

Henrique Herbst Rosa

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA AÇÃO CITOTÓXICA DE  
*Cecropia pachystachya* Trécul, EMBAÚBA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Maria Oliveira Simões

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Izabella Thais da Silva

Florianópolis  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rosa, Henrique Herbst

Avaliação in vitro da ação citotóxica de *Cecropia pachystachya* Trécul, Embaúba / Henrique Herbst Rosa ; orientadora, Cláudia Maria Oliveira Simões ; coorientadora, Izabella Thaís da Silva. - Florianópolis, SC, 2016.

101 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. *Cecropia pachystachya*. 3. triterpenos. 4. câncer de próstata. 5. efeitos citotóxicos. I. Simões, Cláudia Maria Oliveira. II. Silva, Izabella Thaís da. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Farmácia. IV. Título.

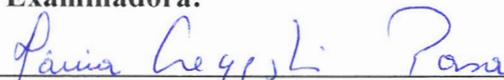
**“Avaliação *in vitro* da ação citotóxica de *Cecropia pachystachya* Trécul, embaúba”**

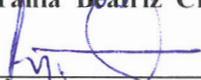
**POR**

**Henrique Herbst Rosa**

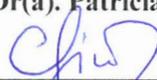
**Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelo(a) Orientador(a) e membros da Banca Examinadora, composta pelos Professores Doutores:**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Ângela Machado de Campos (UFSC – Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Patrícia Hermes Stoco (UFSC - Membro Titular)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Cláudia Maria Oliveira Simões (UFSC – Orientador(a))

**Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa**  
**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da**  
**UFSC**

**Florianópolis, 11 de novembro de 2016.**



Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Virologia Aplicada da  
Universidade Federal de Santa Catarina



## AGRADECIMENTOS

Dentre os caminhos que percorri em minha vida, o ingresso no mestrado destaca-se como um dos desafios que mais me ensinaram e moldaram minha percepção. Compartilho essa conquista com muitas pessoas, a quem sou extremamente grato.

Primeiramente, gostaria de agradecer aos meus pais, Airton e Resilvia, por terem me proporcionado todas as fundações que me fizeram caminhar até aqui, bem como a todo o amor que recebi durante minha vida.

À Professora Cláudia, que aceitou me receber como aluno de mestrado, abrindo as portas de seu laboratório e das oportunidades que se seguiram, além de todo conhecimento e dedicação compartilhados;

À Professora Izabella, que me guiou desde o início dessa jornada, mostrando os caminhos da pesquisa e da ciência, sempre disposta a me ajudar no que precisei;

Aos meus professores da Univille, formando-me como farmacêutico e fomentando meu interesse pela pesquisa. Um agradecimento especial ao Professor Luiz Wiese, que foi o elo entre minha graduação e o mestrado;

A todos os integrantes do LVA, que me acolheram como parte da família: Ana Z., Ana D., Ariadne, Camila, Carlos, Célia, Débora, Dóris, Elisabet, ElMahdy, Gislaine, Lucas A., Mariana, Paula, Talitha, Vanessa, Vitor, além da Clarissa, Lara, Laurita, Lucas M. e Naira, que contribuíram diretamente na realização desse trabalho;

Aos integrantes do Laboratório de Farmacognosia: Pâmela, Carol e Professor Flávio H. Reginatto, fornecedores dos extratos e frações objetos de estudo desse trabalho, servindo como base fundamental na realização dessa pesquisa;

Ao João, Marcelo, Matheus e Cristiani, que, apesar de não terem contribuído diretamente na construção científica, ofereceram apoio nos momentos em que mais precisei;

Às agências de fomento, CNPq, CAPES e FAPESC, pelo financiamento de materiais e equipamentos utilizados nessa pesquisa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC e ao CNPq pela concessão da bolsa.

Muito obrigado!



## RESUMO

O câncer é uma das maiores causas de mortes no mundo sendo responsável por aproximadamente 13% da mortalidade global. No Brasil, as estimativas para 2016 apontam para a ocorrência de 600 mil novos casos, sendo de grande relevância a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos antineoplásicos. Ao examinar a origem dos medicamentos usados no tratamento do câncer, grande parte deles foi desenvolvido a partir de fontes naturais, destacando-se os compostos triterpênicos, com elevado potencial terapêutico. No presente trabalho, investigou-se os efeitos citotóxicos de extratos e frações de *Cecropia pachystachya*, frente a linhagens celulares tumorais humanas, e investigou-se o mecanismo de indução de morte celular da amostra mais ativa. Dentre as amostras avaliadas, destacou-se a fração orgânica (FO) obtida a partir do extrato bruto, a qual demonstrou citotoxicidade relevante para a linhagem de câncer de próstata PC-3. Assim, a FO foi submetida a técnicas cromatográficas para enriquecimento do seu conteúdo triterpênico, dando origem à fração enriquecida em triterpenos (FET), que apresentou valor de  $CC_{50}$  de 65,37  $\mu\text{g/mL}$  para a linhagem PC-3 e foi submetida a uma série de experimentos a fim de elucidar o seu mecanismo de indução de morte celular. A avaliação das alterações morfológicas nucleares demonstrou aumento na população de células com núcleos grandes e regulares, sugerindo a indução de senescência, corroborada pela superatividade da  $\beta$ -galactosidase. Ademais, houve diminuição no número de células viáveis capazes de formar colônias e decréscimo de sua capacidade de duplicação após o tratamento. Foi observada extensa vacuolização do citoplasma, não relacionada com autofagia ou paraptose. Em relação ao ciclo celular, houve diminuição das células na fase G1 e aumento em sub G0/G1. Os ensaios para avaliação da apoptose não demonstraram participação relevante desse tipo de morte. Entretanto, o potencial de membrana mitocondrial sofreu diminuição, não havendo a participação de EROs na citotoxicidade induzida. O mesmo tratamento não inibiu a migração das células PC-3, e as mesmas readquiriram capacidade proliferativa. Em conclusão, os resultados obtidos demonstraram o potencial citotóxico *in vitro* da fração enriquecida em triterpenos (FET). Desta forma, serão avaliados, oportunamente, os efeitos citotóxicos dos triterpenos majoritários a serem isolados da FET, a fim de se confirmar seu potencial citotóxico.

**Palavras-chave:** *Cecropia pachystachya*, triterpenos, câncer de próstata, linhagem celular PC-3, efeitos citotóxicos.



## ABSTRACT

### CYTOTOXIC *IN VITRO* EVALUATION OF *Cecropia pachystachya* Trécul, EMBAÚBA

Cancer is a major cause of death worldwide, responsible for approximately 13% of global mortality. In Brazil, the estimates in 2016 indicate the occurrence of 600,000 new cases, highlighting the importance of research and development of new anticancer drugs. By examining the source of drugs used in cancer treatment, most of them were developed from natural sources, where the triterpenic compounds stand out, with great therapeutic potential. In this study, we investigated the cytotoxic effects of extracts and fractions of *Cecropia pachystachya*, against human tumor cell lines and investigated the mechanism of cell death induction of the most active sample. Among the samples, the organic fraction (OF) obtained from the crude extract stood out, showing significant cytotoxicity for the PC-3 prostate cancer cell line. Based on these results, the OF was subjected to chromatographic techniques for enrichment of its triterpene content giving rise to the enriched-triterpenes fraction (ETF), which showed  $CC_{50}$  value of 65.37 mg/mL for PC-3 lineage and was subjected to a series of experiments in order to elucidate its cell death mechanism of action. The assessment of nuclear morphology demonstrated an increase of cells with large and regular nuclei, suggesting senescence induction, supported by the overexpression of  $\beta$ -galactosidase. Furthermore, there was a decrease in the number of viable cells able to form colonies and of its duplication capacity after treatment. It was observed extensive cytoplasmic vacuolization, unrelated to autophagy and paraptosis. Regarding the cell cycle, there was a reduction of cells in G1 phase and an increase in sub G0/G1. Apoptosis evaluation did not show significant participation of this type of cell death. However, there was a decrease in mitochondrial membrane potential, without the participation of ROS in induced cytotoxicity. The same treatment did not inhibit the migration of PC-3 cells, and they reacquired their proliferative capacity. The results showed the *in vitro* cytotoxic potential of a fraction enriched with triterpenes (ETF) obtained from *C. pachystachya*. Therefore, the cytotoxic effects of triterpenes isolated from ETF will be evaluated opportunely in order to confirm their cytotoxic potential.

**Keywords:** *Cecropia pachystachya*, triterpenes, prostate cancer, PC-3 cell line, cytotoxic effects



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações morfológicas celulares no processo apoptótico..	35
Figura 2 - Processo autofágico.....	36
Figura 3 - Alterações morfológicas do retículo endoplasmático e da mitocôndria durante a paraptose.....	37
Figura 4 - Origem dos medicamentos anticâncer aprovados para uso de 1930 a 2014.....	38
Figura 5 - Folhas de <i>Cecropia pachystachya</i> .....	40
Figura 6 - Estrutura química da molécula de isopreno e de um triterpeno .....	42
Figura 7 – Fluxograma de obtenção das amostras de <i>Cecropia pachystachya</i> com seus respectivos valores de CC <sub>50</sub> e índice de seletividade para a linhagem de tumor de próstata PC-3.....	56
Figura 8 - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a morfometria nuclear. ....	58
Figura 9 - Efeito do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a atividade da enzima $\beta$ -galactosidase .....	59
Figura 10 - Correlação entre a atividade de $\beta$ -galactosidase e a população de células com núcleos grandes e regulares (senescentes), obtida por análise de morfometria nuclear, após tratamento com a fração enriquecida em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> .....	60
Figura 11 - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a indução de vacúolos citoplasmáticos, por meio da coloração com laranja de acridina .....	62
Figura 12 - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) (duas vezes o valor da CC <sub>50</sub> ) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a indução de vacúolos citoplasmáticos, por meio da coloração com laranja de acridina. ....	63

Figura 13 - Efeitos do pré-tratamento com cicloheximida sobre a viabilidade de células PC-3 tratadas com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> .....	64
Figura 14 - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a distribuição das células nas fases do ciclo celular.....	65
Figura 15 - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a indução de apoptose. ....	67
Figura 16 - Efeitos do pré-tratamento com Z-VAD 50 $\mu$ M sobre a viabilidade de células PC-3 tratadas com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> . ....	68
Figura 17 - Efeito do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a organização dos filamentos de actina do citoesqueleto (400x).....	69
Figura 18 - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre o potencial de membrana mitocondrial. ....	70
Figura 19 - Efeitos do tratamento de células PC-3 com NAC 500 $\mu$ M e a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a viabilidade de células PC-3.....	71
Figura 20 - Efeitos do tratamento de células PC-3 com BSO 10 $\mu$ M e a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a viabilidade de células PC-3.....	72
Figura 21 – Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a migração celular.	73
Figura 22 - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre capacidade de duplicação. ....	74
Figura 23 - Efeito do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de <i>Cecropia pachystachya</i> sobre a capacidade destas células de formarem colônias.....	76

Figura 24 – Resumo dos resultados obtidos após o tratamento das células PC-3 com a fração enriquecida em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya*. ..... 79



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Triagem citotóxica de amostras de <i>Cecropia pachystachya</i> em diferentes linhagens celulares tumorais.....	53
Tabela 2 - Índices de seletividade de amostras de <i>Cecropia pachystachya</i> em diferentes linhagens celulares tumorais em relação à cultura primária de fibroblastos saudáveis de gengiva. ....	54



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549: linhagem de células de tumor pulmonar humano  
ATCC: *American Type Culture Collection*  
BSO: L-butionina-S-sulfoxamina  
CC: controle celular  
CC<sub>50</sub>: concentração que reduz a viabilidade celular em 50%  
CCD: cromatografia em camada delgada  
CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência  
CPD: *Cumulative Population Doubling*, duplicação cumulativa de populações celulares  
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMSO: dimetilsulfóxido  
DOC: docetaxel  
DSMZ: *German Collection of Microorganisms and Cell Culture*  
DU 145: linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata insensível à terapia antiandrogênica  
EB: extrato bruto de *C. pachystachya*  
EF: extrato bruto filtrado de *C. pachystachya*  
ERO: espécie reativa de oxigênio  
FA: fração aquosa do extrato bruto filtrado de *C. pachystachya*  
FET: fração enriquecida em triterpenos de *C. pachystachya*  
FPT: fração pobre em triterpenos de *C. pachystachya*  
FO: fração orgânica do extrato bruto filtrado de *C. pachystachya*  
HCT-8: linhagem celular humana de adenocarcinoma ileocecal  
INCA: Instituto Nacional do Câncer  
IP: iodeto de propídeo  
IS: índice de seletividade  
LNCaP: linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata sensível à terapia antiandrogênica  
MEM: Minimal Essential Medium  
MTT: brometo de [3 (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio]  
NAC: N-acetilcisteína  
NMA: *Nuclear Morphometric Analysis*, análise morfométrica nuclear  
OMS: Organização Mundial da Saúde  
PAC: paclitaxel  
PBS: Phosphate-buffered saline, solução de tampão fosfato  
PC-3: linhagem celular humana de adenocarcinoma de próstata insensível à terapia antiandrogênica

PC-3M: linhagem derivada de PC-3 com potencial metastático aumentado

PSA: mistura de penicilina, estreptomicina e anfotericina B

RE: retículo endoplasmático

RD: linhagem celular humana de rabdomiosarcoma

Rf: fator de retenção

RPMI: meio *Roswell Park Memorial Institute*

SFB: soro fetal bovino

zVAD: inibidor de caspases

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO .....</b>	<b>27</b>
2.1 CÂNCER.....	27
2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA .....	28
2.3 MORTE CELULAR.....	33
2.4 CONTRIBUIÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS AO ARSENAL QUIMIOTERÁPICO .....	38
2.5 <i>Cecropia pachystachya</i> .....	39
2.6 TERPENOIDES .....	41
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 OBJETO DE ESTUDO .....	45
4.2 CULTIVO CELULAR .....	46
4.3 TRIAGEM CITOTÓXICA PELO ENSAIO COM SULFORRODAMINA B .....	46
4.4 AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE .....	47
4.5 ANÁLISE DA MORFOMETRIA NUCLEAR .....	48
4.6 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA .....	48
4.7 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE PARAPTOSE.....	48
4.8 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	49
4.9 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM Z-VAD SOBRE A MORTE CELULAR.....	49
4.10 ANÁLISE DA INDUÇÃO DE APOPTOSE OU NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	50
4.11 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO CITOESQUELETO .....	50
4.12 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO .....	51

4.13 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) NA CITOTOXICIDADE .....	51
4.14 AVALIAÇÃO DO EFEITO NA MIGRAÇÃO CELULAR.....	51
4.15 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DUPLICAÇÃO CUMULATIVA DE POPULAÇÕES CELULARES ( <i>CUMULATIVE POPULATION DOUBLING</i> , CPD).....	52
4.16 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA CLONOGÊNICA .....	52
4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	52
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
5.1 TRIAGEM CITOTÓXICA.....	53
5.2 ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR.....	57
5.2.1 Análise da morfometria nuclear .....	57
5.2.2 Avaliação da indução de senescência .....	58
5.2.3 Avaliação da indução de paraptose.....	61
5.2.3 Ciclo celular .....	65
5.2.4 Avaliação da apoptose.....	66
5.2.5 Avaliação da participação de EROs.....	71
5.3 MIGRAÇÃO CELULAR .....	72
5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO EM LONGO PRAZO .....	74
5.5 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA CLONOGÊNICA .....	75
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>77</b>
<b>7 CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>81</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>83</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das maiores causas de mortes no mundo e foi responsável por 8,2 bilhões de mortes em 2012. No Brasil, as estimativas para 2016 apontam para a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer. Essa doença se caracteriza pela proliferação acelerada de células, formando tumores, com capacidade de disseminação para órgãos distantes. Dentre os diferentes tipos de câncer, o de próstata se destaca devido à sua grande relevância epidemiológica. É o câncer mais incidente em todas as regiões do Brasil, com mais de 61 mil novos casos previstos para 2016 (BRASIL/INCA, 2016; GLOBOCAN, 2012).

O tratamento para o câncer de próstata baseia-se em diferentes estratégias, que variam entre vigilância ativa, radioterapia, braquiterapia, prostatectomia, castração farmacológica e quimioterapia, a depender do estágio da doença. Nos seus estágios finais, quando o tumor se espalha para tecidos e órgãos distantes, é indicado a quimioterapia, porém para fins apenas paliativos. Isso evidencia a grande relevância da pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos medicamentos antineoplásicos eficazes, com efeitos adversos mínimos e mecanismos de ação diferenciados, os quais poderão complementar os medicamentos atualmente utilizados (BRASIL/INCA, 2016).

Ao examinar a origem dos medicamentos anticâncer aprovados de 1981 a 2014, verificou-se que 77% foram obtidos a partir de fontes naturais ou desenvolvidos direta ou indiretamente com base nessas fontes. Considerando a extensa biodiversidade brasileira, é evidente que existe grande potencial terapêutico no isolamento de compostos de espécies que ainda carecem de pesquisa. Portanto, a exploração desses recursos naturais é uma estratégia válida para o desenvolvimento de medicamentos inovadores, especialmente se considerarmos que produtos naturais forneceram a base para o desenvolvimento da farmacoterapia moderna (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Dentre as classes de compostos isolados de plantas medicinais com elevado potencial terapêutico como agentes anticâncer, destacam-se os triterpenos, os quais representam um grande grupo de compostos naturais (CHUDZIK; KORZONEK-SZLACHETA; KRÓL, 2015; CONNOLLY; HILL, 2010; PATLOLLA; RAO, 2012). Além de já terem dado origem a medicamentos quimioterápicos como o placitaxel e o docetaxel, inúmeros triterpenos já tiveram sua citotoxicidade avaliada frente a linhagens de células tumorais, como as cucurbitacinas, o bacoposídeo, os ácidos pomólico, ursólico, betulínico, entre outros (BAI et al., 2012; MENG et al., 2015; PENG et al., 2010; SILVA et al., 2016).

Das diferentes espécies de plantas utilizadas na medicina popular brasileira, podemos citar as árvores do gênero *Cecropia*, pertencente à família Urticaceae. Conhecidas por diferentes nomes populares, como embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva (BERG; ROSSELLI, 2005), esse gênero compreende mais de 50 espécies, sendo *C. glaziovii* e *C. pachystachya* as de maior ocorrência nas regiões sul e sudeste do Brasil (COSTA et al., 2011).

A coloração prateada do dorso das folhas de *C. pachystachya* fornece uma característica única dentre as demais espécies do seu gênero. Relatos da medicina popular recomendam a ingestão de infusão de suas folhas para curar doenças do pulmão e rins, açúcar e gordura no sangue além de pressão alta (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011; LORENZI; MATOS, 2002).

O potencial citotóxico de outra espécie, *C. lyratiloba*, e também de *C. pachystachya* já está descrito na literatura (ARAGÃO et al., 2013; ROCHA et al., 2007; SCHINELLA et al., 2008), e também foi detectado para essa última em um extrato apolar em ensaios preliminares pelo nosso grupo de pesquisa (KRATZ et al., 2013), tendo sido este efeito relacionado à presença de triterpenos.

Com base nas considerações descritas acima, neste trabalho foram investigados os efeitos citotóxicos de extratos e frações de *C. pachystachya*, frente a diferentes linhagens celulares tumorais humanas. Além disso, foi proposta a elucidação do mecanismo de indução de morte celular *in vitro* induzido por uma fração enriquecida em triterpenos (FET) desta planta, em células tumorais humanas de próstata, e avaliou-se, além de sua capacidade de induzir senescência, o seu efeito na inibição da migração celular e, por consequência, na formação de metástases.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação citotóxica de *Cecropia pachystachya*, em diferentes linhagens de células tumorais humanas, e elucidar o mecanismo de indução de morte celular *in vitro* da fração enriquecida em triterpenos (FET) frente à linhagem celular mais sensível.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar uma triagem citotóxica das amostras de *C. pachystachya* frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas pelo ensaio colorimétrico da sulforrodamina B;
- Avaliar os efeitos citotóxicos das amostras de *C. pachystachya* em uma linhagem de células saudáveis, a fim de determinar sua seletividade, por meio do ensaio colorimétrico da sulforrodamina B;
- Elucidar, por meio de metodologias específicas *in vitro*, o mecanismo de indução de morte celular da amostra mais ativa (FET), na linhagem celular tumoral mais adequada;
- Avaliar a capacidade da amostra mais ativa (FET) de inibir a migração das células tumorais, por meio do ensaio do *scratch*;
- Avaliar o efeito antiproliferativo em longo prazo da amostra mais ativa (FET), por meio do ensaio de *Cumulative Population Doubling*;
- Avaliar e quantificar as células que readquirem capacidade proliferativa após tratamento com a amostra mais ativa (FET), por meio do ensaio de sobrevivência clonogênica.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 2.1 CÂNCER

A palavra câncer refere-se ao termo neoplasia, isto é, tumores malignos, caracterizados não somente pelo crescimento descontrolado de células transformadas, mas pela capacidade de se diferenciarem e invadirem tecidos e órgãos, vizinhos ou distantes, sendo esta capacidade invasiva denominada de metástase (ALMEIDA et al., 2005).

