 1998.

LORENZI, T.F. *Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica*. Medsi, 4.ed., 722p, 2006.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, v.193, p.265-27, 1951.

LOVELL, D.P.; THOMAS, G.; DUBROW, R. Issue related to the experimental design and subsequent statistical analysis of *in vivo* and *in vitro* comet assay. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, v.19, p.109-119, 1999.

MAAS, P.J.M.; KAMER, H.M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, v.52, p.65-98, 2001.

MACKLIS, J.D.; MADISON R.D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. *Journal of Neuroscience Methods*, v.31, p.43-46, 1990.

MAGALHÃES, H.I.F.; VERAS, M.L.; TORRES, M.R.; ALVES, A.P.N.N.; PESSOA, O.D.L.; SILVEIRA, E.R.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.58, p.235-241, 2006.

MARINI, E.S.; GIAMPIETRI, C.; PETRUNGARO, S.; CONTI, S.; FILIPPINI, A.; SCORRANO, L.; ZIPARO, E. The endogenous caspase-8 inhibitor c-FLIPL regulates ER morphology and crosstalk with mitochondria. *Cell Death & Differentiation*, v.22, p.1131-1143, 2015.

MATOS, F.J.A. *Introdução à Fitoquímica Experimental*. 2ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

McLAUGHLIN, J.L. Paw paw and cancer: annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *Journal of Natural Products*, n.71, p.1311-1321, 2008.

MARENGO, B.; NITTI, M.; FURFARO, A.L.; COLLA, R.; CIUCIS, C.; MARINARI, U.M.; PRONZATO, M.A.; TRAVERSO, N.; DOMENICOTTI, C. Redox homeostasis and cellular antioxidant systems: crucial players in cancer growth and therapy. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 16p., 2016.

MELOT, A.; FALL, D.; GLEYE, C.; CHAMPY, P. Apolar Annonaceous Acetogenins from the Fruit Pulp of *Annona muricata*. *Molecules*, v.14, p.4387-4395, 2009.

MESQUITA, M.L.; PAULA, J.E.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L.S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, v.123, p.439-445, 2009.

MISTRY, P.; HERBERT, K.E. Modulation of hOGG1 DNA repair enzyme in human cultured cells in response to pro-oxidant and antioxidant challenge. *Free Radical Biology & Medicine*, v.35, p.397-405, 2003.

MIZUSHIMA, N.; YOSHIMORI, T.; OHSUMI, Y. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v.27, n.1, p.107-132, 2011.

MOLINA, J.R.; SUN, Y.; PROTOPOPOVA, M.; GERA, S.; BANDI, M.; BRISTOW, C. An inhibitor of oxidative phosphorylation exploits cancer vulnerability. *Nature Medicine*, v.24, p.1036-1046, 2018.

MORRÉ, D.J.; CABO, R.D.; FARLEY, C.; OBERLIES, N.H.; McLAUGHLIN, J.L. Mode of bullatacin. A potent new antitumor acetogenin: inhibition of NADH oxidase activity of HELA and HL-60, but not liver plasma membranes. *Life Sciences*, v.56, p.343-348, 1995.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v.16, p.55-63, 1983.

NAKANISHI, Y.; CHANG, F.R.; LIAW, C.C.; WU, Y.C.; BASTOW, K.F.; LEE, K.H. Acetogenins as selective inhibitors of the human ovarian 1A9 tumor cell line. *Journal of Medicinal Chemistry*, v.46, p.3185-3188, 2003.

NEUSS, M.N.; POLOVICH, M.; MCNIFF, K.; ESPER, P.; GILMORE, T.R.; LeFEBVRE, K.B.; SCHULMEISTER, L.; JACOBSON, J.O. 2013 Updated American Society of Clinical Oncology/Oncology Nursing Society Chemotherapy Administration Safety Standards Including Standards for the Safe Administration and Management of Oral Chemotherapy. *Journal of Oncology Practice*, v.9, n.2, p.5-13, 2013.

OECD (ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT). Guideline for testing of chemicals n° 474. Genetic Toxicology: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 1997.

OLIVE, P.L. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. *Journal of Radiation Research*, v.117, p.79-92, 1989.

