



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS CURITIBANOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA  
CONVENCIONAL E INTEGRATIVA

Marilise França da Rocha

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O.  
Kuntze EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA**

Curitibanos

2023

Marilise França da Rocha

**POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE *Araucaria angustifolia***  
**(Bertol.) O. Kuntze EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA**

Dissertação submetida ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária Convencional e Integrativa da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Evelyn Winter da Silva, Dra.

Coorientador: Prof. Greicy Michelle Marafiga Conterato, Dra.

Curitiba

2023

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

da Rocha, Marilise Franca  
POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE Araucaria  
angustifolia (Bertol.) O. Kuntze EM LINHAGENS CELULARES DE  
CÂNCER DE MAMA / Marilise Franca da Rocha ; orientador,  
Evelyn Winter da Silva, coorientador, Greicy Michelle  
Marafiga Conterato, 2023.  
81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária Convencional e Integrativa,  
Curitibanos, 2023.

Inclui referências.

1. Medicina Veterinária Convencional e Integrativa. 2.  
Atividade Antitumoral. 3. Compostos Bioativos. 4. Câncer de  
Mama. 5. Araucaria Angustifolia. I. Winter da Silva,  
Evelyn . II. Michelle Marafiga Conterato, Greicy . III.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária Convencional e  
Integrativa. IV. Título.

Marilise França da Rocha

***POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS DE Araucaria angustifolia  
(Bertol.) O. Kuntze EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER DE MAMA***

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca  
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Greicy Michelle Marafiga Conterato, Dr.(a)  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof.(a) Cristiane Casagrande Denardin, Dr.(a)  
Universidade Federal do Pampa – UNIPAMPA

Prof. Cristian Soldi, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi  
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Ciências.

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. Evelyn Winter da Silva, Dra.

Orientador(a)

Curitiba, 2023.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que iluminou os meus caminhos ao longo desta trajetória, dando-me força e coragem de seguir em frente. Que através de tantos desafios, provações e dificuldades me mostrou que tudo na vida é aprendido.

Aos meus pais, por todo amor que me deram, pela educação e por todos os princípios passados, sem isso eu não seria quem sou. Obrigada MÃE por me incentivar a alcançar meus sonhos e objetivos, independentemente de quais fossem, por se desdobrar em quantas fosse necessário para me ajudar. Obrigada por cuidar e dar todo o amor do mundo pra Olívia nos muitos momentos que não pude estar com ela por causa do mestrado.

À Olívia, meus agradecimentos e minhas desculpas por muitas vezes não poder estar contigo em razão das pesquisas, tudo isso é por você e para você também! Espero doravante compensá-la das horas de atenção e brincadeira que lhe devo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Evelyn Winter da Silva, que sempre acreditou em mim, agradeço a orientação exemplar pautada por um elevado nível científico, uma prontidão e interesse permanente e uma visão crítica e oportuna. As suas críticas construtivas, as discussões e reflexões, bem como seus ensinamentos na parte prática dos experimentos, foram fundamentais ao longo de todo o percurso.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Greicy Michelle Marafíga Conterato, agradeço enormemente pelo “novo mundo” apresentado, pelos ensinamentos e ajuda na execução dos experimentos.

Às minhas colegas de trabalho e ao meu chefe, obrigada pelas palavras de incentivo, por tornar minhas tardes mais leves, por ouvirem minhas reclamações e por acreditarem em mim.

Aos colegas do laboratório (LAFRA), obrigada pelo auxílio quando solicitado e ao Médico Veterinário André, obrigada por todo conhecimento passado e por ajuda recebida, obrigada pela disponibilidade a sempre ajudar.

Aos professores do PPGMVCI, que contribuíram para a minha formação, seja através de aulas, de conversas ou de conselhos. Vocês foram os grandes pilares desta importante vitória.

Aos professores da banca examinadora, pela disponibilidade de fazer a avaliação desta dissertação e contribuir com meu trabalho

Ao Programa de Bolsas Universitárias de Santa Catarina – UNIEDU e a Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina - FAPESC, pelo suporte financeiro, sem ele este trabalho não teria se concretizado.

A todos que aqui possam não ter sido citados, mas que em determinadas ocasiões e de alguma forma contribuíram para que eu conseguisse concluir meu mestrado e foram fundamentais ao aprendizado em algum momento durante esse tempo. Este trabalho não seria uma dissertação sem a colaboração de muitas pessoas.

“A única forma de chegar ao impossível, é acreditar que é possível.” (CARROL, 1985)

## RESUMO

O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo, estando entre as quatro principais causas de morte prematura na maioria dos países. Assim como na medicina humana, na veterinária ele é responsável por uma alta taxa de mortalidade. O tratamento com os quimioterápicos atuais pode causar muitos efeitos adversos como transtornos neurológicos, mielosupressão entre outros. Além disso, há um aumento progressivo de neoplasias que desenvolvem altas taxas de agressividade e resposta variável aos quimioterápicos, inclusive resistência. A descoberta de fármacos a partir de plantas medicinais tem desempenhado importante função no tratamento do câncer. A *Araucaria angustifolia* (Bert. O Kuntze) é encontrada principalmente no Sul do Brasil e tem um notável histórico terapêutico na medicina popular, tendo também grande importância socioeconômica e ambiental. Este estudo objetiva avaliar o potencial antitumoral de extratos de brácteas e sementes da araucária. Para isto, foi analisada a viabilidade celular nas células tumorais bem como o mecanismo de morte envolvido. A citotoxicidade foi avaliada em linhagens celulares tumorais de mama e uma linhagem não tumoral como modelo preliminar de toxicidade. Os testes foram realizados com extratos das brácteas e semente. Calculou-se a concentração citotóxica para 50% das células (CC50) e o índice de seletividade (IS) para todos os extratos. O extrato de bráctea BHA70 foi capaz de induzir citotoxicidade de maneira dose-dependente na linhagem tumoral e mostrou potencial efeito citotóxico seletivo. Os resultados da avaliação do tipo de morte celular demonstraram predominância de características de apoptose induzida pelo extrato. O extrato também inibiu a migração celular em 24 e 48h de tratamento, e teve um efeito antiproliferativo. Evidenciou-se uma atuação do extrato na indução do estresse oxidativo através da redução na atividade das enzimas glutathione peroxidase, glutathione s-transferase, glutathione reductase e catalase. Na avaliação da geração de ROs o extrato BHA70 induziu a formação de EROs, sendo quase 4 vezes superior ao grupo controle. Na avaliação da expressão gênica houve redução na expressão dos genes antiapoptóticos *BCL2* e *BCLXL* e aumento na expressão do gene pró-apoptótico *BAX*, sugerindo uma atuação da via intrínseca da apoptose. Os resultados apresentados sugerem que o extrato das brácteas de Araucária é promissor para a continuidade das investigações de novos fármacos antitumorais.

**Palavras-chave:** antitumoral, câncer, extrato vegetal, *Araucaria angustifolia*.



## ABSTRACT

Cancer is the main public health problem in the world, being among the four main causes of premature death in most countries. As in human medicine, in veterinary medicine it is responsible for a high mortality rate. Treatment with current chemotherapy drugs can cause many adverse effects such as neurological disorders, myelosuppression, among others. In addition, there is a progressive increase in neoplasms that develop high rates of aggressiveness and variable response to chemotherapy, including resistance. The discovery of drugs from medicinal plants has played an important role in the treatment of cancer. *Araucaria angustifolia* (Bert. o Kuntze) is found mainly in southern Brazil and has a notable therapeutic history in folk medicine, also having great socioeconomic and environmental importance. This study aims to evaluate the antitumor potential of araucaria bract and seed extracts. For this, cell viability in tumor cells was analyzed as well as the mechanism of death involved. Cytotoxicity was evaluated in breast tumor cell lines and a non-tumor cell line as a preliminary model of toxicity. The tests were performed with bract and seed extracts. The cytotoxic concentration for 50% of the cells (CC50) and the selectivity index (SI) were calculated for all extracts. The bract extract BHA70 was able to induce dose-dependent cytotoxicity in the tumor cell lineage and showed potential selective cytotoxic effect. The results of the evaluation of the type of cell death showed a predominance of characteristics of apoptosis induced by the extract. The extract also inhibited cell migration at 24 and 48h of treatment, and had an antiproliferative effect. In the evaluation of the generation of ROs, the BHA70 extract induced the formation of ROs, being almost 4 times higher than the control group. In the evaluation of gene expression, there was a reduction in the expression of the anti-apoptotic genes *BCL2* and *BCLXL* and an increase in the expression of the pro-apoptotic gene *BAX*, suggesting an action of the intrinsic pathway of apoptosis. The presented results suggest that the extract of *Araucaria* bracts is promising for the continuation of investigations of new antitumor drugs.

**Keywords:** antitumoral, cancer, plant extract, *Araucaria angustifolia*.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| Figura 1. Vias apoptóticas em resumo. ....  | 24 |
| Figura 2. Árvores de <i>Araucaria angustifolia</i> .....  | 27 |
| Figura 3. Quantificação dos flavonoides presentes nos extratos. Resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão. .... | 43 |
| Figura 4. Citotoxicidade dos extratos de brácteas e sementes de <i>A. angustifolia</i> em linhagem MCF-7. ....              | 45 |
| Figura 5. Citotoxicidade dos extratos de brácteas e sementes de <i>A. angustifolia</i> em linhagem MDA-MB-231. ....         | 45 |
| Figura 6. Citotoxicidade dos extratos de brácteas e sementes de <i>A. angustifolia</i> em linhagem HUVEC. ....              | 46 |
| Figura 7. Avaliação do tipo de morte celular. ....  | 48 |
| Figura 8. Avaliação do tipo de morte celular. ....  | 49 |
| Figura 9. Avaliação da migração celular após 24 e 48h de incubação com o extrato. ....                                      | 50 |
| Figura 10. Avaliação da migração celular após 24 e 48h de incubação com o extrato. ....                                     | 51 |
| Figura 11. Avaliação da formação de colônias após 48h de incubação com o extrato BHA70. ....                                | 52 |
| Figura 12. Avaliação da formação de colônias após 48h de incubação com o extrato BHA70. ....                                | 53 |
| Figura 13. Efeito do BHA70 na expressão dos genes <i>BLCL2</i> , <i>BCLXL</i> , <i>BAX</i> e <i>Fas</i> . ....              | 54 |
| Figura 14. Efeito do BHA7 na relação <i>BAX/BLCL2</i> . ....  | 55 |
| Figura 15. Avaliação de espécies reativas de oxigênio por DCFH-DA. ....   | 57 |
| Figura 16. Efeito do tratamento na produção de espécies reativas de oxigênio por DCFH-DA. ....                              | 57 |
| Figura 17. Efeito do BHA70 na atividade das enzimas antioxidante em células MDA-MB231. ....                                 | 59 |
| Figura 18. Efeito do BHA70 na concentração de Tióis Totais em células MDA-MB-231. ....                                      | 60 |
| Figura 19. Coeficiente angular da reta do <i>GAPDH</i> .....  | 77 |
| Figura 20. Coeficiente angular da reta do <i>FAS</i> .....  | 78 |
| Figura 21. Coeficiente angular da reta do <i>BCL2</i> .....   | 78 |
| Figura 22. Coeficiente angular da reta do <i>BAX</i> .....  | 79 |
| Figura 23. Coeficiente angular da reta do <i>BCLXL</i> .....  | 79 |

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Curvas de calibração dos padrões utilizados na determinação de compostos fenólicos dos extratos BHA70 e BHA96. ....   | 31 |
| Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR. ....  | 36 |
| Tabela 3. Resultados da caracterização dos compostos fenólicos presentes nos extratos de brácteas de <i>A. angustifolia</i> . ....  | 42 |
| Tabela 4. Valores de CC50 obtidos nos testes de viabilidade celular após 72 horas do tratamento com concentrações crescentes dos diferentes extratos nas diferentes linhagens celulares. .... | 46 |
| Tabela 5. Valores de Índice de Seletividade (IS) dos extratos BHA70 e BAE nas linhagens tumorais. ....  | 47 |
| Tabela 6. Curva de Eficiência Primers da qPCR. ....   | 76 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| BAE               | Extrato de brácteas em Acetato de Etila                 |
| BCL2              | Célula B de linfoma 2                                   |
| BE                | Brometo de etídio                                       |
| BHA70             | Extrato hidroalcoólico de brácteas em etanol 70 °GL     |
| BHA96             | Extrato hidroalcoólico de brácteas em etanol 96 °GL     |
| BSA               | Albumina sérica bovina                                  |
| CAT               | Catalase  |
| CC50              | Concentração citotóxica para 50% das células            |
| cDNA              | DNA complementar  |
| CLAE              | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                |
| CMTN              | Câncer de mama triplo negativo                          |
| CNDB              | 1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno                             |
| CO <sub>2</sub>   | Dióxido de carbono                                      |
| CTCF              | Fluorescência celular total corrigida                   |
| CuSO <sub>4</sub> | Sulfato de Cobre  |
| DAD               | Detector de arranjo de diodos                           |
| DCFH-DA           | Diacetato de Diclorofluoresceína                        |
| DISC              | Complexo de sinalização indutor de morte                |
| DMEM              | Meio de Eagle modificado por Dulbecco                   |
| DMSO              | Dimetilsulfóxido  |
| DTT               | Ditiotreitól  |
| EPM               | Erro Padrão da Média                                    |
| EROs              | Espécies reativas de oxigênio                           |
| FADD              | Proteína adaptadora associada à proteína Faz            |
| GAPDH             | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase                   |
| GPx               | Glutaciona peroxidase                                   |
| GR                | Glutaciona redutase                                     |
| GSH               | Glutaciona reduzida                                     |
| GSSG              | Dissulfeto de glutaciona                                |
| GST               | Glutaciona S-transferaseH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>   |
| HEp-2             | Células tumorais de laringe                             |
| HEPES             | Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)1-piperazinil]-etanosulfônico |

|                                 |   |
|---------------------------------|---|
| HER2                            | Fator de crescimento epidérmico humano                              |
| HUVEC                           | Linhagem de células endoteliais de veia umbilical humana            |
| IDH                             | Índice de desenvolvimento Humano                                    |
| INCA                            | Instituto Nacional do Câncer  |
| IS                              | Índice de seletividade  |
| LA                              | Laranja de acridina   |
| LAFRA                           | Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal                      |
| LOD                             | Limite de detecção  |
| LOQ                             | Limite de quantificação   |
| MCF-7                           | Linhagem de células humanas de câncer de mama ER+                   |
| MCL1                            | Myeloid cell leukaemia-1  |
| MDA-MB-231                      | Linhagem de células humanas de câncer de mama triplo negativas      |
| MLKL                            | Proteína domínio quinase símile de linhagem mista                   |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | Carbonato de sódio  |
| NADPH                           | Dinucleotídeo de nicotinamida e adenine fostato reduzido            |
| NaN <sub>3</sub>                | Azida de sódio  |
| NaOH                            | Hidróxido de Sódio  |
| PANC-1                          | Linhagem celular de câncer pancreático                              |
| PBS                             | Tampão Fosfato Salino   |
| PMSF                            | Fluoreto de fenilmetilsulfonil                                      |
| qPCR                            | Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa                         |
| RIPK1                           | Proteína serina-treonina quinase de interação com receptores 1      |
| RIPK3                           | Proteína serina-treonina quinase de interação com receptores 3      |
| RNA                             | Ácido Ribonucléico  |
| SOD                             | Superóxido Dismutase  |
| t-BuOOH                         | Terc-Butil  |
| TRAIL                           | Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral |
| UFSC                            | Universidade Federal de Santa Catarina                              |
| °C                              | Graus Celsius   |

## SUMÁRIO

|              |  |           |
|--------------|--|-----------|
| <b>1</b>     | <b>INTRODUÇÃO .....</b>  | <b>15</b> |
| 1.1          | OBJETIVOS .....  | 17        |
| <b>1.1.1</b> | <b>Objetivo Geral.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>1.1.2</b> | <b>Objetivos Específicos .....</b>   | <b>18</b> |
| <b>2</b>     | <b>Revisão bibliográfica .....</b>   | <b>19</b> |
| 2.1          | Câncer .....   | 19        |
| <b>2.1.1</b> | <b>Câncer de mama .....</b>  | <b>19</b> |
| 2.2          | Tipos de morte celular .....   | 22        |
| <b>2.2.1</b> | <b>Apoptose .....</b>  | <b>23</b> |
| 2.3          | Estresse Oxidativo .....   | 25        |
| 2.4          | Produtos naturais e desenvolvimento de novos fármacos .....  | 26        |
| 2.5          | <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert.) O. Kuntze.....   | 26        |
| <b>3</b>     | <b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>  | <b>29</b> |
| 3.1          | Obtenção dos extratos.....   | 29        |
| 3.2          | CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS .....   | 30        |
| <b>3.2.1</b> | <b>DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE).....</b> | <b>30</b> |
| <b>3.2.2</b> | <b>QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS.....</b>  | <b>32</b> |
| 3.3          | Linhagens celulares e Avaliação de Citotoxicidade .....  | 32        |
| 3.4          | Avaliação do tipo de morte celular .....   | 33        |
| 3.5          | Avaliação da migração celular.....   | 34        |
| 3.6          | Avaliação da formação de colônias .....  | 34        |
| 3.7          | Extração de RNA.....   | 35        |
| 3.8          | Síntese de cDNA.....   | 36        |
| 3.9          | Curva de eficiência da reação de PCR.....  | 36        |
| 3.10         | Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....   | 36        |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.11     | Avaliação de espécies reativas de oxigênio (EROs).....        | 37        |
| 3.12     | Preparação das Amostras para Defesas Antioxidantes.....       | 37        |
| 3.13     | Dosagem de proteína .....                                     | 38        |
| 3.14     | Mensuração da Atividade da Catalase.....                      | 38        |
| 3.15     | Mensuração da Atividade da Glutathione Redutase.....          | 39        |
| 3.16     | Mensuração da Atividade da Glutathione Peroxidase (GPX) ..... | 39        |
| 3.17     | Mensuração da Atividade da Glutathione Transferase (GST)..... | 40        |
| 3.18     | mensuração de Tióis Totais .....                              | 40        |
| 3.19     | Análise estatística dos dados .....                           | 41        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>                            | <b>41</b> |
| 4.1      | Obtenção e caracterização do extrato vegetal.....             | 41        |
| 4.2      | Quantificação dos flavonoides.....                            | 43        |
| 4.3      | Citotoxicidade.....   | 44        |
| 4.4      | Tipo de morte celular.....                                    | 48        |
| 4.5      | Inibição de mecanismos migratórios .....                      | 50        |
| 4.6      | Inibição da formação de colônias .....                        | 51        |
| 4.7      | Expressão gênica por PCR quantitativo .....                   | 54        |
| 4.8      | Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....         | 56        |
| 4.9      | Defesas antioxidantes e tióis totais.....                     | 58        |
| <b>5</b> | <b>CONCLUSÃO.....</b>   | <b>62</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                       | <b>63</b> |
|          | <b>APÊNDICE A – Curva de Eficiência da qPCR.....</b>          | <b>76</b> |





## 1 INTRODUÇÃO

As neoplasias têm a cada dia mais importância no perfil de morbidade e mortalidade da população mundial. O câncer é o principal problema de saúde pública no mundo e já está entre as quatro principais causas de morte prematura (antes dos 70 anos de idade) na maioria dos países (1). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Brasil, as neoplasias são responsáveis pela terceira causa de morte na população, sendo que entre as mulheres, ocupam a segunda posição, e Santa Catarina está entre os estados com maior incidência tanto para homens como para mulheres. Entre os tumores responsáveis por mais óbitos no Estado, nos últimos 5 anos, temos os de pulmão, mama, estômago, pâncreas e próstata (1). Se espera 704 mil novos casos de câncer humano no Brasil para cada ano do triênio 2023-2025, sendo, cerca de 70% da incidência nas regiões Sul e Sudeste. Os tipos mais incidentes nessas duas regiões são o câncer de mama em mulheres (Sul: 71,44/100 mil; Sudeste: 84,46/100 mil), o de próstata (Sul: 57,23/ 100 mil; Sudeste: 77,89/ 100 mil) e o de cólon e reto (Sul: 26,46/100 mil; Sudeste: 28,75/100 mil) (2,3).

Assim como na medicina humana, na veterinária o câncer é responsável por uma das maiores taxas de mortalidade em animais de companhia (4,5), sendo o tumor de mama a neoplasia mais comum nas fêmeas (6,7). Nas cadelas representa aproximadamente a metade de todas as neoplasias observadas, e destes, 50% são malignas (8).

Em mulheres, é o tumor mais frequente no mundo, tendo 22% de casos novos a cada ano. No Brasil, em 2017, ocorreram 16.724 óbitos por câncer de mama feminino, o equivalente a um risco de 16,16 por 100 mil (1).

O câncer de mama canino apresenta muitas similaridades clínicas e moleculares com o humano. O comportamento e a epidemiologia tumoral em ambos são muito semelhantes, tornando o tumor canino um excelente modelo para estudos de câncer de mama e consequentemente, trazendo grandes benefícios tanto na medicina humana quanto na veterinária (9,10).

Tanto nos tumores de mama em cadelas como nas mulheres, a cirurgia é o tratamento mais recomendado e utilizado (11, 12, 1). Ao protocolo cirúrgico pode ser associada a quimioterapia a fim de evitar metástases e recidivas e auxiliar na eliminação de células tumorais residuais. Ainda, a quimioterapia pode ser realizada de maneira paliativa em neoplasias que não podem ser operadas ou em pacientes com metástases, proporcionando uma melhor qualidade e expectativa de vida. Os fármacos mais usados para o tratamento das neoplasias mamárias são a

doxorrubicina associada com a ciclofosfamida, cisplatina, carboplatina, gencitabina e paclitaxel, tanto na cadela quanto na mulher (13,14).

O desenvolvimento do câncer é um processo de várias etapas, onde muitos mecanismos estão envolvidos na sua iniciação e progressão, envolvendo um acúmulo de alterações ou “defeitos” no DNA celular. As etapas que levam a alteração de uma célula em tumoral não são totalmente esclarecidas mas a mudança fundamental envolve a função prejudicada dos genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular, como oncogenes e genes supressores tumoral, que levam a falhas nas vias da apoptose, (15,16).