O câncer é uma das maiores causas de mortes no mundo, com estimativa de ter sido responsável por 8,9 milhões de mortes em 2015, e previsão para que esse número cresça até 13 milhões em 2030, correspondendo a cerca de 13% da mortalidade global (GLOBOCAN, 2012; LOPEZ-GOMEZ et al., 2013; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2015). No Brasil, as estimativas para 2016 apontam para a ocorrência de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer, sendo os de maior incidência, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, os cânceres de próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral entre os homens, e os cânceres de mama, intestino, colo do útero, pulmão e estômago entre as mulheres. É incontestável que o câncer é hoje, no Brasil, um problema de saúde pública, cujo controle e prevenção deverão ser priorizados em todas as regiões, desde as mais desenvolvidas até as mais desiguais (BRASIL/INCA, 2016). A título comparativo, nos EUA, estima-se que 1,6 milhões de novos casos de câncer tenham sido diagnosticados em 2015, e que 589 mil pessoas venham a falecer dessa patologia (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

De forma geral, as principais características do câncer (em inglês, *hallmarks*) compreendem dez capacidades biológicas, sendo elas: (1) autossuficiência em relação aos sinais de crescimento, (2) insensibilidade a sinais inibitórios de crescimento, (3) evasão à morte celular programada (apoptose), (4) potencial ilimitado de replicação, (5) angiogênese sustentada, (6) invasão tecidual e metástase, (7) mutação e instabilidade genômica, (8) inflamação induzida pelos tumores, e duas características ainda emergentes, que são (9) desregulação energética celular, e (10) evasão à destruição imunológica, sendo essas adquiridas durante os múltiplos passos do desenvolvimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Neste sentido, compostos que interfiram diretamente em alguma destas características necessárias para o crescimento e a progressão do tumor, são potenciais candidatos a fármacos.

Outra característica do câncer é a metástase (do grego *metastatis*, significa mudança de lugar, transferência), que é definida pela capacidade das células tumorais de se disseminarem a partir do tumor primário e invadirem órgãos distantes (DUFFY; MCGOWAN; GALLAGHER, 2008). A teoria de multiestágios da metástase celular é bem conhecida e mostra como uma célula é capaz de completar esse processo no organismo: (1) crescimento descontrolado das células, (2) perda de adesão célula-célula, (3) aquisição de capacidade migratória, (4) aquisição de capacidade invasiva, (5) saída da massa tumoral primária, (6) rompimento da membrana basal vascular, (7) intravasamento nos vasos, (8) sobrevivência na circulação (resistindo ao sistema imune), (9) extravasamento no novo órgão, distante do local primário, (10) invasão no tecido local, para criar um novo tumor e reiniciar o ciclo (ROBERT, 2013).

## 2.2 CÂNCER DE PRÓSTATA

Dentre os diferentes tipos de câncer existentes, o câncer de próstata se destaca devido a sua relevância epidemiológica mundial. É uma doença que se caracteriza pela proliferação acelerada de células prostáticas, em diferentes graus de indiferenciação, com capacidade de disseminação para tecidos e órgãos, que acomete principalmente homens idosos. Com exceção do câncer de pele do tipo não-melanoma, é o câncer de maior incidência em todas as regiões do Brasil (mesmo que acometa somente homens), com 61.200 novos casos previstos para 2016 (BRASIL/INCA, 2016). Em países como os EUA e no restante do mundo, o perfil é semelhante, com 220.800 e 1.201.619 novos casos em 2015, respectivamente, representando o câncer mais incidente entre homens nesse país (GLOBOCAN, 2012; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016, 2015).

Entretanto, sua taxa de incidência é cerca de seis vezes maior nos países desenvolvidos em comparação aos países em desenvolvimento. Esse aumento pode ser explicado pela maior expectativa de vida nos países desenvolvidos, já que a idade avançada representa um fator de risco para o aparecimento da doença. Além disso, as estratégias de triagem para o câncer de próstata na população desses países resultam em mais diagnósticos, o que leva a crer que a taxa de incidência em países em desenvolvimento seja subestimada (KLEIN; KNESEBECK, 2015).

Em relação à mortalidade, apesar da grande variação na taxa de sobrevivência após cinco anos do diagnóstico no mundo inteiro (os números variam entre 40% a mais de 95%), no período entre 1995 e 2009,

houve um aumento desse parâmetro em, pelo menos, 37 países, sendo que desses, 22 países apresentaram aumento de 10 a 20% na sobrevivência após cinco anos de diagnóstico. O Brasil está presente no grupo de nações que possuem taxas de sobrevivência superiores a 90%, juntamente com Austria, Bélgica, Canadá, Chipre, Equador, Finlândia, França, Alemanha, Israel, Itália, Lituânia, Porto Rico e EUA. Em contrapartida, Líbia e Mongólia sofrem com as mais baixas taxas de sobrevivência, de somente 40% (ALLEMANI et al., 2015).

Existem três fatores de risco bem estabelecidos para o desenvolvimento do câncer de próstata: idade, histórico familiar e raça, sendo que a idade é o fator de risco mais determinante para a doença, com aproximadamente 85% dos casos diagnosticados depois dos 65 anos. O número de familiares próximos que já tiveram a doença, assim como a idade do paciente no momento do diagnóstico, também pode aumentar a chance de risco relativo em até cinco vezes (PATEL; KLEIN, 2009). Por fim, pessoas afrodescendentes têm 60% mais probabilidade de desenvolverem câncer de próstata, quando comparados com indivíduos caucasianos, além de mortalidade elevada em 200%. Ainda não se sabe ao certo se essas peculiaridades da etnia afrodescendente são decorrentes de aspectos sociais, genéticos ou uma combinação de ambos os fatores (BROOKS, 2013).

A dieta é outro fator que exerce efeito sobre a incidência da doença. A alimentação rica em cálcio está associada com maior risco de desenvolvimento de câncer de próstata, enquanto que uma alimentação rica em tomates cozidos (contendo licopeno) e em alimentos ricos em selênio (castanha-do-brasil, frutos do mar, sementes de girassol, etc.) parece ter efeito protetor sobre o aparecimento deste tipo de câncer (LABBÉ et al., 2014). De modo controverso, o consumo elevado de gorduras foi durante muito tempo associado com maiores chances de desenvolvimento do câncer de próstata (SEBASTIANO; MOURTZAKIS, 2014), porém, uma meta-análise recente da literatura não obteve êxito em encontrar base estatística sólida para essa afirmação (XU et al., 2015).

Assim como acontece em outras neoplasias malignas, o diagnóstico precoce do câncer de próstata é essencial para o prognóstico favorável, possibilitando o tratamento quando o tumor ainda está confinado em seu sítio primário, diminuindo as chances de surgimento de metástase e recidiva da doença. Nesse sentido, a dosagem do Antígeno Prostático Específico (PSA) fornece auxílio como exame de triagem inicial para a doença (SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA, 2016).

Estratégias de rastreio da população assintomática para o câncer de próstata utilizando o PSA como exame de triagem são altamente controversas. Foi demonstrado que, dessa forma, é possível diagnosticar a doença em estágios iniciais, reduzindo assim sua mortalidade (SCHRODER et al., 2009). Porém há evidências de que a dosagem do PSA em indivíduos aparentemente saudáveis acarreta em sobrediagnóstico (do inglês, *overdiagnosis*) (MOYER, 2012).

Como o câncer de próstata é uma doença de crescimento relativamente lento, muito dos tumores descobertos não são capazes de progredir em velocidade suficiente para causar danos à saúde do paciente, permanecendo assintomáticos durante toda a vida. Porém, como não existem ainda marcadores adequados para se determinar a agressividade do câncer de próstata, esses pacientes acabam recebendo tratamento, algumas vezes de forma desnecessária já que existe a possibilidade da doença permanecer estável. Desta forma, o sobrediagnóstico, associado ao sobretratamento (do inglês, *overtreatment*), são responsáveis por grande morbidade, onde, a cada 1000 pacientes que realizam o teste do PSA, 200 fazem biópsias desnecessárias, 29 ficam impotentes e 18 apresentam incontinência urinária, além do estresse psicológico, sem ter impacto significativo sobre a diminuição da mortalidade (MOYER, 2012).

Tendo em vista o exposto, a Associação Americana de Urologia, a Força Tarefa de Serviços Preventivos dos EUA, o Instituto Nacional do Câncer (Brasil) e o Ministério da Saúde brasileiro, entre outras organizações, não recomendam o rastreio do câncer de próstata em homens assintomáticos, alegando que os benefícios dessa estratégia não justificam seus malefícios (BRASIL/INCA, 2013; CARTER et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; MOYER, 2012). A Sociedade Brasileira de Urologia, na contramão, ainda recomenda a triagem da população com a dosagem do PSA, baseando-se em estudos que demonstraram que houve um aumento no diagnóstico de câncer de próstata em estágios avançados após a determinação contrária aos exames de rastreio (BANERJI et al., 2016; BHINDI et al., 2015).

De posse do laudo da dosagem do PSA, do exame digital do reto, da ultrassonografia de próstata, da sintomatologia do paciente e de seu histórico familiar, o médico pode suspeitar fortemente da presença de um câncer de próstata. O diagnóstico definitivo da doença é então realizado através da análise histopatológica de biópsia prostática guiada por ultrassom transretal, sendo positivo quando se observa a presença de células com características de malignidade (BACELAR et al., 2015; MAGNABOSCO, 2014).

Além da confirmação da presença do tumor, a biópsia também permite classificar a doença quanto a sua agressividade, de acordo com a análise histológica e a predominância de células com características de indiferenciação, pelo chamado escore de Gleason. Nessa classificação, é atribuído um escore de 1 a 5 para os dois tipos celulares mais frequentes na biópsia, sendo que 1 é o grau histológico onde as células são mais diferenciadas, e portanto, menos agressivas, e o grau 5 é reservado para as células mais indiferenciadas, logo, mais agressivas. O escore então é expresso pela soma dos dois graus histológicos mais frequentes, seguido da discriminação dos graus, com o predominante em primeiro lugar. Portanto, um escore de Gleason 7 (3 + 4) representa um tumor de próstata com predominância de células com grau histológico 3, acompanhado com células de grau histológico 4 (EPSTEIN et al., 2005).

De forma complementar ao escore de Gleason, o estadiamento do câncer de próstata é realizado pela classificação Tumor/Nódulo/Metástase (TNM), da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), que avalia a extensão do tumor primário, a disseminação para linfonodos, e a presença ou não de metástases, sendo que a cada um desses parâmetros é atribuído um estágio (SOBIN; WITTEKIND, 2009).

Diferente da maioria dos tumores sólidos, a quimioterapia não é o tratamento de primeira escolha para o câncer de próstata (HURWITZ, 2015). Levando em consideração a idade do paciente, sua expectativa de vida, o escore de Gleason, a classificação TNM, a dosagem do PSA e de outros biomarcadores, o tratamento indicado pode variar entre vigilância ativa, radioterapia, braquiterapia, prostatectomia, castração farmacológica e quimioterapia, ou por combinação desses (BACELAR et al., 2015).

A estimulação androgênica em células prostáticas é um fator que induz a sua proliferação, portanto, estratégias que suprimam esse sistema são capazes de conter o avanço do câncer de próstata. Neste sentido, a castração farmacológica pode ser alcançada de diferentes maneiras, com antagonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), agonistas do receptor de GnRH ou antagonistas do receptor androgênico (BERGH et al., 2016). Porém, no decorrer da terapia de privação androgênica, o tumor eventualmente pode desenvolver resistência a esse tipo de tratamento, fazendo-se necessária a introdução de novas abordagens terapêuticas. A quimioterapia, apesar de ser incapaz de curar a doença na sua forma metastática resistente à castração, é indicada como tratamento paliativo, aumentando em alguns meses a sobrevida do paciente (HURWITZ, 2015).

Os taxanos são a classe de quimioterápicos mais bem estudados na terapia deste câncer, devido aos seus resultados de eficácia. Estes fármacos têm a capacidade de se ligar à  $\beta$ -tubulina, estabilizando os microtúbulos e parando a divisão celular na metáfase (WEAVER, 2014). Além disso, em células prostáticas, os taxanos parecem interferir com a sinalização androgênica. Após a ativação do receptor androgênico, ocorre a translocação do mesmo ao núcleo, com a ativação da transcrição de genes específicos. Essa translocação é mediada pela ligação de microtúbulos, logo, o tratamento com taxanos sequestra o receptor no citoplasma, impedindo sua ação (ZHU et al., 2010).

O tratamento quimioterápico é geralmente iniciado com docetaxel (um derivado do taxol) em combinação com prednisona em ciclos de três semanas. Esse esquema já se mostrou superior a outros quimioterápicos utilizados anteriormente para a doença, como mitoxantrona e estramustina; porém, esses dois fármacos ainda podem ser utilizados em caso de resistência ou intolerância ao docetaxel (PETRYLAK et al., 2004; TANNOCK et al., 2004). Mais recentemente, foram aprovados dois novos fármacos para o tratamento do câncer de próstata metastático resistente à castração: abiraterona e enzalutamida. A abiraterona inibe a enzima citocromo P450 (CYP17) necessária para a síntese de andrógenos, bloqueando desta forma a síntese destes hormônios. Já a enzalutamida bloqueia os receptores androgênicos, prevenindo a ligação do hormônio ao seu receptor e a consequente translocação do complexo “receptor-andrógeno” ao núcleo, inibindo a expressão de seus genes alvos. Esses dois fármacos aumentam consideravelmente a sobrevida dos pacientes com câncer de próstata metastático resistente à castração e refratário ao docetaxel ou, ainda, daqueles pacientes virgens de tratamento (CRAWFORD et al., 2015; NARAYANAN; SRINIVAS; FELDMAN, 2015).

Assim como em qualquer outro tratamento quimioterápico, as células tumorais de próstata podem desenvolver mecanismos de resistência ao docetaxel, particularmente neste caso com o aumento da expressão de bombas de efluxo que expulsam o fármaco para o meio extracelular. Os taxanos em geral possuem alta afinidade pela glicoproteína-P e pela proteína de resistência a múltiplas drogas (MDR), fato que levou ao desenvolvimento do cabazitaxel, um taxano de segunda geração, que possuiu afinidade muito menor por essa proteína de efluxo (MITA et al., 2009). Como resultado, o cabazitaxel permite a continuidade do tratamento quimioterápico mesmo após o desenvolvimento de resistência ao docetaxel. Porém, o próprio cabazitaxel não está isento de mecanismos de resistência alternativos,

como a expressão de variantes genéticas do receptor para andrógenos que são constitutivamente ativos (THADANI-MULERO et al., 2014), ou a superexpressão da isoforma III da  $\beta$ -tubulina, que não possui muita afinidade por taxanos (PLOUSSARD et al., 2010).

Diante desse cenário, é essencial que sejam empreendidos esforços para o desenvolvimento de fármacos com mecanismos de ação diferenciados, para o tratamento dos pacientes com câncer de próstata metastático resistente à castração.

### 2.3 MORTE CELULAR

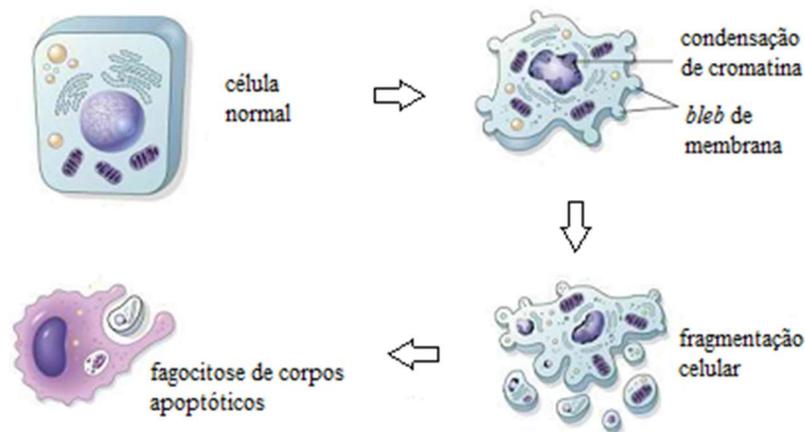
Em 2009, o Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (*National Commite of Cell Death*, EUA) categorizou a morte celular através de seus aspectos morfológicos, enzimáticos, funcionais ou imunológicos (KROEMER et al., 2009). Com o avanço das pesquisas e dos conhecimentos relacionados aos aspectos bioquímicos da morte celular, a classificação não se baseou mais exclusivamente nos parâmetros morfológicos das células, mas preferencialmente nos seus aspectos bioquímicos e moleculares (GALLUZZI et al., 2012). Dentre os vários tipos de morte celular, abaixo estão descritos aqueles que foram investigados neste trabalho (necrose, apoptose, macroautofagia, paraptose e, até mesmo, senescência).

A **necrose** é desencadeada em situações de injúria irreversível, como desastre físico ou privação de oxigênio, provocando inchaço celular e desequilíbrio osmótico, levando ao rompimento da membrana plasmática e consequente extravasamento do conteúdo intracelular. A liberação do conteúdo intracelular é capaz de iniciar um processo inflamatório, através de moléculas conhecidas como alarminas, que atraem e induzem as células do sistema imune, resultando no agravo da lesão tecidual provocado pelo próprio processo inflamatório. Tendo em vista o dano ao tecido adjacente que a necrose origina, não é interessante o desenvolvimento de um fármaco anticâncer capaz de induzir esse tipo de morte em células tumorais (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

De forma contrária, a **apoptose** é um tipo de morte celular que elimina células sem o desencadeamento de processo inflamatório, de modo a manter o tecido íntegro, com pouca participação de leucócitos além de macrófagos, sendo originalmente descrita por Kerr e colaboradores em 1972. É um processo fisiológico que está envolvido na renovação e homeostase tecidual, eliminação de estruturas dispensáveis durante o período embrionário, destruição de células infectadas com patógenos intracelulares e remoção de células com potencial para

transformação maligna. Durante o processo apoptótico, as células apresentam morfologia característica, com redução do volume celular, condensação da cromatina, fragmentação cromossomal do DNA, exposição da fosfatidilserina na porção externa da membrana plasmática e formação de *blebs* (bolhas) na membrana (Figura 1). Esses eventos podem ser atribuídos, principalmente, mas não exclusivamente, a ativação de caspases, uma família de enzimas cisteína-proteases (OUYANG et al., 2012; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008). Diferentes vias de ativação de caspases já foram descritas, sendo duas delas as mais estudadas, a via extrínseca e a intrínseca. A via extrínseca é iniciada após a ativação de receptores de morte localizados na membrana plasmática através dos ligantes FasL ou TNF- $\alpha$ . Essa ligação recruta proteínas adaptadoras que clivam e ativam duas moléculas de pró-caspase 8, que por sua vez ativa as caspases 3 e 7, conhecidas como caspases efetoras. A via intrínseca pode ser iniciada após dano no DNA, ativação de oncogenes, privação de fatores de crescimento e culmina na fusão das proteínas BAX e BAK na membrana externa da mitocôndria permitindo o efluxo do citocromo *c* ao citoplasma. Por sua vez, o citocromo *c*, juntamente com APAF-1 e caspase 9, se unem formando o complexo chamado de apoptossomo, culminando na via comum da apoptose com ativação de caspase 3 (ARYA; WHITE, 2015).