OLIVEIRA, C.C. 2012. Estudos toxicológicos pré-clínicos e antitumorais do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. 180f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Faculdade de Medicina, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

OSTLING, O.; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.123, p.291-298, 1984.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.-T.; ZHOU, T.-T.; LIU, B.; BAO, J.-K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. *Cell Proliferation*, v.45, p 487-498, 2012.

PADOVAN-NETO, F.E.; ECHEVERRY, M.B.; TUMAS, V.; DEL-BEL, E.A. Nitric oxide synthase inhibition attenuates L-DOPA-induced dyskinesias in a rodent model of Parkinson's disease. *Neuroscience*, v.159, p.927-935, 2009.

PARK, M.T.; LEE, S.J. Cell Cycle and Cancer. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v.36, n.1, p.60-65, 2003.

PASPARAKIS, M.; VANDENABEELE, P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*, v.517, n.7534, p.311-320, 2015.

PASTORINO, J.G.; WILHELM, T.J.; GLASCOTT JR, P.A.; KUCSIS, J.J.; FARBER, J.L. Dexamethasone induces resistance to the lethal consequences of electron transport inhibition in cultured hepatocytes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, n.318, n.1, p.175-181, 1995.

PAVLOVA, N.N.; THOMPSON, C.B. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metabolism*, v.23, n.1, p.27-47, 2016.

PEDRO, N.; CAUTAIN, B.; MELGUIZO, A.; CORTES, D.; VICENTE, F.; GENILLOU, O.; TORMO, J.R.; PELÁEZ, F. Analysis of cytotoxic activity at short incubation times reveals profound differences among Annonaceus acetogenins, inhibitors of mitochondrial Complex I. *The Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.45, p.145-152, 2013a.

PEDRO, N.; CAUTAIN, B.; MELGUIZO, A.; VICENTE, F.; GENILLOU, O.; PELÁEZ, F.; TORMO, J.R. Mitochondrial complex I inhibitors, acetogenins, induce HepG2 cell death through the induction of the complete apoptotic mitochondrial pathway. *The Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, v.45, p.153-164, 2013b.

PÉREZ-AGUILAR, B.; VIDAL, C.J.; PALOMECA, G.; GARCÍA-DOLORES, F.; GUTIÉRREZ-RUIZ, M.C.; BUCIO, L.; GÓMEZ-OLIVARES, J.L.; GÓMEZ-QUIROZ, L.E. Acetylcholinesterase is associated with a decrease in cell proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1852, p.1380-1387, 2015.

PERVAIZ, S.; CLEMENT, M.V. Tumor intracellular redox status and drug resistance-serendipity or a casual relationship? *Current Pharmaceutical Design*, v.10, p.1969-1977, 2004.

PESSOA, C.; SILVEIRA, E.R.; LEMOS, T.G.L.; WETMORE, L.A.; MORAES, M.O.; LEYVA, A. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil. *Phytotherapy Research*, v.14, n.3, p.187-191, 2000.

PETIT, P.X.; LECOUEUR, H.; ZORIN, E.; DAUGUET, C.; MIGNOTTE, B.; GOUGEON, M.L. Alterations of mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *Journal of Cell Biology*, v.130, p.157-167, 1995.

PINKEL, D. Cancer cells, chemotherapy & gene clusters. *Nature Genetics*, v.24, p.208-209, 2000.

POWIS, G.; BAKER, A. Redox signaling and the control of cell growth and death. *Advances in Pharmacology*, v.38, p.329-359, 1996.

QAZI, A.K.; SIDDIQUI, J.A.; JAHAN, R.; CHAUDHARY, S.; WALKER, L.A.; SAYED, Z.; JONES, D.T.; BATRA, S.K. MACHA, M.A.; Emerging therapeutic potential of graviola and its constituents in cancers. *Carcinogenesis*, v.39, n.4, p.522-533, 2018.

QUISPE, A.; ZAVALA, D.; ROJAS, J.; POSSO, M.; VAISBERG, A. Efecto citotóxico selectivo in vitro de muricin H (acetogenina de *Annona muricata*) en cultivos celulares de cáncer de pulmón. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, n.23, p.265-269, 2006.

RAGASA, A.Y.; SORIANO, G.; TORRES, G.B.; DON, M.; SHEN, C. Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacognosy Journal*, n.32, p.32-37, 2012.