A apoptose é um processo de morte celular programada e participa de processos fisiológicos, como no desenvolvimento embriológico, na regulação da proliferação celular, na correção ou eliminação de células danificadas. Acredita-se que a supressão da apoptose durante a carcinogênese desempenhe um papel central no desenvolvimento e progressão de alguns tipos de câncer (17). A apoptose pode ser desencadeada pela ligação de ligantes de morte a receptores de morte na via extrínseca ou por citotoxicidade que inicia a via “mitocondrial” intrínseca. No geral, essas vias convergem para ativar uma série de proteases específicas (caspases), que clivam as principais proteínas celulares e levam a morte celular. A via extrínseca da apoptose é mediada por receptores, como Fas e TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral de ocorrência natural) que transmitem sinais de morte extracelular para a maquinaria intracelular apoptótica para provocar a morte celular. Já a via intrínseca (ou mitocondrial) é controlada por ações opostas de membros da família *BCL2* (B-cell lymphoma 2) que reagem à danos celulares. O início da apoptose nessa via depende do equilíbrio entre proteínas proapoptóticas (BAX, BAK, BAD, BID, BIK E BIM) e proteínas antiapoptóticas (BCL2, BCLXL, BCLW, BFL1 E MCL1) (18,19,20).

Os mecanismos apoptóticos também podem ser afetados por desequilíbrio no metabolismo oxidativo. Em condições normais na respiração celular mitocondrial há um equilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua neutralização pelo organismo, porém quando o organismo se expõe a grandes quantidades de EROs exógenos ou há uma falha na autorregulação deles pelos mecanismos de defesa, gera o estresse oxidativo. Enzimas antioxidantes, incluindo Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx) são as enzimas de defesa celular de primeira linha contra a lesão oxidativa. A produção excessiva de EROs também pode atuar prejudicando as células tumorais e as levando a apoptose (21).

Compostos bioativos oriundos de produtos naturais têm sido usados por milhares de anos como tratamento para inúmeras doenças, incluindo diferentes tipos de câncer (22-23). A descoberta de fármacos a partir de plantas medicinais tem desempenhado uma importante função no tratamento de câncer (24-25). A capacidade de induzir a apoptose nas células tumorais sem causar danos excessivos às células normais é fundamental na identificação de qualquer composto natural com possível uso para prevenção ou terapia contra câncer (26).

A *Araucaria angustifolia* (Bert. O Kuntze) pertence à família Araucariaceae e é encontrada principalmente no Sul do Brasil. Esta planta possui um histórico terapêutico na medicina popular onde, infusões de folhas, cascas e nós são utilizadas para tratar anemias, distensões musculares, varizes, doenças renais e sexualmente transmissíveis [21-23]. Além disso, o xarope produzido a partir da resina é utilizado no tratamento de infecções do trato respiratório. Ainda, tem grande importância socioeconômica e ambiental. Seus estróbilos femininos originam a pinha, composta por pinhões (sementes verdadeiras) e brácteas (sementes não desenvolvidas) (27). A análise fitoquímica de brácteas de *A. angustifolia*, mostrou a presença de ácidos graxos dodecanóico e hexadecanóico, além de compostos fenólicos (28).

Estudos prévios sobre as atividades biológicas de diferentes partes da *A. angustifolia* demonstraram grande potencial medicinal ou outras propriedades benéficas ainda desconhecidas, em função da diversidade de compostos bioativos que possui. Em estudos de Almeida (29), foram isolados taninos, biflavonóides com possível ação antitumoral, bilobetina atribuída à atividade inibidora linfocitária, cupressuflavona com atividade antifúngica e proantocianidinas com atividade antiviral. Em algumas pesquisas, foram relatados que através de diferentes mecanismos, extratos de brácteas de *A. angustifolia* apresentam efeitos antiproliferativos seletivos em células tumorais de laringe, estômago e próstata (27-32).

Neste trabalho, será avaliado a atividade antitumoral de diferentes extratos de sementes e brácteas de *A. angustifolia* em linhagens celulares de tumor de mama.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antitumoral *in vitro* de extratos de brácteas e sementes de *A. angustifolia* (araucária).

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- investigar o potencial antitumoral dos extratos em linhagens de células tumorais de mama.
- investigar a citotoxicidade dos extratos em linhagem de célula não-tumoral.
- verificar a seletividade dos extratos para células tumorais em relação à célula não-tumoral.
- verificar o potencial inibitório dos extratos sobre a capacidade migratória e proliferativa das células tumorais.
- identificar o tipo de morte celular induzida pelos extratos.
- investigar o mecanismo de ação dos extratos através de avaliações de marcadores de apoptose e estresse oxidativo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER

Câncer, palavra originada do latim, é o nome atribuído a um grupo de mais de 100 enfermidades que têm em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos adjacentes podendo gerar metástases (se espalhar para outras partes do corpo). Proliferando vertiginosamente, estas células geralmente agressivas e incontroláveis, levam a formação de tumores (aglomerado de células cancerosas) ou neoplasias malignas. Já os tumores benignos são definidos como uma massa localizada de células que se assemelham ao seu tecido original e se proliferam lentamente, raramente apresentando risco de vida ao paciente. O processo de carcinogênese se dá por efeitos cumulativos de diferentes agentes carcinogênicos que são os responsáveis pelo início, promoção e progressão do tumor (3).

Os diferentes tipos de tumores apresentam sete características: crescimento seletivo e vantagem proliferativa, resposta alterada ao estresse favorecendo a sobrevivência, vascularização, invasão e metástase, modulação metabólica, microambiente tumoral alterado e modulação imunológica (33).

No câncer, há uma perda de equilíbrio entre a divisão celular e a morte celular e as células que deveriam ter morrido não receberam os sinais para fazê-lo. O problema pode surgir em qualquer passo ao longo do caminho da apoptose, levando à transformação maligna das células afetadas, metástases e resistência a medicamentos anticancerígenos. Apesar de ser a causa do problema, a apoptose desempenha um papel importante no tratamento do câncer, pois é um alvo comum de muitas estratégias de tratamento (34).

#### 2.1.1 Câncer de mama

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em mulheres de todas as regiões, com taxas mais altas nas regiões Sul e Sudeste. Para o ano de 2023 foram estimados 73.610 casos novos (3).

Na veterinária, cerca de 52% de todas as neoplasias nas cadelas são de mama, sendo que destes, 50% são malignas (35). No Brasil, a ocorrência de tumores mamários malignos em cadelas chega à 70% e acomete, principalmente, fêmeas entre 7-12 anos (36).

Vários aspectos, incluindo fatores hormonais, nutricionais e genéticos têm sido implicados no desenvolvimento de neoplasias mamárias. As principais opções de tratamento utilizadas são: cirurgia, quimioterapia, radioterapia e imunoterapia (37).

Tanto em humanos quanto em caninos, a análise histopatológica continua sendo o padrão-ouro para o diagnóstico de câncer. Na avaliação, analisa-se o tipo e grau histológico do tumor, devendo esta fornecer principalmente informações sobre proliferação celular, arquitetura, invasão linfática, atividade de mitose, necrose, formação de túbulos, pleomorfismo nuclear entre outros. A principal razão para somar essas duas classificações é fornecer mais informações sobre o comportamento biológico do tumor sendo que a classificação das amostras de mama em benignas e malignas é essencial para a escolha do regime de tratamento adequado (38,39).

O tipo histológico do câncer de mama reflete suas características morfológicas e também suas características biológicas. Os sistemas de classificação histológica categorizam o câncer de mama humano em carcinomas invasivos e *in situ*. Os carcinomas *in situ* são tumores nos quais as células malignas proliferam, mas permanecem confinadas dentro da membrana basal das unidades lobulares do ducto terminal da mama e podem ser subclassificados como lobulares ou ductais. Os carcinomas invasivos podem ser histologicamente classificados em invasivos lobulares, infiltrantes ductais, ductais/lobulares, tubulares, mucinosos, papilares e medulares (40). Sendo o tipo histológico mais comum de tumor mamário em mulheres o carcinoma invasivo, mais precisamente, o carcinoma ductal invasivo (41).

Nos cães, um subconjunto de carcinomas mamários apresenta-se como carcinomas simples que podem ser derivados de células progenitoras epiteliais mutantes e são comparáveis à forma mais comum de câncer de mama humano, os carcinomas ductais. Os carcinomas ductais (adenocarcinomas) são o tipo mais comum de tumores das glândulas mamárias no cão, sendo que a maioria dos tumores da glândula mamária são de origem epitelial. Alguns, no entanto, podem ter uma histologia mista que consiste em tecido epitelial e mioepitelial, com áreas de cartilagem e osso, e alguns tumores são de origem puramente mesenquimatosa (42).

Os exames laboratoriais e de imagem, como ultrassonografia abdominal e, principalmente radiografias torácicas devem ser realizadas como exames complementares ao diagnóstico na busca de síndrome paraneoplásica em curso e metástases, respectivamente (37,43).

Para instituir o tratamento adequado ao paciente é necessário o estadiamento da neoplasia, onde se analisa o tamanho, o envolvimento dos linfonodos e presença de metástase,

seguindo o sistema TNM (tumor, linfonodo e metástase) recomendado pelo OMS (Organização Mundial da Saúde), o qual é indicado apenas em neoplasias epiteliais caninas, onde os estágios 1, 2 e 3 diz respeito ao tamanho tumoral, a fase 4 se tem comprometimento dos linfonodos regionais e na fase 5 se há metástases, independente da extensão tumoral e do estado nodal (43).

Clinicamente, o câncer de mama pode ser dividido em três subtipos básicos: (I) com base no nível de expressão dos receptores de estrogênio e progesterona, com vários testes genômicos para auxiliar na previsão de resultados para pacientes, recebendo terapia endócrina; (II) com base no fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), que tem grande sucesso clínico devido ao direcionamento terapêutico eficaz de HER2 com Trastuzumabe e Pertuzumabe; (III) um terceiro subtipo, quando nem estrogênio, progesterona ou HER2 são expressos (câncer de mama triplo negativo), também conhecidos como cânceres de mama tipo basal, são um grupo com somente opções de quimioterapia convencional (44-46).

O perfil de expressão gênica é de utilidade limitada na prática clínica, e substitutos imuno-histoquímicos foram desenvolvidos. Recentemente, um estudo avaliando um grande número de casos subdividiu os tumores caninos de glândula mamária em subtipos moleculares e encontrou um aumento da prevalência de tumores triplo-negativos em cães (47).

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) abrange um grupo heterogêneo de doenças fundamentalmente diferentes com diferentes perfis histológicos, genômicos e imunológicos (48).

Os CMTNs mostraram uma alta frequência de mutações TP53 e a alta expressão nesse subtipo se correlaciona com mau prognóstico, estando fortemente correlacionada com a baixa sobrevida do paciente (9,49).

Devido à ausência de terapia direcionada aprovada, não sendo sensível à terapia endócrina ou à terapia alvo molecular, a quimioterapia citotóxica é a atual terapia sistêmica primária estabelecida para doença CMTN precoce e avançada. Estes tumores apresentam alta invasividade, alto potencial metastático e mau prognóstico. Embora a quimioterapia melhore significativamente os resultados clínicos dos pacientes CMTN, as taxas de recorrência permanecem relativamente altas e os tumores CMTN geralmente desenvolvem resistência a agentes quimioterápicos. Assim, considerando as opções limitadas de tratamento e os fenótipos agressivos do CMTN, é crucial descobrir potenciais alvos terapêuticos para auxiliar no desenvolvimento de terapias eficazes (50-52).

Ao comparar as curvas de sobrevida global de animais tratados com diferentes terapias adjuvantes e aqueles tratados apenas com cirurgia, verificou-se que pacientes com estadiamento

clínico avançado se beneficiam da terapia complementar. Pacientes caninas que apresentem neoplasias malignas da glândula mamária com estadiamento clínico avançado devem ser submetidas a medicação terapêutica complementar baseada no estadiamento clínico e nas características imunofenotípicas da doença (53,54).

Os quimioterápicos mais utilizados na medicina veterinária para o tratamento das neoplasias mamárias de cadelas são a doxorrubicina associada com a ciclofosfamida, cisplatina, carboplatina, gencitabina e paclitaxel (36).

O tratamento com os quimioterápicos atuais pode causar muitos efeitos adversos como transtornos neurológicos e disfunções motoras, anemia, alopecia, mielossupressão, hipertensão, êmese, convulsão, paresia, leucopenia, febre, trombocitopenia, poliúria, disúria e sintomas gastrointestinais (55,56).

## 2.2 TIPOS DE MORTE CELULAR

Tradicionalmente, a morte celular tem sido dividida em três categorias diferentes de acordo com as mudanças morfológicas celular. Isso inclui apoptose, que é caracterizada por uma série de alterações morfológicas, como volume celular aumentado, condensação da cromatina nuclear, formação de prolongamentos na membrana celular (“blebs” da membrana), fragmentação do DNA, e a formação de corpos apoptóticos. O resultado é a depuração das células do corpo, com danos mínimos aos tecidos subjacentes. A autofagia que envolve a extensa vacuolização citoplasmática, é seguida pela fusão autofagossomo-lisossomo e degradação do conteúdo celular. Finalmente, a necrose que é geralmente caracterizada como a morte descontrolada da célula, geralmente após um insulto grave, resultando em inchaço celular e desintegração tanto da membrana plasmática quanto da membrana nuclear, levando ao derramamento do conteúdo da célula nos tecidos circundantes e subsequente dano ao mesmo (57-60).

No entanto, na última década, uma ampla classificação de vários tipos de morte tem sido proposta, com base em mecanismos moleculares, morfológicos e bioquímicos, bem como consequências biológicas. Esta lista está em permanente progressão, com mais de 20 tipos diferentes já descritos (61). No entanto, apenas alguns desses foram relatadas no contexto do câncer: necrose, autofagia, apoptose, necroptose, piroptose e ferroptose (62).

A ferroptose é uma forma de morte celular regulada iniciada por perturbações oxidativas do microambiente intracelular que está sob controle constitutivo pelo GPX4 e pode



ser inibida por quelantes de ferro e antioxidantes lipofílicos. A piroptose é utilizada principalmente por células imunes inatas em resposta a perturbações celulares, danos e sinais induzidos por patógenos e depende da formação de poros da membrana plasmática por membros da família de proteínas gasdermina, muitas vezes como consequência da ativação das caspases inflamatórias 1, 4, 5 e 11. A necroptose é desencadeada por perturbações da homeostase extracelular ou intracelular que depende de proteínas cinases específicas como MLKL, RIPK3 e RIPK1 (62).

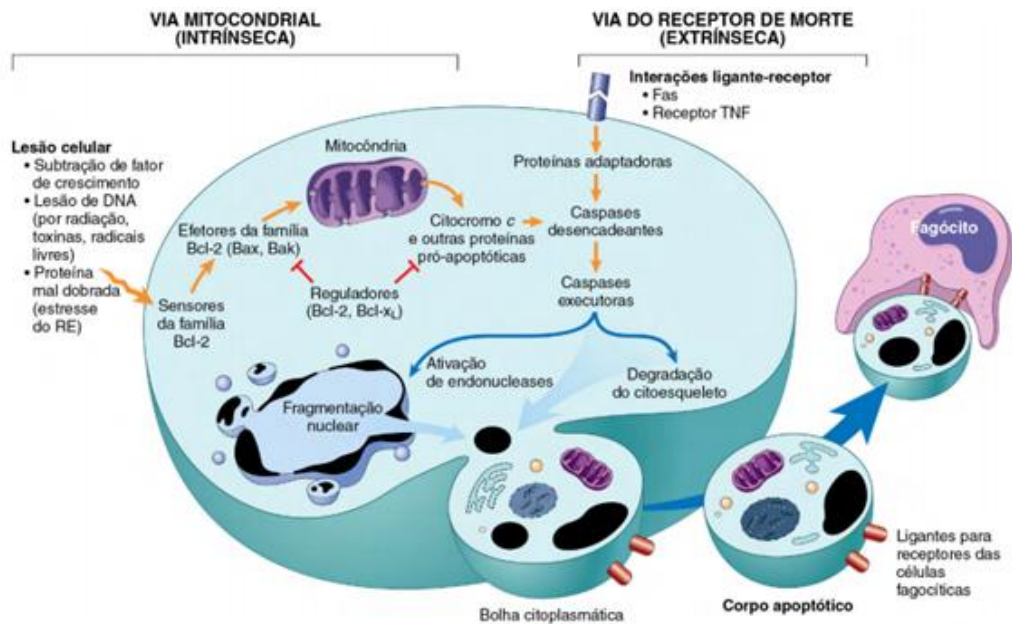
### 2.2.1 Apoptose

A apoptose é uma de morte celular programada que garante um equilíbrio homeostático entre a taxa de formação celular e a morte celular, contribuindo para a renovação dos tecidos e para a eliminação das células danificadas (63).

Morfologicamente se vê encolhimento celular, condensação da cromatina e fragmentação nuclear, formação de vesículas pela membrana plasmática (*blebbing*) e picnose celular. As características bioquímicas incluem fragmentação do DNA, clivagem proteica em locais específicos, aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial levando à liberação de proteínas pró-apoptóticas e subsequente formação de corpos apoptóticos que são consumidos por células vizinhas ou por macrófagos, sem induzir uma reação inflamatória (64,65).

A apoptose ocorre principalmente por duas vias centrais: via extrínseca e via intrínseca (Figura 1). A via mitocondrial intrínseca, também chamada de mitocondrial, inicia dentro da célula em resposta a estresses celulares, como danos ao DNA, espécies reativas de oxigênio, radiação, privação de fator de crescimento, agentes quimioterápicos, citocinas e glicocorticoides. Essa via envolve a atividade de proteínas BCL-2 pró-apoptóticas (BAX, BAK1, BIM, BID e PUMA) que promovem permeabilidade da membrana externa mitocondrial, liberação do citocromo *c*, ativação das caspases efetoras (3 e 7) e apoptose. A liberação do citocromo *c* das mitocôndrias é inibida por membros anti-apoptóticos da mesma família (BCL-2, BCLXL, BCL-W, BCL-2-A1 e MCL1). A via extrínseca (também chamada do receptor de morte) é estimulada pela ativação de receptores de morte (Fas, TNFR1, TNFR2, DR4 e DR5 do TRAIL - ligante indutor de apoptose relacionados ao TNF-) que recrutam FADD (Proteína adaptadora associada à proteína Fas) e caspase 8 e/ou caspase 10 para formar o complexo de sinalização indutor de morte (DISC). A ativação da caspase 8 ou 10 no DISC resulta na ativação de caspases efetoras (3 e 7) e na apoptose (34,57 61, 64 - 71).

Figura 1. Vias apoptóticas em resumo.



Fonte: (72)

Outras substâncias podem iniciar as vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Por exemplo, a fosfoproteína p53 é um fator de transcrição que regula o ciclo celular e funciona como uma molécula sensor de dano celular. Fatores que danificam o DNA, como radiação ionizante, drogas genotóxicas e radicais livres, ativam a p53, que induz a apoptose, principalmente através de sua capacidade de suprimir a transcrição de fatores anti-apoptóticos como *BCL2* ou induzir a fabricação de fatores pró-apoptóticos como BAX, proteína de ligação do fator de crescimento de insulina-3 e regulação positiva do receptor Fas. *BCLXL* pode inibir p53 e a inativação ou mutação de *p53* é uma situação comum de muitos cânceres humanos (64,65).

As células tumorais desenvolvem variadas estratégias para limitar ou evitar a apoptose. A mais frequente é a perda da função da p53. Alternativamente, os tumores podem aumentar a expressão de reguladores antiapoptóticos (*BCL2*, *BCLXL*, etc) ou de sinais de sobrevivência (IGF1/2), regular negativamente fatores proapoptóticos (*BAX*, *BIM*, *PUMA*), ou causar erros na via de morte induzida por ligantes extrínsecos (73).

O aumento da expressão do gene *BCLXL*, assim como os níveis diminuídos de expressão do gene *BAX* exibem uma correlação positiva com o crescimento descontrolado de células tumorais (74). Por suprimir a apoptose e induzir a quimiorresistência, as proteínas *BCL2*

e BCLXL são elegíveis como moléculas chave para a terapia contra o câncer e transpor a barreira de resistência aos fármacos (75).

### 2.3 ESTRESSE OXIDATIVO

A respiração aeróbica gera energia nas mitocôndrias das células eucarióticas e, como resultado desse metabolismo oxidativo, vários compostos são produzidos como as espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem também ser oriundas de exposição xenobiótica (76).

A regulação dos níveis de EROs intracelulares é crucial na manutenção da homeostase celular e, portanto, diferentes níveis de EROs podem causar diversas respostas biológicas. Em níveis baixos, EROs atuam como moléculas de sinalização enquanto em altos níveis eles induzem danos celulares, danificando inúmeras biomoléculas, como proteínas, lipídios, ácidos nucleicos, membranas celulares e organelas que podem resultar em disfunção celular progressiva e apoptose. No processo de carcinogênese causam cortes no DNA e mau funcionamento do mecanismo de reparo do DNA. A oxidação do DNA por essas espécies reativas gera 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, que é um produto capaz de gerar mutações no DNA em um processo que potencializa o envelhecimento e a carcinogênese. O dano que essas EROs podem causar à célula não depende apenas de sua concentração intracelular, mas também do equilíbrio entre elas e as espécies antioxidantes endógenas (76-78).

Um complexo sistema de defesa antioxidante de origem endógena, como as enzimas: catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx), e os tióis de baixo peso molecular (glutathione ou GSH) regulam as EROs no metabolismo celular (79-81).

A CAT converte peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. Já a GR não age diretamente na remoção de EROs, porém é responsável pela regeneração da glutathione à sua forma reduzida (GSH) na presença de NADPH. GPx atua na presença da GSH para a remoção de peróxido de hidrogênio e formação de água. A GST utiliza GSH nas reações de conjugação com compostos eletrofilicos, para detoxificação dos mesmos (82-84).

A GSH é o principal antioxidante citosólico não enzimático; seu nível durante a condição fisiológica é mantido pela glutathione redutase usando NADPH celular (85). GSH através da GST, detoxifica aldeídos reativos, como o malonaldeído, que são gerados durante a lipoperoxidação. GSH reduzida é a forma ativa biológica que é oxidada em dissulfeto de glutathione (GSSG) durante o estresse oxidativo. A sinalização apoptótica mediada por EROs

está associada à diminuição dos níveis celulares de GSH e à perda do equilíbrio redox celular (86).

Estudos têm demonstrado que compostos derivados de plantas que levam ao estresse oxidativo podem resultar em citotoxicidade de células cancerígenas (87).