**Figura 1** – Alterações morfológicas celulares no processo apoptótico.

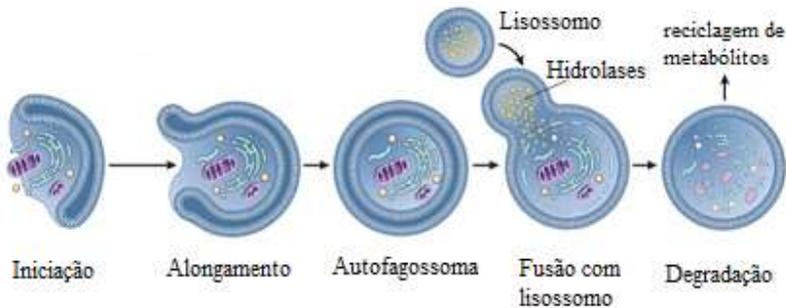


Durante a apoptose, as células adquirem morfologia característica, com condensação de cromatina, formação de *blebs* (bolhas) de membrana e fragmentação nuclear. No final, os macrófagos participam removendo os corpos apoptóticos por meio da fagocitose. Fonte: adaptado de SALVESEN; DUCKETT (2002)

Outro processo envolvido com a morte celular é a **macroautofagia** (nesta dissertação denominada de “autofagia”). Inicialmente, ela foi descrita como um mecanismo de sobrevivência celular, sendo iniciada principalmente após privação de nutrientes e outros estímulos de estresse celular. Nesse processo, porções do citoplasma são englobadas por uma bicamada fosfolipídica, formando o autofagossoma, que é posteriormente fundido com lisossomas, permitindo que as hidrolases ácidas dessas últimas organelas degradem o conteúdo autofágico (Figura 2). Assim, organelas danificadas e o conteúdo do citoplasma podem ser reciclados, fornecendo substratos para futuras reações anabólicas. Esse processo pode ser visualizado, em parte, pela formação de vacúolos citoplasmáticos em células autofágicas, que são corados pelo corante acidotrópico laranja de acridina (GALLUZZI et al., 2014; VLADA; KIM; BEHRNS, 2015). Importante citar que o Prêmio Nobel de Medicina deste ano de 2016 foi outorgado ao Professor Yoshinori Ohsumi, da Universidade de Tóquio, Japão, pelos seus trabalhos pioneiros sobre a autofagia (KOBAYASHI; SUZUKI; OHSUMI, 2012; MOCHIDA; OHSUMI; NAKATOGAWA, 2014; NAKATOGAWA; OHSUMI, 2014; NODA; OHSUMI; INAGAKI,

2010; NODA; SUZUKI; OHSUMI, 2002; OHSUMI; MIZUSHIMA, 2004; SUZUKI; OHSUMI, 2010; TSUKADA; OHSUMI, 1993; WADA; OHSUMI; ANRAKU, 1992), evidenciando a importância deste tipo de morte celular, que foi negligenciada pela comunidade científica por muito tempo.

**Figura 2** - Processo autofágico.



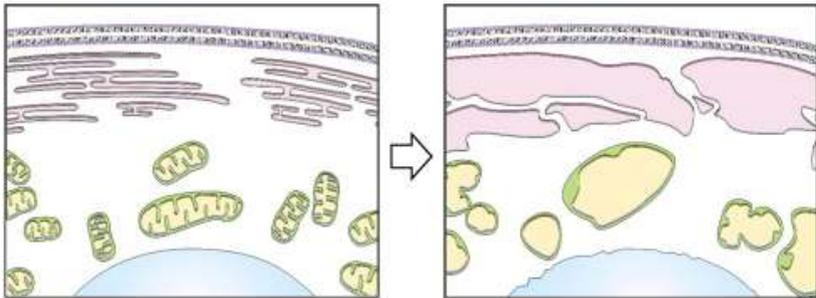
No processo autofágico, ocorre o englobamento de porções do citoplasma em estruturas denominadas de autofagossomas, contendo organelas e proteínas danificadas. Em seguida, esse material é reciclado através da atividade enzimática de hidrolases, provenientes da fusão com lisossomos, para reciclagem do seu conteúdo.

Fonte: adaptado de MELENDEZ; LEVINE (2009)

Apesar de não ser incomum que células tumorais, recebendo tratamento quimioterápico, iniciem o processo autofágico como mecanismo citoprotetor, existem relatos que sugerem a sua participação direta na morte celular (AKAR et al., 2008; SCARLATTI et al., 2008; SEONG et al., 2014). Para poder se afirmar a morte celular autofágica, foram propostos três critérios a serem seguidos: (1) a morte celular é independente de apoptose, (2) existe aumento no fluxo autofágico, (3) e a supressão farmacológica ou genética da autofagia é capaz de impedir a morte celular (SHEN; CODOGNO, 2011). Por isso, ao se investigar o mecanismo de indução de morte celular de um candidato a fármaco quando a autofagia está presente, deve-se perguntar se a autofagia exibe um comportamento pró-sobrevivência ou pró-morte.

A **paraptose** é outro tipo de morte celular (SPERANDIO; DE BELLE; BREDESEN, 2000), cujas características bioquímicas ainda carecem de elucidação. Morfologicamente, células em paraptose apresentam extensa vacuolização citoplasmática, oriundos do inchaço do retículo endoplasmático e/ou mitocôndrias (Figura 3) (LEE et al., 2016).

**Figura 3** - Alterações morfológicas do retículo endoplasmático e da mitocôndria durante a paraptose



Na paraptose, o acúmulo de proteínas malformadas/danificadas acarreta em estresse do retículo endoplasmático, resultando em alteração morfológica característica, com o inchaço dessa organela e da mitocôndria. Fonte: adaptado de LEE et al. (2016)

Essas alterações ocorrem após perturbação na proteostase celular, por inibição do sistema de degradação proteica dos proteossomos. Com isso, o acúmulo de proteínas malformadas e danificadas leva à geração de EROs, associada com o aumento da expressão de proteínas marcadoras de estresse do retículo endoplasmático (CHEN et al., 2008; LEE et al., 2015; YOON et al., 2010, 2012). Em relação às suas vias de ativação, a paraptose não parece estar relacionada com a apoptose, ocorrendo independente da ação de caspases ou do tratamento com inibidores de apoptose (YOON et al., 2010).

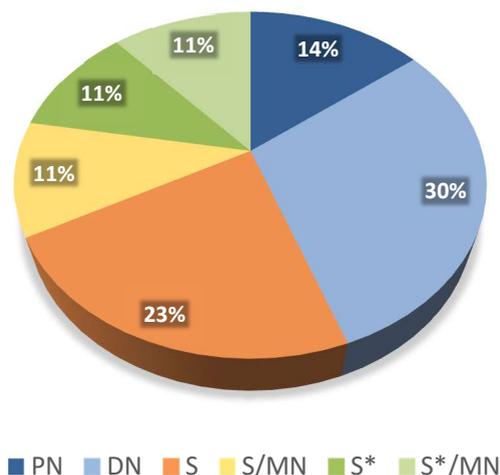
Apesar de não ser classificada como um tipo de morte celular, a **senescência** é um processo fisiológico que está envolvido no desfecho do tratamento quimioterápico (LOAIZA; DEMARIA, 2016). Descrita primeiramente por Hayflick e Moorhead em 1961 em fibroblastos humanos, ela é definida como uma condição celular onde ocorre a perda irreversível da capacidade de proliferação, prendendo as células na fase G1 do ciclo celular, mas mantendo-se metabolicamente ativas. Além disso, diferentes características estão associadas ao estado senescente, como acúmulo da enzima  $\beta$ -galactosidase nos lisossomos, aumento da expressão de genes supressores de tumor como p53 e p21, encurtamento dos telômeros, aparecimento de focos de heterocromatina e aumento geral da célula e do núcleo observável *in vitro* (KUILMAN et al., 2010). A senescência é iniciada geralmente após dano ao material genético, onde

dependendo da extensão desse dano, pode ser ativado o sistema de reparo ao DNA, o processo apoptótico ou a senescência, com o objetivo de impedir a perpetuação de mutações que poderiam dar origem à transformação maligna (GONZALEZ et al., 2016).

## 2.4 CONTRIBUIÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS AO ARSENAL QUIMIOTERÁPICO

Ao examinar a origem dos medicamentos prescritos por profissionais da saúde, verificou-se que os produtos naturais ou fármacos a eles relacionados são usados para tratar aproximadamente 87% de todas as doenças humanas, incluindo os antineoplásicos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossuppressores, entre outros (CHATTOPADHYAY; NAIK, 2007; CHIN et al., 2006; SAKLANI; KUTTY, 2008). Estudos recentes indicaram que dentre os 207 fármacos aprovados para o tratamento de câncer, de 1930 a 2014, 77% deles foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016) (Figura 4).

**Figura 4** - Origem dos medicamentos anticâncer aprovados para uso de 1930 a 2014



PN = produto natural inalterado; DN = derivado de produto natural; S = fármaco sintético; S\* = fármaco sintético com grupo farmacofórico derivado de produto natural; S/MN e S\*/MN = mimetizam produto natural. Fonte: NEWMAN; CRAGG (2016)

Nesse contexto, a biodiversidade brasileira proporciona inúmeras oportunidades para a inovação, caracterizando-se como um diferencial competitivo do Brasil. Contudo, é necessário criar condições e ambientes adequados à geração de negócios a partir da absorção dos conhecimentos etnofarmacológicos e científicos, como mencionado no Decreto nº 6.041 de 08/02/2007, que instituiu a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia (BRASIL, 2007). Portanto, a exploração desses recursos naturais é uma estratégia válida para o desenvolvimento de medicamentos inovadores especialmente se considerarmos que produtos naturais forneceram a base para o desenvolvimento da farmacoterapia moderna e de diversos novos fármacos introduzidos na terapêutica nos últimos anos (CRAGG; NEWMAN, 2013; NEWMAN; CRAGG, 2016; NEWMAN; GIDDINGS, 2014).

A potencialidade dos produtos naturais como possíveis fontes de novos fármacos para o tratamento do câncer tem sido demonstrada, principalmente, pelo fornecimento de um número significativo de substâncias ativas que chegaram à fase de ensaios clínicos, sendo que alguns dos compostos testados são, atualmente, empregados na clínica, como é o caso dos alcaloides da vinca e seus derivados, e de compostos terpênicos como o paclitaxel, os quais são amplamente empregados no tratamento de diversos tipos de câncer (SCHENKEL; GOSMANN; PETROVICK, 2010).

## 2.5 *Cecropia pachystachya*

Dentre as diferentes espécies de plantas utilizadas na medicina popular brasileira, podemos citar as espécies do gênero *Cecropia*, pertencente à família Urticaceae. Suas árvores compreendem cerca de 100 espécies de ocorrência na América Tropical, com destaque para Argentina, Brasil, México e Paraguai (BERG; ROSSELLI, 2005). No território brasileiro, mais de 50 espécies deste gênero podem ser encontradas, sendo *C. glaziovii* e *C. pachystachya* as espécies de maior ocorrência nas regiões sul e sudeste do Brasil (COSTA et al., 2011; PIO CORRÊA, 1978). São conhecidas por diferentes nomes populares, como embaúba, imbaúba, umbaúba e embaúva, derivados da palavra “ambaíba”, que na língua Tupi significa tronco oco (BERG; ROSSELLI, 2005).

Devido à coloração prateada do dorso de suas folhas (Figura 5), *C. pachystachya* é conhecida popularmente como embaúba prateada,

atingindo alturas que variam entre 4 a 7 metros, com tronco de 15 a 25 cm de diâmetro (JORGE; MARKMAN; FERRO, 1998).

Estudos etnofarmacológicos revelaram que a população utiliza a infusão de suas folhas para curar doenças do pulmão, açúcar no sangue, pressão alta (COSTA; SCHENKEL; REGINATTO, 2011; LORENZI; MATOS, 2002), doenças dos rins (RIBEIRO et al., 2014), tosse (BRITO; SENNA-VALE, 2011) e gordura no sangue (SILVA, M.A.B. et al., 2010).

**Figura 5** - Folhas de *Cecropia pachystachya*



Folhas de árvores adultas de *Cecropia pachystachya*. As folhas possuem cerca de 30 cm de diâmetro e são digitadas, contendo de 7 a 10 lobos. O dorso possui coloração prateada, característica que a diferencia das demais espécies do seu gênero. Fonte: SAUERESSIG (2012)

Considerando os estudos científicos em relação às propriedades farmacológicas de *C. pachystachya*, foram relatados estudos pré-clínicos para diversas atividades, tais como anti-hipertensiva (CONSOLINI; MIGLIORI, 2005), cardiotônica e sedativa (CONSOLINI et al., 2006), anti-inflamatória (ARAGÃO et al., 2013; HIKAWCZUK et al., 1998; PACHECO et al., 2014; SCHINELLA et al., 2008), antinociceptiva (ARAGÃO et al., 2013), citotóxica (ARAGÃO et al., 2013; PRÍNCIPE ROSALINA; SPIRA, 2009), antioxidante (ARAGÃO et al., 2010; FARIAS et al., 2013; PACHECO et al., 2014; VELAZQUEZ et al.,

2003), antiviral (RUFFA et al., 2004), hipoglicemiante (ARAGÃO et al., 2010), antiparasitária (CRUZ et al., 2013; UCHÔA et al., 2010), antígenotóxica (MENDONÇA et al., 2016), antiespasmódica (MATERA et al., 2016), antidepressiva (GAZAL et al., 2014; ORTMANN et al., 2016), cicatrizante (DUQUE et al., 2016), neuroprotetora (GAZAL et al., 2015; ORTMANN et al., 2016), nefroprotetora (MAQUIAVELI et al., 2014), inibidora de *quorum-sensing* (BRANGO-VANEGAS et al., 2014) e antibacteriana (SOUZA et al., 2014).

Em relação à sua constituição química, já foi relatada a presença de diferentes compostos como flavonoides (ARAGÃO et al., 2010; COSTA et al., 2011), proantocianidinas (LACAILLE-DUBOIS; FRANCK; WAGNER, 2001) e terpenoides como ácidos ursólico (HIKAWCZUK et al., 1998), pomólico, oleanólico e tormêntico,  $\beta$ -sitosterol, sitosterona e  $\alpha$ -amirina (HIKAWCZUK et al., 1998; UCHÔA et al., 2010).

Contudo, a maioria dos estudos realizados com espécies do gênero *Cecropia* é focada na investigação das propriedades farmacológicas de **extratos polares** ricos em flavonoides C-glicosilados. Dentre esses podem ser citados os trabalhos de Brango-Vanegas e colaboradores (2014), Costa e colaboradores (2011), Pacheco e colaboradores (2014), Silva e colaboradores (2010), que identificaram como compostos majoritários de espécies de *Cecropia*, os flavonoides C-glicosilados: vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina.

De forma contrária, a triagem citotóxica de um **extrato apolar** de *C. pachystachya* contendo triterpenos, realizada no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, apresentou atividade promissora frente a diferentes linhagens de células tumorais (KRATZ et al., 2013), o que motivou a investigação do seu mecanismo de ação citotóxico e, conseqüentemente, o desenvolvimento dessa dissertação.

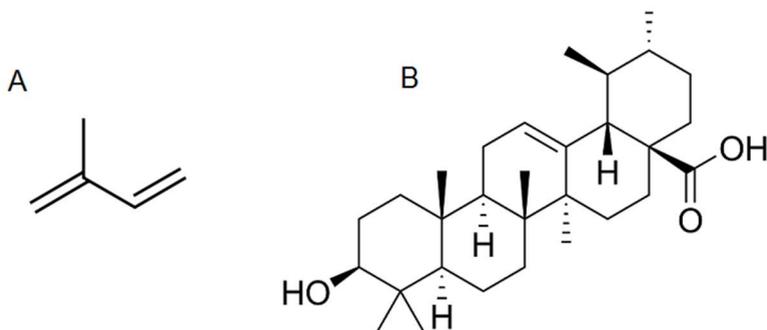
## 2.6 TERPENOIDES

Os terpenoides (classe de compostos presentes na planta estudada nesta dissertação) representam um grande grupo de metabólitos secundários, de ampla distribuição no reino vegetal, com elevado potencial terapêutico como agente anticâncer (CHUDZIK; KORZONEK-SZLACHETA; KRÓL, 2015; CONNOLLY; HILL, 2010; FERNANDES et al., 2003; PATLOLLA; RAO, 2012; YOSHIDA et al., 2005).

Em relação à sua estrutura química, os terpenoides são classificados em relação à quantidade de unidades de isopreno ( $C_5H_8$ , Figura 6A) que os compõem, pela chamada “regra do isopreno”. Assim,

é possível separá-los em hemiterpenos (C<sub>5</sub>), monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>), tetraterpenos (C<sub>40</sub>) e politerpenos (THIMMAPPA et al., 2014).

**Figura 6** - Estrutura química da molécula de isopreno e de um triterpeno



A – Isopreno, a unidade estrutural que compõe os terpenoides. B – Ácido ursólico, um exemplo de triterpeno pentacíclico com atividade antitumoral.

Os triterpenos (C<sub>30</sub>, Figura 6B), constituídos de seis unidades de isopreno, podem apresentar-se acíclicos (sendo o esqualeno seu representante com a molécula mais simples) ou contendo estrutura mono-, bi-, tri-, tetra- e pentacíclica. A título ilustrativo, pode-se citar que aproximadamente 20.000 triterpenos já foram isolados e identificados de várias plantas medicinais, sendo os compostos tetracíclicos e pentacíclicos os mais extensivamente investigados em relação às suas atividades farmacológicas (SHANMUGAM et al., 2012).

Considerando os estudos farmacológicos, foram isolados triterpenos de *C. pachystachya*, tais como o ácido pomólico e  $\beta$ -sitosterol, que foram estudados em relação à sua atividade antimalárica, apresentando resultados promissores *in vivo*, reduzindo a parasitemia em camundongos (UCHÔA et al., 2010). Além disso, o ácido pomólico apresentou efeito anti-inflamatório, inibindo o edema de pata em camundongos provocado pela carragenina. A atividade imunomoduladora foi relacionada à diminuição da expressão da interleucina-1 $\beta$ , como também pela indução de apoptose em células polimorfonucleares, majoritariamente neutrófilos. A indução desse tipo de morte foi avaliada pela exposição da fosfatidilserina na membrana plasmática e pela fragmentação nuclear (SCHINELLA et al., 2008).

Dentre os triterpenos tetracíclicos de ocorrência natural destacam-se as cucurbitacinas, compostos que vêm sendo investigados mundialmente (ABBAS et al., 2013; DING et al., 2011; ISHDORJ; JOHNSTON; GIBSON, 2011; ISHII et al., 2013; KAUSAR et al., 2013; LEE; IWANSKI; THOENNISSSEN, 2010; PROMKAN et al., 2013; RIOS et al., 2012; SIQUEIRA et al., 2009; SUN et al., 2010; TAKAHASHI et al., 2009; THOENNISSSEN et al., 2009; WAKIMOTO et al., 2008; ZHANG et al., 2010, 2011) e também por nosso grupo de pesquisa devido aos seus potentes efeitos citotóxicos e ação antitumoral (LANG et al., 2011, 2012, 2014; SILVA, 2013; SILVA et al., 2013, 2015; SILVA, I. et al., 2016). Com base nestes resultados, a coorientadora desta dissertação determinou o mecanismo da ação citotóxica de uma das cucurbitacinas mais ativas (SILVA, 2013; SILVA et al., 2013, 2015; SILVA, I. et al., 2016), corroborando o potencial dos compostos triterpênicos como agentes antitumorais.

Mais especificamente em relação ao câncer de próstata, diversos trabalhos já foram realizados por meio da triagem da ação citotóxica de diferentes triterpenos em linhagens tumorais de próstata: ácido ursólico nas linhagens PC-3, DU 145 e LNCaP (MENG et al., 2015; PARK et al., 2013), bacopasídeo na linhagem PC-3M, uma linhagem derivada de PC-3 com atividade metastática diferenciada (PENG et al., 2010), derivados dos ácidos ursólico e betulínico na linhagem PC-3 (BAI et al., 2012; GAUTHIER et al., 2009), derivados de saponinas na linhagem DU 145 (ZHAO et al., 2011), triterpenos isolados de *Poria cocos* na linhagem PC-3 (ZHOU et al., 2008), triterpenos isolados de *Polycarpaea corymbosa* na linhagem DU 145 (MANASE et al., 2014), entre outros.