RASTOGI, N.; MISHRA, D.P. Therapeutic targeting of cancer cell cycle using proteasome inhibitors. *Cell Division*, v.7, n.26, p.1-10, 2012.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v.26, p.1231-1237, 1999.

RHEE, I.K.; van de MENT, M.; INGGANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, v.915, n.1-2, p.217-223, 2001.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. *In: RIBEIRO, R.L. Mutagênese ambiental*. Canoas, RS: Ed. Ulbra, p.173-198, 2003.

RICH, T.; ALLEN, R.L.; WYLLIE, A.H. Defying death after DNA damage. *Nature*, v.407, p.777-783, 2000.

RICCI, J.E.; MUÑOZ-PINEDO, C.; FITZGERALD, P.; BAILLY-MAITRE, B.; PERKINS, G.A.; YADAVA, N.; SCHEFFLER, I.E.; ELLISMAN, M.H.; GREEN, D.R. Disruption of

mitochondrial function during apoptosis is mediated by caspase cleavage of the p75 subunit of complex I of the electron transport chain. *Cell*, v.117, p.773-786, 2004.

RIESER, M.J.; GU, Z.M.; FANG, X.P.; ZENG, L.; WOOD, K.V.; MCLAUGHLIN, J.L. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenin from the seed of *Annona muricata*. *Journal of Natural Products* v.59, p.100-108, 1996.

RINALDI, M.V.N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. 2007. 125p. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

RIOS, M.E.F. 2013. Estudo da atividade citotóxica e do potencial antitumoral do extrato acetônico das sementes de *Annona muricata* L. (AMSA), em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. 121p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Mestrado Profissional, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Faculdade de Medicina, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

ROY, K.; WU, Y.; MEITZLER, J.L.; JUHASZ, A.; LIU, H.; JIANG, G.; LU, J.; ANTONY, S.; DOROSHOW, J.H. NADPH oxidases and cancer. *Clinical Science* v.128, p.863-75, 2015.

RUIZ-ESPEJO, F.; CABEZAS-HERRERA, J.; ILLANA, J.; CAMPOY, F.J.; MUÑOZ-DELGADO, E.; VIDAL, C.J. Breast cancer metastasis alters acetylcholinesterase activity and the composition of enzyme forms in axillary lymph nodes. *Breast Cancer Research and Treatment*, n.80, p.105-14, 2003.

RUPPRECHT, J.K.; HUI, Y.H.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: a review. *Journal of Natural Products*, v.53, n.2, p.237-278, 1990.

SABAPATI, M.; PALEI, N.N.; KUMAR, C.K.A.; MOLAKPOGU, R.B. Solid lipid nanoparticles of *Annona muricata* fruit extract: formulation, optimization and *in vitro* cytotoxicity studies, v.45, p.577-586, 2019.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovascular Research* v.2000, n.45, p.528-537.

SCHABEL JR, F.M.; GRISWOLD JR, D.P.; LASTER JR, W.R.; CORBETT, T.H.; LLOYD, H.H. Quantitative evaluation of anticancer agent activity in experimental animals. *Pharmacology & Therapeutics. Part A: Chemotherapy, Toxicology and Metabolic Inhibitors*, v.1, n.4, p.411-435, 1977.

SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, v.112, p.654-658, 2009.

SENTHIL, K.; ARANGANATHAN, S.; NALINI, N. Evidence of oxidative stress in the circulation of ovarian cancer patients. *Clinica Chimica Acta*, v.339, p.27-32, 2004.

SHAPIRO, H.M. Overture. In: SHAPIRO, H.M. (Org.). *Practical Flow Cytometry*. New York: Wiley-Liss, 3.ed., p.1-32, 1995.

SHEN, J.X.; QIN, D.; WANG, H.; WU, C.; SHI, F.D.; WU, J. Roles of nicotinic acetylcholine receptors in stem cell survival/apoptosis, proliferation and differentiation, *Current Molecular Medicine*, v.13, p.1455-1464, 2013.

SHINTANI, T.; KLIONSKY, D.J. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*, v.306, p.990-995, 2004.