## 2.4 PRODUTOS NATURAIS E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

As plantas medicinais são uma rica fonte de metabólitos secundários com atividades biológicas e farmacológicas e têm sido usadas para tratar doenças desde os tempos antigos. A maioria (mais de 60%) dos medicamentos anticancerígenos que apresentaram alta eficiência no uso clínico foi obtida de plantas, organismos aquáticos e/ou microrganismos. O efeito anticancerígeno desses produtos naturais é mediado por diferentes mecanismos, incluindo indução de apoptose, modulação do sistema imunológico e inibição da angiogênese. Taxol, etoposídeo, alcaloides da vinca, camptotecina, podofilotoxinas, bem como seus derivados semissintéticos ou sintéticos, são as drogas anticancerígenas mais importantes obtidas a partir de plantas (88-92).

Ainda, os efeitos anticancerígenos dos fitoquímicos envolvendo a modulação da apoptose, observados em estudos, tendem a ser mais seletivos para as células cancerosas (93).

Os polifenóis são compostos farmacologicamente ativos derivados de plantas naturais que têm potenciais propriedades terapêuticas, incluindo antioxidantes, anti-inflamatórios e antitumorais (94).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* de polifenóis foram realizados, concluindo que os polifenóis foram responsáveis por diminuir o crescimento do tumor, sendo observado para vários tipos de câncer, incluindo das glândulas mamárias, pele, pulmão, fígado, intestino, estômago e boca (95,96).

Evidências experimentais mostram as propriedades benéficas de prevenção e controle do câncer pelos polifenóis se deve a estimulação das vias pró-oxidante e proapoptótica (97).

Os flavonoides interagem com várias vias de transdução de sinal no processo de carcinogênese, reduzindo a proliferação, a angiogênese e a metástase e aumentando a apoptose (96).

## 2.5 *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze

A *Araucaria angustifolia* (Bert. O Kuntze) pertence à família Araucariaceae e é encontrada principalmente no Sul do Brasil, é conhecida como pinheiro-brasileiro, pinheiro-do-paraná ou araucária. É uma árvore que pode viver de 200 a 300 anos. É perenifólia, com altura média de 20 m a 25 m e 1,0 m a 1,5 m de diâmetro. Contém tronco reto e cilíndrico, com ramos dispostos em 8 a 15 verticilos, tendo 6 a 10 ramos por verticilo. Seus estróbilos femininos originam a pinha, composta por pinhões (sementes verdadeiras) e brácteas (sementes não desenvolvidas) que geralmente são descartadas no meio ambiente (Figura 2) (98) e podem representar 80% da pinha de *Araucaria angustifolia* (99).

Figura 2. Árvores de *Araucaria angustifolia*



( a ); pinha madura ( b ) sementes (pinhões) ( c ) e brácteas ( sementes estéreis ) ( d ). Fonte: (99).

A *A. angustifolia* possui um histórico terapêutico na medicina popular, e tem grande importância socioeconômica e ambiental (27), sendo que no Brasil segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2021) no ano de 2021 foram comercializadas cerca de 13000 toneladas de pinhão, o que movimentou aproximadamente 44,4 milhões de reais (100). Apesar de significativos, esses valores são subestimados já que a maioria das vendas são feitas sem emissão de notas fiscais. Santa Catarina é o segundo estado com maior inserção da araucária, porém, a intensa exploração predatória de sua madeira no início do século XX, diminuiu suas reservas naturais a valores estimados entre 2 e 4% da área original (101), estando classificada como vulnerável na Lista Vermelha de espécies ameaçadas de extinção. Um estudo previu uma redução drástica nas áreas ambientalmente adequadas para essa espécie de até 77% nas próximas décadas. Sendo essencial o desenvolvimento de estratégias de conservação para salvar esta espécie (102).

O consumo do pinhão leva ao descarte de tudo aquilo que não é aproveitado das pinhas colhidas, incluindo as brácteas e as cascas. Estima-se que aproximadamente 10 toneladas por ano de cascas de pinhão são descartadas direto no meio ambiente e esses resíduos podem levar muito tempo para se decompor (40).

As brácteas são ricas em flavonoides. As principais subclasses fenólicas são flavan-3-ols (catequina, epicatequina e apigenina) e flavonóis (glicosídeos de quercetina) (99).

Nas cascas residuais da semente de pinhão a catequina foi o composto majoritário encontrado, além de taninos condensados, flavonóides e triterpenóides em menor quantidade (52,103).

Em estudos foram isolados taninos, biflavonóides com possível ação antitumoral, bilobetina atribuída à atividade inibidora linfocitária, cupressuflavona com atividade antifúngica e proantocianidinas com atividade antiviral. Em algumas pesquisas, foram relatados que através de diferentes mecanismos, extratos de brácteas de *A. angustifolia* apresentaram efeitos antiproliferativos seletivos em células tumorais de laringe HEp-2, através de inibição da atividade do complexo mitocondrial I, indução de estresse oxidativo e quebra do DNA. A ativação da via de apoptose ocorreu via Bax, juntamente com a liberação de fator indutor de apoptose e citocromo c, e independente de ativação de p53. Ainda, em pesquisa com extratos de sementes de *A. angustifolia*, a mesma apresentou ação antiproliferativa em linhas de células de câncer gástrico e de próstata, através da inibição da catepsina L, que está envolvida na degradação da matriz extracelular e metástase de células tumorais (27-32).

A realização de estudos acerca do potencial biológico da araucária pode ser uma estratégia para valorização da espécie. Essa valorização poderá se traduzir a médio e longo prazo em ações e políticas públicas de conservação da espécie e valorização dos produtores locais, através da implementação de uma cadeia produtiva forte para o pinhão, podendo também contribuir para o desenvolvimento da região com o mais baixo IDH do estado (104). O cultivo da araucária com interesse econômico do pinhão e com possível uso dos seus produtos como brácteas na produção de fármacos é uma ferramenta que pode ser eficaz para impulsionar o plantio e diminuir a exploração das araucárias remanescentes. Podendo-se criar estratégias em parceria com organizações de produtores e coletores, pesquisadores e órgãos governamentais brasileiros para desenvolver e aprimorar técnicas de manejo, processamento e comercialização do pinhão e seus possíveis subprodutos (105).

Neste projeto, propomos avaliar a atividade antitumoral de diferentes extratos de sementes e brácteas de *A. angustifolia* em linhagens celulares que envolvem tumores de interesse para a medicina humana e veterinária.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

As sementes e brácteas de 3 diferentes exemplares da árvore de *A. angustifolia* foram coletadas em propriedades rurais dos municípios de Frei Rogério/SC (-27.1220640, -50.7343413 UTM), Painel/SC (-28.0154832, -50.0726841 UTM) e Ponte Alta/SC, Brasil (-27.396552, -50.451401 UTM), em junho de 2021. O material vegetal foi levado até o Laboratório de Fisiologia da Reprodução Animal (LAFRA), da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), campus de Curitibanos, onde foi realizada a separação do material, para posterior lavagem e refrigeração a -20°C. Para a preparação do extrato hidroalcoólico das brácteas em etanol 70 °GL (BHA70), do extrato hidroalcoólico das brácteas em etanol 96 °GL (BHA96), do extrato em acetato de etila das Brácteas (BAE) e do extrato hidroalcoólico das sementes em etanol 96 °GL (SHA96), foi utilizado o laboratório de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, Campus de Curitibanos, em colaboração com os professores Cristian Soldi e Greicy Conterato. Inicialmente, as brácteas foram separadas de sujidades e de amostras danificadas. Logo após foi realizada a lavagem das amostras com água e hipoclorito de sódio 2,5% por 10 minutos. Na sequência, as brácteas foram levadas à estufa onde permaneceram por 21 horas em 35°C para secagem. Posteriormente foram trituradas e peneiradas (peneira de 420µM), obtendo-se um material com granulometria de 1mm. O material foi separado em 3 amostras. Cada amostra foi submetida à extração em equipamento soxhlet, utilizando etanol 70 °GL (103,62g de brácteas), etanol 96 °GL (108,5g de brácteas), ou acetato de etila (108,23g de brácteas) como solvente, por um período de 6 horas. Logo após o material foi evaporado em um evaporador rotatório RV3 (IKA-Brasil, Campinas, SP), à temperatura de 40°C. Após a rotaevaporação, o extrato foi liofilizado obtendo-se ao final desse procedimento, os extratos das brácteas. Sendo 4,37g de BHA70, 5,5g de BHA96 e 2,03g de BAE. Para obtenção do extrato hidroalcoólico de sementes (SHA96), estas foram lavadas e armazenadas em refrigeração por 7 dias. Em seguida, foram descascadas manualmente, moídas em liquidificador, transferidas para placas de cerâmica e refrigeradas a -80°C. Posteriormente 171,59g foram liofilizadas e

submetidas à extração por soxhlet, rotaevaporação e novamente liofilizadas, resultando em 6,93g de SHA96. Os extratos obtidos foram então solubilizados em DMSO e obteve-se soluções estoque com concentração de 100 mg/mL para as brácteas e 200 mg/mL para as sementes, as quais foram armazenadas a -20°C. Essas soluções estoques foram diluídas em meio de cultura para atingir a concentração desejada nos experimentos.

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Os extratos vegetais foram caracterizados em colaboração. O método de Folin-Ciocalteu (106) com modificações foi utilizado para quantificar o teor de compostos fenólicos totais. Para a realização do método, em colaboração com os professores Cristian Soldi e Greicy Conterato foram adicionadas diferentes concentrações dos extratos ao reagente de Folin-Ciocalteu 1N diluído em água ultrapura em uma proporção 1:10. Os experimentos foram realizados em triplicata de três repetições independentes e o conteúdo de fenólicos totais foi calculado através uma curva padrão de ácido gálico. Dessa forma os resultados foram expressos como miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato liofilizado (mg GAE.g<sup>-1</sup>).

#### 3.2.1 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LIQUÍDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Previamente às análises em cromatógrafo líquido de alta eficiência, os extratos foram submetidos à extração sólido líquido com hexano grau CLAE para remoção de substâncias apolares. Foram utilizados 100 mg do BHA70, 500 mg do BHA96, 499 mg do SHA96 e 409 mg do BAE. Os extratos foram pesados em microtubos de 2 mL e submetidos à extração por 5 vezes com 1 mL de hexano em banho ultrassônico por 2 minutos. Os extratos foram então secos sob ventilação a temperatura ambiente resultando em 67,2 mg do extrato BHA70, 30,3 mg do BHA96, 25,5 mg do SHA96 e 19,3 mg do BAE. Com o remanescente de cada extrato, foi preparado uma solução estoque em metanol (MeOH) na concentração de 500 mg.L<sup>-1</sup> para análise em CLAE. As amostras foram analisadas quanto a composição fenólica usando um equipamento de CLAE acoplado a uma coluna de fase reversa (HPLC Eclipse Plus C18, 4,6 x 100 mm, 3,5 µm) e a um detector de arranjo de diodos (DAD). As amostras foram filtradas (0,45 µm, filtros de seringa de nylon, 15 mm) antes da injeção. O sistema solvente (fase móvel)



foi baseado em 0,2% de ácido acético em água ultrapura e 0,2% de ácido acético em metanol puro como fases A e B, respectivamente. Para a separação cromatográfica, foi utilizado 1% de B por 2 min, depois de 1 a 20% em 4 minutos e de 20 a 30% em 4 minutos, sendo posteriormente mantido em 30% por 5 minutos. Em seguida, o solvente foi trocado de 30 para 50% em 5 minutos e mantido por mais 5 minutos. Um gradiente de 50 a 100% de B foi estabelecido em 5 minutos com 5 minutos de espera. Então, o solvente B voltou a 1% em 2 min, com 3 min de espera antes da próxima injeção. O tempo total de análise foi de 40 minutos. A taxa de fluxo do solvente foi de 0,8 mL.min<sup>-1</sup>, o volume de injeção foi de 5 µL e a temperatura do compartimento da coluna foi de 30°C. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando uma curva de calibração para cada padrão. O método em CLAE foi validado determinando a linearidade da curva de calibração, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) (Tabela 1). O limite de detecção foi determinado pelo método da relação sinal-ruído.

Tabela 1. Curvas de calibração dos padrões utilizados na determinação de compostos fenólicos dos extratos BHA70 e BHA96.

| Pico | TR (min) | λ (nm) | Equação da reta                  |                           | LOD (mg/L) | LOQ (mg/L) | BHA70 (mg/L)* | BHA96 (mg/L)* | BAE (mg/L)* |
|------|----------|--------|----------------------------------|---------------------------|------------|------------|---------------|---------------|-------------|
| 1    | 5.979    | 255    | y = 1,550,159.55x + 627,914.51   | Ac. Gálico                | 0.001      | 0.007      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 2    | 8.130    | 255    | y = 162492x + 72412              | Galocatequina             | 0.010      | 0.104      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 3    | 8.567    | 255    | y = 2,402,217.95 + 1,081,177.78  | Ac. 3,4-dihidroxibenzóico | 0.000      | 0.004      | 1.07          | 0.66          | 4.82        |
| 4    | 9.901    | 255    | y = 16400x + 19975               | Catequina                 | 0.043      | 0.433      | 11.13         | 12.00         | <LOD        |
| 5    | 10.601   | 280    | y = 901595x + 392289             | 2-(4-hidroxifenil)etanol  | 0.002      | 0.016      | 3.14          | <LOD          | 3.61        |
| 6    | 12.471   | 255    | y = 2.825.268.59x - 974.532.62   | Ácido Vanílico            | 0.000      | 0.004      | 3.27          | 3.14          | 3.71        |
| 7    | 12.705   | 320    | y = 4.825.927.96x + 1.960.324.51 | Ácido cafeico             | 0.000      | 0.002      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 8    | 13.058   | 280    | y = 519655x + 165455             | Epi-catequina             | 0.002      | 0.018      | 3.88          | 3.29          | 5.91        |
| 9    | 13.257   | 280    | y = 2.492.983.64x + 1.527.153.91 | Ácido siríngico           | 0.001      | 0.012      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 10   | 16.167   | 320    | y = 6.205.117.62x + 2.151.677.30 | Ácido p-cumárico          | 0.000      | 0.003      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 11   | 17.788   | 320    | y = 4.568.685.97x + 1.072.369.00 | Ácido sinápico            | 0.000      | 0.003      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 12   | 18.310   | 320    | y = 4.154.370.57x + 1.614.583.50 | Ácido Ferúlico            | 0.000      | 0.002      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 13   | 20.787   | 360    | y = 1.389.801.21x + 570.183.28   | Miricitrina               | 0.001      | 0.005      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 14   | 21.580   | 360    | y = 1.418.048.15x + 590.214.45   | Rutina                    | 0.001      | 0.010      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 15   | 22.160   | 255    | y = 2.723.406.12x + 634.171.48   | Ácido elágico             | 0.000      | 0.004      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 16   | 22.651   | 360    | y = 2.159.130.63x + 516.689.02   | Miricetina                | 0.001      | 0.007      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 17   | 24.673   | 280    | y = 6.576.666.49x + 1.853.766.32 | Quercetina                | 0.000      | 0.002      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |
| 18   | 25.608   | 360    | y = 2.519.950.60x + 892.064.18   | Ácido cinâmico            | 0.001      | 0.006      | 0.84          | 1.76          | 2.37        |
| 19   | 28.999   | 360    | y = 2.437.818.15x + 977.632.71   | Kampferol                 | 0.001      | 0.013      | <LOD          | <LOD          | <LOD        |

\*Concentração dos componentes fenólicos na solução de 500 mg.L<sup>-1</sup> injetada no aparelho de CLAE; TR: tempo de retenção do pico em minutos; λ: Comprimento de onda utilizado para quantificação da substância; LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; Fonte: William Katovisck Mozzer (2022).

### 3.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação dos flavonoides foi realizada a partir do método de Peřkal & Pyrzynska (2014) (32), com algumas modificações, em colaboração com os professores Cristian Soldi e Greicy Conterato. Os experimentos foram realizados em triplicata de três repetições independentes e o conteúdo de flavonoides totais foi calculado através uma curva padrão de quercetina. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de quercetina por grama de extrato liofilizado ( $\text{mg EqQ.g}^{-1}$ ).

### 3.3 LINHAGENS CELULARES E AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

Foram utilizadas duas linhagens celulares tumorais humanas que abrangem tipos de câncer com interesse para a medicina veterinária e uma linhagem não tumoral como modelo preliminar de toxicidade. Foram utilizadas as seguintes linhagens: MCF-7 (Células tumorais humanas de câncer de mama ER+), MDA-MB-231 (Células tumorais humanas de câncer de mama triplo negativas) e HUVEC (Células endoteliais de veia umbilical humana), adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro.

Toda a manipulação das células ocorreu em capela de fluxo laminar. As células foram cultivadas em garrafas de cultura com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM - Gibco Life Technologies Inc., USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 unidades / mL de penicilina e 100  $\mu\text{g/mL}$  de estreptomicina (LGC Biotecnologia, SP, BRL), pH 7.4, em estufa umidificada, a 37°C e com 5% CO<sub>2</sub>. As células foram subcultivadas usando o seguinte protocolo: o meio foi removido dos frascos de células quando estas atingiam 80 % de confluência e as células foram lavadas com solução de PBS (pH 7,4). Para o desprendimento das células, as células foram incubadas com solução de tripsina 0,25% (Gibco Life Technologies Inc., USA). A densidade celular foi determinada em Câmara de Neubauer.

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do reagente resazurina. As células foram semeadas com meio de cultura DMEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) em placas de cultura de 96 poços na densidade de  $7,0 \times 10^3$  células/poço com 100  $\mu\text{l}$  de meio de cultura/poço e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h para adesão celular. Após este período, foi adicionado ao meio de cultura concentrações crescentes dos extratos (0- 2000  $\mu\text{g/mL}$ ) em cada tipo celular. Transcorridas 72h de tratamento, o meio foi removido e adicionado corante azul de resazurina 100  $\mu\text{g/mL}$  (Sigma-Aldrich, SP, BRL) e as células foram

incubadas novamente por 2 horas. Então a absorbância foi medida em 570 e 600 nm usando a multileitora Spectramax (Paradigm; Molecular Devices, USA) e o software Softmax® Pro 6.4.

Os ensaios foram realizados em triplicata e os experimentos foram realizados pelo menos três vezes.

Foram utilizados controles com células sem tratamento e com tratamento de DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), diluído em meio de cultura, na mesma proporção utilizada para solubilizar os compostos. A concentração máxima de DMSO adicionada as células foi de 1 %.

Com base nos resultados de absorbância a citotoxicidade foi expressa em percentagem em relação ao controle não exposto  $\pm$  EPM. Os valores de controle foram definidos em 100% de viabilidade. Os dados de citotoxicidade foram ajustados a uma curva sigmoideal para calcular CC50, que é a concentração do agente que reduz o crescimento celular em 50% nas condições experimentais, usando GraphPad Prism 8 (San Diego, USA). O índice de seletividade (IS) que indica a seletividade de um composto entre uma linhagem tumoral e uma não tumoral, foi calculado dividindo-se a CC50 obtida da linhagem celular não tumoral HUVEC pela CC50 da linhagem tumoral.

Para todos os ensaios seguintes, optou-se por usar a concentração do extrato BHA70 de 435  $\mu\text{g/mL}$ , que corresponde à metade da CC50. Dessa forma, foi possível verificar o mecanismo de ação do extrato sem ter uma alta citotoxicidade.

### 3.4 AVALIAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR

A indução de apoptose ou necrose foi avaliada por coloração com os corantes laranja de acridina e brometo de etídeo e posterior visualização em microscopia de fluorescência. O método de coloração pelos corantes fluorescentes brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA) permite a diferenciação e visualização de células viáveis daquelas em processos de morte por necrose ou apoptose. Nesta técnica, o corante LA tem capacidade de atravessar a membrana celular intacta interagindo com o DNA da célula, como ocorre na apoptose, e cora de verde o núcleo que se apresenta condensado e fragmentado. A coloração por BE, tem característica de marcar células necróticas com membrana danificada intercalando com o DNA, conferindo fluorescência laranja e/ou vermelha as células.

Para a realização deste ensaio foi selecionado o extrato BHA70 e as células MDA-MB-231. As células foram tripsinizadas, contadas e adicionadas em placas de 12 poços ( $2 \times 10^5$

células/poço), as quais continham uma lamínula circular de vidro, estas foram então mantidas por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram submetidas ao tratamento com ½ CC50, sendo novamente incubadas por 24 horas. Como grupo controle foram utilizadas células tratadas com DMSO nas mesmas condições de densidade e tempo. Posteriormente, o meio de cultura foi retirado e adicionado 500 µL de PBS com 2 µL de solução constituída de brometo de etídio (1 mg/mL) e laranja de acridina (300 µg/mL) - ambos Sigma-Aldrich, St. Louis, USA - a placa foi coberta com papel alumínio e a solução foi mantida por 2 minutos em contato com as células. Em seguida, o poço foi lavado com PBS e a lamínula retirada para observação em microscópio de fluorescência Olympus BX-FLA (Olympus Co, Japão) com aumento de 100 e 200x. As imagens foram obtidas através do software Cellsens e o tipo de morte celular foi identificado visualmente através das características inerentes a cada tipo de morte.

### 3.5 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR

A inibição da migração celular foi avaliada através do teste de migração celular 2D. As células da linhagem MDA-MB-231 foram adicionadas em placas de 12 poços (2x10<sup>5</sup> células/poço) em meio de cultivo por 24h para aderência. Após atingir 70% de confluência as células foram lavadas com PBS e uma fenda foi feita na monocamada de cada poço com uma ponteira estéril (p100), causando uma descontinuidade da mesma (109). Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as células lavadas com PBS para eliminar as células desprendidas. Foi então acrescentado meio de cultura fresco e os tratamentos com o extrato BHA70 na ½ CC50, sendo que o grupo controle continha somente o meio de cultura com concentração equivalente de DMSO. Foram obtidas imagens em três pontos do poço nos tempos 0, 24 e 48 horas após o tratamento. Então, calculou-se a área da descontinuidade feita na monocamada com o auxílio do software ImageJ. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de migração celular em relação ao controle ± EPM.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

O efeito do extrato BHA70 sobre o potencial replicativo das células foi avaliado com base no ensaio de formação de colônia ou ensaio clonogênico (109). Para tal, 5x10<sup>2</sup> células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços. Após 24 h, as células foram incubadas com a

concentração de  $\frac{1}{2}$  CC50 do extrato BHA70 sendo que o grupo controle continha somente o meio de cultura com concentração equivalente de DMSO. Passados 48h de incubação, o meio de cultura contendo o extrato foi retirado, os poços foram lavados com PBS e 2mL de meio de cultura foi adicionado. Após o período de 7 dias de experimento as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (Sigma-Aldrich, Munich, Germany) e coradas com 400  $\mu$ L de cristal violeta 0,25% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). O corante foi retirado e cada poço foi lavado 2 vezes com água destilada. As colônias foram identificadas através de análise por microscópio óptico no aumento de 10 x, com três campos randomizados para cada n. Agregados com mais de 50 células foram reconhecidos como colônia. Considerou-se os valores referentes ao controle negativo correspondentes a 100% de viabilidade celular sem a presença do extrato testado. O percentual do número de colônias nos tratamentos foi calculado em relação ao controle negativo de acordo com a seguinte equação: Número de colônias (%) = (número de colônias da amostra x 100) / número de colônias do controle negativo. A formação de colônias foi expressa em percentagem em relação ao controle não exposto  $\pm$  EPM.