Dentre os triterpenos citados, o ácido ursólico e seus derivados semissintéticos foram os únicos que tiveram seus mecanismos de ação citotóxica estudados frente a linhagens celulares de câncer de próstata. O achado mais comum foi a indução de apoptose, acompanhada da diminuição da expressão de proteínas antiapoptóticas, tais como Bcl-2 e Bcl-xl, e indução da expressão de proteínas pró-apoptóticas, tal como a caspase-3 clivada (BAI et al., 2012; MENG et al., 2015; PARK et al., 2013).

Considerando a atividade promissora do extrato apolar de *C. pachystachya*, foi levantada a hipótese de que amostras obtidas desta espécie vegetal poderiam apresentar atividade citotóxica contra diferentes linhagens celulares tumorais humanas, e que esse efeito estaria relacionado majoritariamente com o seu conteúdo triterpênico. Os experimentos para avaliação desta hipótese, juntamente com seus resultados, estão descritos a seguir.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBJETO DE ESTUDO

Exemplares de *Cecropia pachystachya* foram coletados e identificados e suas folhas foram colhidas pelo Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto no município de Torres (RS), coordenadas geográficas 29°29'21.9"S 49°52'07.5"W, no mês de janeiro de 2016. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Santa Catarina (FLOR 150025).

Os extratos e frações testados foram fornecidos pelo grupo de pesquisa coordenado pelo mesmo professor, tendo sido obtidos pela aluna do Curso de Graduação em Farmácia, Pâmela de Carvalho, no Laboratório de Farmacognosia da UFSC, a quem agradecemos a parceria.

Resumidamente, folhas secas de *C. pachystachya* foram maceradas com diclorometano:metanol (1:1 v/v) para obtenção do extrato bruto (EB). Após, foi realizada a filtração em coluna de carvão ativado:sílica (2:1 m/m), dando origem ao extrato filtrado (EF), seguido de extração líquido-líquido com solução de hidróxido de potássio 1%, até a obtenção das frações aquosa (FA) e orgânica (FO). As amostras foram então secas por meio de evaporador rotatório.

A presença de triterpenos na FO foi confirmada por cromatografia em camada delgada (CCD), comparando-se os valores de R<sub>f</sub> das amostras com os dos padrões de triterpenos disponíveis (ácidos ursólico, oleanico e lupeol). Por fim, o EB, EF, FA e FO foram testados em relação à sua citotoxicidade frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas na primeira etapa desse trabalho.

Em etapa posterior, por ter sido a mais ativa na triagem citotóxica, a FO foi submetida a técnicas cromatográficas para enriquecimento do seu conteúdo triterpênico. Foram realizadas sucessivas cromatografias em coluna, tendo sido coletadas diferentes subfrações, que foram analisadas por CCD para visualização dos seus perfis triterpênicos. As amostras que apresentaram os mesmos perfis cromatográficos foram reunidas gerando quatro subfrações, que foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A subfração que não apresentou absorvância em 340 nm (comprimento de onda referente à compostos fenólicos) e apresentou maior absorvância em 207 nm (comprimento de onda com pico de absorção para triterpenos) foi selecionada para os estudos posteriores, e definida como fração enriquecida em triterpenos (FET). Além dela, foi selecionada uma fração sem conteúdo triterpênico (fração pobre em triterpenos - FPT).

Todas as amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 50 mg/mL, e testadas de modo que não fosse ultrapassada a concentração de 1% de DMSO.

## 4.2 CULTIVO CELULAR

As linhagens tumorais humanas utilizadas neste trabalho foram as seguintes: A549 (adenocarcinoma de pulmão) e LNCaP (adenocarcinoma de próstata sensível à terapia antiandrogênica) adquiridas do ATCC® (*American Type Culture Collection*); RD (rabdiosarcoma) adquirida do Instituto Aldolfo Lutz, São Paulo; DU 145 e PC-3 (adenocarcinomas de próstata insensíveis à terapia antiandrogênica, com diferentes potenciais metastáticos) adquiridas do DSMZ® (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*, Braunschweig, Alemanha) e HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal) obtida de *Texas A&M University System*, EUA; além de cultura primária de fibroblastos de gengiva humana não-tumorais isolados pela Dr<sup>a</sup>. Ariadne Cruz, que realizou seu Doutorado no mesmo laboratório onde este trabalho foi desenvolvido.

As linhagens celulares A549 e RD foram cultivadas em Meio MEM (Cultilab®), HCT-8 foi cultivada em Meio RPMI 1640 (Gibco®), LNCaP e DU 145 foram cultivadas em Meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol (Gibco®); PC-3 foi cultivada em Meio DMEM sem vermelho de fenol (Gibco®), e os fibroblastos de gengiva foram cultivados em Meio DMEM (Gibco®). Todos os meios foram suplementados com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco®), e as células mantidas em frascos de cultura a 37 °C, em atmosfera umedecida de 5% de CO<sub>2</sub>.

Todas as linhagens celulares foram rotineiramente testadas para garantir ausência de contaminação por bactérias, fungos, leveduras e micoplasmas.

## 4.3 TRIAGEM CITOTÓXICA PELO ENSAIO COM SULFORRODAMINA B

A sulforrodamina B é um corante solúvel em água que em meio ácido possui afinidade por resíduos de aminoácidos básicos presentes em proteínas. É um indicador quantitativo do conteúdo proteico, sendo diretamente proporcional à viabilidade celular (SKEHEN et al., 1990). Este procedimento foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Vichai e Kirtikara (2006) e padronizada no nosso laboratório por Silva (2009). Assim, suspensões de cada linhagem celular foram distribuídas

em placas de 96 cavidades ( $1 \times 10^4$  células/cavidade) e incubadas por 24 h, a 37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub>. Após 24 h, o meio de cultivo foi adicionado com as diferentes amostras (EB, EF, FA e FO), além dos controles positivos paclitaxel, cisplatina e irinotecano, em diferentes concentrações, através de diluições seriadas na razão 1:2, e a placa foi incubada por 48 h. Depois desse período, foi adicionado em cada cavidade solução a 10% do ácido tricloroacético para fixação das células. Essa solução foi então removida e substituída pela solução ácida de sulforrodamina B, mantida por 30 min em temperatura ambiente.

Após esse período, foi adicionado solução de Tris base 10 mM, em cada cavidade, para dissolver a sulforrodamina B ligada às proteínas celulares. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro Molecular Devices® modelo SpectraMax® M2<sup>e</sup>, a 510 nm.

Os valores de absorbância medidos para cada concentração de cada amostra testada foram transformados em porcentagens de viabilidade (X%), em relação aos controles celulares, os quais são considerados 100% viáveis. Em seguida, os percentuais de viabilidade foram transferidos para o software de estatística GraphPad Prism 6, e, através de análise de regressão não linear, foi possível calcular os valores de CC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de cada amostra que reduz em 50% a viabilidade celular. Os valores de CC<sub>50</sub> calculados representam a média de três experimentos independentes e foram expressos com seus respectivos intervalos de confiança de 95%.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA SELETIVIDADE

A seletividade das amostras de *C. pachystachya*, em cultura primária de fibroblastos de gengiva humana não-tumoral, foi avaliada pelo método da sulforrodamina B, conforme descrito acima. Em seguida, de posse dos valores de CC<sub>50</sub> de cada amostra para cada linhagem tumoral e do valor de CC<sub>50</sub> para a linhagem saudável, foi possível calcular o Índice de Seletividade (IS), de acordo com a seguinte fórmula:

$$IS = \frac{CC_{50}Fib}{CC_{50}Tum} ;$$

onde CC<sub>50</sub>Fib equivale ao valor de CC<sub>50</sub> de uma amostra para os fibroblastos saudáveis, e CC<sub>50</sub>Tum equivale ao valor de CC<sub>50</sub> da mesma amostra para cada linhagem tumoral (SILVA, 2009).

#### 4.5 ANÁLISE DA MORFOMETRIA NUCLEAR

Neste ensaio, que foi realizado de acordo com Filippi-Chiela e colaboradores (2012), células PC-3 foram semeadas em baixa densidade em placas de 12 cavidades e mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> durante 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com duas concentrações de FET (uma vez e duas vezes o valor da CC<sub>50</sub>), na ausência ou presença do pré-tratamento com o pan-inibidor de caspases Z-VAD 50 µM. Após 48 h, as células foram fixadas na placa com paraformaldeído 4% e coradas com solução de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1 µg/mL além de contra-coloração com laranja de acridina 1 µg/mL. Com o auxílio de microscopia de fluorescência (Olympus, modelo IX71), foram obtidas imagens contendo no mínimo 100 núcleos de cada tratamento. Por fim, as imagens foram analisadas com o software Image-Pro Plus 6.0, e os valores de área e índice de irregularidade foram plotados em um gráfico, com a delimitação das regiões para cada categoria de padrão nuclear.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE SENESCÊNCIA

Para tal, foi realizada a metodologia proposta por Filippi-Chiela (2015). Células PC-3 foram semeadas em placas de 12 cavidades e tratadas com duas concentrações de FET (uma vez e duas vezes o valor da CC<sub>50</sub>) durante 48 h. Após, as células remanescentes foram replaqueadas e mantidas em estufa durante sete dias. Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, lavadas com PBS, e marcadas com uma solução de 5-bromo-4-cloro-3 indolil-galactopiranosídeo (X-gal) a 1 mg/mL, 40 mM de ácido cítrico/tampão fosfato pH 6,0, 150 mM de NaCl, 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de K<sub>3</sub>FeCN<sub>6</sub> e 5 mM de K<sub>4</sub>FeCN<sub>6</sub>. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C durante 12 h, e após procedeu-se a contagem, em microscópio invertido, das células coradas em azul. Os resultados foram expressos como porcentagens das células coradas em comparação com o total de células no campo.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE PARAPTOSE

Para avaliar a indução de paraptose, foi utilizado um inibidor deste tipo de morte celular, a cicloheximida (Sigma). Neste ensaio, cujo protocolo foi adaptado de Zhang e colaboradores (2015), células PC-3

foram semeadas em placas de 96 cavidades, tratadas com duas concentrações de FET (uma vez e duas vezes o valor da  $CC_{50}$ ), na presença ou ausência do pré-tratamento com cicloheximida 0,3  $\mu\text{M}$  uma hora antes. Após 48 h do tratamento, o meio de cultivo foi removido e adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de MTT (brometo de [3 (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio]) (1 mg/mL) em cada cavidade, seguido de incubação por 4 h em estufa a 37 °C. Após, o sobrenadante foi removido e adicionou-se DMSO a fim de dissolver os cristais de formazana formados pela ação de enzimas redutoras presentes nas mitocôndrias de células viáveis. Por fim, a absorbância de cada cavidade foi medida utilizando espectrofotômetro Molecular Devices® modelo SpectraMax® M2 com leitura a 540 nm.

#### 4.8 ANÁLISE DO CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Placas de seis cavidades foram semeadas com uma suspensão de células PC-3 e mantidas em estufa a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 h. Em seguida, as células foram tratadas com duas concentrações de FET (uma vez e duas vezes o valor da  $CC_{50}$ ), além de um controle celular não tratado. Após 48 h, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) e fixadas com uma solução de metanol 90% em PBS à -20 °C durante 24 h. Em seguida, a solução fixadora foi removida por centrifugação (1000 Xg), as células foram lavadas com PBS seguido de lavagem com solução de PBS + SFB 2%, EDTA 2 mM,  $\text{NaN}_3$  0,05% (FACS PBS). As células foram então marcadas com uma solução de Iodeto de Propídeo (PI 50  $\mu\text{g/mL}$ , RNase 100  $\mu\text{g/mL}$ , citrato de sódio 0,1%), e mantidas em geladeira ao abrigo da luz durante no mínimo 2 h. Por fim, a suspensão celular foi analisada em citômetro de fluxo BD FACSCanto™ II, com leitura nos filtros PE e PerCP (SILVA, 2013).

#### 4.9 EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM Z-VAD SOBRE A MORTE CELULAR

Para verificar o envolvimento da ação de caspases, e possivelmente de indução de apoptose sobre o efeito citotóxico da FET, foi realizado o ensaio da sulforrodamina B em células PC-3 pré-tratadas ou não com Z-VAD juntamente com FET, em diferentes concentrações (metade, uma vez e duas vezes o valor da  $CC_{50}$ ). O restante do experimento seguiu a metodologia descrita no item 4.3.

#### 4.10 ANÁLISE DA INDUÇÃO DE APOPTOSE OU NECROSE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Para tal ensaio, adaptado de Silva (2013), placas de seis cavidades foram semeadas com células PC-3 e mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h. Após, as células foram tratadas durante 48 h com duas concentrações de FET (uma vez e duas vezes o valor da CC<sub>50</sub>), na presença ou ausência de Z-VAD 50 µM. Após, as células foram lavadas com PBS e em seguida com FACS PBS. Por fim, as células foram ressuspendidas em tampão de ligação, marcadas com Anexina V e PI, e incubadas durante 15 min ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A análise em citometria de fluxo foi realizada nos filtros de leitura FITC, PE e PerCP.

#### 4.11 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO CITOESQUELETO

A organização dos filamentos de actina foi avaliada por meio de microscopia de fluorescência utilizando o corante rodamina-faloidina e também por imunofluorescência, descritas a seguir (MAROSTICA et al., 2015).

Células PC-3 foram semeadas em placas de 12 cavidades, e mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h. Após, as células foram tratadas com duas concentrações de FET (uma vez e duas vezes o valor da CC<sub>50</sub>) durante 48 h. Em seguida, as células foram fixadas com solução de paraformaldeído 4%, permeabilizadas com triton-X 0,1%, e coradas com solução de rodamina-faloidina. Por fim, as células foram visualizadas e fotografadas com o auxílio de microscópio invertido de fluorescência (Olympus®, modelo IX71).

Para análise de imunofluorescência, a metodologia seguiu os mesmos passos do experimento anterior. Após a permeabilização das células com Triton-X 0,1%, foi realizada uma incubação durante a noite com um anticorpo monoclonal de camundongo anti  $\alpha$ -actina (Sigma). Após sucessivas lavagens, foi realizada uma segunda incubação com anticorpo secundário anti-camundongo conjugado ao FITC durante 2 h, para em seguida as células serem fotografadas em microscopia de fluorescência (Olympus, modelo IX71).

#### 4.12 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL POR CITOMETRIA DE FLUXO

Neste experimento, realizado de acordo com o protocolo do fabricante do kit comercial MitoStatus TMRE (BD Pharmigen™), placas de seis cavidades foram semeadas com células PC-3 e mantidas em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> durante 24 h. Após, as células foram tratadas com duas concentrações de FET (uma vez e duas vezes o valor da CC<sub>50</sub>), na presença ou ausência de N-acetilcisteína (NAC) 500 µM, durante 48 h. Em seguida, foi adicionado ao meio de cultivo, o corante MitoStatus TMRE na concentração de 2 µM, seguido de incubação da placa a 37 °C, protegida da luz durante 30 min. O meio de cultivo foi então reservado, as células foram coletadas da placa por tripsinização e a suspensão celular adicionada ao seu respectivo meio. Procedeu-se a lavagem duas vezes com FACS PBS e as células foram ressuspensas na mesma solução. Por fim, a análise em citômetro de fluxo foi realizada nos filtros de leitura PE e PerCP.

#### 4.13 AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) NA CITOTOXICIDADE

A participação de EROs na citotoxicidade induzida por FET foi avaliada pelo cotratamento das células PC-3 com NAC e L-butionina-S-sulfoxamina (BSO), que são compostos anti- e pró-oxidantes, respectivamente. O efeito citotóxico foi avaliado pelo método da sulforrodamina B (MAROSTICA et al., 2015), em diferentes concentrações de FET (metade, uma vez e duas vezes o valor da CC<sub>50</sub>) na ausência e presença de NAC 500 µM e BSO 10 µM.

#### 4.14 AVALIAÇÃO DO EFEITO NA MIGRAÇÃO CELULAR

O efeito antimigratório da FET sobre as células PC-3 foi avaliado através do ensaio do *scratch*, com metodologia adaptada de Geller (2012). Neste experimento, a suspensão celular foi distribuída em placas de 12 cavidades, na concentração de 2,0 x 10<sup>5</sup> células/cavidade. Após a formação de um tapete celular denso, uma ferida artificial (*scratch*) foi gerada na monocamada celular, com o auxílio de uma ponta de ponteira estéril. Em seguida, as cavidades foram tratadas com FET em concentrações não citotóxicas (um quarto, metade e uma vez o valor da CC<sub>50</sub>). Este espaço foi fotografado logo após o tratamento e 16 h depois (tempo em que a ferida artificial era quase totalmente fechada), a fim de

se estimar quantitativamente a migração de células na área artificialmente lesada. A análise dos dados foi realizada através do software ImageJ, tendo sido calculados os percentuais de migração em relação aos controles.

#### 4.15 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE DUPLICAÇÃO CUMULATIVA DE POPULAÇÕES CELULARES (*CUMULATIVE POPULATION DOUBLING*, CPD)

Neste ensaio, células PC-3 foram tratadas com duas concentrações de FET (uma vez e duas vezes o valor da  $CC_{50}$ ) durante 48 h. Em seguida, 50.000 células viáveis, que sobreviveram ao tratamento prévio, foram replaqueadas e avaliadas durante 21 dias. A cada três dias, as células foram tripsinizadas, contadas, e a cinética de crescimento das células foi determinada. Após, foi plotado um gráfico da PD (*population doubling*) em função do tempo, a fim de facilitar a visualização do momento que as células tumorais resistentes ao tratamento readquiriram ou não capacidade proliferativa (FILIPPI-CHIELA et al., 2015).

#### 4.16 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA CLONOGÊNICA

Para tal, células PC-3 foram semeadas em placas de seis cavidades e tratadas com duas concentrações de FET (uma vez e duas vezes o valor da  $CC_{50}$ ) durante 48 h. Após, foram replaqueadas 100 células vivas de cada grupo experimental, e mantidas em cultivo durante 14 dias. Em seguida, o meio de cultura foi removido, as placas coradas com solução de cristal violeta a 0,5%, e as colônias formadas foram contadas utilizando um estereomicroscópio (Olympus®). Os resultados estão expressos como porcentagens de colônias formadas em cada grupo experimental, em relação ao controle celular não tratado (FILIPPI-CHIELA et al., 2013).

#### 4.17 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA seguida do *post* teste de Dunnett ou, quando oportuno, pelo teste *t* de Student (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ ). Os cálculos foram realizados com GraphPad Prism® software versão 6.01 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 TRIAGEM CITOTÓXICA

Os resultados da triagem inicial do potencial citotóxico de extratos e frações de *C. pachystachya* em diferentes linhagens celulares tumorais estão dispostos na Tabela 1. Como é possível visualizar, para todas as linhagens do estudo (com exceção da LNCaP), a fração orgânica foi a amostra mais ativa, demonstrado pelos menores valores de  $CC_{50}$ . Embora os índices de seletividade (tabela 2) para o EB e EF tenham se mostrado superiores quando comparados aos da FO, o baixo potencial em induzir toxicidade frente às linhagens tumorais testadas (representada pelos elevados valores de  $CC_{50}$ ) levaram a descontinuidade do estudo com os EB e EF.

**Tabela 1** - Triagem citotóxica de amostras de *Cecropia pachystachya* em diferentes linhagens celulares tumorais (resultados expressos em  $CC_{50}$   $\mu\text{g/mL}$  e intervalo de confiança de 95%).

Linhagem celular	Amostras			
	EB	EF	FA	FO
RD	<b>216,9</b> (144,3 - 325,8)	<b>154,1</b> (141,1 - 168,3)	>500	<b>51,93</b> (41,34 - 65,22)
A549	<b>164,3</b> (143,1 - 188,6)	<b>154,7</b> (141,8 - 168,7)	>500	<b>86,12</b> (74,11 - 100,1)
PC-3	<b>681,8</b> (427,9 - 1086)	<b>295,2</b> (277,9 - 313,6)	>500	<b>70,85</b> (64,92 - 77,32)
DU 145	<b>295,3</b> (254,0 - 343,3)	<b>168,3</b> (162,6 - 174,3)	>500	<b>107,6</b> (98,45 - 117,7)
LNCaP	<b>34,14</b> (24,06 - 48,45)	<b>55,08</b> (41,95 - 72,30)	>500	<b>97,43</b> (78,84 - 120,4)
HCT-8	<b>357,4</b> (266,4 - 479,5)	<b>185,3</b> (167,5 - 204,9)	>500	<b>77,55</b> (68,82 - 87,39)

EB = extrato bruto; EF = extrato filtrado; FA = fração aquosa; FO = fração orgânica; RD = rabdomiosarcoma; A549 = adenocarcinoma de pulmão; PC-3 e DU 145 = adenocarcinoma de próstata insensível à terapia antiandrogênica; LNCaP = adenocarcinoma de próstata sensível à terapia antiandrogênica; HCT-8 = adenocarcinoma ileocecal.