SILMAN, I.; SUSSMAN, J.L. Acetylcholinesterase: "Classical" and "non-classical" functions and pharmacology. *Current Opinion in Pharmacology*, n.5, p.293-302, 2005.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P.; *Genética Toxicologia*. Porto Alegre, Alcance, 422p., 2003.

SINGH, M.P.; MCCOY, M.; TICE, R.R.; SCHINEIDER, P. A simple technique for quantitation of low levels of DNA in individual cells. *Experimental Cell Research*, v.175, p.184-191, 1988.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H.E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutation Research*, v.531, p.231-251, 2003.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR, G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOREQ, H.; SEIDMAN, S. Acetylcholinesterase-new roles for an old actor. *Nature Reviews Neuroscience*, n.2, p.294-302, 2001.

STEWART, H.L.; SNELL, K.C.; DUNHAM, L.J.; SCHLYEN, S.M. Transplantable and Transmissible Tumors of Animals. *Armed Forces Institute of Pathology*, Washington, D.C. 378p., 1959.

SZNARKOWSKA, A.; KOSTECKA, A.; MELLER, K.; BIELAWSKI, K.P. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. *Oncotarget*, v.8, n.9, p.15996-16016, 2017.

TDRG (Technical Data Report on graviola). *Annona muricata*. Sage Press Inc, Austin, p.52, 2002.

VANDEN BERGHE, T.; LINKERMANN, A.; JOUAN-LANHOUE, S.; WALCZAK, H.; VANDENABEELE, P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nature reviews. Molecular Cell Biology*, v.15, n.2, p.135-147, 2014.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *Journal of Immunological Methods*, v.184, p.39-51, 1995.

VIJAYAKURUP, V.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C.; JAYAKRISHNAN, P.C.; SRINIVAS, P.; GOPALA, S. Phenethyl caffeate benzoxanthene lignan is a derivative of

caffeic acid phenethyl ester that induces bystander autophagy in WiDr cells. *Molecular Biology Reports.*, v.41, n.1, p.85-94, 2014.

VILA-NOVA, N.S.; MORAIS, S.M.; FALCAO, M.J.; ALCANTARA, T.T.; FERRERIA, P.A.; CAVALCANTI, E.S.; VIEIRA, I.G.; CAMPELLO, C.C.; WILSON, M. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. Promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corossolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. *Experimental Parasitology*, v.133, p.334-338, 2013.

VILA-NOVA, N.S.; MORAIS, S.M.; FALCÃO, M.J.C.; MACHADO, L.K.A.; BEVILÁQUA, C.M.L.; COSTA, I.R.S.; BRASIL, N.V.G.P.S.; ANDRADE JÚNIOR, H.F. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.44, n.5, p.567-571, 2011.

von KARSTEDT, S.; MONTINARO, A.; WALCZAK, H. Exploring the TRAILs less travelled: TRAIL in cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer*, v.17, p.352-366, 2017.

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas*, 2^a Ed., Spring, 1996.

WAJANT, H. The Fas signaling pathway: more than a paradigm. *Science*, v.296, n.5573, p.1635-1636, 2002.

WANG, A.Q.; MIN, B.S.; NAKAMURA, N.; QIN, G.; LI, C.J.; HATTORI, M. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.10, p.561-565, 2002.

WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.47, p.1801-1812, 1999.

WESSLER, I.K.; KIRKPATRICK, C.J. The non-neuronal cholinergic system: an emerging drug target in the airways. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* v.14, p.423-434, 2001.

WHO, World Health Organization. Global health observatory data repository. 2011. Number of deaths (World) by cause. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.CODWORLD?lang=en>. Acessado em 14 de março de 2018.

WILBUR, M.A.; SHIH, I.M.; SEGARS, J.H.; FADER, A.N. Cancer implications for patients with endometriosis. *Seminars in Reproductive Medicine*, n.35, p.110-116, 2017.

WILLIAMS, C. L. Muscarinic signaling in carcinoma cells. *Life Sciences*, v.72, p.2173-2182, 2003.

WOLVETANG, E.J.; JOHNSON, K.L.; KRAUER, K.; RALPH, S.J.; LINNANE, A.W. Mitochondrial respiratory chain inhibitors induce apoptosis. *FEBS Letters*. v.339, p.40-44, 1994.