### 3.7 EXTRAÇÃO DE RNA

$7 \times 10^5$  células MDA-MB-231 foram incubadas com o extrato BHA70 na concentração de  $\frac{1}{2}$  CC50, sendo que o grupo controle continha somente o meio de cultura com concentração equivalente de DMSO. Células foram incubadas por 24 horas em 37,5°C e 5% CO<sub>2</sub>, então, o RNA total foi extraído com TRIZOL (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA), segundo orientações do fabricante. Após adição do Trizol, as amostras foram agitadas em vórtex por 30 segundos. Após, foram adicionados às amostras clorofórmio e as mesmas foram agitadas e incubadas por 15 minutos em gelo. Então foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 x g (4°C) e a fase aquosa foi coletada e transferida para um novo tubo onde adicionou-se álcool isopropílico. Agitou-se, incubou-se por 15 minutos e centrifugou-se por 15 minutos a 12000 x g (4°C). O sobrenadante foi removido, o decantado foi lavado com etanol 75% e posteriormente centrifugados por 5 minutos a 7500 x g (4°C). O sobrenadante foi removido, o decantado foi seco em temperatura ambiente e o RNA foi dissolvido em 30  $\mu$ L de água livre de RNase (Qiagen Inc., Missisauga, Ontario, Canada). O RNA extraído foi quantificado por leitura espectrofotométrica em um NanoVue plus (GE Healthcare, USA) e a pureza foi avaliada através da razão 260/280 e 260/230.

### 3.8 SÍNTESE DE CDNA

A síntese de DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando o kit GoScript Reverse Transcription system (Promega Corporation, Madison, WI, USA), seguindo o protocolo do fabricante, em um termociclador Veriti (Applied Biosystems, California, USA). Inicialmente as amostras de RNA foram tratadas com DNase e utilizou-se 300 ng de RNA para síntese de cDNA em volume final de 20 µl de cDNA para cada amostra.

### 3.9 CURVA DE EFICIÊNCIA DA REAÇÃO DE PCR

Visando determinar a eficiência da reação de PCR em tempo real, uma curva foi feita com diferentes concentrações de cDNA (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) para todos os pares de oligonucleotídeos (Tabela 2). A amplificação foi realizada utilizando o Power SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme recomendação do fabricante. A análise da regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a, em  $y=ax+b$ ) que foi utilizado para o cálculo da eficiência da amplificação dos produtos.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na reação de qPCR.

| <b>Genes</b> | <b>Sense</b>               | <b>Antisense</b>            |
|--------------|----------------------------|-----------------------------|
| <b>GAPDH</b> | 5'-GTGTCCGTCGTGGATCTGAC-3' | 5'-GGAGACAACCTGGTCCTCAG-3'  |
| <b>BCL2</b>  | 5'-AGAGACTCACCAGGGTCTGC-3' | 5'-GCACTACCTGCGTTCTCCTC-3'  |
| <b>BLXL</b>  | 5'-TCAGGAACAGCTATGGGAGC-3' | 5'-TTCTAGTCAGCCCTACCCCA-3'  |
| <b>BAX</b>   | 5'-ACAGGGGCCTTTTTGCTAC-3'  | 5'-GAGACACTCGCTCAGCTTCTT-3' |
| <b>FAS</b>   | 5'-CTGCGATGAAGAGCATGGTT-3' | 5'-GCAGCGAACACAGTGTTTACA-3' |

### 3.10 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE EM TEMPO REAL (qPCR)

Todos os genes propostos foram mensurados por qPCR em tempo real em um termociclador MX3000P (Stratagene, San Diego, USA), utilizando como reagente Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, USA). No presente estudo foram utilizados parâmetros térmicos cíclicos específicos (10 minutos a 95 °C, 40 ciclos de 30 segundos a 95 °C, 60 segundos a 60 °C, 60 segundos a 72 °C, 60 segundos a 95°C, 30 segundos

a 60°C e 30 segundos a 95°C) usados para amplificar cada transcrito. As amostras foram processadas em duplicatas e expressas relativamente ao GAPDH como gene constitutivo. Os dados então foram normalizados através do método  $\Delta\Delta C_t$  com correção para a eficiência de amplificação (116).

### 3.11 AVALIAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

Foram plaqueadas  $2 \times 10^5$  células MDA-MB-231 em placa de 12 poços, que continha uma lamínula circular de vidro no interior de cada poço e incubadas por 24 h a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. Após, foram tratadas com o extrato BHA70 na concentração de ½ CC50 e incubadas por mais 4h a 37°C. O grupo controle continha somente o meio de cultura com concentração equivalente de DMSO. O tempo de 4h foi escolhido afim de detectar a formação de EROs em etapas iniciais da sua formação. Adicionou-se então, 10µM de DCFH –DA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), incubou-se por 30 minutos, lavou-se três vezes com PBS e retirou-se a lamínula com as células aderidas, que foram observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX-FLA (Olympus Co, Japão). Foram obtidas 5 imagens aleatórias de cada lamínula em aumento de 200x. A densidade integrada, área das células e background foram calculadas através do software ImageJ, a fim de obter a fluorescência celular total corrigida (CTCF), através da fórmula:  $CTCF = \text{Densidade Integrada} - (\text{Área de célula selecionada} \times \text{Fluorescência média de leituras de fundo})$ . O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de fluorescência emitida em relação ao controle  $\pm$  EPM.

### 3.12 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA DEFESAS ANTIOXIDANTES

Foram plaqueadas  $7 \times 10^5$  células MDA-MB-231 em placas de 6 poços, mantidas por 24 horas a 37° C com 5% CO<sub>2</sub> e posteriormente tratadas com o extrato BHA70 na concentração de ½ CC50, sendo que o grupo controle continha somente o meio de cultura com concentração equivalente de DMSO. Após 24h do tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS, centrifugadas e o sobrenadante ressuspensado em tampão de Lise 1x contendo HEPES 50mM (Gibco Life Technologies, Grand Island, NY, USA), Triton 1% (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), DTT 5mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), aprotinina 2mg/mL (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany), PMSF 200mM (Sigma-Aldrich, Shanghai, China), leupeptina 1µg/mL e pepstatina 1µg/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), As células foram lisadas por

20 minutos e centrifugadas em 1500 rpm por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios e para dosagem de proteína.

### 3.13 DOSAGEM DE PROTEÍNA

A dosagem de proteína foi realizada pelo método de Lowry. (110). 1 µL de cada amostra foi adicionado juntamente com água destilada para volume final de 50 µL. Após, foi adicionado 150 µL de uma solução cupro-alkalina (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2%, NaOH 0,4%, tartarato de sódio 2% e CuSO<sub>4</sub> 1%) e incubado em agitação por 10 minutos em temperatura ambiente. Foram então adicionados 15 µL de reagente de Folin 0,4N e incubado em agitação por mais 30 minutos. A leitura foi realizada na multileitora Spectramax (Paradigm; Molecular Devices, USA) em 750 nm e as concentrações foram obtidas através de uma curva padrão utilizando albumina sérica bovina (BSA).

### 3.14 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA CATALASE

A atividade da enzima catalase (CAT) foi mensurada cineticamente através do método descrito por Aebi (1984) (111). Esta medida se baseia na reação de decomposição do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pela ação enzimática da CAT. Todos os reagentes usados para o ensaio foram da Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. No dia da análise, foi preparada uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM em tampão fosfato 50mM pH 7,0. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100 µg/µL de proteína em uma solução contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 9,2M. Imediatamente foram efetuadas as leituras para monitoramento das absorbâncias no comprimento onda de 240 nm, a cada 10 segundos, por 5 minutos usando a multileitora Spectramax (Paradigm; Molecular Devices, USA). Para o cálculo da atividade da CAT empregou-se o coeficiente e extinção molar do peróxido de hidrogênio com a seguinte fórmula:

$$\text{CAT (mmol.minuto}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}) = (((K) \times 60 \times \text{diluição}) \div \text{PTN}) \times 1000$$

Sendo, K = coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra;  $\epsilon = 40 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ; Diluição = 1x; PTN = proteína em µg/µL.

O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem  $\pm$  EPM, em relação ao controle que foi considerado como 100% de atividade.



### 3.15 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA REDUTASE

A atividade da enzima glutatona redutase (GR) foi mensurada pelo método descrito por Carlberg e Mannervik (112), através da medição da taxa de oxidação de NADPH que ocorre devido à redução da GSSG pela GR presente na amostra. Todos os reagentes usados para o ensaio foram da Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Em meio de reação formado por tampão fosfato 0,1 M; pH = 7,0 ; ácido dietilenotriaminopentacético 5 mM; pH = 7,0; glutatona oxidada (GSSG) 1 mM, NADPH 0,2 mM (todos Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e 100 µg/µL de proteína. A diminuição da absorbância foi monitorada por espectrofotometria efetuando-se a leitura cinética a cada 30 segundos, durante 10 minutos em comprimento onda de 350 nm, usando a multileitora Spectramax (Paradigm; Molecular Devices, USA).

Para o cálculo de GR contida na amostra foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{GR (mmol.minuto}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}) = ((K) \times \text{diluição} \times 1000 \times 60) \div \text{PTN}$$

Sendo, K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra; Diluição: 20x; PTN: (µg.µL<sup>-1</sup>).

O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos em porcentagem ± EPM, de atividade enzimática em relação ao controle que foi considerado como 100% de atividade.

### 3.16 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA PEROXIDASE (GPX)

A atividade da enzima glutatona peroxidase (GPx) foi mensurada pelo método descrito por Flohé e Gunzler (113), com adaptações e todos os reagentes usados para o ensaio foram da Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Tal ensaio baseia-se na dismutação do Terc-Butil (t-BuOOH) pela GPx que forma uma ponte dissulfeto entre duas GSH (GS-SG), que após volta ao estado reduzido como 2 moléculas de GSH, pela ação da GR. A GR reage mediante a oxidação de NADPH, assim, o ensaio é uma medida indireta que consiste em registrar a redução de NADPH em 340 nm. Nesse ensaio o Terc-Butil foi substituído pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, com a adição de NaN<sub>3</sub> 10% para impedir a ação da catalase na reação. Para isso 100 µg/µL de proteína foi adicionado ao meio de reação contendo tampão fosfato 0,1M pH 7, NADPH 0,2mM, GR e GSH 1,6mM e então adicionado 5 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em cada poço de uma placa de 96 poços. Foi realizada a leitura

cinética em 340nm, a cada 15 segundos por 5 minutos, usando a multileitora Spectramax (Paradigm; Molecular Devices, USA).

Para a determinação da GPx nas axostras foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{GPx (mmol.minuto}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}) = ((K) \times \text{diluição} \times 1000 \times 60) \div \text{PTN (6)}$$

Sendo, K= coeficiente angular da equação de reta obtida de cada amostra;  $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ; Diluição: 1x; PTN: proteína em  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos em porcentagem  $\pm$  EPM, de atividade enzimática em relação ao controle que foi considerado como 100% de atividade

### 3.17 MENSURAÇÃO DA ATIVIDADE DA GLUTATIONA TRANSFERASE (GST)

A atividade da enzima Glutationa Transferase (GST) foi mensurada pelo método descrito por Keen *et al.*, (1976) (114) e todos os reagentes usados foram da Sigma-Aldrich, St. Louis, USA. Esta é uma medida indireta onde se verifica o decaimento de um cofator da reação chamado CNDB (1-cloro-2, 4-dinitrobenzeno). Para isso em uma placa de 96 poços foi adicionado tampão fosfato 0,1M pH 7, 1  $\mu\text{L}$  de CNDB 0,1M e 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  de proteína de cada amostra e GSH 0,05M. Realizou-se a leitura espectrofotométrica em 340nm, a cada 20 segundos por 5 minutos, usando a multileitora Spectramax (Paradigm; Molecular Devices, USA).

O ensaio foi realizado em triplicata e os valores finais, foram expressos em porcentagem em relação ao controle, que foi considerado como 100% de atividade de GST.

### 3.18 MENSURAÇÃO DE TIÓIS TOTAIS

O conteúdo de tióis totais foi estimado através da reação de grupos tióis presentes nas amostras com o ácido ditiobisnitrobenzóico (DTNB). Nesta reação forma-se o composto amarelo (tiolato) que é proporcional ao conteúdo de GSH e pode ser determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 412 nm. Para a sua determinação, foi utilizada uma solução de GSH 2mM recentemente preparada, tampão fosfato 0,2M pH 8,0 e DTNB 2,525mM. Uma curva padrão de GSH foi realizada, conforme descrito por Tietze (1969) (115). Foram adicionados aos poços da placa, 100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , com do tampão fosfato adicionado da GSH.

Posteriormente, foi adicionado 5 $\mu$ L de DTNB 2,525mM e realizou-se a leitura em 412nm, em multileitora Spectramax (Paradigm; Molecular Devices, USA).

O ensaio foi realizado em triplicata e os valores finais, foram expressos em porcentagem em relação ao controle, que foi considerado como 100% de tióis.

### 3.19 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM e as comparações entre os grupos foram realizadas usando Teste T de Student não pareado (GraphPad Prism 8) e considerados significativos quando  $p < 0.05$ .

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

Para 103,62g de brácteas obteve-se 4,37g de extrato BHA70, com um rendimento de 4,21%, para 108,5g de brácteas obteve-se 5,5g de extrato BHA96, com um rendimento de 5,07%, para 108,23g de brácteas obteve-se 2,03g de BAE, com rendimento de 1,87%. Para 171,59g de sementes obteve-se 6,93 de extrato SHA96, com rendimento de 4,04%. Os extratos obtidos das brácteas de araucária (BHA70, BHA96, BAE) apresentaram maior conteúdo fenólico total quando comparados aos extratos das sementes (SHA96). Os extratos das brácteas BHA70 e BHA96 apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos (1.696,72  $\pm$  119,19 mg EAG.100g<sup>-1</sup> de brácteas e 2.130,82  $\pm$  32,48 mg EAG.100g<sup>-1</sup> de brácteas, respectivamente), seguidos por BAE (385,37  $\pm$  16,6 mg EAG.100g<sup>-1</sup> de brácteas). O extrato das sementes SHA96 (18,46  $\pm$  1,91 mg EAG.100g<sup>-1</sup> de brácteas) apresentaram as menores concentrações de fenólicos totais neste estudo, sendo seus valores foram de 85 a 170 vezes inferiores aos dos extratos das brácteas.

As concentrações obtidas nos extratos das brácteas apresentam valores semelhantes ao extrato aquoso produzidos no trabalho de Souza *et al.* (2014) (117), o qual apresentou o valor de 1586 mg EAG.100g<sup>-1</sup> de brácteas. Para tal comparação, as concentrações dos fenólicos totais dos extratos do presente estudo foram convertidas para mg EAG.100g<sup>-1</sup> de brácteas. Ressalta-se que não é possível garantir que as formas de preparo dos extratos usadas neste estudo

obtiveram uma extração exaustiva dos compostos fenólicos, uma vez que este parâmetro não foi avaliado durante as extrações.

Compostos fenólicos de importante atividade biológica já foram encontrados nas sementes da araucária, especialmente da classe dos flavonoides, ácidos fenólicos e proantocianidinas (27,118).

Os resultados da caracterização obtidos por CLAE-DAD são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Resultados da caracterização dos compostos fenólicos presentes nos extratos de brácteas de *A. angustifolia*.

| Pico | Substância                  | BHA70 (mg/g) | BHA96 (mg/g)               | BAE (mg/g)       |
|------|-----------------------------|--------------|----------------------------|------------------|
| 1    | Ácido gálico                | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 2    | Galocatequina               | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 3    | Ácido 3.4-dihidroxibenzóico | 2.13 ± 0.02  | 1.33 ± 0.06 **             | 9.56 ± 0.02****  |
| 4    | Catequina                   | 23.24 ± 3.40 | 24.00 ± 1.28 <sup>ns</sup> | <LOD ***         |
| 5    | 2-(4-hidroxifenil)etanol    | 6.17 ± 0.28  | <LOD ****                  | 7.17 ± 0.19 *    |
| 6    | Ácido vanílico              | 6.27 ± 0.46  | 6.27 ± 0.44 <sup>ns</sup>  | 7.377 ± 0.11*    |
| 7    | Ácido cafeico               | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 8    | epi-catequina               | 7.81 ± 0.06  | 6.57 ± 0.01 ***            | 11.73 ± 0.40**** |
| 9    | Ácido siríngico             | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 10   | Ácido p-cumárico            | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 11   | Ácido sinápico              | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 12   | Ácido Ferúlico              | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 13   | Miricitrina                 | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 14   | Rutina                      | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 15   | Ácido elágico               | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 16   | Miricetina                  | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 17   | Quercetina                  | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |
| 18   | Ácido cinâmico              | 1.64 ± 0.03  | 3.53 ± 0.05****            | 4.70 ± 0.12****  |
| 19   | Kampferol                   | <LOD         | <LOD                       | <LOD             |

Concentração expressa em mg de substância por g de extrato polar (após limpeza do extrato com Hexano). Os resultados são expressos como média ± erro padrão. < LOD: abaixo do limite de detecção; Valores de \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\*p <0.0001 foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo BHA70, ns= não significativo, usando Test T de Student. (N=3).

Ao todo, foram identificados seis compostos em BHA70, cinco em BHA96 e BAE. O ácido 3.4-dihidroxibenzóico e o ácido cinâmico foram identificados em todos os extratos, ambos com maior concentração em BAE. A catequina foi identificada somente em BHA70 e BHA96 em concentrações semelhantes em ambos os extratos. O 2-(4-hidroxifenil)etanol foi encontrado em BHA70 e BAE.

Os compostos fenólicos rutina e quercetina que foram previamente identificados nas brácteas da araucária em estudos de outros autores, não foram identificados no presente estudo. Esses dados podem ser atribuídos, provavelmente, aos diferentes métodos e solventes utilizados

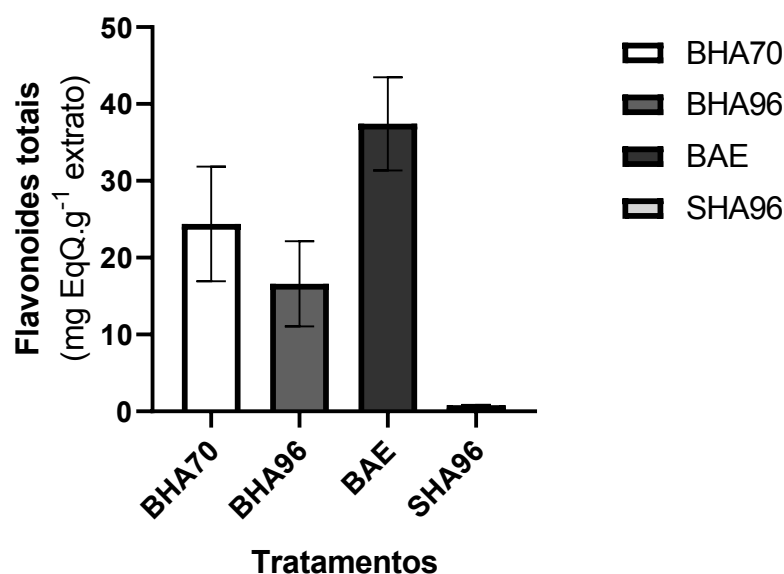
no preparo dos extratos, bem como aos diferentes métodos usados na identificação desses compostos, os quais apresentam diferentes limites de detecção e de quantificação (103,117-124).

Assim como em outros estudos o presente trabalho revelou que o flavanol catequina foi o composto majoritário encontrado nas brácteas de *A. angustifolia*. A catequina também foi o composto majoritário encontrado nos extratos aquosos de pinhões inteiros sendo identificada a presença de catequina em extratos aquosos de pinhões tanto na casca quanto no interior (103,117-124). O presente trabalho é o primeiro a relatar a presença de ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido vanílico, ácido cinâmico e 2-(4-hidroxifenil) etanol nas brácteas de *A. angustifolia*, compostos que foram associados em estudos anteriores a diversas atividades biológicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, neuroprotetora, entre outras (125,126).

#### 4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS FLAVONOIDES

Assim como observado na Figura 3, os extratos das brácteas de araucária apresentaram as maiores concentrações de flavonoides totais.

Figura 3. Quantificação dos flavonoides presentes nos extratos.



Resultados são expressos como média  $\pm$  erro padrão.

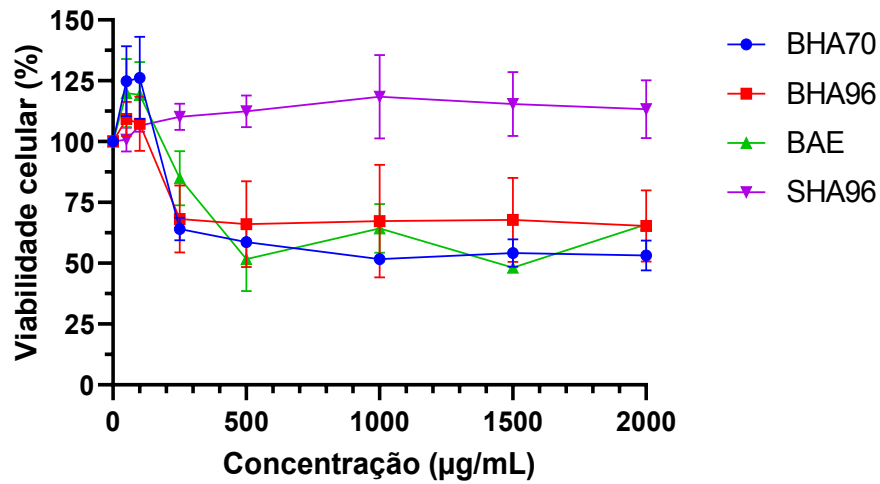
O extrato BAE ( $37,42 \pm 3,51$  mg EqQ.g<sup>-1</sup> de extrato) apresentou as maiores concentrações de flavonoides, seguido por BHA70 ( $24,39 \pm 4,31$  mg EqQ.g<sup>-1</sup> de extrato) e BHA96 ( $16,61 \pm 3,20$  mg EqQ.g<sup>-1</sup> de extrato). Portanto, apesar dos extratos BHA96 e BHA70 apresentarem os maiores teores de fenólicos totais, os dados indicam que o extrato BAE apresentou maiores teores de compostos da classe dos flavonoides especificamente. Os teores de flavonoides do extrato das sementes, SHA96 ( $0,77 \pm 0,04$  mg EqQ.g<sup>-1</sup> de extrato) foram os menores entre todos os extratos avaliados, apresentando concentrações de 23 a 51 vezes menores em relação aos extratos das brácteas.