Dentre as linhagens tumorais que foram mais sensíveis ao tratamento com a FO, destacam-se RD e PC-3. Porém, apesar da primeira ter se mostrado mais sensível ao tratamento, a linhagem de próstata foi escolhida devido à elevada incidência deste tipo de câncer em nível mundial (BRASIL/INCA, 2016), justificando a importância do seguimento do estudo com esta linhagem tumoral.

**Tabela 2** - Índices de seletividade de amostras de *Cecropia pachystachya* em diferentes linhagens celulares tumorais em relação à cultura primária de fibroblastos saudáveis de gengiva.

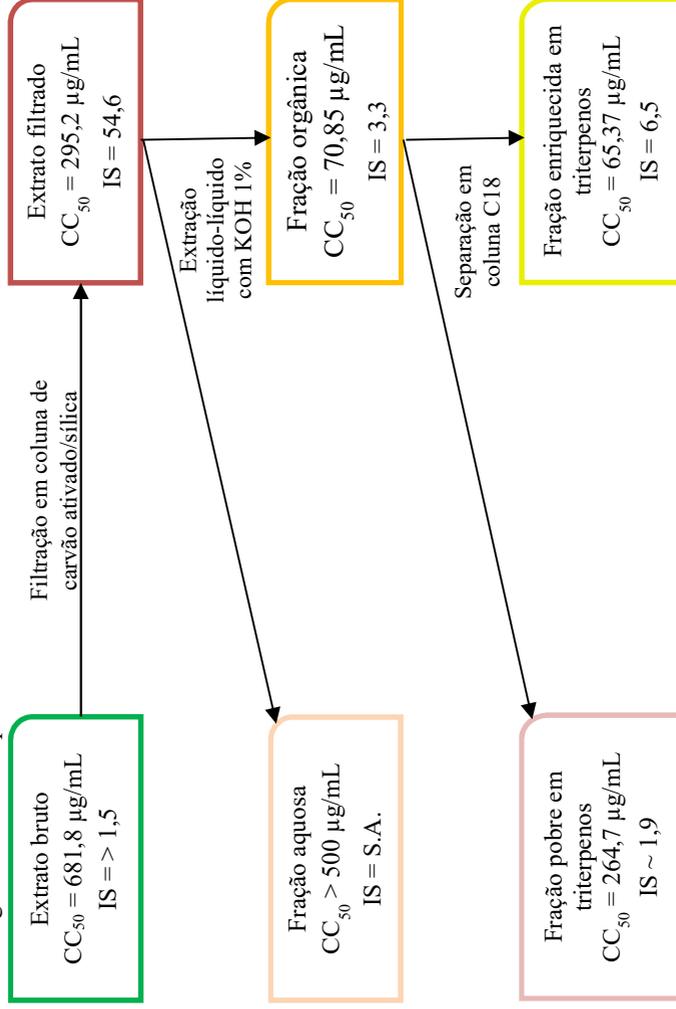
Linhagem celular	Amostras			
	EB	EF	FA	FO
RD	> 4,6	104,6	S.A.	4,5
A549	> 6,1	104,2	S.A.	2,7
PC-3	> 1,5	54,6	S.A.	3,3
DU 145	> 3,4	95,8	S.A.	2,2
LNCaP	> 29,3	292,6	S.A.	2,4
HCT-8	> 2,8	87,0	S.A.	3,0

EB = extrato bruto; EF = extrato filtrado; FA = fração aquosa; FO = fração orgânica; RD = rabdomiosarcoma; A549 = adenocarcinoma de pulmão; PC-3 e DU 145 = adenocarcinoma de próstata insensível à terapia antiandrogênica; LNCaP = adenocarcinoma de próstata sensível à terapia antiandrogênica; HCT-8 = adenocarcinoma ileocecal; S.A. = sem atividade. Os índices de seletividade foram calculados de acordo com a fórmula:  $IS = CC_{50}Fib / CC_{50}Tum$ ; onde  $CC_{50}Fib$  equivale à  $CC_{50}$  de cada amostra para os fibroblastos de gengiva, enquanto que  $CC_{50}Tum$  equivale à  $CC_{50}$  da mesma amostra para dada linhagem tumoral. Os valores de  $CC_{50}$  para a linhagem de fibroblastos são: EB > 1000 µg/mL; EF = 16118 µg/mL; FA = 12153 µg/mL; FO = 234,5 µg/mL.

Após selecionar a linhagem tumoral (PC-3) e a amostra de *C. pachystachya* mais ativa (FO), foi iniciada a segunda etapa do estudo que consistiu na elucidação dos processos celulares envolvidos na citotoxicidade induzida pela amostra. Para isso, deu-se início ao processo de purificação da FO. A fim de se obter uma amostra com maior concentração de triterpenos, foram empregadas técnicas cromatográficas para particionar a fração orgânica de *C. pachystachya* em diferentes subfrações, e isolou-se aquela com menor concentração de compostos

fenólicos e maior concentração de triterpenos. A esta subfração deu-se o nome de fração enriquecida em triterpenos (FET), que foi escolhida para o seguimento dos estudos de determinação de mecanismo de ação citotóxica em células PC-3. Além dessa fração, outra amostra com escasso conteúdo triterpênico (FPT) originada da FO foi purificada para comparação do efeito citotóxico. A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio da sulforrodamina B obtendo-se valores de  $CC_{50}$  de 65,37  $\mu\text{g/mL}$  para a FET e de 264,7  $\mu\text{g/mL}$  para a FPT. Esses resultados corroboram a hipótese de que os triterpenos sejam os responsáveis majoritários pelos efeitos citotóxicos observados na linhagem PC-3. Um resumo do fracionamento biomonitorado das amostras de *C. pachystachya* em relação à atividade citotóxica em células PC-3 está compilado na Figura 7.

**Figura 7** – Fluxograma de obtenção das amostras de *Cecropia pachystachya* com seus respectivos valores de  $CC_{50}$  e índice de seletividade para a linhagem de tumor de próstata PC-3.



CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica 50%; IS = índice de seletividade; S.A. = sem atividade

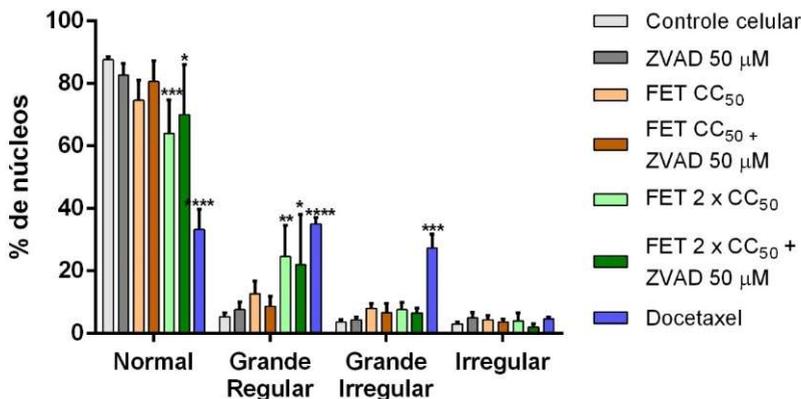
## 5.2 ELUCIDAÇÃO DO MECANISMO DE MORTE CELULAR

### 5.2.1 Análise da morfometria nuclear

Com a escolha da linhagem para seguimento de experimentos (PC-3) e da amostra mais ativa (FET), pode-se dar início à segunda fase do estudo: elucidação do mecanismo de indução de morte celular *in vitro*. A análise da morfometria nuclear foi utilizada como ensaio de triagem para diferentes tipos de morte celular e eventos relacionados. Essa metodologia foi desenvolvida por Filippi-Chiela e colaboradores (2012), correlacionando o tamanho e irregularidade morfológica do núcleo com diferentes estágios do ciclo celular e tipos de morte. De acordo com esses dois parâmetros, cada núcleo pode ser classificado em sete categorias: **normal** (células em intérfase), **irregular** (catástrofe mitótica ou outro evento com dano nuclear), **pequeno e regular** (apoptose em estágio inicial ou intermediário), **pequeno** (mitose), **pequeno e irregular** (mitose com dano nuclear ou fragmentos de núcleo), **grande e regular** (senescência) ou **grande e irregular** (catástrofe mitótica ou outro evento com dano nuclear).

Os resultados deste ensaio estão mostrados na Figura 8. Após o tratamento com a FET no dobro do seu valor de  $CC_{50}$ , houve aumento da população de células com núcleos grandes e regulares, característico de células senescentes, efeito não revertido pelo pré-tratamento com Z-VAD, o que corrobora a não participação de caspases neste efeito. As populações celulares com núcleos pequenos e regulares, pequenos, e pequenos e irregulares (característicos de apoptose, mitose e mitose com danos ou fragmentação nuclear, respectivamente) não representaram mais de 1% do total, nas condições experimentais testadas, tendo sido excluídas de representação no gráfico da Figura 8.

**Figura 8** - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a morfometria nuclear.



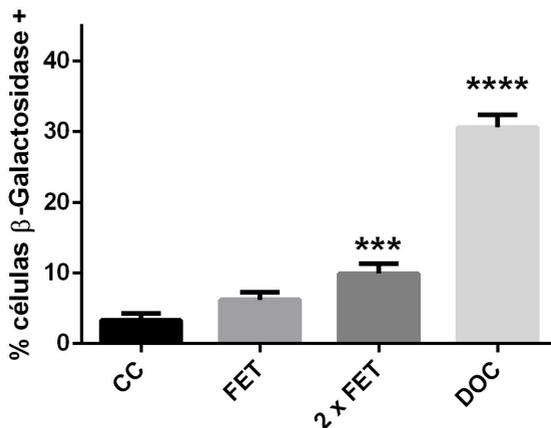
Análise da morfologia de núcleos de células PC-3 após tratamento com FET durante 48 h, na ausência ou presença de Z-VAD, um inibidor de caspases. Os núcleos foram corados com DAPI e avaliados pelo software Image-Pro Plus 6.0. ANOVA, pós-teste Dunnett; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$  indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles.

### 5.2.2 Avaliação da indução de senescência

A fim de se confirmar a indução de senescência pelo tratamento com a FET em células PC-3, foi analisado o aumento da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, um dos marcadores do estado senescente. Esta enzima possui atividade ótima em pH 4,0; porém, com o acúmulo da mesma nos lisossomos, ela passa a exibir atividade em pH 6,0. Portanto, um ensaio que consiga detectar a ação catalítica da enzima em pH ligeiramente ácido pode servir como indicativo do estado senescente (DEBACQ-CHAINIAUX et al., 2009).

Os resultados deste experimento estão dispostos na Figura 9.

**Figura 9** - Efeito do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase

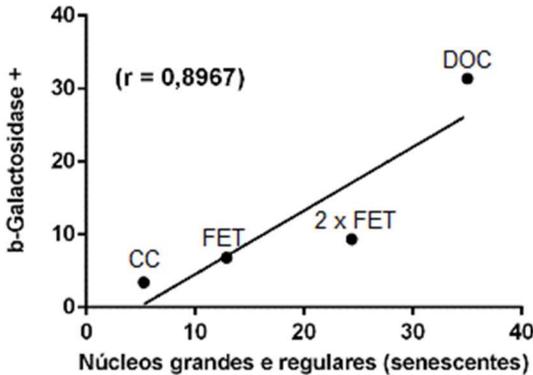


Análise da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase em células PC-3 tratadas com FET durante 48 h. CC = controle celular; FET = fração enriquecida em triterpenos de *C. pachystachya*; DOC = docetaxel.

ANOVA, pós-teste Dunnett; \*\*\*  $p < 0,005$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$  indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles.

Como é possível observar, o tratamento com duas vezes o valor da  $CC_{50}$  de FET foi capaz de exibir células com maior atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, corroborando os resultados obtidos na análise de morfometria nuclear. Além disso, existe uma correlação positiva, demonstrada pelo valor de coeficiente de correlação de Pearson ( $r = 0,8967$ ), entre a porcentagem de células com maior atividade desta enzima com a quantidade de células com característica nuclear senescente, como indicado na Figura 10.

**Figura 10** - Correlação entre a atividade de  $\beta$ -galactosidase e a população de células com núcleos grandes e regulares (senescentes), obtida por análise de morfometria nuclear, após tratamento com a fração enriquecida em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya*.



A indução de senescência após o tratamento com um triterpeno em células tumorais prostáticas já foi relatada na literatura. Em pesquisa desenvolvida por Alcantara-Flores e colaboradores (2015), o tratamento de células PC-3 com argentatina B levou a um aumento significativo da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, além das proteínas p21 e p27, ambas relacionadas com a parada do ciclo celular e indução do estado senescente. No entanto, essa molécula foi capaz de induzir senescência em cerca de 66% das células PC-3 tratadas, número superior ao encontrado nesta dissertação, de cerca de 10%.

A indução do estado de senescência por triterpenos já foi relatada também em outros tipos de linhagens tumorais. A título de exemplo, o ácido ursólico, em combinação com a temozolomida, induziu sinergicamente senescência em células de glioblastoma multiforme, GBM, por meio da observação da presença de células com núcleos grandes e regulares (ZHU et al., 2016). Em células de carcinoma hepatocelular, HepG2, o triterpeno ganoderiol F induziu senescência indicada pelo aumento da atividade da  $\beta$ -galactosidase (CHANG et al., 2006).

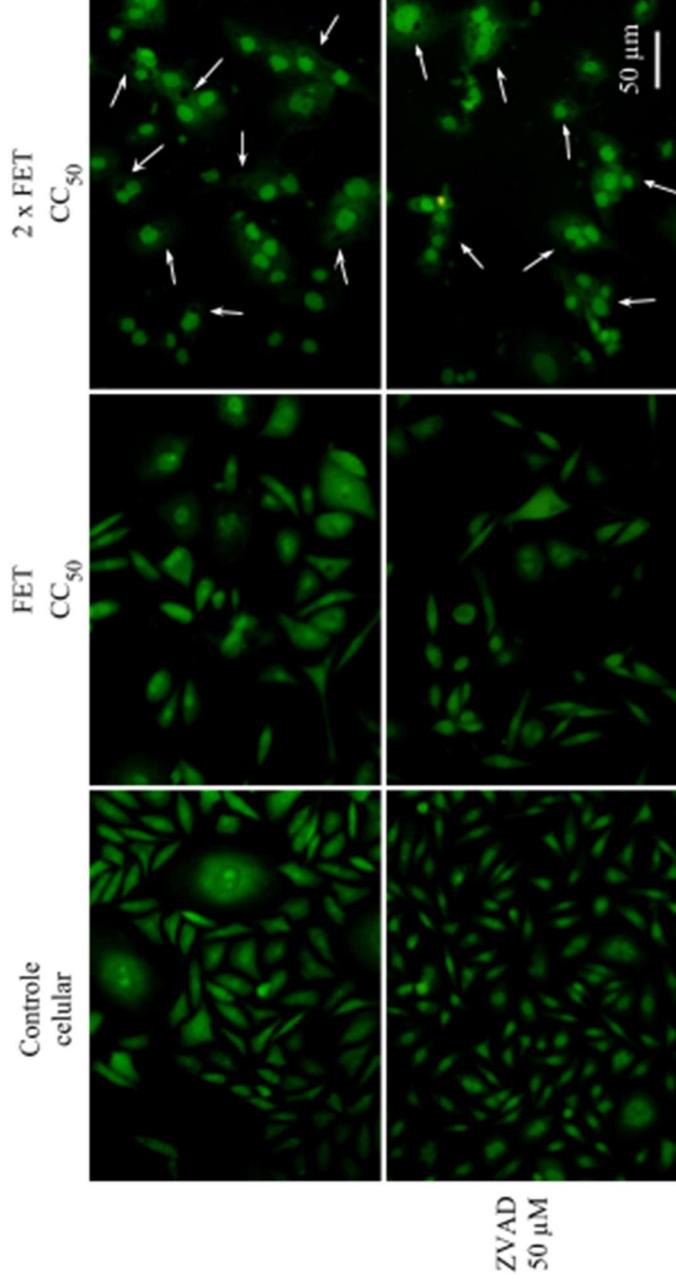
De modo geral, células tumorais recebendo tratamento quimioterápico podem interromper permanentemente sua proliferação chegando a um estado chamado de “senescência celular induzida por terapia” (do inglês, *therapy-induced cellular senescence*) (GONZALEZ et al., 2016). Sua atividade metabólica, porém, permanece ativa,

permitindo que essas células modulem o microambiente tumoral, podendo exibir papel benéfico ou desfavorável no contexto da terapia anticâncer. Uma dessas atividades é a secreção de citocinas pró-inflamatórias, capazes de recrutar e atrair macrófagos, neutrófilos, células *natural killer* e linfócitos T, que irão auxiliar no combate ao tumor (CHIEN et al., 2011; KANG et al., 2011; KRIZHANOVSKY et al., 2008). Em contrapartida, já foi relatada a possibilidade de células senescentes estimularem o crescimento do tumor por meio de fatores de crescimento nos cânceres de próstata (BAVIK et al., 2006) e de mama (COPPE, 2008).

### **5.2.3 Avaliação da indução de paraptose**

A contracoloração com laranja de acridina, que, a princípio, foi realizada para melhor delimitar o citoplasma no ensaio da morfometria nuclear, revelou uma informação interessante. O tratamento com duas vezes o valor da  $CC_{50}$  da FET induziu a formação de vacúolos citoplasmáticos grandes e numerosos, fato que não foi revertido pelo pré-tratamento com Z-VAD 50  $\mu$ M (Figura 11).

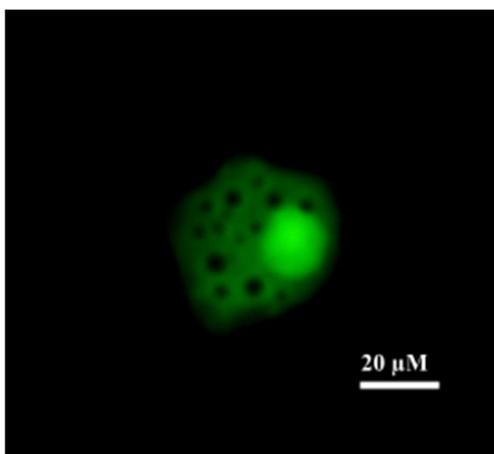
**Figura 11** - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a indução de vacúolos citoplasmáticos, por meio da coloração com laranja de acridina (400x).



Células PC-3 foram tratadas com FET durante 48 horas e coradas com laranja de acridina. CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica 50%.

Quando observados mais atentamente, por meio da marcação com laranja de acridina, nota-se que os vacúolos formados após o tratamento com a FET não estão corados de verde (indicando um pH neutro) e tampouco de laranja (indicando pH ácido) (Figura 12). Considerando que, durante o processo autofágico, o caráter ácido dos autolissosomos é necessário para que ocorra a lise de seu conteúdo, este processo pode ser descartado como hipótese de origem dos vacúolos pós-tratamento com FET.

**Figura 12** - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) (duas vezes o valor da  $CC_{50}$ ) de *Cecropia pachystachya* sobre a indução de vacúolos citoplasmáticos, por meio da coloração com laranja de acridina.



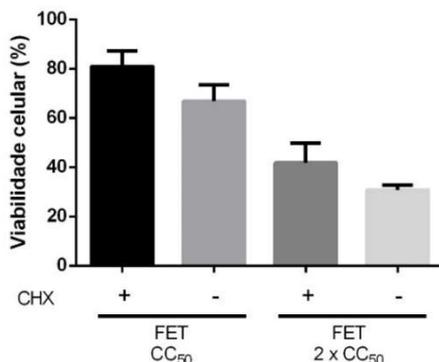
Células PC-3 foram tratadas com FET por 48 h e coradas com laranja de acridina.  $CC_{50}$  = concentração citotóxica 50%.