WU, F.E., ZHAO, G.X., ZENG, Y., SCHWEDLER, J.T., McLAUGHLIN, J.L. Additional bioactive acetogenins, annomutacin and (2,4-trans and cis)-10R-annonacin-A-ones, from the leaves of *Annona muricata*. Journal of Natural Products, n.58, p.1430-1437, 1995.

YANG, H.; ZHANG, N.; ZENG, Q.; YU, Q.; KE, S.; LI, X. HPLC method for the simultaneous determination of ten annonaceous acetogenins after supercritical fluid CO₂ extraction. International Journal of Biomedical Science, v.6, p.202-207, 2010.

YEPEZ, B.; ESPINOSA, M.; LOPEZ, S.; BOLANOS, G. Producing antioxidant fractions from herbaceous matrices by super-critical fluid extraction. Fluid Phase Equilibria, v.194, p.879-884, 2002.

YIALLOURIS, A.; PATRIKIOS, I.; JOHNSON, E.O.; SERETI, E.; DIMAS, K.; FORD, C.; FEDOSOVA, N.U.; GRAIER, W.F.; SOKRATOUS, K.; KYRIAKOU, K.; STEPHANOU, A. Annonacin promotes selective cancer cell death via NKA-dependent and SERCAdependent pathways. Cell Death and Disease, v.9, p.764, 2018.

YUAN, S.S.F.; CHANG, H.L.; CHEN, H.W.; YEH, Y.T.; KAO, Y.H.; LIN, K.H.; WU, Y.C.; SU, J.H. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway. Life Sciences, v.72, n.25, p.2853-2861, 2003.

YU, J.G.; GUI, H.Q.; LUO, X.Z.; SUN, L.; ZHU, P.; YU, Z.L. Studies on the chemical constituents of *Annona muricata*. Pharmaceutic\ Sinica B, v.3, p.431-437, 1997.

XIA, P. WANG, S.; DU, Y.; ZHAO, Z.; SHI, L.; SUN, L.; HUANG, G.; YE, B.; LI, C.; DAI, Z.; HOU, N.; CHENG, X.; SUN, Q.; LI, L.; YANG, X.; FAN, Z. WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. The EMBO Journal, v.32, p.2685-2696, 2013.

XI, H.-J.; WU, R.-P.; LIU, J.-J.; ZHANG, L.-J.; LI, Z.-S. Role of acetylcholinesterase in lung cancer. Thoracic Cancer, v.6, p.390-398, 2015.

ZAFRA-POLO, M.C.; GONZÁLEZ, C.; ESTORNELL, E.; SAHPAZ, S.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex. Phytochemistry, v.42, p.253-271, 1996.

ZAMZAMI, N.; MARCHETTI, P.; CASTEDO, M.; ZANIN, C.; VAYSSIÈRE, J.-L.; PETIT, P.X., KROEMER, G. Reduction in mitochondrial potential constitutes an early irreversible step of programmed lymphocyte cell death in vivo. The Journal of Experimental Medicine, v.181, p.1661-1672, 1995.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. Cancer Research, v.33, p.2278-2282, 1973.

Anexos

Anexo I – Protocolo do Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFC)



Universidade Federal do Ceará
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “ESTUDO TOXICOLÓGICOS PRÉ-CLÍNICOS E ANTICÂNCER DA ANONACINA ISOLADA DE *ANNONA MURICATA L.*”, protocolo nº13/2017, sob-responsabilidade da Prof. Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de nº8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 28 de março de 2017.

Vigência do projeto	03/04/2017 a 10/10/2017
Espécie/Linhagem	- Camundongo heterogênicos Swiss – 67 25 – 30g / 8 semanas – 56 Machos e 16 Fêmeas - Camundongos isogênico Black C57BL/6 – 18g - 8 semanas – 60 - Machos - Camundongo transgênico nude atímicos - 18g 8 semanas – 48- Machos - Rato heterogênico Wistar – 180g – 8 semanas- 32- Machos
Nº de Animais	207
Peso/Idade	-
Sexo	-
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 30 de março de 2017

Alexandre Havt Bindá

Prof. Dr. Alexandre Havt Bindá
Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
ALEXANDRE HAVT BINDÁ
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E AO USO COM
ANIMAIS - CEUA/UFC - MATRÍCULA DAPE: 190882