### 4.3 CITOTOXICIDADE

Os quatro extratos foram testados em duas linhagens tumorais de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) e uma linhagem não tumoral (HUVEC) e a atividade citotóxica está representada como curva dose-resposta nas Figuras 4-6.

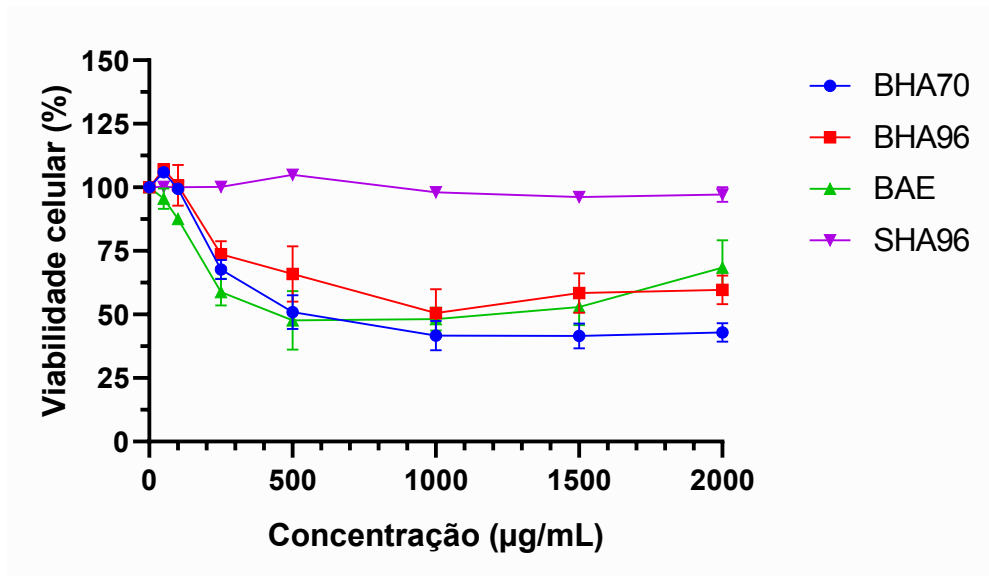
Como pode ser observado nas figuras, os extratos de brácteas BHA70, BHA96 e BAE foram capazes de induzir citotoxicidade de maneira dose-dependente nas duas linhagens tumorais. Na linhagem não-tumoral HUVEC os extratos de brácteas BHA70 e BHA96 também apresentaram citotoxicidade dose-dependente, no entanto, em concentrações mais elevadas. O extrato de bráctea BAE induziu citotoxicidade dose-dependente de forma semelhante nas linhagens tumorais e na não-tumoral. O extrato da semente, SHA96, não induziu atividade citotóxica em nenhuma das linhagens celulares.

Figura 4. Citotoxicidade dos extratos de brácteas e sementes de *A. angustifolia* em linhagem MCF-7.



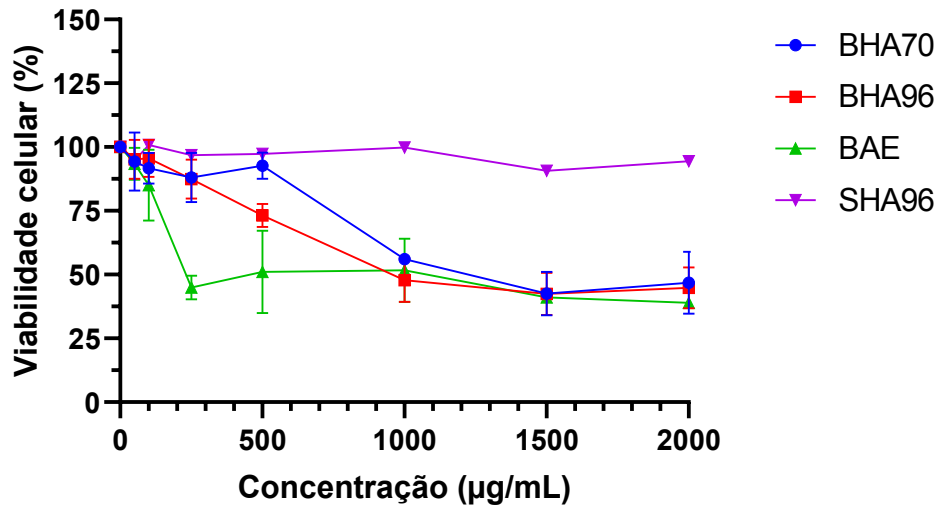
As células ( $7,0 \times 10^3$  células/poço) foram incubadas por 72 horas em concentrações crescentes e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do reagente resazurina. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados. (N=3).

Figura 5. Citotoxicidade dos extratos de brácteas e sementes de *A. angustifolia* em linhagem MDA-MB-231.



As células ( $7,0 \times 10^3$  células/poço) foram incubadas por 72 horas em concentrações crescentes e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do reagente resazurina. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados. (N=3).

Figura 6. Citotoxicidade dos extratos de brácteas e sementes de *A. angustifolia* em linhagem HUVEC.



As células ( $7,0 \times 10^3$  células/poço) foram incubadas por 72 horas em concentrações crescentes e a viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do reagente resazurina. Cada ponto representa a média  $\pm$  EPM dos experimentos realizados. (N=3).

Os dados de citotoxicidade foram ajustados a uma curva sigmoideal para calcular os valores de CC50 e os resultados são mostrados na Tabela 4. Como pode ser observado na tabela, os extratos BHA70 e BAE induziram maior atividade citotóxica em todas as linhagens celulares (menores valores de CC50).

Tabela 4. Valores de CC50 obtidos nos testes de viabilidade celular após 72 horas do tratamento com concentrações crescentes dos diferentes extratos nas diferentes linhagens celulares.

| Extrato      | MCF-7       | MDA-MB-231  | HUVEC       |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>BHA70</b> | 1434 µg/mL  | 870 µg/mL   | 1465 µg/mL  |
| <b>BHA96</b> | >2000 µg/mL | >2000 µg/mL | 1230 µg/mL  |
| <b>SHA96</b> | >2000 µg/mL | >2000 µg/mL | >2000 µg/mL |
| <b>BAE</b>   | 1622 µg/ml  | >2000 µg/mL | 688 µg/mL   |

**Legenda:** BHA70 – Extrato hidroalcoólico 70 de brácteas; BHA96 - Extrato hidroalcoólico 96 de brácteas; SHA96 – Extrato hidroalcoólico 96 de sementes; BAE - Extrato em acetato de etila de brácteas.

Considerando os valores de CC50 obtidos, calculou-se o índice de seletividade (IS) dos extratos BHA70 e BAE, já que estes extratos foram os mais ativos. De acordo com os valores descritos na Tabela 5, podemos observar que o extrato BAE apresenta IS menor que 1 na



linhagem MCF-7, não sendo interessante como possível candidato a fármaco antitumoral por apresentar pouca seletividade em células tumorais, não sendo possível calcular o IS deste extrato para a linhagem MDA-MB-231 pois o mesmo não apresentou CC50 nesta linhagem. O extrato BHA70 apresentou nenhuma seletividade para as linhagens de câncer de mama MCF-7 e índice de seletividade 1,7 para MDA-MB-231.

Tabela 5. Valores de Índice de Seletividade (IS) dos extratos BHA70 e BAE nas linhagens tumorais.

| <b>Extrato</b> | <b>MCF-7</b> | <b>MDA-MB-231</b> |
|----------------|--------------|-------------------|
| <b>BHA70</b>   | 1,0          | 1,7               |
| <b>BAE</b>     | 0,42         | NC                |

**Legenda:** NC - não calculado.

As células do endotélio vascular desempenham um papel crítico no progresso fisiológico e patológico, pois servem como a principal barreira entre o compartimento intravascular e os tecidos extravasculares (127). As células endoteliais são o alvo primário de muitos agentes químicos. Muitos agentes químicos antitumorais não podem ser usados na clínica por sua citotoxicidade em células endoteliais. Aqui descobrimos que o extrato BHA70 mostrou potencial efeito citotóxico de maneira seletiva, diminuindo a viabilidade de células tumorais MDA-MB-231. Nossos resultados parciais estão de acordo com estudos que demonstraram a mesma capacidade antitumoral seletiva de extratos de brácteas em células tumorais de laringe Hep-2 (27,28,32). Essa seletividade é um fator importante na terapia do câncer e produtos naturais que apresentam essa seletividade são promissores candidatos no desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (28,31,32). Da mesma forma outros autores avaliaram a atividade citotóxica de um extrato etanólico de cascas de sementes *A. angustifolia*, sendo que este não apresentou citotoxicidade para células normais, mas apresentou atividade citotóxica em relação às linhagens celulares tumorais de pulmão, colo do útero, hepatocelular e carcinoma de mama. Tal atividade pode ser atribuída aos compostos existentes nos extratos, como os fenólicos e flavonoides (119).

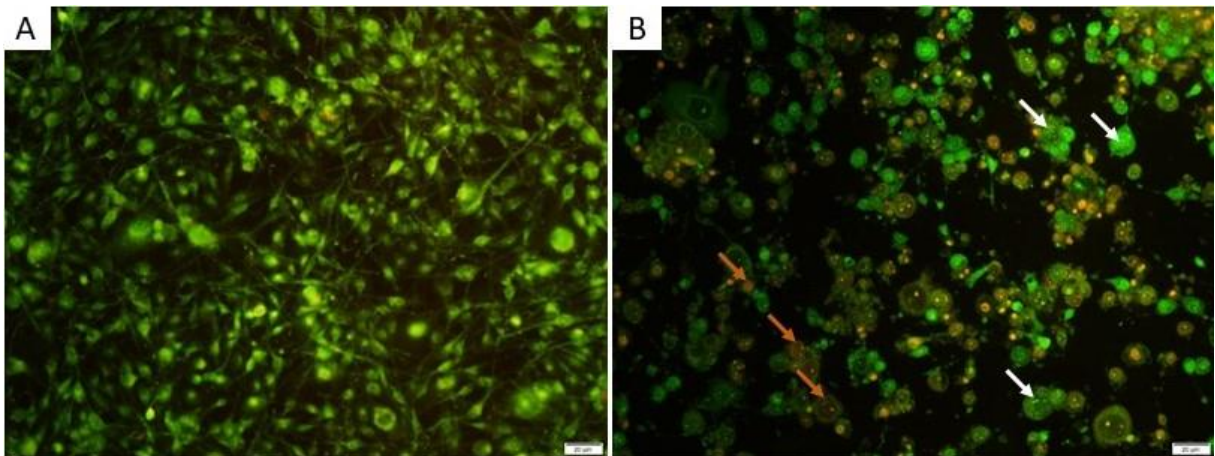
Considerando os resultados obtidos, os ensaios posteriores de avaliação de mecanismo de ação foram realizados utilizando a linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 e o extrato BHA70 na concentração de  $\frac{1}{2}$  CC50, que não induziu citotoxicidade em células HUVEC.

#### 4.4 TIPO DE MORTE CELULAR

O método de coloração pelos corantes fluorescentes brometo de etídio e laranja de acridina (BE/LA) permite a diferenciação e visualização de células viáveis daquelas em processos de morte por necrose ou apoptose.

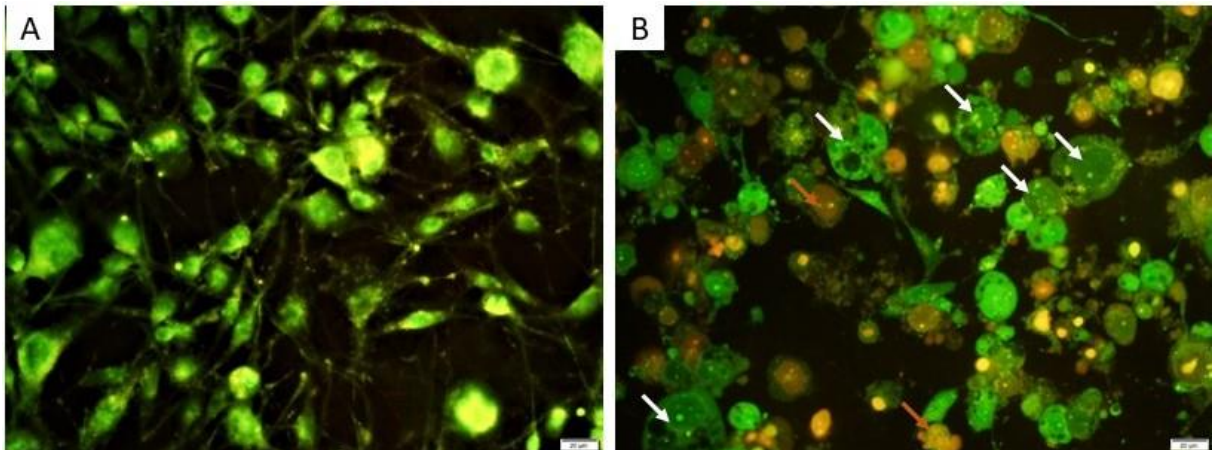
Neste estudo, foi possível visualizar no grupo controle células com forma e tamanho característicos da linhagem celular, com prologamentos preservados, estruturas nucleares verdes, redondas e intactas (Figuras 7 e 8A). Já nas imagens do grupo tratamento, as células se tornam mais arredondadas, multinucleadas e com volume aumentado, com condensação da cromatina nuclear, sendo possível a identificação de alterações características de apoptose, tais como, formação de prolongamentos na membrana celular (“blebs” da membrana), fragmentação do DNA, condensação da cromatina e a formação de corpos apoptóticos. Os resultados ainda demonstraram células em apoptose tardia com áreas alaranjadas e fragmentação do DNA e células necróticas apresentam um núcleo homogêneo e avermelhado (Figuras 7 e 8B).

Figura 7. Avaliação do tipo de morte celular.



Os ensaios foram realizados após 24 horas de incubação com o extrato BHA70. Controle (A), BHA70 (B). As células foram coradas com laranja de acridina e brometo de etideo. As setas brancas representam as células em apoptose, enquanto as setas laranjas representam as células em apoptose tardia/necrose. Imagens representativas de um experimento. Aumento de 100x. (N=3).

Figura 8. Avaliação do tipo de morte celular.



Os ensaios foram realizados após 24 horas de incubação com o extrato BHA70. Controle (A), BHA70 (B). As células foram coradas com laranja de acridina e brometo de etídeo. As setas brancas representam as células em apoptose, enquanto as setas laranjas representam as células em apoptose tardia/necrose. Imagens representativas de um experimento. Aumento de 200x. (N=3).

Conceitualmente, a apoptose pode ser considerada como um mecanismo protetor para o controle da homeostase tecidual. Por exemplo, no contexto do câncer, a apoptose representa uma barreira para a formação do câncer, impedindo a sobrevivência e proliferação de células pré-cancerosas. Conseqüentemente, a redução da morte celular apoptótica pode contribuir para a carcinogênese e progressão do câncer (5). Assim, este é caracterizado pela capacidade de escape da apoptose para crescer e sobreviver (6). Nesse sentido o direcionamento terapêutico para a apoptose representa um caminho promissor para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos (128). Embora a apoptose seja o principal tipo de morte celular desejado na quimioterapia, recentemente, a necrose foi considerada interessante para o tratamento de células tumorais que desenvolvem mecanismos distintos para escapar da maquinaria da apoptose. Ao contrário da apoptose, a necrose que ocorre após um estresse metabólico ou terapêutico resulta de um comprometimento bioenergético que leva à morte celular rápida. Embora a apoptose seja em grande parte silenciosa ou imunossupressora, a morte celular necrótica induzida por terapia inicia uma resposta imune às células tumorais. Ainda está em debate se a inflamação associada à necrose é desejável ou leva a um maior crescimento do tumor. (129).

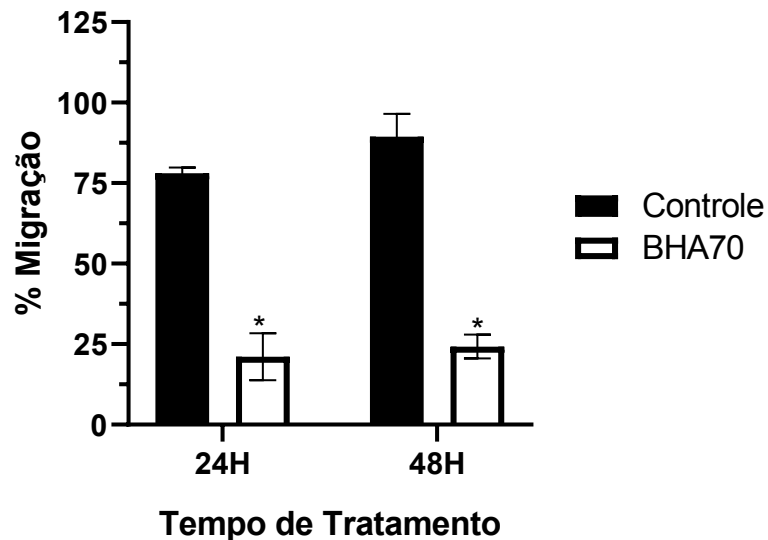
Nossos resultados estão de acordo com Branco *et.al.*, 2015 (28) que verificaram que o extrato aquoso de brácteas de *A. angustifolia* apresenta efeitos antiproliferativos seletivos através de ativação apoptose em células cancerígenas HEP-2 da laringe humana. Outros estudos mostram que os polifenóis possuem propriedades antitumorais e indutoras de apoptose em diferentes linhagens tumorais de câncer (130-136).

#### 4.5 INIBIÇÃO DE MECANISMOS MIGRATÓRIOS

A migração celular é uma das características principais em neoplasias e está inter-relacionada à malignidade. A migração celular pode ser avaliada *in vitro* através do ensaio de scratch (108).

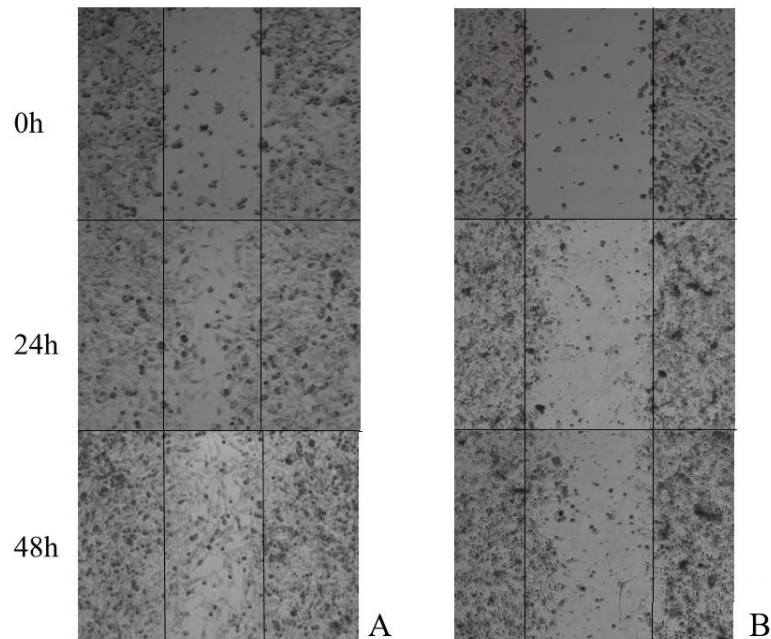
Conforme se observa na Figura 9, os resultados deste experimento mostraram que o tratamento foi capaz de diminuir a migração celular de MDA-MB-231 após 24 e 48 horas do tratamento. A redução na migração celular, como pode ser observada na Figura 10 (painel B), é caracterizada pela presença da abertura entre as lacunas de células. No grupo controle, as células foram capazes de migrar, diminuindo a distância criada pelo risco quase fechando a lacuna, em relação ao tempo 0 horas. O tratamento com BHA70 inibiu quase que completamente a migração das células, visto que a lacuna tem em média o mesmo tamanho do tempo 0 horas. Após as 48 horas de incubação com o BHA70 a inibição da migração tornou-se ainda mais pronunciada, percebendo-se também alterações de forma e tamanho celular.

Figura 9. Avaliação da migração celular após 24 e 48h de incubação com o extrato.



Células confluentes foram tratadas com o BHA70. A quantificação da migração celular das imagens foi avaliada pelo programa ImageJ e foi comparada com o tempo 0 considerado como 0% de migração. Valores de  $*p < 0,05$ , foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle, usando Test T de Student. (N=3).

Figura 10. Avaliação da migração celular após 24 e 48h de incubação com o extrato.



Controle (A) e BHA70 (B). A quantificação da migração celular das imagens foi avaliada pelo programa ImageJ e foi comparada com o tempo 0 considerado como 0% de migração. Aumento de 400x. Imagens representativas de um experimento (N=3).

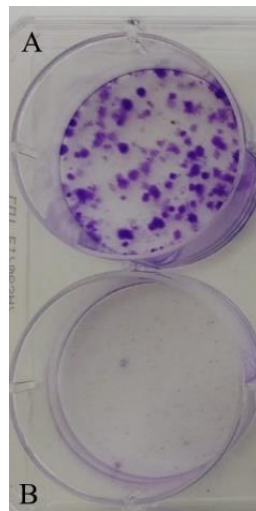
Sabe-se que a metástase tumoral é a principal causa de mortalidade em pacientes com câncer de mama. A metástase é um processo de várias etapas. As células de câncer de mama MDA-MB-231, uma linhagem celular de carcinoma de mama humano altamente metastática, são amplamente utilizadas como modelo para estudar metástases de células de câncer de mama (137). Aqui descobrimos que o BHA70 inibiu notavelmente a migração de células MDA-MB-231, o que sugere uma boa capacidade do extrato em inibir a metástase de células de câncer de mama.