Além da ativação da via autofágica, outros processos podem estar envolvidos na indução de vacúolos citoplasmáticos no contexto da terapia antitumoral, tal como a paraptose. Esse tipo de morte celular é caracterizado pela extensa vacuolização do citoplasma, provocados pelo inchaço do retículo endoplasmático (RE) e/ou mitocôndrias, efeito que é independente da ativação de caspases, formação de corpos apoptóticos ou outras características morfológicas da apoptose. A paraptose pode ser avaliada por meio da expressão de proteínas das vias de sinalização MAPK, MEK-2, JNK, além da inibição da indução de vacúolos com cicloheximida, um inibidor da síntese proteica (LEE et al., 2016).

Diversos produtos naturais já se mostraram capazes de induzir esse tipo de morte celular, entre eles dois triterpenos. O celastrol, isolado das raízes de *Tripterygium wilfordii*, mostrou-se citotóxico para células de cânceres de mama e cólon, sem grande envolvimento de apoptose e autofagia, com presença de vacuolização derivada do RE (YOON et al., 2014). O paclitaxel, na concentração de 70  $\mu\text{M}$ , induziu morte celular relacionada à paraptose em células de câncer de pulmão, com presença de vacúolos citoplasmáticos originados do inchaço do RE (CHEN et al., 2008). Embora não seja um triterpeno, a curcumina também foi capaz de induzir esse tipo de morte em células PC-3M (linhagem derivada de PC-3 com atividade metastática diferenciada), demonstrando a possibilidade dessa linhagem de próstata de morrer por paraptose (LEE et al., 2015).

A fim de se verificar a possível participação dessa via de morte no efeito citotóxico da FET, foi realizado ensaio para avaliar a viabilidade de células PC-3, pré-tratadas ou não com cicloheximida, um inibidor de paraptose. De acordo com os resultados expressos na Figura 13, não houve diferenças estatísticas significativas na viabilidade de células pré-tratadas com cicloheximida em comparação com aquela das células sem o tratamento prévio, descartando a participação deste tipo de morte nas células PC-3.

**Figura 13** - Efeitos do pré-tratamento com cicloheximida sobre a viabilidade de células PC-3 tratadas com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya*



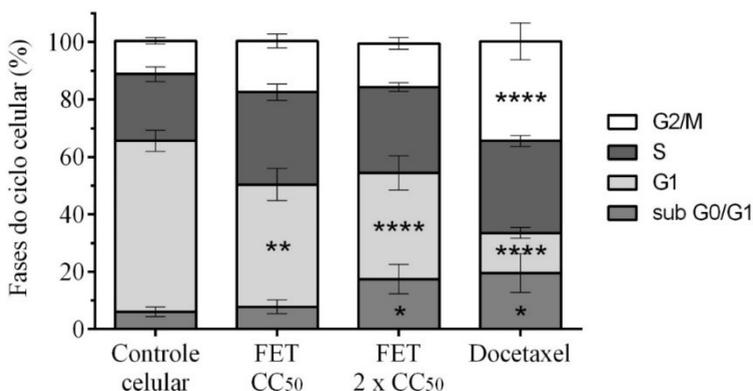
As células foram tratadas com FET durante 48 h na ausência ou presença de cicloheximida, um inibidor de paraptose. CHX = cicloheximida; CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica 50%. Não houve diferenças estatisticamente significativas: Teste *t* de Student,  $p < 0,05$

### 5.2.3 Ciclo celular

Em relação ao ciclo celular (Figura 14), o tratamento com FET nas duas concentrações testadas reduziu a população de células da fase G1 do ciclo celular, enquanto que, na maior concentração, houve aumento estatisticamente significativo da população celular em sub G0/G1 (núcleos em processo de fragmentação decorrentes de evento citotóxico) em relação aos controles celulares. Histogramas representativos desse experimento encontram-se no apêndice.

Resultados similares foram encontrados em outros estudos que avaliaram os efeitos do tratamento com o ácido ursólico e seus derivados (BAI et al., 2012; PARK et al., 2013), e com a argentatina B em células PC-3 (ALCANTARA-FLORES et al., 2015). Nos estudos com ácido ursólico, o acúmulo de células em sub G0/G1 foi relacionado com a indução de apoptose, tipo de morte celular não envolvida no efeito citotóxico induzido por FET (item 5.2.4).

**Figura 14** - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a distribuição das células nas fases do ciclo celular.



As células foram tratadas com FET durante 48 h, e após, coradas com iodeto de propídeo. Por fim, a suspensão celular foi analisada em citômetro de fluxo, com leitura nos filtros PE e PerCP.

ANOVA, pós-teste Dunnett; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$  indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles

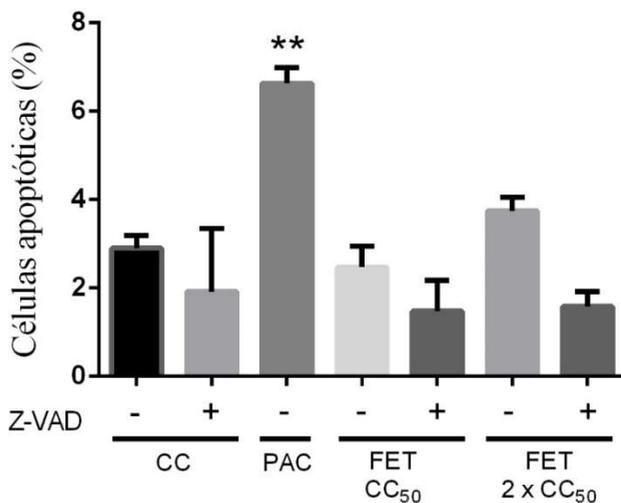
### 5.2.4 Avaliação da apoptose

Durante o processo apoptótico, ocorre a sinalização celular devido à translocação precoce de resíduos de fosfatidilserina do folheto interno da membrana plasmática para o folheto externo, marcando as células que devem ser fagocitadas pelo sistema imunológico (ELMORE, 2007). A proteína recombinante Anexina V é uma molécula de ligação para fosfatidilserina que interage fortemente e especificamente com resíduos deste fosfolípido de membrana, por meio de suas cargas negativas em presença de cálcio, podendo ser usada para a detecção *in vitro* do processo de morte celular programada (VAN GENDEREN et al., 2006).

No ensaio da avaliação de indução de apoptose por citometria de fluxo (Figura 15), não houve diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento com FET, nas duas concentrações testadas, em comparação com o controle celular. Ademais, o pan-inibidor de caspases Z-VAD não exerceu efeito protetor estatisticamente significativo sobre a exposição da fosfatidilserina.

De modo similar, a viabilidade celular não foi alterada com o pré-tratamento com Z-VAD (Figura 16), tampouco houve desorganização dos filamentos de actina nas duas concentrações avaliadas de FET (Figura 17), corroborando os resultados anteriores que não demonstraram o envolvimento da apoptose como via de morte celular.

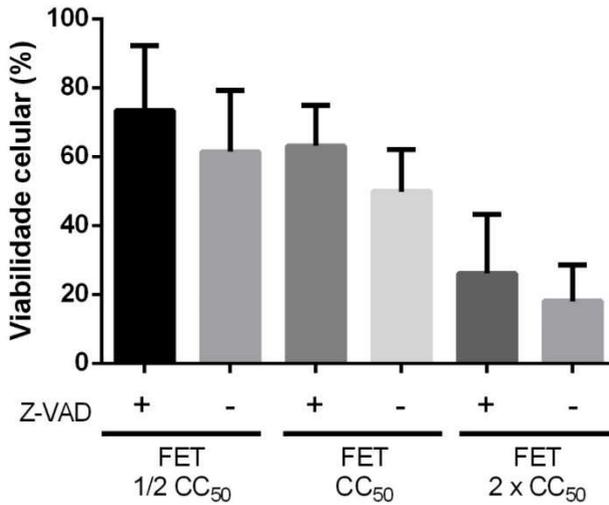
**Figura 15** - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a indução de apoptose.



As células foram tratadas com FET durante 48 h, na ausência ou presença de Z-VAD (um inibidor de caspases), e após, marcadas com Anexina V e iodeto de propídeo. Por fim, a suspensão celular foi analisada em citômetro de fluxo, com leitura nos filtros FITC, PE e PerCP.

ANOVA, pós-teste Dunnett; \*\*  $p < 0,01$  indica diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles

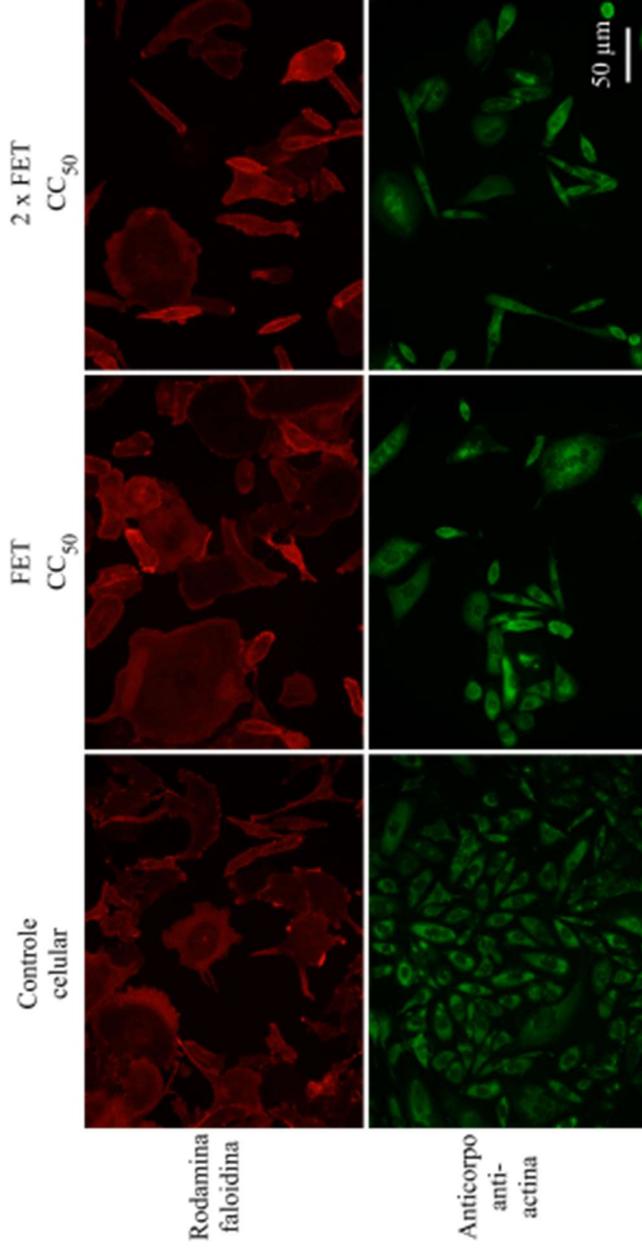
**Figura 16** - Efeitos do pré-tratamento com Z-VAD 50  $\mu$ M sobre a viabilidade de células PC-3 tratadas com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya*.



As células foram tratadas com FET durante 48 h, na ausência ou presença de Z-VAD (um inibidor de caspases). A viabilidade celular foi avaliada por meio da metodologia da sulforrodamina B.

Não houve diferenças estatisticamente significativas: Teste *t* de Student,  $p < 0,05$

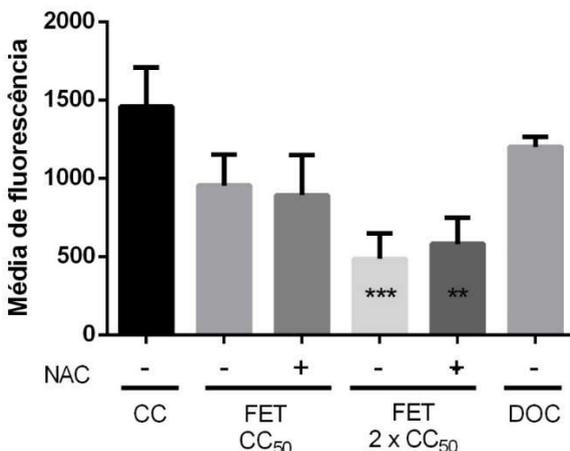
**Figura 17** - Efeito do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a organização dos filamentos de actina do citoesqueleto (400x).



Células PC-3 foram tratadas com FET durante 48 h e marcadas com rodamina faloidina ou anticorpo anti-actina, a fim de se visualizar possíveis alterações no citoesqueleto provocadas pelo tratamento.

Entretanto, quando o potencial de membrana mitocondrial foi avaliado, surgiram indícios de despolarização da mesma, uma característica marcante da ativação da via intrínseca da apoptose. O tratamento com FET, nas duas concentrações testadas, induziu a despolarização da membrana mitocondrial; efeito que não foi revertido pelo cotratamento com o antioxidante NAC 500  $\mu$ M (Figura 18). Contudo, apesar de haver despolarização da membrana mitocondrial, esse estímulo não parece ser suficiente para dar início ao processo apoptótico de maneira expressiva, uma vez que outros marcadores de indução de morte por apoptose não foram observados nas células tratadas com FET, tais como externalização de fosfatidilserina, desorganização do citoesqueleto e reversão de efeito citotóxico ao empregar um pan-inibidor de caspases Z-VAD.

**Figura 18** - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre o potencial de membrana mitocondrial.



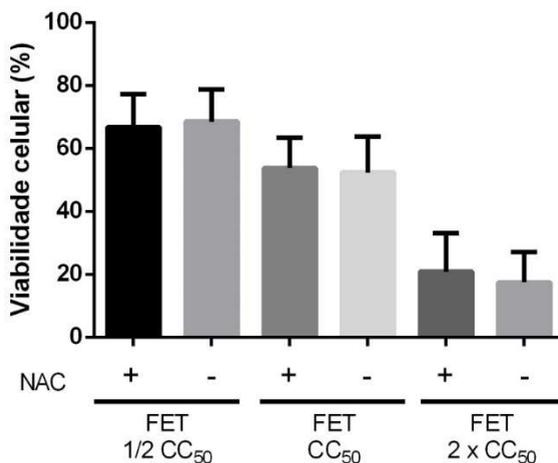
Células PC-3 foram tratadas com FET durante 48 h, na ausência ou presença de NAC (N-acetilcisteína), uma molécula antioxidante. Após, as células foram marcadas com corante MitoStatus TMRE, seguida da análise em citômetro de fluxo, com leitura nos filtros PE e PerCP.

ANOVA, pós-teste Tukey; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles

### 5.2.5 Avaliação da participação de EROs

Nos experimentos realizados para detectar se havia ou não a participação EROs no mecanismo de indução de morte celular induzido por FET, foi avaliada a viabilidade de células PC-3 cotratadas com NAC, um agente antioxidante (Figura 19), e com BSO um indutor de radicais livres (Figura 20). De acordo com os resultados, ambos os cotratamentos não demonstraram ter participação relevante na viabilidade celular, nas três concentrações avaliadas de FET, sugerindo que o efeito citotóxico induzido por esta fração não seja dependente da geração de EROs.

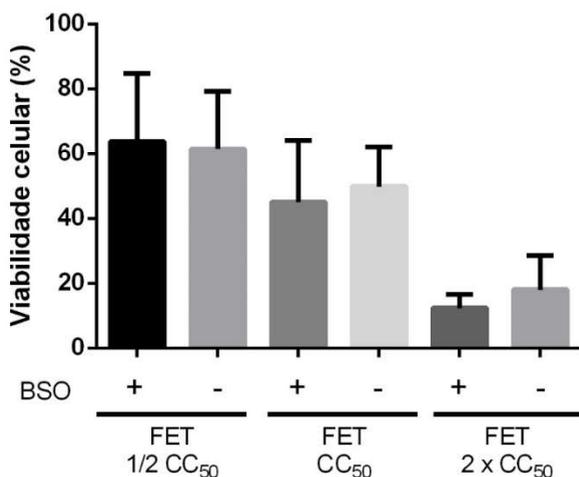
**Figura 19** - Efeitos do tratamento de células PC-3 com NAC 500  $\mu$ M e a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a viabilidade de células PC-3.



Células PC-3 foram tratadas com FET durante 48 h, na ausência ou presença de NAC (N-acetilcisteína), uma molécula antioxidante. A viabilidade celular foi avaliada por meio da metodologia da sulforrodamina B.

Não houve diferenças estatisticamente significativas: Teste *t* de Student,  $p < 0,05$

**Figura 20** - Efeitos do tratamento de células PC-3 com BSO 10  $\mu$ M e a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a viabilidade de células PC-3.



Células PC-3 foram tratadas com FET durante 48 h, na ausência ou presença de BSO (L-butionina-S-sulfoxamina), uma molécula oxidante. A viabilidade celular foi avaliada por meio da metodologia da sulforrodamina B.

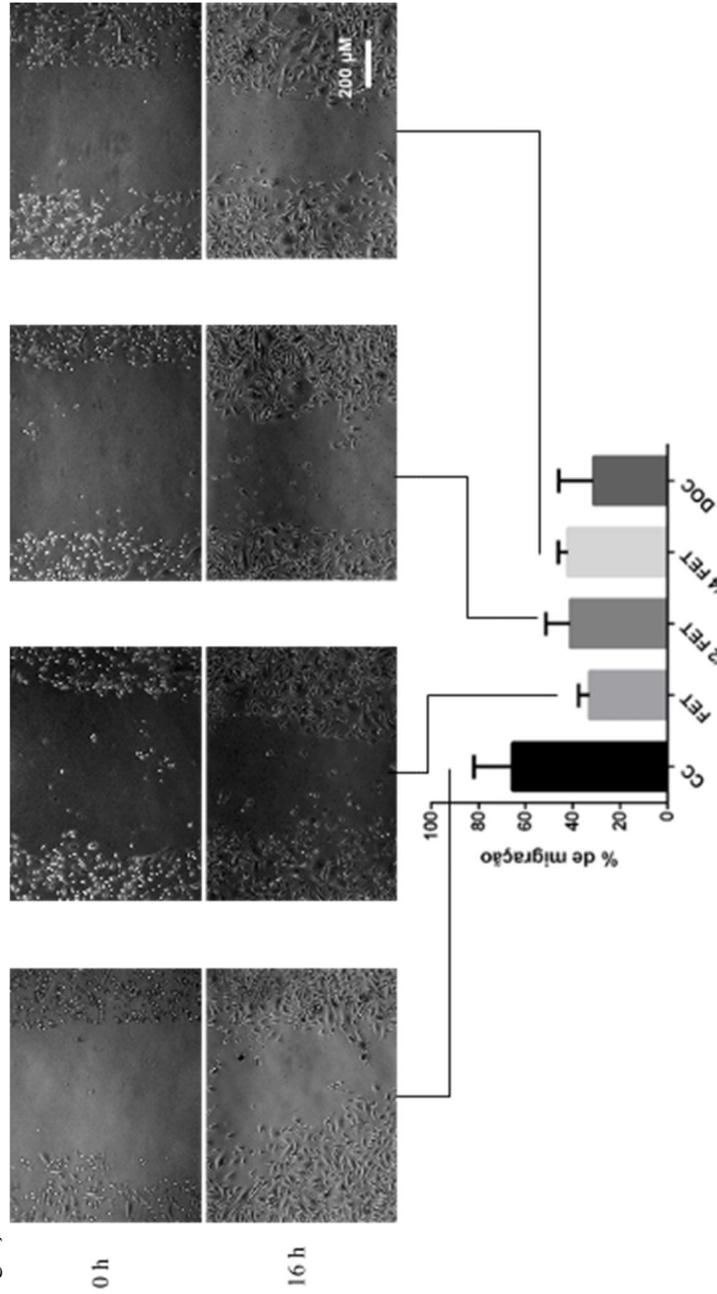
Não houve diferenças estatisticamente significativas: Teste *t* de Student,  $p < 0,05$

### 5.3 MIGRAÇÃO CELULAR

O potencial antimigratório do tratamento com FET sobre células PC-3, em concentrações não citotóxicas, foi avaliado pelo método do *scratch*. Neste ensaio, após uma ferida artificial provocada na monocamada celular, é avaliada a quantidade de células que migraram para o local lesado após um tempo determinado. A avaliação desse fator é interessante, pois está relacionado com o potencial antimetastático *in vivo* dos tratamentos, por mecanismos que envolvem a inibição da degradação da matriz extracelular ou por aumento de expressão de proteínas de junções aderentes (WELCH, 2016).

No entanto, o tratamento com FET nas duas concentrações testadas não exerceu diferença estatisticamente significativa sobre a migração celular em relação ao controle não tratado, como demonstrado na Figura 21.

**Figura 21** – Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a migração celular.



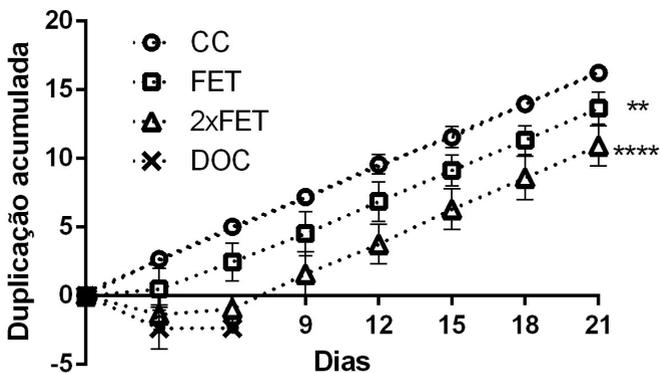
Não houve diferenças estatisticamente significativas: ANOVA,  $p > 0,05$ .

## 5.4 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPROLIFERATIVO EM LONGO PRAZO

A avaliação, em longo prazo, de amostras potencialmente citotóxicas pode revelar uma possível reaquisição da capacidade proliferativa de células tumorais previamente tratadas e que se mostraram, a princípio, sensíveis a elas. Isso reflete os efeitos dos antineoplásicos na clínica, onde o tratamento, muitas vezes, apenas seleciona subpopulações resistentes, com capacidade de restabelecer a massa tumoral com o passar do tempo. Ademais, o uso de ensaios crônicos de investigação dos efeitos citotóxicos de novas propostas de tratamento parece ser mais fidedigno ao que ocorre na clínica, tornando-se uma opção bastante adequada (SILVA, A. et al., 2016).

Para avaliar esse efeito, foi acompanhado, ao longo do tempo, o crescimento de uma população de células que sobreviveram ao tratamento com FET, cujos resultados constam na Figura 22.

**Figura 22** - Efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre capacidade de duplicação.



Células PC-3 foram tratadas com FET durante 48 h, e após, submetidas a contagem e replaqueamentos a cada 3 dias, a fim de se visualizar a cinética de crescimento da população de células que sobreviveram ao tratamento.

ANOVA, pós-teste Tukey; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$  indicam diferenças estatisticamente significativas em relação aos controles

De acordo com a Figura 22, é possível observar que, ao final de 21 dias de experimento, houve diferenças estatisticamente significativas entre a duplicação acumulada da população de células tratadas com FET

em relação ao grupo controle. Estas diferenças podem ser explicadas pela indução de senescência de parte da população, bem como pelo efeito citotóxico residual pós-tratamento.

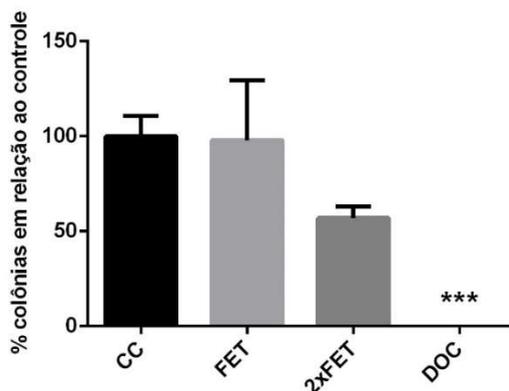
No entanto, mesmo que tenham sido observadas diferenças na duplicação acumulada final entre os grupos experimentais, cerca de nove dias após o tratamento com a FET, as células readquiriram capacidade proliferativa semelhante ao controle celular.

## 5.5 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA CLONOGÊNICA

Outro ensaio que também avalia a capacidade de células tumorais resistentes ao tratamento antineoplásico de voltarem a proliferar é a avaliação da sobrevivência clonogênica. Neste experimento, é possível quantificar a porcentagem de clones de células que permaneceram viáveis, mesmo após o tratamento, fator que está relacionado com a recidiva da doença.

Os resultados expressos na Figura 23 indicam que a FET não foi capaz de inibir significativamente a capacidade clonogênica das células PC-3 que sobreviveram ao tratamento. Porém, quando comparado somente o grupo controle celular com o grupo experimental tratado com duas vezes o valor da  $CC_{50}$  da FET utilizando o teste estatístico  $t$  de Student, encontra-se diferença significativa, com  $p = 0,026$ .

**Figura 23** - Efeito do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a capacidade destas células de formarem colônias.



Células PC-3 foram tratadas com FET durante 48 h, e após, 100 células que sobreviveram ao tratamento foram replaqueadas e mantidas em cultivo durante 14 dias. Em seguida, as células foram coradas com cristal violeta e contadas o número de colônias formadas.

ANOVA, pós-teste Tukey; \*\*\*  $p < 0,005$  indica diferença estatisticamente significativa em relação ao controle

A diminuição do número de clones viáveis após o tratamento com duas vezes o valor da  $CC_{50}$  da FET corrobora os resultados encontrados nos primeiros dias de experimento da avaliação do efeito antiproliferativo, em longo prazo, bem como os resultados de indução de senescência.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com os resultados obtidos para avaliação de mecanismo de indução de morte celular da FET em células PC-3, foi possível delimitar a participação ou não de diferentes eventos celulares.

Considerando os resultados dos diferentes experimentos para avaliação de indução de apoptose, pode-se concluir que esse tipo de morte não colabora, de forma expressiva, para os efeitos citotóxicos observados. Essa observação foi baseada no fato de que o Z-VAD não exerceu efeito protetor sobre a viabilidade de células PC-3 tratadas com a FET, sugerindo que esse efeito não depende da ativação de caspases. Além disso, não foi detectada a exposição da fosfatidilserina no folheto externo da membrana celular, bem como a desorganização dos filamentos de actina no citoesqueleto e o aparecimento de células com núcleos pequenos e fragmentados, eventos característicos do processo apoptótico. Em contrapartida, a despolarização do potencial de membrana mitocondrial observado, quando considerado isoladamente, não foi capaz de fornecer evidências que indicassem a ativação da via intrínseca da apoptose.

Além disso, a autofagia e a paraptose não foram consideradas como sendo responsáveis pela vacuolização citoplasmática observada nas células PC-3 tratadas com a FET. A ausência de marcação dos vacúolos pós coloração com laranja de acridina, bem como a falta de efeito protetor exercida pela cicloheximida, sugerem a não participação desses dois eventos, respectivamente.

O efeito citotóxico também não parece estar relacionado com a geração de EROs, visto que os cotratamentos com NAC e BSO não exerceram efeitos sobre a viabilidade de células PC-3 tratadas com a FET.

No entanto, foi possível observar a ativação de senescência em parte da população de células PC-3 tratadas com a FET. Essa afirmação baseia-se no aparecimento de células com núcleos grandes e regulares, no aumento da atividade da enzima  $\beta$ -galactosidase, na diminuição de clones viáveis aptos a formarem colônias pós-tratamento com a FET, e na redução da duplicação acumulada de células tratadas em longo prazo. Todos esses resultados condizem com o aparecimento de células senescentes, fornecendo base para esta inferência.

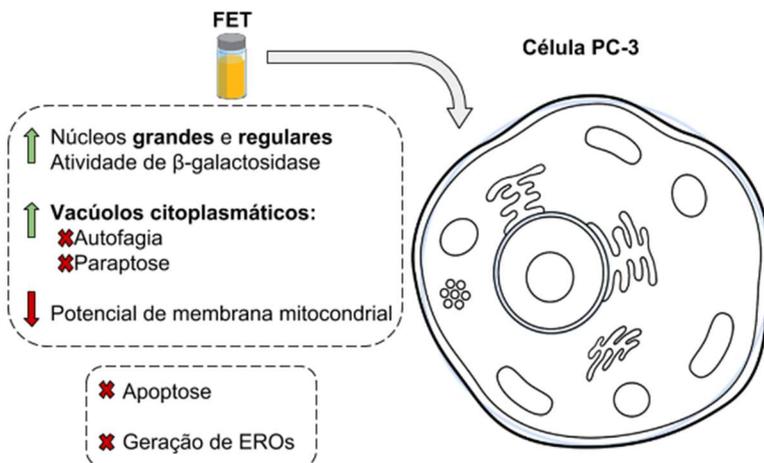


## 7 CONCLUSÕES

Na primeira etapa deste projeto, foi realizada uma triagem citotóxica com extratos e frações de *Cecropia pachystachya* em seis linhagens celulares tumorais humanas, demonstrando os efeitos citotóxicos da fração orgânica (FO), que contém triterpenos e outros metabólitos de baixa polaridade. A fração enriquecida em triterpenos (FET), derivada da FO, apresentou citotoxicidade relevante e seletiva para a linhagem tumoral de próstata PC-3, quando comparado com a linhagem saudável de fibroblastos de gengiva.

Após, foram realizadas diferentes estratégias metodológicas a fim de elucidar o mecanismo de indução da morte de células PC-3, causada pela FET, cujos resultados foram resumidos e estão apresentados na Figura 24.

**Figura 24** – Resumo dos resultados obtidos após o tratamento das células PC-3 com a fração enriquecida em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya*.



O aparecimento de extensa vacuolização citoplasmática após tratamento com a FET não está relacionada com o processo autofágico, tampouco com a paraptose.

Apesar de ter ocorrido despolarização da membrana mitocondrial após o tratamento com FET, não foi possível visualizar claramente a ocorrência do processo apoptótico. Ademais, o efeito citotóxico da FET

não se mostrou dependente da geração de EROs. Em relação à atividade antimigratória, a FET não foi capaz de inibir a migração celular no ensaio do *scratch*.

Em contrapartida, o aparecimento de células com núcleos grandes e regulares indicou a indução de senescência em células tumorais de próstata tratadas com a FET, corroborada pela visualização do aumento da atividade de  $\beta$ -galactosidase. A indução deste processo, mediado pela FET, está relacionado, ao menos parcialmente, com a redução da viabilidade das células PC-3 e com o decréscimo de sua capacidade de duplicação e de formação de colônias, conforme foi demonstrado nos ensaios de avaliação do efeito antiproliferativo em longo prazo e de sobrevivência clonogênica.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram o potencial citotóxico *in vitro* de uma fração enriquecida em triterpenos (FET), obtida de *Cecropia pachystachya*. Além disso, serão avaliados oportunamente, os efeitos citotóxicos dos triterpenos majoritários isoladamente obtidos da FET, a fim de se confirmar a principal propriedade desta classe de compostos, que é seu potencial citotóxico.

## **8 PERSPECTIVAS**

Como continuidade deste trabalho, sugere-se:

- Determinar o conteúdo dos vacúolos observados após tratamento com a FET em células PC-3 por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET);
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos triterpênicos majoritários presentes na FET (a serem isolados e identificados pelo grupo parceiro), em diferentes linhagens celulares tumorais humanas;
- Elucidar o mecanismo de morte celular induzido após o tratamento com os compostos triterpênicos majoritários da FET, que apresentarem resultados promissores na triagem citotóxica.



## REFERÊNCIAS

- ABBAS, S. et al. The cucurbitacins E, D and I: investigation of their cytotoxicity toward human chondrosarcoma SW 1353 cell line and their biotransformation in man liver. **Toxicology Letters**, v. 216, n. 3, p. 189–199, 2013.
- AKAR, U. et al. Silencing of Bcl-2 expression by small interfering RNA induces autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells. **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 669–679, 2008.
- ALCANTARA-FLORES, E. et al. Argentatin B inhibits proliferation of prostate and colon cancer cells by inducing cell senescence. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21125–21137, 2015.
- ALLEMANI, C. et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: analysis of individual data for 25,676,887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **Lancet**, v. 385, n. 9972, p. 977–1010, 2015.
- ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005.
- ARAGÃO, D. M. O. et al. Anti-inflammatory, antinociceptive and cytotoxic effects of the methanol extract of *Cecropia pachystachya* Trécul. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 6, p. 926–930, 2013.
- ARAGÃO, D. M. O. et al. Hypoglycemic effects of *Cecropia pachystachya* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 3, p. 629–633, 2010.
- ARYA, R.; WHITE, K. Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 39, p. 12–19, 2015.
- BACELAR, A. et al. Câncer de próstata: métodos de diagnóstico, prevenção e tratamento. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research - BJSCR**, v. 10, n. 3, p. 40–46, 2015.
- BAI, K. et al. Synthesis and evaluation of ursolic acid derivatives as

potent cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 7, p. 2488–2493, 2012.

BANERJI, J. S. et al. Prostate needle biopsy outcomes in the era of the U.S. Preventive Services Task Force recommendation against prostate specific antigen based screening. **The Journal of Urology**, v. 195, n. 1, p. 66–73, 2016.

BAVIK, C. et al. The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. **Cancer Research**, v. 66, n. 2, p. 794–802, 2006.

BERG, C. C.; ROSSELLI, P. F. **Cecropia**. Flora Neotropica. New York, 2005.

BERGH, R. C. N. et al. Role of hormonal treatment in prostate cancer patients with nonmetastatic disease recurrence after local curative treatment: A systematic review. **European Urology**, v. 69, n. 5, p. 802–820, 2016.

BHINDI, B. et al. Impact of the U.S. Preventive Services Task Force recommendations against prostate specific antigen screening on prostate biopsy and cancer detection rates. **The Journal of Urology**, v. 193, n. 5, p. 1519–1524, 2015.

BRANGO-VANEGAS, J. et al. Glycosylflavonoids from *Cecropia pachystachya* Trécul are quorum sensing inhibitors. **Phytomedicine**, v. 21, n. 5, p. 670–675, 2014.

BRASIL. Presidência da República. Casa Civil. Subchefia para assuntos jurídicos. Decreto Nº 6.041, de 8 de fevereiro de 2007. Institui a Política de Desenvolvimento da Biotecnologia, cria o Comitê Nacional de Biotecnologia e dá outras providências. Diário Oficial da União, 09.02.2007.

BRASIL/INCA. **Rastreamento do Câncer de Próstata**. 2013. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/deteccao\\_precoce](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/deteccao_precoce)>. Acesso em: 1 dez. 2015.

BRASIL/INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2016.

BRITO, M. R.; SENNA-VALE, L. Plantas medicinais utilizadas na comunidade caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 363–372, 2011.

BROOKS, D. D. Prostate cancer screening in black men-new questions, few answers. **Cancer**, v. 119, n. 12, p. 2206–8, 2013.

CARTER, H. B. et al. Early detection of prostate cancer: AUA Guideline. **The Journal of Urology**, v. 190, n. 2, p. 419–426, 2013.

CHANG, U. M. et al. Ganoderiol F, a ganoderma triterpene, induces senescence in hepatoma HepG2 cells. **Life Sciences**, v. 79, n. 12, p. 1129–1139, 2006.

CHATTOPADHYAY, D.; NAIK, T. N. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 275–301, 2007.

CHEN, T. et al. Taxol induces caspase-independent cytoplasmic vacuolization and cell death through endoplasmic reticulum (ER) swelling in ASTC-a-1 cells. **Cancer Letters**, v. 270, n. 1, p. 164–172, 2008.

CHIEN, Y. et al. Control of the senescence-associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. **Genes & Development**, v. 25, n. 20, p. 2125–2136, 2011.

CHIN, Y. W. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v. 8, n. 2, p. 239–253, 2006.

CHUDZIK, M.; KORZONEK-SZLACHETA, I.; KRÓL, W. Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 1610–1625, 2015.

CONNOLLY, J. D.; HILL, R. A. Triterpenoids. **Natural product reports**, v. 27, n. 1, p. 79–132, 2010.

CONSOLINI, A. E. et al. Cardiotoxic and sedative effects of *Cecropia pachystachya* Mart. (ambay) on isolated rat hearts and conscious mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 90–96, 2006.

CONSOLINI, A. E.; MIGLIORI, G. N. Cardiovascular effects of the South American medicinal plant *Cecropia pachystachya* (ambay) on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 417–422, 2005.

COPPE, J. P. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. **PLoS Biology**, v. 6, p. 2853–2868, 2008.

COSTA, G. M. et al. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1096–1102, 2011.

COSTA, G. M.; SCHENKEL, E. P.; REGINATTO, F. H. Chemical and pharmacological aspects of the genus *Cecropia*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 6, p. 913–920, 2011.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRAWFORD, E. D. et al. Treating patients with metastatic castration resistant prostate cancer: A comprehensive review of available therapies. **The Journal of Urology**, v. 194, n. 6, p. 1537–1547, 2015.

CRUZ, E. D. M. et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: Arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, v. 89, p. 71–77, 2013.

DEBACQ-CHAINIAUX, F. et al. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and *in vivo*. **Nature Protocols**, v. 4, n. 12, p. 1798–1806, 2009.

DING, N. et al. Apoptosis induction through proteasome inhibitory activity of cucurbitacin D in human T-cell leukemia. **Cancer**, v. 117, n. 12, p. 2735–2746, 2011.

DUFFY, M. J.; MCGOWAN, P. M.; GALLAGHER, W. M. Cancer invasion and metastasis: changing views. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 3, p. 283–293, 2008.

DUQUE, A. P. N. et al. *In vivo* wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 128–138, 2016.

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

EPSTEIN, J. I. et al. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) consensus conference on gleason grading of prostatic carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 29, n. 9, p. 1228–1242, 2005.

FARIAS, K. S. et al. Antioxidant properties of species from the Brazilian cerrado by different assays. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 520–528, 2013.

FERNANDES, J. et al. Pentacyclic triterpenes from *Chrysobalanaceae* species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letters**, v. 190, n. 2, p. 165–169, 2003.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 2012.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Resveratrol abrogates the temozolomide-induced G2 arrest leading to mitotic catastrophe and reinforces the temozolomide-induced senescence in glioma cells. **BMC Cancer**, v. 13, p. 1-13, 2013.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Single-cell analysis challenges the connection between autophagy and senescence induced by DNA damage. **Autophagy**, v. 11, n. 7, p. 1099–1113, 2015.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, n. 2014, p. 1–16, 2014.

GAUTHIER, C. et al. Synthesis and cytotoxicity of bidesmosidic betulin and betulinic acid saponins. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 1, p. 72–81, 2009.

GAZAL, M. et al. Antidepressant-like effects of aqueous extract from *Cecropia pachystachya* leaves in a mouse model of chronic unpredictable stress. **Brain Research Bulletin**, v. 108, p. 10–17, 2014.

GAZAL, M. et al. Preventive effect of *Cecropia pachystachya* against ketamine-induced manic behavior and oxidative stress in rats. **Neurochemical Research**, v. 40, n. 7, p. 1421–1430, 2015.

GELLER, F.C. Complementação da avaliação *in vitro* do mecanismo citotóxico de cucurbitacinas, através do ensaio de inibição da migração e da invasão celular. Relatório de atividades: Pós-Doutorado Júnior – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

GLOBOCAN, **Cancer incidence and mortality worldwide: IARC**, 2012. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr/>> Acesso em: julho de 2015.

GONZALEZ, L. C. et al. Premature aging/senescence in cancer cells facing therapy: good or bad? **Biogerontology**, v. 17, n. 1, p. 71–87, 2016.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 25, p. 585–621, 1961.

HIKAWCZUK, V. J. et al. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from *Cecropia pachystachya*. **Anales des la Asociacion Quimica Argentina**, v. 86, n. 3, p. 167–170, 1998.

HURWITZ, M. Chemotherapy in prostate cancer. **Current Oncology Reports**, v. 17, n. 10, p. 44, 2015.

ISHDORJ, G.; JOHNSTON, J. B.; GIBSON, S. B. Cucurbitacin-I (JSI-124) activates the JNK/c-Jun signaling pathway independent of apoptosis and cell cycle arrest in B leukemic cells. **BMC Cancer**, v. 11, p. 268, 2011.

ISHII, T. et al. Cucurbitacin D induces growth inhibition, cell cycle arrest, and apoptosis in human endometrial and ovarian cancer cells. **Tumour Biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine**, v. 34, n. 1, p. 285–291, 2013.