Em estudo do potencial antitumoral da própolis chinesa, a qual possui predominantemente na sua composição química flavonoides e compostos fenólicos, foi observado também a inibição da migração de células MDA-MB-231 (138). Ainda outros estudos recentes, com extratos contendo flavonoides e compostos fenólicos, obtiveram resultados semelhantes de inibição de migração celular em diferentes linhagens tumorais (139-141).

#### 4.6 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

A capacidade das células de sofrer proliferação ilimitada é testada por sua capacidade de formar uma colônia, e o ensaio de formação de colônias (Figura 11) determina a proporção de células que sobrevivem a um determinado tratamento nas condições utilizadas, avaliando assim sua sensibilidade a tratamentos citotóxicos (142).

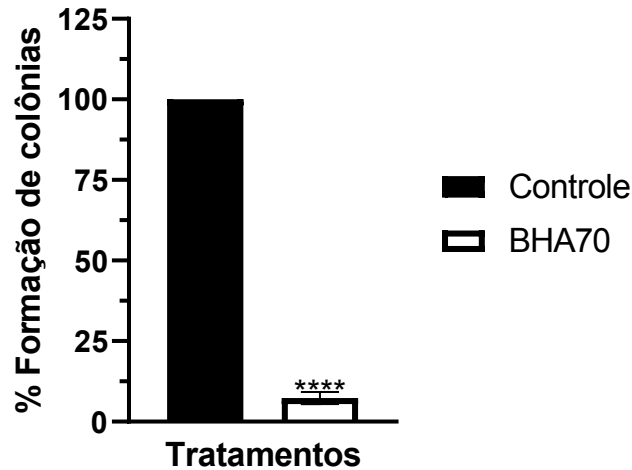
Figura 11. Avaliação da formação de colônias após 48h de incubação com o extrato BHA70.



Controle (A) e BHA70 (B).  $5 \times 10^2$  células foram incubadas com o BHA70. Após 48h de incubação, o meio de cultura contendo os extratos foi retirado, os poços foram lavados com PBS e adicionado meio de cultura. A contagem de colônias foi feita em microscópio óptico no aumento de 10 x, com três campos randomizados para cada n, após 7 dias. Agregados com mais de 50 células foram reconhecidos como colônia. A formação de colônias foi expressa em percentagem em relação ao controle não exposto  $\pm$  EPM. Imagens representativas de um experimento (N=3).

Nesta avaliação, como pode-se verificar nas Figura 12, o extrato BHA70 induziu uma diminuição de 92,63 % da proliferação das células MD-MB-231 quando comparado ao controle.

Figura 12. Avaliação da formação de colônias após 48h de incubação com o extrato BHA70.



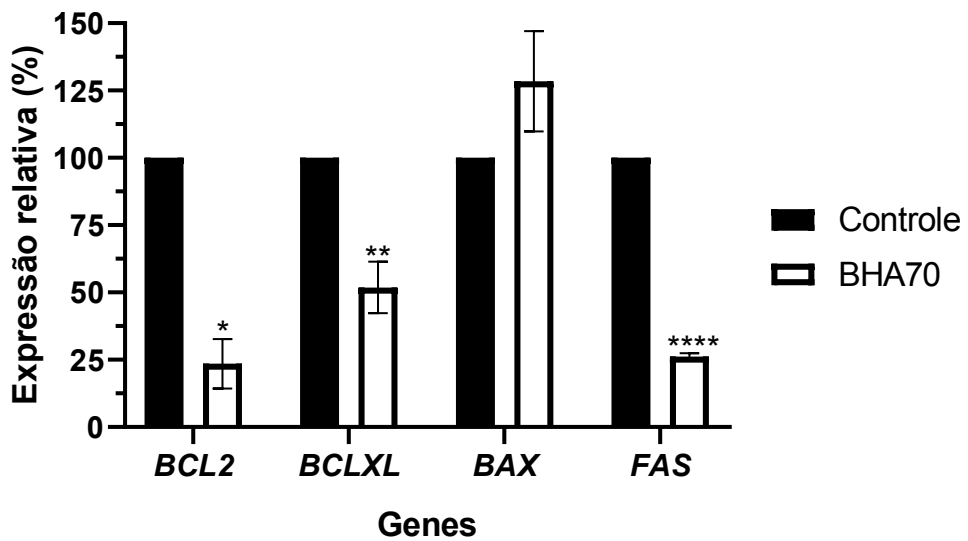
Controle (A) e BHA70 (B).  $5 \times 10^2$  células foram incubadas com o BHA70. Após 48h de incubação, o meio de cultura contendo os extratos foi retirado, os poços foram lavados com PBS e adicionado meio de cultura. A contagem de colônias foi feita em microscópio óptico no aumento de 10 x, com três campos randomizados para cada n, após 7 dias. Agregados com mais de 50 células foram reconhecidos como colônia. A formação de colônias foi expressa em porcentagem em relação ao controle não exposto  $\pm$  EPM,. Valores de \*\*\*\* $p < 0.0001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle, usando Test T de Student (N=3).

A inibição do crescimento de células malignas tem sido estudada principalmente em culturas de monocamada. Pesquisadores estudando o metabólito flavonoide ácido 2,4,6-trihidroxibenzoico, perceberam também a inibição da proliferação celular em células MDA-MB-231 através de ensaio clonogênico (143). Da mesma forma KIM *et al.* (2022) (144) descobriram que o extrato de polpa de banana, que contém catequina, epicatequina e, ácido cinâmico, assim como o BHA70, exerce inibição dose-dependente da formação de colônias em células MDA-MB-231. Ainda, SMITH *et al.* (2016) (145) viram que células MDA-MB-231 e MDA-MB-468 tratadas com fisetina (3,3',4',7-tetrahidroxiflavona), um flavonoide encontrado em várias frutas e vegetais, tiveram também a formação de colônias reduzida. Outros pesquisadores viram que o mel de manuka, rico em compostos fenólicos, exerceu um efeito inibitório significativo na capacidade de formação de colônias de longo prazo de células MDA-MB-231. Acredita-se que as propriedades antiproliferativas e pró-apoptóticas do mel e de outros extratos fitoquímicos, nas células cancerígenas, se devam principalmente aos seus constituintes de compostos fenólicos, incluindo, entre outros, crisina, luteolina, quercetina, catequina e ésteres de ácido cafeico (146).

#### 4.7 EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR QUANTITATIVO

A fim de elucidar por qual via apoptótica o BHA70 causa a morte celular, foi analisada a expressão relativa de diferentes genes envolvidos na apoptose, a qual está representada na Figura 13.

Figura 13. Efeito do BHA70 na expressão dos genes *BLCL2*, *BCLXL*, *BAX* e *Fas*.

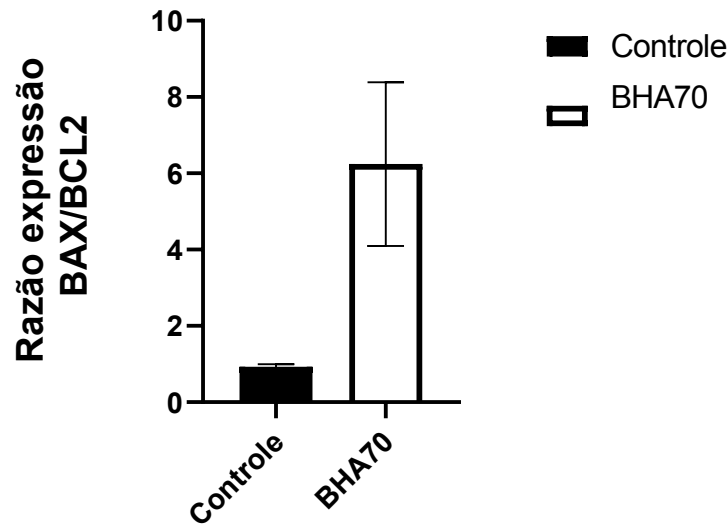


As células foram incubadas com o extrato por 24h. A avaliação da expressão gênica foi realizada por PCR quantitativo em tempo real utilizando GAPDH como controle endógeno. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM (N=3). Os dados foram expressos em relação ao controle de células sem tratamento considerado 100%. Valores de \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\*\* $p < 0.0001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle, usando Test T de Student (N=3).

Nossos resultados mostraram que o tratamento com o extrato BHA70 induziu redução estatisticamente significativa na expressão dos genes antiapoptóticos *BCL2* e *BCLXL* e uma tendência (estatisticamente não significativa) a aumento na expressão do gene pró-apoptótico *BAX*. A via intrínseca da apoptose é marcada pela perda da integridade mitocondrial, a qual é medida em termos de relação *BAX/BCL2*, ocorrendo então a liberação de citocromo-c e perda de potencial de membrana mitocondrial (147). A relação *BAX/BCL2* foi de  $6,44 \pm 1,63$  <sup>ns</sup> (Figura 14) neste sentido, percebemos que o extrato BHA70 foi capaz de atuar nestes fatores relacionados à apoptose intrínseca, aumentando a relação *BAX/BCL2* no grupo tratado.



Figura 14. Efeito do BHA70 na relação BAX /BCL2.



As células foram incubadas com o extrato por 24h. A avaliação da expressão gênica foi realizada por PCR quantitativo em tempo real utilizando GAPDH como controle endógeno. Cada barra representa a Média ± EPM (N=3). Os dados foram expressos em relação ao controle de células sem tratamento considerado 100%. Valores de <sup>ns</sup>p < 0,0686 não considerados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle, usando Test T de Student (N=3).

Um desequilíbrio entre a família de proteínas *BCL2*, em favor dos membros anti-apoptóticos, é um fenômeno que ocorre frequentemente em células cancerosas. A superexpressão de *BCL2* ou *BCLXL* antiapoptótico provavelmente ocorre em mais da metade de todos os tipos de câncer (148,149).

Os protocolos anticancerígenos atuais usados na clínica, como radioterapia e quimioterapia, visam eliminar as células tumorais que proliferam rapidamente, ativando principalmente a apoptose. Nesse contexto, a superexpressão de *BCL2* e *BCLXL* e a perda de *BAX* e/ou *BAK* tem sido associada à resistência adquirida de tumores à radiação e quimioterapia. Portanto, tem sido proposto que a diminuição da expressão dos membros da família *BCL2* anti-apoptóticos ou a superexpressão dos pró-apoptóticos poderiam possivelmente restaurar a maquinaria apoptótica intrínseca nas células tumorais e sensibilizar esses tumores a quimioterapia e radioterapia (150).

Nossos resultados estão de acordo com BRANCO *et. al.*, (2015) (28) que em suas pesquisas verificaram que a expressão de *BAX* foi significativamente aumentada após o tratamento com o extrato de brácteas de *Araucaria angustifolia*. LI *et al.* (2021) (135) também verificaram em células MDA-MB-231 tratadas com o flavonóide anemilpsina, um aumento de *BAX* e diminuição de *BCL2*. Outro estudo com células MDA-MB-231 e tâmaras de Ajwa

(*Phoenix dactylifera*L), também composta de fenólicos e flavonoides, incluindo catequina, obteve o mesmo resultado (134). Estudos avaliando outras espécies vegetais contendo flavonóides e polifenóis, em células de câncer de mama, encontraram os mesmos resultados (150,151).

Além da via intrínseca, a apoptose pode ser desencadeada por ligantes que se ligam a receptores de morte celular como Fas ou TRAIL, localizados na membrana citoplasmática. O complexo ligante-receptor recruta outros fatores citosólicos, como a caspase-8, formando um complexo de sinalização indutor de morte (DISC), que cliva e ativa a caspase-3 efetora (64).

Vários estudos mostraram que quimioterápicos, como a doxorubicina por exemplo, resultam em maior expressão de Fas e FasL e aumento da suscetibilidade das células expostas a esses agentes à morte celular apoptótica dependente de Fas (152).

Em nosso estudo verificamos uma diminuição na expressão do receptor de morte Fas. Há evidências de que a regulação transcricional por p53 modula a expressão de *Fas* e *FasL* após danos no DNA, sendo que a presença de *p53* funcional do tipo selvagem está intimamente ligada à indução eficiente de apoptose mediada por *Fas* em muitos tipos de células (153-157).

Tendo em vista que a linhagem celular MDA-MB-231 apresenta mutação no gene *p53*, o não aumento de Fas pode estar relacionado a isso (155,158-165). No entanto, o mecanismo que levou a sua diminuição da sua expressão é desconhecido e precisa ser melhor estudado. Para confirmar que não há a participação da via extrínseca da apoptose no mecanismo de ação de BHA70, uma avaliação da atividade de caspase-8 precisaria ser realizada. Apenas com os resultados atuais, sugere-se que não há envolvimento da via extrínseca da apoptose.

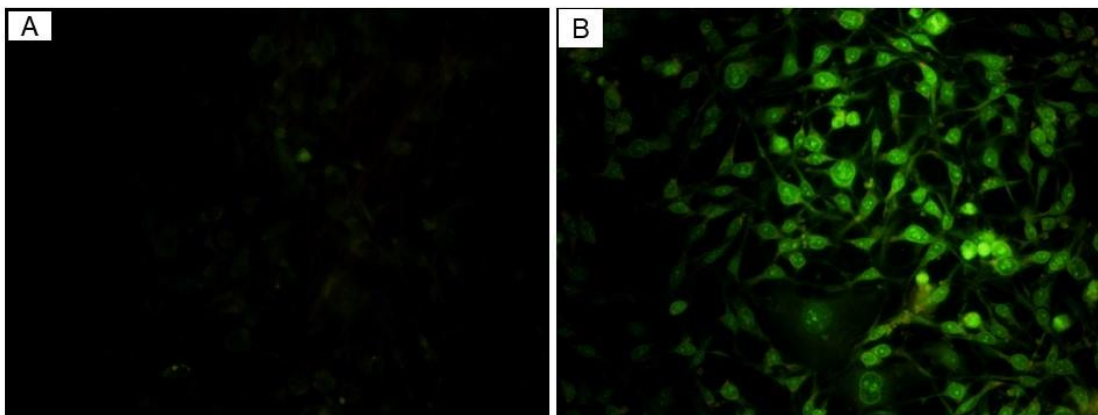
#### 4.8 PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROs)

As espécies reativas, que incluem principalmente espécies reativas de oxigênio (EROs), são produtos gerados como consequência de reações metabólicas nas mitocôndrias de células eucarióticas. Baixos níveis de EROs geralmente estimulam a proliferação e sobrevivência celular, enquanto níveis excessivos induzem estresse oxidativo e levam a morte celular através da diminuição da capacidade antioxidante, gerando disfunção mitocondrial, oxidação de proteínas e lipídios e dano ao DNA, assim desencadeando moléculas de sinalização pró-apoptótica (166, 167).

As implicações para a regulação das EROs são altamente significativas para a terapia do câncer, porque as drogas radioterápicas e quimioterápicas comumente modulam a quantidade das EROs (76).

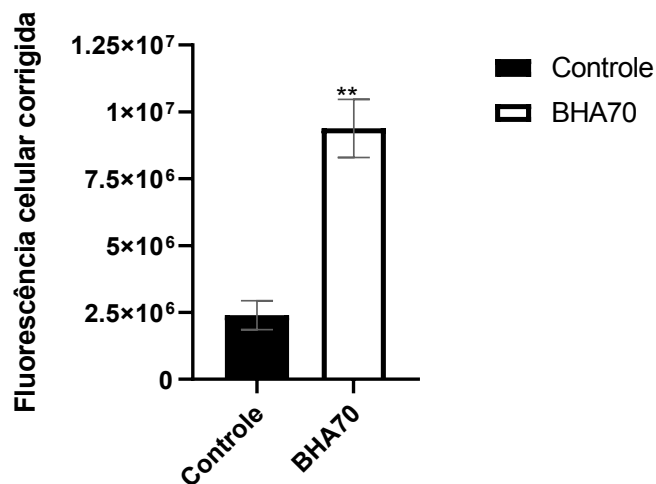
Nossos resultados, demonstrados nas Figura 15 e 16 constataam que o extrato BHA70 induziu a formação de EROs no grupo tratado com o extrato BHA70, sendo quase 4 vezes superior ao grupo controle.

Figura 15. Avaliação de espécies reativas de oxigênio por DCFH-DA.



Os ensaios foram realizados após 4 horas de incubação com o extrato. Controle (A), BHA70 (B). Aumento de 200x. Imagens representativas de um experimento (N=3).

Figura 16. Efeito do tratamento na produção de espécies reativas de oxigênio por DCFH-DA.



As células ( $2 \times 10^6$ ) foram incubadas com o extrato por 4h. Os dados foram obtidos em fluorescência celular e foram expressos em porcentagem de EROs em relação ao controle sem Tratamento. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM (N=3). Valores de \*\*\*  $p < 0,001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle, usando Test T de Student. (N=3).

Um estudo mostrou que o tratamento com o flavonoide epicatequina, um dos compostos identificados no BHA70, levou a diminuição na viabilidade das células MDA-MB-231 e MCF-7, através da indução de apoptose via produção de EROs (168). Extratos de *Phoenix dactylifera*, rico em polifenóis, incluindo a catequina produziram efeito semelhante em células MDA-MB-231. (134).

Estudos com extrato da planta *Argemone mexicana* revelaram que este induziu a morte celular em células de carcinoma epidermoide via EROs e ativação da via apoptótica mediada por p53, que pode ser atribuída à presença de polifenóis em sua composição, sendo identificados: ácido cafeico> epicatequina> kaempferol> ácido clorogênico> ácido gálico> catequina> ácido elágico>umbeliferona> quercetina> ácido cumárico (169).

Diversos estudos com extrato de semente de uva, e também com chá verde, ambos ricos em polifenóis como a catequina e a epicatequina, demonstraram a indução de morte celular apoptótica através da produção de EROs em diferentes tipos de câncer (170-174).

Um extrato de sementes de *Eugenia involucrata* DC, rico em catequina e a epicatequina, exibiu atividade antitumoral em uma linha celular de câncer pancreático (PANC-1) também através do aumento da produção de EROs (175).

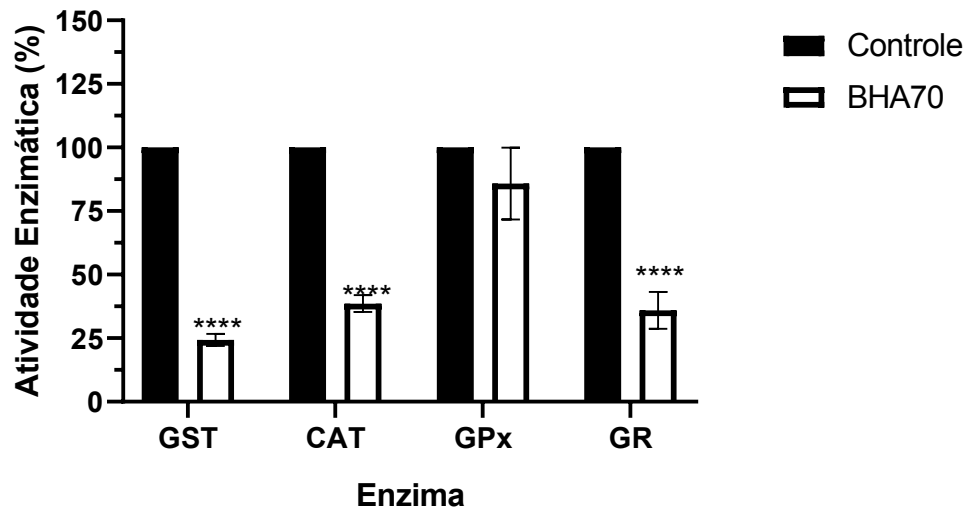
O extrato de semente de açaí, rico em flavonoides, apresentou efeitos citotóxicos contra tumor de mama em células MCF-7 e aumentou a produção de EROs (176).

A atividade antitumoral do BHA70, foi provavelmente relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos específicos (epicatequina, catequina e ácido cinâmico) com efeitos antitumorais já relatados anteriormente.

#### 4.9 DEFESAS ANTIOXIDANTES E TIÓIS TOTAIS

Após a verificação da geração de EROs induzida pelo extrato, avaliou-se também o efeito do mesmo sob diferentes defesas antioxidantes. Conforme se observa na Figura 17 nossos resultados mostram que houve uma tendência (não significativa) à diminuição da GPx para o grupo exposto ao extrato BHA70 e diminuição acentuada das demais defesas antioxidantes analisadas.

Figura 17. Efeito do BHA70 na atividade das enzimas antioxidante em células MDA-MB231.

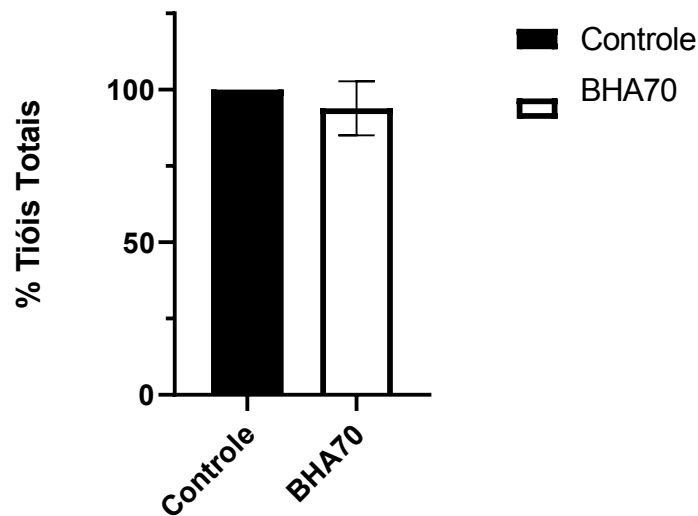


$6 \times 10^6$  células foram incubadas com o tratamento por 24 horas. As células foram lisadas e as atividades enzimáticas foram avaliadas espectrofotometricamente. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM. Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao controle. Valor de \*\*\*\* $p < 0.0001$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados ao grupo controle, usando Test T de Student. (N=3).

O decréscimo nas enzimas GST, CAT, GPx e GR pode ser explicado pela grande demanda dos sistemas antioxidantes das células devido ao aumento da produção de EROs gerada pelo extrato, o qual excedeu as capacidades detoxificantes das enzimas, levando-as à exaustão enzimática, ou ainda pode ser por um efeito direto do extrato na atividade delas ou na expressão gênica (que não foi avaliada). Com relação tendência não significativa a baixa da Gpx pode ter ocorrido pelo fato de que essa enzima age em concentrações menores de EROs, enquanto CAT age quando há altas concentrações como nos resultados obtidos.