JORGE, L. I. F.; MARKMAN, B. E. O.; FERRO, V. DE O. Elementos histológicos característicos de *Cecropia pachystachya* Trécul (embaúba). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 7–8, n. 1, p. 35–40, 1998.

KANG, T.-W. et al. Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. **Nature**, v. 479, n. 7374, p. 547–551, 2011.

KAUSAR, H. et al. Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: identification of intracellular thiols as critical targets. **Cancer Letters**, v. 332, n. 1, p. 35–45, 2013.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972.

KLEIN, J.; KNESEBECK, O. V. D. Socioeconomic inequalities in prostate cancer survival: A review of the evidence and explanatory factors. **Social Science & Medicine**, v. 142, p. 9–18, 2015.

KOBAYASHI, T.; SUZUKI, K.; OHSUMI, Y. Autophagosome formation can be achieved in the absence of Atg18 by expressing engineered PAS-targeted Atg2. **FEBS Letters**, v. 586, n. 16, p. 2473–2478, 2012.

KRATZ, J. M., et al., Avaliação dos efeitos citotóxicos de extratos de *Cecropia pachystachya* frente a linhagens celulares tumorais. Dados não publicados, 2013.

KRIZHANOVSKY, V. et al. Senescence of activated stellate cells limits liver fibrosis. **Cell**, v. 134, n. 4, p. 657–667, 2008.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

KUILMAN, T. et al. The essence of senescence. **Genes & Development**, v. 24, n. 22, p. 2463–2479, 2010.

LABBÉ, D. et al. Role of diet in prostate cancer: the epigenetic link. **Oncogene**, v. 34, p. 4683–4691, 2014.

LACAILLE-DUBOIS; FRANCK, U.; WAGNER, H. Search for potential angiotensin converting enzyme (ACE)-inhibitors from plants. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 8, n. 1, p. 47–52, 2001.

LANG, K. L. et al. New cytotoxic cucurbitacins from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **Planta Medica**, v. 77, n. 14, p. 1648–1651, 2011.

LANG, K. L. et al. Synthesis and cytotoxic activity evaluation of dihydrocucurbitacin B and cucurbitacin B derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 3016–3030, 2012.

LANG, K. L. et al. Multivariate SAR and QSAR of cucurbitacin derivatives as cytotoxic compounds in a human lung adenocarcinoma cell line. **Journal of Molecular Graphics & Modelling**, v. 48, p. 70–79, 2014.

LEE, D. et al. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. **Pharmacology and Therapeutics**. v. 162, p. 120-133, 2016.

LEE, D. H.; IWANSKI, G. B.; THOENNISSSEN, N. H. Cucurbitacin: ancient compound shedding new light on cancer treatment. **The Scientific World Journal**, v. 10, p. 413–418, 2010.

LEE, W.-J. et al. Nonautophagic cytoplasmic vacuolation death induction in human PC-3M prostate cancer by curcumin through reactive oxygen species -mediated endoplasmic reticulum stress. **Scientific Reports**, v. 5, p. 10420, 2015.

LOAIZA, N.; DEMARIA, M. Cellular senescence and tumor promotion: Is aging the key? **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1865, n. 2, p. 155–167, 2016.

LOPEZ-GOMEZ, M. et al. Cancer in developing countries: the next most preventable pandemic. The global problem of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 1, p. 117–122, 2013.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil - Nativas e exóticas**. 2ª ed. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 512 p.

MAGNABOSCO, W. J. Câncer de próstata – diagnóstico e estadiamento. **Onco&**, n. 1, p. 22–25, 2014.

MANASE, M. J. et al. Triterpenoid saponins from *Polycarpaea corymbosa* Lamk. var. *eriantha* Hochst. **Phytochemistry**, v. 100, p. 150–155, 2014.

MAQUIAVELI, C. C. et al. *Cecropia pachystachya* extract attenuated the renal lesion in 5/6 nephrectomized rats by reducing inflammation and renal arginase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, p. 49–57, 2014.

MAROSTICA, L. L. et al. Synergistic antiproliferative effects of a new cucurbitacin B derivative and chemotherapy drugs on lung cancer cell line A549. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 10, p. 1949–1960, 2015.

MATERA, S. et al. Intestinal antispasmodic effects of three argentinian plants: *Hypericum conatum*, *Berberis ruscifolia* and *Cecropia pachystachya*: Mechanisms of action and comparison with the effects of *Brugmansia arborea*. **Pharmacologyonline**, v. 2016, n. 2, p. 91–99, 2016.

MELÉNDEZ, A.; LEVINE, B. **Autophagy in *C. elegans***. 2009  
Disponível em: <[http://www.wormbook.org/chapters/www\\_autophagy/](http://www.wormbook.org/chapters/www_autophagy/)

autophagy.pdf>. Acesso em: 16 out. 2016.

MENDONÇA, E. D. et al. Genotoxic, mutagenic and antigenotoxic effects of *Cecropia pachystachya* Trécul aqueous extract using *in vivo* and *in vitro* assays. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 214–220, 2016.

MENG, Y. et al. Ursolic acid induces apoptosis of prostate cancer cells via the PI3K / Akt / mTOR pathway. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 43, n. 7, p. 1–16, 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Posicionamento do Ministério da Saúde acerca da integralidade da saúde dos homens no contexto do Novembro Azul**. 2015. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Integralidade-sa--de-homens.pdf>>. Acesso em: 20 maio 2016.

MITA, A. C. et al. Phase I and pharmacokinetic study of XRP6258 (RPR 116258A), a novel taxane, administered as a 1-hour infusion every 3 weeks in patients with advanced solid tumors. **Clinical Cancer Research: an Official Journal of the American Association for Cancer Research**, v. 15, n. 2, p. 723–730, 2009.

MOCHIDA, K.; OHSUMI, Y.; NAKATOGAWA, H. Hrr25 phosphorylates the autophagic receptor Atg34 to promote vacuolar transport of  $\alpha$ -mannosidase under nitrogen starvation conditions. **FEBS Letters**, v. 588, n. 21, p. 3862–3869, 2014.

MOYER, V. A. Screening for prostate cancer: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. **Annals of Internal Medicine**, v. 157, n. 2, p. 120–134, 2012.

NAKATOGAWA, H.; OHSUMI, Y. Autophagy: close contact keeps out the uninvited. **Current Biology**, v. 24, n. 12, p. 560–562, 2014.

NARAYANAN, S.; SRINIVAS, S.; FELDMAN, D. Androgen–glucocorticoid interactions in the era of novel prostate cancer therapy. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 1, p. 47–60, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p.

629–661, 2016.

NEWMAN, D. J.; GIDDINGS, L.-A. Natural products as leads to antitumor drugs. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 123–137, 2014.

NODA, N. N.; OHSUMI, Y.; INAGAKI, F. Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. **FEBS Letters**, v. 584, n. 7, p. 1379–1385, 2010.

NODA, T.; SUZUKI, K.; OHSUMI, Y. Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. **Trends in Cell Biology**, v. 12, n. 5, p. 231–235, 2002.

OHSUMI, Y.; MIZUSHIMA, N. Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 15, n. 2, p. 231–236, 2004.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Cancer**. 2015 Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 20 maio 2016.

ORTMANN, C. F. et al. Enriched flavonoid fraction from *Cecropia pachystachya* Trécul leaves exerts antidepressant-like behavior and protects brain against oxidative stress in rats subjected to chronic mild stress. **Neurotoxicity Research**, v. 29, n. 4, p. 469–483, 2016.

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

PACHECO, N. R. et al. *Cecropia pachystachya*: A species with expressive *in vivo* topical anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant effects. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

PARK, J. H. et al. Inhibition of Wnt/b-catenin signaling mediates ursolic acid-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 5, p. 1366–1374, 2013.

PATEL, A. R.; KLEIN, E. A. Risk factors for prostate cancer. **Nature Clinical Practice Urology**, v. 6, n. 2, p. 87–95, 2009.

PATLOLLA, J. M. R.; RAO, C. V. Triterpenoids for cancer prevention and treatment: current status and future prospects. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 147–155, 2012.

PENG, L. et al. Antitumor activities of dammarane triterpene saponins from *Bacopa monniera*. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 864–868, 2010.

PETRYLAK, D. P. et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 15, p. 1513–1520, 2004.

PIO CORRÊA, M.; **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1978. v. 4. p. 199 – 208

PLOUSSARD, G. et al. Class III beta-tubulin expression predicts prostate tumor aggressiveness and patient response to docetaxel-based chemotherapy. **Cancer Research**, v. 70, n. 22, p. 9253–9264, 2010.

PRÍNCIPE ROSALINA, C.; SPIRA, B. The effect of sixteen medicinal plants used in the Brazilian pharmacopoeia on the expression and activity of glutathione S -transferase in hepatocytes and leukemia cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 12, p. 1192–1197, 2009.

PROMKAN, M. et al. The effectiveness of cucurbitacin B in BRCA1 defective breast cancer cells. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. 55732, 2013.

RIBEIRO, D. A. et al. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155, n. 3, p. 1522–1533, 2014.

RIOS, J. L. et al. Cucurbitacins as inducers of cell death and a rich source of potential anticancer compounds. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 12, p. 1663–1676, 2012.

ROBERT, J. Biologie de la métastase. **Bulletin du Cancer**, v. 100, p. 333-342, 2013.

ROCHA, G. DA G. et al. Natural triterpenoids from *Cecropia lyratiloba*

are cytotoxic to both sensitive and multidrug resistant leukemia cell lines. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 23, p. 7355–7360, 2007.

RUFFA, M. J. et al. Inhibitory effect of medicinal herbs against RNA and DNA viruses. **Antiviral Chemistry & Chemotherapy**, v. 15, n. 3, p. 153–159, 2004.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3–4, p. 161–171, 2008.

SALVESEN, G. S.; DUCKETT, C. S. IAP proteins: blocking the road to death's door. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 6, p. 401–410, 2002.

SAUERESSIG, D. *Cecropia pachystachya* Trécul. 2012 Disponível em: <<http://florestaombrofilamista.com.br/sidol/?menu=species&menu=home&page=details&id=370>>. Acesso em: 3 out. 2016.

SCARLATTI, F. et al. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. **Cell Death and Differentiation**, v. 15, n. 8, p. 1318–1329, 2008.

SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFGRS / Ed. da UFSC, 2010. p. 371-400.

SCHINELLA, G. et al. Anti-inflammatory and apoptotic activities of pomolic acid isolated from *Cecropia pachystachya*. **Planta Medica**, v. 74, n. 3, p. 215–220, 2008.

SCHRODER, F. H. et al. Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 13, p. 1320–1328, 2009.

SEBASTIANO, K. M. D.I; MOURTZAKIS, M. The role of dietary fat throughout the prostate cancer trajectory. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6095–6109, 2014.

SEONG, Y.A. et al. Induction of the endoplasmic reticulum stress and autophagy in human lung carcinoma A549 cells by anacardic acid. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 2, p. 369–377, 2014.

SHANMUGAM, M. K. et al. Targeted inhibition of tumor proliferation, survival, and metastasis by pentacyclic triterpenoids: Potential role in prevention and therapy of cancer. **Cancer Letters**, v. 320, n. 2, p. 158–170, 2012.

SHEN, H.-M.; CODOGNO, P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? **Autophagy**, v. 7, n. 5, p. 457–465, 2011.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7–30, 2016.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5–29, 2015.

SILVA, A. O. et al. A guide for the analysis of long-term population growth in cancer. **Tumor Biology**, p. 1–7, 2016.

SILVA, I.T. **Avaliação da ação citotóxica e antitumoral de cucurbitacinas naturais e derivados semissintéticos**. Tese (Doutorado em Farmácia) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

SILVA, I. T. et al. In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. **Letters in Applied Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 143–148, 2010.

SILVA, I. T. et al. Proliferative inhibition and apoptotic mechanism on human non-small-cell lung cancer (A549 cells) of a novel cucurbitacin from *Wilbrandia ebracteata* Cogn. **International Journal of Cancer Research**, v. 9, n. 2, p. 54–68, 2013.

SILVA, I. T. et al. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of a novel semisynthetic derivative of cucurbitacin B. **PLoS one**, v. 10, n. 2, p. 1–19, 2015.

SILVA, I. T. et al. Cytotoxic effects of natural and semisynthetic cucurbitacins on lung cancer cell line A549. **Investigational New Drugs**,

v. 34, n. 2, p. 139–148, 2016.

SILVA, M. A. B. et al. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 4, p. 549–562, 2010.

SILVA, I.T. **Triagem anti-herpética de alguns táxons da biodiversidade brasileira: fracionamento biomonitorado de *Cecropia glaziovii* Sneath., Urticaceae (embaúba)**. Dissertação (Mestrado em Farmácia) - Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SIQUEIRA, J. M. et al. Evaluation of the antitumoral effect of dihydrocucurbitacin-B in both *in vitro* and *in vivo* models. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 64, n. 3, p. 529–538, 2009.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107 - 1112, 1990.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. H. **TNM Classifications of malignant tumours 7. ed.** University of Toronto, 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE UROLOGIA. **NOTA OFICIAL – Rastreamento do câncer de próstata**. 2016. Disponível em: <<http://portaldaurologia.org.br/destaques/nota-oficial-rastreamento-do-cancer-de-prostata-2/>>. Acesso em: 10 outubro 2016.

SOUZA, D. O. et al. Atividade antibacteriana e moduladora de *Cecropia pachystachya* Trécul sobre a ação de aminoglicosídeos. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 19, n. 3, p. 121–132, 2014.

SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 26, p. 14376–14381, 2000.

SUN, C. et al. Inhibitory effect of cucurbitacin E on pancreatic cancer cells growth via STAT3 signaling. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 136, n. 4, p. 603–610, 2010.

SUZUKI, K.; OHSUMI, Y. Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). **FEBS Letters**, v. 584, n. 7, p. 1280–1286, 2010.

TAKAHASHI, N. et al. Cucurbitacin D isolated from *Trichosanthes kirilowii* induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 4, p. 508–513, 2009.

TANNOCK, I. F. et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 15, p. 1502–1512, 2004.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231–241, 2008.

THADANI-MULERO, M. et al. Androgen receptor splice variants determine taxane sensitivity in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 74, n. 8, p. 2270–2282, 2014.

THOENNISSSEN, N. H. et al. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. **Cancer Research**, v. 69, n. 14, p. 5876–5884, 2009.

THIMMAPPA, R. et al. Triterpene biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Biology**, v. 65, p. 225–257, 2014.

TSUKADA, M.; OHSUMI, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v. 333, n. 1–2, p. 169–174, 1993.

UCHÔA, V. T. et al. Antimalarial activity of compounds and mixed fractions of *Cecropia pachystachya*. **Drug Development Research**, v. 71, n. 1, p. 82–91, 2010.

VAN GENDEREN, H. et al. In vitro measurement of cell death with the annexin A5 affinity assay. **Nature protocols**, v. 1, n. 1, p. 363–367, 2006.

- VELAZQUEZ, E. et al. Antioxidant activity of Paraguayan plant extracts. **Fitoterapia**, v. 74, n. 2, p. 91–97, 2003.
- VICHAI, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.
- VLADA, C. A.; KIM, J. S.; BEHRNS, K. E. Autophagy: self-preservation through cannibalism of proteins and organelles. **Surgery**, v. 157, n. 1, p. 1–5, 2015.
- WADA, Y.; OHSUMI, Y.; ANRAKU, Y. Chloride transport of yeast vacuolar membrane vesicles: a study of *in vitro* vacuolar acidification. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1101, n. 3, p. 296–302, 1992.
- WAKIMOTO, N. et al. Cucurbitacin B has a potent antiproliferative effect on breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer Science**, v. 99, n. 9, p. 1793–1797, 2008.
- WEAVER, B. A. How taxol/paclitaxel kills cancer cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 18, p. 2677–81, 2014.
- WELCH, D. R. Tumor cell invasion-not all barriers are created equal. **Cancer Research**, v. 76, n. 7, p. 1675–1676, 2016.
- XU, C. et al. Fat intake is not linked to prostate cancer: A systematic review and dose-response meta-analysis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–15, 2015.
- YOON, M. J. et al. Superoxide anion and proteasomal dysfunction contribute to curcumin-induced paraptosis of malignant breast cancer cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 48, n. 5, p. 713–726, 2010.
- YOON, M. J. et al. Simultaneous mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  overload and proteasomal inhibition are responsible for the induction of paraptosis in malignant breast cancer cells. **Cancer Letters**, v. 324, n. 2, p. 197–209, 2012.
- YOON, M. J. et al. Release of  $\text{Ca}^{2+}$  from the endoplasmic reticulum and its subsequent influx into mitochondria trigger celastrol-induced paraptosis in cancer cells. **Oncotarget**, v. 5, n. 16, p. 6816–6831, 2014.

YOSHIDA, M. et al. Antiproliferative constituents from Umbelliferae plants VII. Active triterpenes and rosmarinic acid from *Centella asiatica*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 173–175, 2005.

ZHANG, C. et al. 8-p-Hydroxybenzoyl tovarol induces paraptosis like cell death and protective autophagy in human cervical cancer HeLa cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 7, p. 14979–14996, 2015.

ZHANG, M. et al. Inhibition of pancreatic cancer cell growth by cucurbitacin B through modulation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling. **Pancreas**, v. 39, n. 6, p. 923–929, 2010.

ZHANG, Y. et al. Cucurbitacin B induces rapid depletion of the G-actin pool through reactive oxygen species-dependent actin aggregation in melanoma cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 43, n. 7, p. 556–567, 2011.

ZHAO, J. M. et al. Novel dammarane-type saponins from *Panax ginseng* berry and their biological activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 3, p. 1027–1031, 2011.

ZHOU, L. et al. Cytotoxic and anti-oxidant activities of lanostane-type triterpenes isolated from *Poria cocos*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, n. 10, p. 1459–62, 2008.

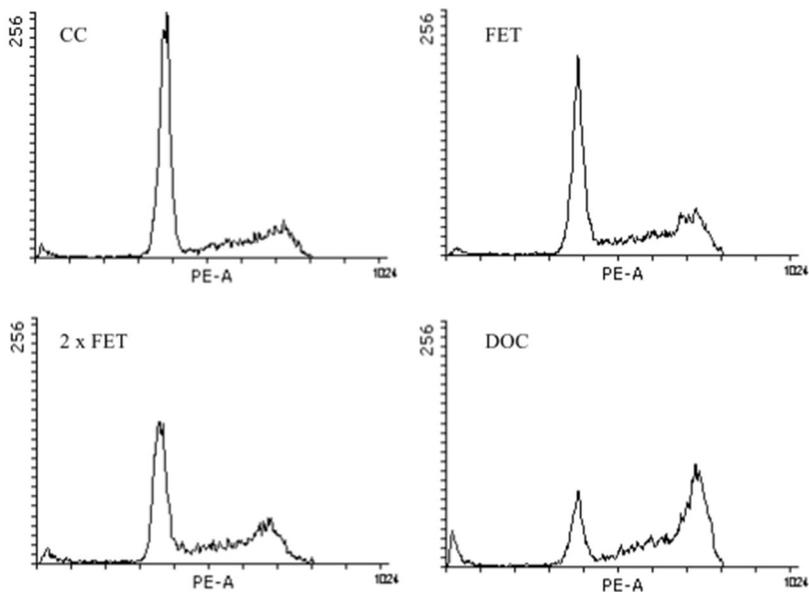
ZHU, M. L. et al. Tubulin-targeting chemotherapy impairs androgen receptor activity in prostate cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 20, p. 7992–8002, 2010.

ZHU, Z. et al. Ursolic acid attenuates temozolomide resistance in glioblastoma cells by downregulating O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) expression. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 7, p. 3299–3308, 2016.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News in Physiological Sciences**, v. 19, n. 10, p. 124–128, 2004.

## APÊNDICE

**Apêndice 1** – Histogramas representativos dos efeitos do tratamento de células PC-3 com a fração rica em triterpenos (FET) de *Cecropia pachystachya* sobre a distribuição das células nas fases do ciclo celular



As células foram tratadas com FET durante 48 h, e após, coradas com iodeto de propídeo. Por fim, a suspensão celular foi analisada em citômetro de fluxo, com leitura nos filtros PE e PerCP.