Quanto aos tióis totais, houve uma tendência à diminuição (não significativo), conforme se observa na Figura 18. Porém os tióis totais incluem os proteicos e não proteicos, não sendo uma mensuração fidedigna de glutatona.

Figura 18. Efeito do BHA70 na concentração de Tióis Totais em células MDA-MB-231.



$6 \times 10^6$  células foram incubadas com o tratamento por 24 horas. As células foram lisadas e as atividades enzimáticas foram avaliadas espectrofotometricamente. Cada barra representa a Média  $\pm$  EPM. Os dados foram expressos em porcentagem em relação ao controle. (N=3).

BRANCO *et al.* (2015, 2016, 2019) também observaram citotoxicidade relacionada à depleção nas defesas antioxidantes enzimáticas (CAT) nas células tumorais HepG2 tratadas com o extrato de brácteas de *A. angustifolia*. Ainda, avaliaram os efeitos tóxicos desse extrato na biologia e no desenvolvimento da lagarta veludo, *Anticarsia gemmatalis*. Em seu estudo mostraram que a atividade de CAT foi significativamente diminuída em todas as concentrações de tratamento indicando um esgotamento nas defesas antioxidantes, tendo como consequência a diminuição da viabilidade larval atribuída pelos autores à geração de altos níveis de EROs e desequilíbrio redox celular (27,28,31).

GIRALDELO *et al.* (2020) em pesquisas com o extrato de sementes de *E. involucrata*, rico em flavonoides, também verificaram decréscimo na atividade da GPx e o atribuíram a inibição direta sobre a enzima já que GPx pode ser inativada por diversas substâncias *in vitro* e ainda, que o aumento dos níveis de  $H_2O_2$  resultante dessa queda, pode agir como segundo mensageiro e regular a expressão de genes antiapoptóticos (175).

Algumas pesquisas relacionam o efeito antitumoral com a geração de altos níveis de EROs, que acabam exaurindo as defesas antioxidantes, como a depleção dos níveis de glutatona (GSH) induzindo a apoptose (80,81).

THANGAVELU *et al.* (2022) em suas pesquisas em células HepG2, avaliaram o potencial antitumoral de extratos etanólicos de *Acácia catechu*, a qual contém vários compostos bioativos como afzelechina, catequina, epicatequina, kaempferol, quercetina e rutina (136).

O tratamento induziu a citotoxicidade e diminuiu significativamente ( $p < 0,001$ ) o conteúdo de GSH em comparação com o controle, sugerindo que o aumento da geração de EROs com uma diminuição concomitante dos antioxidantes intracelulares pode ser responsável pela citotoxicidade mediada pelo estresse oxidativo induzida pelo extrato

Portanto, nossos resultados sugerem que o tratamento com o BHA70 desencadeou um mecanismo que sobrecarrega os sistemas de defesas antioxidantes, manifestando-se como uma diminuição considerável nas atividades e dos níveis de CAT, GR, GST, GPx e GSH (tióis totais).

## 5 CONCLUSÃO

O presente trabalho permite-nos concluir que o extrato hidroalcoólico de brácteas (BHA70) foi capaz de induzir citotoxicidade de maneira dose-dependente em linhagem tumoral de mama e mostrou efeito citotóxico seletivo. O extrato induziu predominantemente apoptose pela via intrínseca envolvendo a ativação de proteína pró-apoptótica (BAX) e inativação de proteínas anti-apoptóticas (BCLXL e BCL-2). O efeito do extrato também demonstrou estar relacionado à indução de estresse oxidativo evidenciado através de um desbalanço entre a geração de EROS e a diminuição de defesas antioxidantes como glutathione peroxidase, glutathione s-transferase, glutathione reductase e atividade de catalase.

A atividade antitumoral do extrato BHA70, foi provavelmente relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos específicos (epicatequina, catequina e ácido cinâmico) com efeitos antitumorais previamente relatados na literatura.

Em suma, os resultados apresentados sugerem que o extrato das brácteas de *Araucaria angustifolia* são promissores para a continuidade das investigações de novos fármacos antitumorais.



## REFERÊNCIAS

- 1 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em out. 2021.
- 2 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **INCA estima 704 mil casos de câncer por ano no Brasil até 2025**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/noticias/2022/inca-estima-704-mil-casos-de-cancer-por-ano-no-brasil-ate-2025>. Acesso em jan. 2023.
- 3 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2023: incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>. Acesso em jan. 2023.
- 4 DOBSON, Jane M. et al. **Cancer chemotherapy in small animal practice**. Blackwell Scientific Publications, 1993.
- 5 WITHROW, Stephen J.; VAIL, David M.; PAGE, Rodney L. **Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 2013.
- 6 SANGHA, Shivani et al. Specificity and sensitivity of cytological techniques for rapid diagnosis of neoplastic and non-neoplastic lesions of canine mammary gland. **Braz J Vet Pathol**, v. 4, n. 1, p. 13-22, 2011.
- 7 SILVA, Alessandra Estrêla da; SERAKIDES, Rogéria; CASSALI, Geovanni Dantas. Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. **Ciência Rural**, v. 34, p. 625-633, 2004.
- 8 NELSON, Richard; COUTO, C. Guillermo. **Medicina interna de pequenos animais**. Elsevier Brasil, 2006
- 9 QUEIROGA, Felisbina Luisa et al. Canine mammary tumours as a model to study human breast cancer: most recent findings. **in vivo**, v. 25, n. 3, p. 455-465, 2011.
- 10 RYBICKA, Agata; KRÓL, Magdalena. Identification and characterization of cancer stem cells in canine mammary tumors. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 1, p. 1-7, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13028-016-0268-6>. Acesso em outubro de 2021.
- 11 Misdorp, W. (2002). Tumours of the mammary gland. In, D.J. Meuten (Ed.), Tumors in domestic animals (4th Edition). Iowa State Press, Blackwell Publishing Company.
- 12 FOSSUM, Theresa Welch. **Cirurgia de pequenos animais**. Elsevier Brasil, 2015.
- 13 DALECK, Carlos Roberto; DE NARDI, Andriago Barboza. **Oncologia em cães e gatos**. Grupo Gen-Editora Roca Ltda. 2016.

- 14 Euler, H.V (2011). Tumours of the mammary glands. In J. M. Dobson & B. D. Lascelles, *BSAVA Manual of canine and feline oncology*. (3th Ed.)
- 15 ZACHARY, James F.; MCGAVIN, M. Donald; MCGAVIN, M. Donald. **Bases da patologia em veterinária**. Elsevier Health Sciences Brazil, 2012.
- 16 MORRIS, Joanna. **Oncologia em pequenos animais**. Editora Roca, 2007.
- 17 ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- 18 WEI, Michael C. et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v. 292, n. 5517, p. 727-730, 2001.
- 19 YOULE, Richard J.; STRASSER, Andreas. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 9, n. 1, p. 47-59, 2008.
- 20 CORY, Suzanne; ADAMS, Jerry M. The *BCL2* family: regulators of the cellular life-or-death switch. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 9, p. 647-656, 2002.
- 21 RAJANI, G. P.; ASHOK, Purnima. *In vitro* antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. **Indian journal of pharmacology**, v. 41, n. 5, p. 227, 2009.
- 22 PATIL, Jeevitha B.; KIM, Jinhee; JAYAPRAKASHA, G. K. Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. **European journal of pharmacology**, v. 645, n. 1-3, p. 70-78, 2010.
- 23 JAYAPRAKASHA, Guddadarangavvanahally K.; RAO, Lingamallu Jaganmohan; SAKARIAH, Kunnumpurath K. Antioxidant activities of flavidin in different *in vitro* model systems. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, n. 19, p. 5141-5146, 2004.
- 24 NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- 25 EFFERTH, Thomas. Cancer therapy with natural products and medicinal plants. **Planta medica**, v. 76, n. 11, p. 1035-1036, 2010.
- 26 TARAPHDAR, Amit K.; ROY, Madhumita; BHATTACHARYA, R. K. Natural products as inducers of apoptosis: Implication for cancer therapy and prevention. **Current science**, p. 1387-1396, 2001. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/24104955>. Acesso em outubro de 2021.
- 27 BRANCO, Cátia. S. et al. Chemical constituents and biological activities of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) O. Kuntze: a review. **J. Org. Inorg. Chem**, v. 2, p. 1-10, 2016. Disponível em: <https://organic-inorganic.imedpub.com/chemical-constituents-and-biologicalactivities-of-araucaria-angustifolia-bertolo-kuntze-a-review.php?aid=8964>. Acesso em outubro de 2021.
- 28 BRANCO, Cátia. S. et al. Mitochondria and redox homeostasis as chemotherapeutic targets of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze in human larynx HEP-2 cancer cells. **Chemico-**

- biological interactions**, v. 231, p. 108, 2015. **Chemico-Biological Interactions**, v. 231, p. 108-118, 2015. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/335055217\\_Mitochondria\\_and\\_redox\\_homeostasis\\_as\\_chemotherapeutic\\_targets\\_of\\_Araucaria\\_angustifolia\\_Bert\\_O\\_Kuntze\\_in\\_human\\_larynx\\_HEp-2\\_cancer\\_cells](https://www.researchgate.net/publication/335055217_Mitochondria_and_redox_homeostasis_as_chemotherapeutic_targets_of_Araucaria_angustifolia_Bert_O_Kuntze_in_human_larynx_HEp-2_cancer_cells). Acesso em outubro de 2021.
- 29 ALMEIDA, Maria Tereza Rojo de et al. Isolamento e identificação de substâncias ativas de araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze com potencial atividade antiviral. 2003.
- 30 SALLAI, Roberto Carlos et al. Biotechnological Potential of Araucaria angustifolia Pine Nuts Extract and the Cysteine Protease Inhibitor AaCI-2S. **Plants**, v. 9, n. 12, p. 1676, 2020.
- 31 BRANCO, Catia S. et al. Modulation of mitochondrial and epigenetic targets by polyphenols-rich extract from Araucaria angustifolia in larynx carcinoma. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 19, n. 1, p. 130-139, 2019. Disponível em: <https://www.ingentaconnect.com/content/ben/acame/2019/00000019/00000001/art00016>. Acesso em outubro de 2021
- 32 MICHELON, Fabiane et al. Araucaria angustifolia: A potential nutraceutical with antioxidant and antimutagenic activities. **Current Nutrition & Food Science**, v. 8, n. 3, p. 155-159, 2012.
- 33 FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. **American journal of cancer research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.
- 34 WONG, Rebecca SY. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of experimental & clinical cancer research**, v. 30, n. 1, p. 1-14, 2011.
- 35 FELICIANO, Marcus Antonio Rossi et al. NEOPLASIA MAMÁRIA EM CADELAS–REVISÃO DE LITERATURA: MAMMARY NEOPLASM IN BITCHES–A LITERATURE REVIEW. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, n. 18, 2012.
- 36 DE NARDI, Andriago Barboza; DALECK, Carlos Roberto. **Oncologia em cães e gatos**. Grupo Gen-Editora Roca Ltda., 2016.2. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 498-516
- 37 SORENMO, K. U. et al. Development, anatomy, histology, lymphatic drainage, clinical features, and cell differentiation markers of canine mammary gland neoplasms. **Veterinary pathology**, v. 48, n. 1, p. 85-97, 2011.
- 38 DA ROCHA, Aline Alvarenga; DE FÁTIMA GARTNER, Maria. Histological Classification in Canine Mammary Tumors: Back to Basics. **Archives of Veterinary Science and Medicine**, v. 4, n. 3, p. 67-70, 2021.
- 39 KUMAR, Abhinav et al. Deep feature learning for histopathological image classification of canine mammary tumors and human breast cancer. **Information Sciences**, v. 508, p. 405-421, 2020.

- 40 GRAY, Mark et al. Naturally-occurring canine mammary tumors as a translational model for human breast cancer. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 617, 2020.
- 41 AKIYAMA, Futoshi; HORII, Rie. Therapeutic strategies for breast cancer based on histological type. **Breast cancer**, v. 16, p. 168-172, 2009.
- 42 MEDEIROS, Vítor Brasil. Câncer da mama na cadela. **Journal of Surgical and Clinical Research**, v. 8, n. 1, p. 118-129, 2017.
- 43 CASSALI, Geovanni D. et al. Consensus regarding the diagnosis, prognosis and treatment of canine and feline mammary tumors-2019. 2020.
- 44 MARTIN, Heather L.; SMITH, Laura; TOMLINSON, Darren C. Multidrug-resistant breast cancer: current perspectives. **Breast Cancer: targets and therapy**, p. 1-13, 2014.
- 45 YERSAL, Ozlem; BARUTCA, Sabri. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World journal of clinical oncology**, v. 5, n. 3, p. 412, 2014.
- 46 LEHMANN, Brian D.; PIETENPOL, Jennifer A. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. **The Journal of pathology**, v. 232, n. 2, p. 142-150, 2014.
- 47 ABADIE, Jérôme et al. Canine invasive mammary carcinomas as models of human breast cancer. Part 2: immunophenotypes and prognostic significance. **Breast cancer research and treatment**, v. 167, p. 459-468, 2018.
- 48 DERAKHSHAN, Fatemeh; REIS-FILHO, Jorge S. Pathogenesis of triple-negative breast cancer. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 17, p. 181-204, 2022.
- 49 PAN, Yunbao et al. P53 and Ki-67 as prognostic markers in triple-negative breast cancer patients. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. e0172324, 2017.
- 50 YIN, Li et al. Triple-negative breast cancer molecular subtyping and treatment progress. **Breast Cancer Research**, v. 22, p. 1-13, 2020.
- 51 FOULKES, William D.; SMITH, Ian E.; REIS-FILHO, Jorge S. Triple-negative breast cancer. **New England journal of medicine**, v. 363, n. 20, p. 1938-1948, 2010.
- 52 CAREY, Lisa A. et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 8, p. 2329-2334, 2007.
- 53 LAVALLE, Gleidice Eunice et al. Canine malignant mammary gland neoplasms with advanced clinical staging treated with carboplatin and cyclooxygenase inhibitors. **In vivo**, v. 26, n. 3, p. 375-379, 2012.
- 54 TRAN, C. M.; MOORE, A. S.; FRIMBERGER, A. E. Surgical treatment of mammary carcinomas in dogs with or without postoperative chemotherapy. **Veterinary and Comparative oncology**, v. 14, n. 3, p. 252-262, 2016.

- 55 TAN, Wen et al. Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. **Chinese medicine**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2011.
- 56 MARTINS, MI Mello et al. The canine transmissible venereal tumor: etiology, pathology, diagnosis and treatment. **Recent Advances in Small Animal Reproduction**, v. 25, n. 7, p. 161-167, 2005.
- 57 D'ARCY, Mark S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell biology international**, v. 43, n. 6, p. 582-592, 2019.
- 58 LEE, Yongchan; OVERHOLTZER, Miguel. Foco: Morte: Funções Pós-Morte da Morte Celular. **Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 4, p. 687, 2019.
- 59 DHURIYA, Yogesh K.; SHARMA, Divakar. Necroptose: um modo inflamatório regulado de morte celular. **Revista de neuroinflamação**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2018.
- 60 SUCHA, Lenka et al. The cytotoxic effect of  $\alpha$ -tomatine in MCF-7 human adenocarcinoma breast cancer cells depends on its interaction with cholesterol in incubation media and does not involve apoptosis induction. **Oncology Reports**, v. 30, n. 6, p. 2593-2602, 2013.
- 61 GALLUZZI, Lorenzo et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.
- 62 KOREN, Elle; FUCHS, Yaron. Modes of Regulated Cell Death in Cancer Modes of Regulated Cell Death in Cancer. **Cancer discovery**, v. 11, n. 2, p. 245-265, 2021.
- 63 OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals-A review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, p. 1133-1143, 2020.
- 64 O'BRIEN, Mauria A.; KIRBY, Rebecca. Apoptosis: A review of pro-apoptotic and anti-apoptotic pathways and dysregulation in disease. **Journal of veterinary emergency and critical care**, v. 18, n. 6, p. 572-585, 2008.
- 65 STRASSER, Andreas; VAUX, David L. Cell death in the origin and treatment of cancer. **Molecular cell**, v. 78, n. 6, p. 1045-1054, 2020.
- 66 JAN, Rehmat et al. Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205, 2019.
- 67 BOCK, Florian J.; TAIT, Stephen WG. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 21, n. 2, p. 85-100, 2020.
- 68 BERTHELOOT, Damien; LATZ, Eicke; FRANKLIN, Bernardo S. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. **Cellular & molecular immunology**, v. 18, n. 5, p. 1106-1121, 2021.
- 69 LOSSI, Laura. The concept of intrinsic versus extrinsic apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 479, n. 3, p. 357-384, 2022.

70 SINGH, Vishakha et al. Apoptosis and pharmacological therapies for targeting thereof for cancer therapeutics. **Sci**, v. 4, n. 2, p. 15, 2022.

71 PENG, Fu et al. Regulated cell death (RCD) in cancer: key pathways and targeted therapies. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 7, n. 1, p. 286, 2022.

72 KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K. Robbins y Cotran. Patología estructural y funcional. Elsevier Health Sciences, 2021.

73 HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

74 SHARIFI, Simin et al. Doxorubicin changes *BAX/BCLXL* ratio, caspase-8 and 9 in breast cancer cells. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 5, n. 3, p. 351, 2015.

75 YIN, Hang et al. Terphenyl-based Bak BH3  $\alpha$ -helical proteomimetics as low-molecular-weight antagonists of BCLXL. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 29, p. 10191-10196, 2005.

76 SOSA, Venus et al. Oxidative stress and cancer: an overview. **Ageing research reviews**, v. 12, n. 1, p. 376-390, 2013.

77 REDZA-DUTORDOIR, Maureen; AVERILL-BATES, Diana A. Ativação de vias de sinalização de apoptose por espécies reativas de oxigênio. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1863, n. 12, p. 2977-2992, 2016.

78 VESKOUKIS, Aristidis S.; TSATSAKIS, Aristidis M.; KOURETAS, Dimitrios. Dietary oxidative stress and antioxidant defense with an emphasis on plant extract administration. **Cell Stress and Chaperones**, v. 17, n. 1, p. 11-21, 2012.

79 NATH, Karl A.; NORBY, Suzanne M. Reactive oxygen species and acute renal failure. **The American journal of medicine**, v. 109, n. 8, p. 665-678, 2000.

80 HIGUCHI, Yoshihiro; YOSHIMOTO, Tanihiro. Arachidonic acid converts the glutathione depletion-induced apoptosis to necrosis by promoting lipid peroxidation and reducing caspase-3 activity in rat glioma cells. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 400, n. 1, p. 133-140, 2002.

81 DE SOUZA GRINEVICIUS, Valdelúcia Maria Alves et al. Piper nigrum ethanolic extract rich in piperamides causes ROS overproduction, oxidative damage in DNA leading to cell cycle arrest and apoptosis in cancer cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 189, p. 139-147, 2016.

82 ALLOCATI, Nerino et al. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. **Oncogenesis**, v. 7, n. 1, p. 1-15, 2018.

83 BUETTNER, Garry R.; WAGNER, Brett A.; RODGERS, Victor GJ. Quantitative redox biology: an approach to understand the role of reactive species in defining the cellular redox environment. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 67, n. 2, p. 477-483, 2013.

- 84 ROVER JÚNIOR, Laércio et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutathiona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.
- 85 KALANTARI, Heibatullah et al. Protective effect of inulin on methotrexate-induced liver toxicity in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 943-950, 2019.
- 86 CIRCU, Magdalena L.; AW, Tak Yee. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free radical biology and medicine**, v. 48, n. 6, p. 749-762, 2010.
- 87 THAKUR, Rohit Singh; DEVARAJ, Ezhilarasan. Lagerstroemia speciosa (L.) Pers. triggers oxidative stress mediated apoptosis via intrinsic mitochondrial pathway in HepG2 cells. **Environmental Toxicology**, v. 35, n. 11, p. 1225-1233, 2020.
- 88 HABTEMARIAM, Solomon; LENTINI, Giovanni. Plant-derived anticancer agents: Lessons from the pharmacology of geniposide and its aglycone, genipin. **Biomedicines**, v. 6, n. 2, p. 39, 2018.
- 89 DEY, Prasanta et al. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). In: **Recent advances in natural products analysis**. Elsevier, 2020. p. 505-567.
- 90 KHAN, Haroon et al. Glycosides from medicinal plants as potential anticancer agents: emerging trends towards future drugs. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 13, p. 2389-2406, 2019.
- 91 MORAES, Denise Fernandes Coutinho et al. Anticancer drugs from plants. **Biotechnology and production of anti-cancer compounds**, p. 121-142, 2017.
- 92 RAYAN, Anwar; RAIYN, Jamal; FALAH, Mizied. A natureza é a melhor fonte de medicamentos anticancerígenos: Indexação de produtos naturais por sua bioatividade anticancerígena. **PloS One**, v. 12, n. 11, p. e0187925, 2017.
- 93 RAHMAN, Md Ataur et al. Phytochemicals as a complement to cancer chemotherapy: pharmacological modulation of the autophagy-apoptosis pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 639628, 2021.
- 94 ISHAQ, Ali Raza et al. Natural Polyphenols a New Paradigm in Treatment of Various Diseases. **Polyphenols-based Nanotherapeutics for Cancer Management**, p. 17-55, 2021.
- 95 MUTHA, Rakesh E.; TATIYA, Anilkumar U.; SURANA, Sanjay J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: An overview. **Future journal of pharmaceutical sciences**, v. 7, p. 1-13, 2021.
- 96 RAVISHANKAR, Divyashree et al. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 45, n. 12, p. 2821-2831, 2013.

97 STEVENS, Jan F.; REVEL, Johana S.; MAIER, Claudia S. Mitochondria-centric review of polyphenol bioactivity in cancer models. **Antioxidants & redox signaling**, v. 29, n. 16, p. 1589-1611, 2018.

98 ZANETTE, F. et al. Araucária: particularidades, propagação e manejo de plantios. 2017.

99 FISCHER, Thaís Estéfane et al. Bioactive Activities of the Phenolic Extract from Sterile Bracts of *Araucaria angustifolia*. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2431, 2022.

100 IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da extração vegetal e da silvicultura - PEVS. Disponível em: [pevs\\_2020\\_v35\\_informativo.pdf \(ibge.gov.br\)](https://pevs.ibge.gov.br/pevs_2020_v35_informativo.pdf). Acesso em fev. 2023.

101 GUERRA, Miguel Pedro et al. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). 2002.

102 MARCHIORO, Cesar A.; SANTOS, Karine L.; SIMINSKI, Alexandre. Present and future of the critically endangered *Araucaria angustifolia* due to climate change and habitat loss. **Forestry: An International Journal of Forest Research**, v. 93, n. 3, p. 401-410, 2020.

103 SAMPAIO, Danielle Affonso et al. Diversity of Secondary Metabolites of *Araucaria* Seed (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze) Residues. **Ensaio e Ciência C Biológicas Agrárias e da Saúde**, v. 26, n. 2, p. 289-292, 2022.

104 SEBRAE, Santa Catarina. Santa Catarina em números. **Florianópolis: Sebrae SC**, 2013.

105 DANNER, Moeses Andriago; ZANETTE, Flávio; RIBEIRO, Juliana Zanetti. O cultivo da araucária para produção de pinhões como ferramenta para a conservação. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 32, n. 72, p. 441, 2012.

106 SINGLETON, Vernon L.; ROSSI, Joseph A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American journal of Enology and Viticulture**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

107 PEKAL, Anna; PYRZYNSKA, Krystyna. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, p. 1776-1782, 2014.

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

109 FRANKEN, Nicolaas AP et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006

110 LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.



- 111 AEBI, Hugo. [13] Catalase *in vitro*. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1984. p. 121-126.
- 112 CARLBERG, Inger; MANNERVIK, Bengt. [59] Glutathione reductase. In: **Methods in enzymology**. Academic press, 1985. p. 484-490.
- 113 FLOHÉ, Leopold; GÜNZLER, Wolfgang A. [12] Assays of glutathione peroxidase. In: **Methods in enzymology**. Academic Press, 1984. p. 114-120.
- 114 KEEN, JAMES H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for the several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, n. 20, p. 6183-6188, 1976.
- 115 TIETZE, Frank. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. **Analytical biochemistry**, v. 27, n. 3, p. 502-522, 1969.
- 116 PFAFFL, Michael W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic acids research**, v. 29, n. 9, p. e45-e45, 2001.
- 117 SOUZA, Márcia O. et al. Antioxidant and antigenotoxic activities of the Brazilian pine *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze. **Antioxidants**, v. 3, n. 1, p. 24-37, 2014.
- 118 PERALTA, Rosane M. et al. Biological activities and chemical constituents of *Araucaria angustifolia*: An effort to recover a species threatened by extinction. **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, p. 85-93, 2016.
- 119 DE OLIVEIRA, Anielle et al. Bioactivity screening of pinhão (*Araucaria Angustifolia* (Bertol.) Kuntze) seed extracts: The inhibition of cholinesterases and  $\alpha$ -amylases, and cytotoxic and anti-inflammatory activities. **Food & Function**, v. 12, n. 20, p. 9820-9828, 2021.
- 120 KOTHA, Raghavendhar R. et al. Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on *In vitro* Antioxidant Assays. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2388, 2022.
- 121 DA SILVA, Tamires Barlati Vieira et al. *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze extract as a source of phenolic compounds in TPS/PBAT active films. **Food & function**, v. 10, n. 12, p. 7697-7706, 2019.
- 122 CORDENUNSI, Beatriz Rosana et al. Chemical composition and glycemic index of Brazilian pine (*Araucaria angustifolia*) seeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 3412-3416, 2004.
- 123 DA MOTA, Gabriela Sprada Tavares et al. Antioxidant activity of cosmetic formulations based on novel extracts from seeds of Brazilian *Araucaria angustifolia* (Bertoll) Kuntze. **Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications**, v. 2014, 2014.
- 124 KOEHNLEIN, Eloá Angélica et al. Antioxidant activities and phenolic compounds of raw and cooked Brazilian pinhão (*Araucaria angustifolia*) seeds. **African Journal of Food Science**, v. 6, n. 21, p. 512-518, 2012.

125 SHARMA, Neha et al. An overview of therapeutic effects of vanillic acid. **Plant Arch**, v. 20, n. 2, p. 3053-3059, 2020.

126 RUWIZHI, Ngonidzashe; ADERIBIGBE, Blessing Atim. Cinnamic acid derivatives and their biological efficacy. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 16, p. 5712, 2020.

127 MENG, Ning et al. Lipopolysaccharide induces autophagy through BIRC2 in human umbilical vein endothelial cells. **Journal of cellular physiology**, v. 225, n. 1, p. 174-179, 2010.

128 FULDA, Simone. Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2015. p. 20-25.

129 AMARAVADI, Ravi K.; THOMPSON, Craig B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 24, p. 7271-7279, 2007.,

130 DUTHIE, Garry G.; DUTHIE, Susan J.; KYLE, Janet AM. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. **Nutrition research reviews**, v. 13, n. 1, p. 79-106, 2000.

131 LAMSON, Davis W.; BRIGNALL, Matthew S. Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. **Alternative medicine review: a journal of clinical therapeutic**, v. 5, n. 3, p. 196-208, 2000

132 BRUSSELMANS, Koen et al. Induction of cancer cell apoptosis by flavonoids is associated with their ability to inhibit fatty acid synthase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 7, p. 5636-5645, 2005.

133 MISHRA, Amita et al. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

134 KHAN, Mohsin Ali et al. Phytochemicals from Ajwa dates pulp extract induce apoptosis in human triple-negative breast cancer by inhibiting AKT/mTOR pathway and modulating *BCL2* family proteins. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2021.

135 LI, Yue et al. Ampelopsin inhibits breast cancer cell growth through mitochondrial apoptosis pathway. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, p. b21-00470, 2021.

136 THANGAVELU, Lakshmi et al. Acacia catechu seed extract provokes cytotoxicity via apoptosis by intrinsic pathway in HepG2 cells. **Environmental toxicology**, v. 37, n. 3, p. 446-456, 2022.

137 KAZAN, Jalal M. et al. Cx43 expression correlates with breast cancer metastasis in MDA-MB-231 cells *in vitro*, in a mouse xenograft model and in human breast cancer tissues. **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 460, 2019.

138 XUAN, Hongzhuan et al. Antitumor activity of Chinese propolis in human breast cancer MCF-7 and MDA-MB-231 cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014

139 DE OLIVEIRA, Cristiane B. et al. The inhibitory effects of phenolic and terpenoid compounds from *Baccharis trimera* in Siha cells: differences in their activity and mechanism of action. **Molecules**, v. 18, n. 9, p. 11022-11032, 2013.

140 MONTENEGRO, Iván et al. Chemical composition, antioxidant and anticancer activities of *Leptocarpha rivularis* dc flower extracts. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 67, 2020.

141 TEIXEIRA SANTOS, Kamylla et al. *In vitro* Antitumor Effect on Melanoma Cell Line and Chemical Composition of *Diplopterys pubipetala* (A. Juss) WR Anderson and C. Davis. **Pharmacognosy Reviews**, v. 14, n. 28, 2020.

142 GÓMEZ-CORDOVÉS, Carmen et al. Effects of wine phenolics and sorghum tannins on tyrosinase activity and growth of melanoma cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 3, p. 1620-1624, 2001.

143 SANKARANARAYANAN, Ranjini et al. The flavonoid metabolite 2, 4, 6-trihydroxybenzoic acid is a CDK inhibitor and an anti-proliferative agent: A potential role in cancer prevention. **Cancers**, v. 11, n. 3, p. 427, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3390/cancers11030427>>.

144 KIM, Dae Kyeong et al. Antioxidant activity of banana flesh and antiproliferative effect on breast and pancreatic cancer cells. **Food science & nutrition**, v. 10, n. 3, p. 740-750, 2022.

145 SMITH, Matthew L. et al. The dietary flavonoid fisetin causes cell cycle arrest, caspase-dependent apoptosis, and enhanced cytotoxicity of chemotherapeutic drugs in triple-negative breast cancer cells. **Journal of cellular biochemistry**, v. 117, n. 8, p. 1913-1925, 2016.

146 ARYAPPALLI, Priyanka et al. The IL-6/STAT3 signaling pathway is an early target of manuka honey-induced suppression of human breast cancer cells. **Frontiers in Oncology**, v. 7, p. 167, 2017.

147 KROEMER, Guido; GALLUZZI, Lourenço; BRENNER, Catarina. Permeabilização da membrana mitocondrial na morte celular. **Revisões fisiológicas**, v. 87, n. 1, p. 99-163, 2007.

148 WALENSKY, Loren D. et al. Activation of apoptosis *in vivo* by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. **science**, v. 305, n. 5689, p. 1466-1470, 2004.

149 KIRKIN, Vladimir; JOOS, Stefan; ZÖRNIG, Martin. The role of *BCL2* family members in tumorigenesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1644, n. 2-3, p. 229-249, 2004.

150 LV, Zhi-Dong et al. Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth *in vitro* and *in vivo*. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 6, p. 2818, 2014.

151 MOGHTADERI, Hassan et al. Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231. **BioImpacts: BI**, v. 8, n. 3, p. 185, 2018.

152 FULDA, Simone et al. The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. **Cancer research**, v. 57, n. 17, p. 3823-3829, 1997.

153 MÜLLER, Martina et al. p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 11, p. 2033-2045, 1998.

154 MÜLLER, Martina et al. Drug-induced apoptosis in hepatoma cells is mediated by the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system and involves activation of wild-type p53. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 3, p. 403-413, 1997.

155 RUIZ-RUIZ, María del Carmen; LÓPEZ-RIVAS, Abelardo. p53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells. **Cell Death & Differentiation**, v. 6, n. 3, p. 271-280, 1999.

156 LI, Yin et al. Fas-mediated apoptosis is dependent on wild-type p53 status in human cancer cells expressing a temperature-sensitive p53 mutant alanine-143. **Cancer research**, v. 63, n. 7, p. 1527-1533, 2003.

157 WARING, Paul; MÜLLBACHER, Arno. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. **Immunology and cell biology**, v. 77, n. 4, p. 312-317, 1999

158 HUI, L. et al. Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. **Oncogene**, v. 25, n. 55, p. 7305-7310, 2006.

159 HUANG, Lanzhen et al. Curcumin triggers apoptosis of p53 mutant triple-negative human breast cancer MDA-MB 231 cells via activation of p73 and PUMA. **Oncology letters**, v. 14, n. 1, p. 1080-1088, 2017.

160 HUOVINEN, Marjo et al. Characterization of human breast cancer cell lines for the studies on p53 in chemical carcinogenesis. **Toxicology in vitro**, v. 25, n. 5, p. 1007-1017, 2011.

161 AMIRTHARAJ, Francis et al. p53 reactivating small molecule PRIMA-1 MET/APR-246 regulates genomic instability in MDA-MB-231 cells. **Oncology Reports**, v. 47, n. 4, p. 1-9, 2022.

162 HAN, Dong Cho et al. 2'-Benzoyloxycinnamaldehyde induces apoptosis in human carcinoma via reactive oxygen species. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 8, p. 6911-6920, 2004.

163 EL-MASRY, Omar S.; BROWN, Barry L.; DOBSON, Pauline RM. AMPK activation of apoptotic markers in human breast cancer cell lines with different p53 backgrounds: MCF-7, MDA-MB-231 and T47D cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 20, n. 12, p. 3763, 2019.

164 LI, Puyu et al. p53 is required for metformin-induced growth inhibition, senescence and apoptosis in breast cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 464, n. 4, p. 1267-1274, 2015.

165 LEROY, Bernard et al. Analysis of TP 53 mutation status in human cancer cell lines: A reassessment. **Human mutation**, v. 35, n. 6, p. 756-765, 2014.

166 STORZ, Peter. Reactive oxygen species in tumor progression. **Frontiers in Bioscience-Landmark**, v. 10, n. 2, p. 1881-1896, 2005.

167 WANG, Yihui et al. Anti-colorectal cancer activity of macrostemonoside A mediated by reactive oxygen species. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 441, n. 4, p. 825-830, 2013.

168 PEREYRA-VERGARA, Fernando et al. Apoptosis induced by (–)-epicatechin in human breast cancer cells is mediated by reactive oxygen species. **Molecules**, v. 25, n. 5, p. 1020, 2020.

169 ATTRI, Shivani et al. Induction of apoptosis in A431 cells via ROS generation and p53-mediated pathway by chloroform fraction of *Argemone mexicana* (Pepaveraceae). **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-20, 2022.

170 DERRY, Molly et al. Differential effects of grape seed extract against human colorectal cancer cell lines: The intricate role of death receptors and mitochondria. **Cancer letters**, v. 334, n. 1, p. 69-78, 2013.

171 RAINA, Komal et al. Role of oxidative stress in cytotoxicity of grape seed extract in human bladder cancer cells. **Food and chemical toxicology**, v. 61, p. 187-195, 2013.

172 TYAGI, Alpna et al. Differential effect of grape seed extract against human non-small-cell lung cancer cells: the role of reactive oxygen species and apoptosis induction. **Nutrition and cancer**, v. 65, n. sup1, p. 44-53, 2013.

173 NAKAZATO, Tomonori et al. Catechin, a green tea component, rapidly induces apoptosis of myeloid leukemic cells via modulation of reactive oxygen species production *in vitro* and inhibits tumor growth *in vivo*. **Haematologica**, v. 90, n. 3, p. 317-325, 2005.

174 SUH, Kwang Sik et al. Prooxidative effects of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line. **Cell biology and toxicology**, v. 26, p. 189-199, 2010.

175 GIRARDELO, Julheli R. et al. Bioactive compounds, antioxidant capacity and antitumoral activity of ethanolic extracts from fruits and seeds of *Eugenia involucrata* DC. **Food Research International**, v. 137, p. 109615, 2020.

176 SILVA, Marcos Antonio Custódio Neto da et al. Açai (*Euterpe oleracea* mart.) seed extract induces ros production and cell death in mcf-7 breast cancer cell line. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3546, 2021.

### APÊNDICE A – Curva de Eficiência da qPCR

Visando determinar a eficiência da reação de PCR em tempo real, uma curva foi feita com diferentes concentrações de cDNA (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1:32) para todos os pares de oligonucleotídeos (Tabela 6). Também nos forneceu base para escolha da diluição que foi realizada em 1:4.

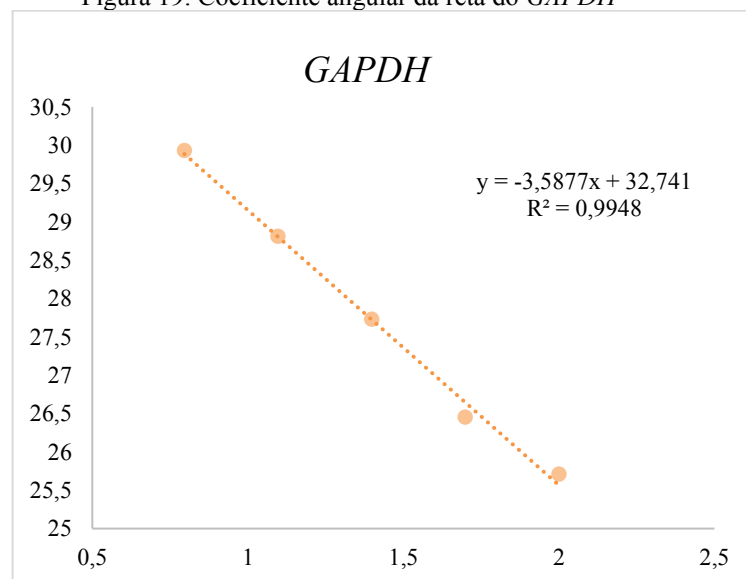
| Primer       | Threshold (dR) | Ct (dR) | Tabela 6. Curva de Eficiência Primers da qPCR |          |            |         | Diluição | Eficiência     |
|--------------|----------------|---------|---|----------|------------|---------|----------|----------------|
|              |                |         | Quantity (nanomoles)                          | RSq (dR) | Slope (dR) | LOG []  |          |                |
| <b>GAPDH</b> | 3634,417       | 25,71   | 100,00  | 0,995    | -3,592     | 2       | 1:2      |                |
|              | 3634,417       | 26,45   | 50,00   | 0,995    | -3,592     | 1,69897 | 1:4      | <b>89,84%</b>  |
|              | 3634,417       | 27,73   | 25,00   | 0,995    | -3,592     | 1,39794 | 1:8      |                |
|              | 3634,417       | 28,81   | 12,50   | 0,995    | -3,592     | 1,09691 | 1:16     | <b>1,90</b>    |
|              | 3634,417       | 29,93   | 6,25  | 0,995    | -3,592     | 0,79588 | 1:32     |                |
| <b>FAZ</b>   | 928,347        | 28,71   | 100,00  | 0,928    | -3,365     | 2       | 1:2      |                |
|              | 928,347        | 29,17   | 50,00   | 0,928    | -3,365     | 1,69897 | 1:4      | <b>98,23%</b>  |
|              | 928,347        | 30,16   | 25,00   | 0,928    | -3,365     | 1,39794 | 1:8      |                |
|              | 928,347        | 30,85   | 12,50   | 0,928    | -3,365     | 1,09691 | 1:16     | <b>1,98</b>    |
|              | 928,347        | 32,94   | 6,25  | 0,928    | -3,365     | 0,79588 | 1:32     |                |
| <b>BCL2</b>  | 5880,95        | 30,18   | 100,00  | 0,962    | -3,266     | 2       | 1:2      |                |
|              | 5880,95        | 31,24   | 50,00   | 0,962    | -3,266     | 1,69897 | 1:4      | <b>102,39%</b> |
|              | 5880,95        | 32,72   | 25,00   | 0,962    | -3,266     | 1,39794 | 1:8      |                |
|              | 5880,95        | 33,55   | 12,50   | 0,962    | -3,266     | 1,09691 | 1:16     | <b>2,02</b>    |
|              | 5880,95        | 33,94   | 6,25  | 0,962    | -3,266     | 0,79588 | 1:32     |                |
| <b>BAX</b>   | 1400,547       | 27,94   | 100,00  | 0,995    | -3,896     | 2       | 1:2      |                |
|              | 1400,547       | 29,1    | 50,00   | 0,995    | -3,896     | 1,69897 | 1:4      | <b>80,58%</b>  |

|               |          |       |        |       |        |         |      |                |
|---------------|----------|-------|--------|-------|--------|---------|------|----------------|
|               | 1400,547 | 30,51 | 25,00  | 0,995 | -3,896 | 1,39794 | 1:8  |                |
|               | 1400,547 | 31,33 | 12,50  | 0,995 | -3,896 | 1,09691 | 1:16 | <b>1,81</b>    |
|               | 1400,547 | 32,69 | 6,25   | 0,995 | -3,896 | 0,79588 | 1:32 |                |
| <b>BCL-XL</b> | 2921,722 | 24,37 | 100,00 | 0,976 | -3,209 | 2       | 1:2  |                |
|               | 2921,722 | 24,8  | 50,00  | 0,976 | -3,209 | 1,69897 | 1:4  | <b>104,94%</b> |
|               | 2921,722 | 25,85 | 25,00  | 0,976 | -3,209 | 1,39794 | 1:8  |                |
|               | 2921,722 | 26,88 | 12,50  | 0,976 | -3,209 | 1,09691 | 1:16 | <b>2,05</b>    |
|               | 2921,722 | 28,16 | 6,25   | 0,976 | -3,209 | 0,79588 | 1:32 |                |

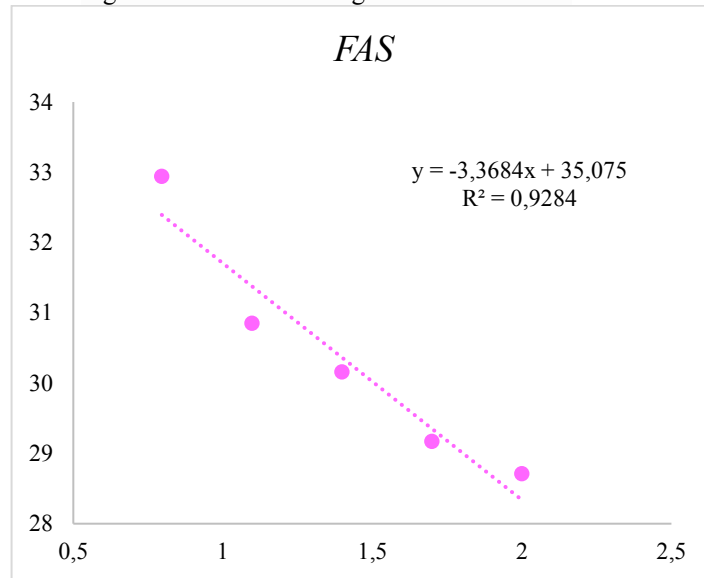
Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise da regressão linear dos valores de Cts em função do logaritmo da respectiva diluição forneceu o coeficiente angular da reta (a, em  $y=ax+b$ ) que foi utilizado para o cálculo da eficiência da amplificação dos produtos.

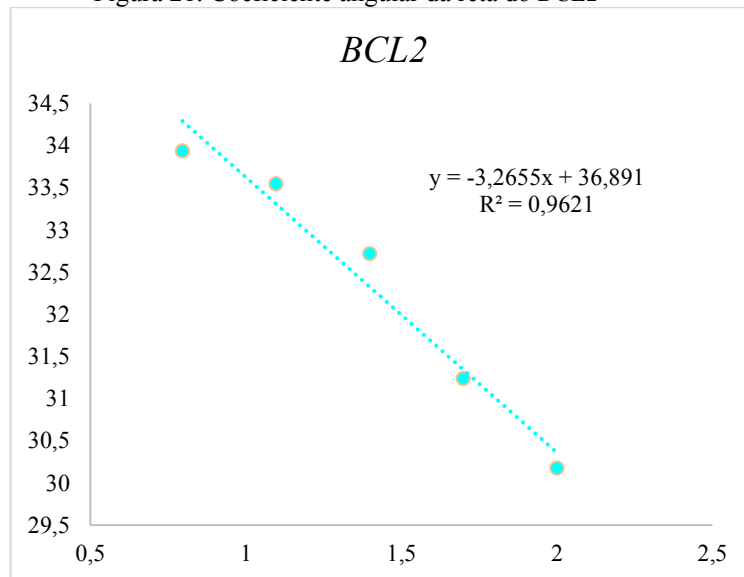
Figura 19. Coeficiente angular da reta do *GAPDH*



Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

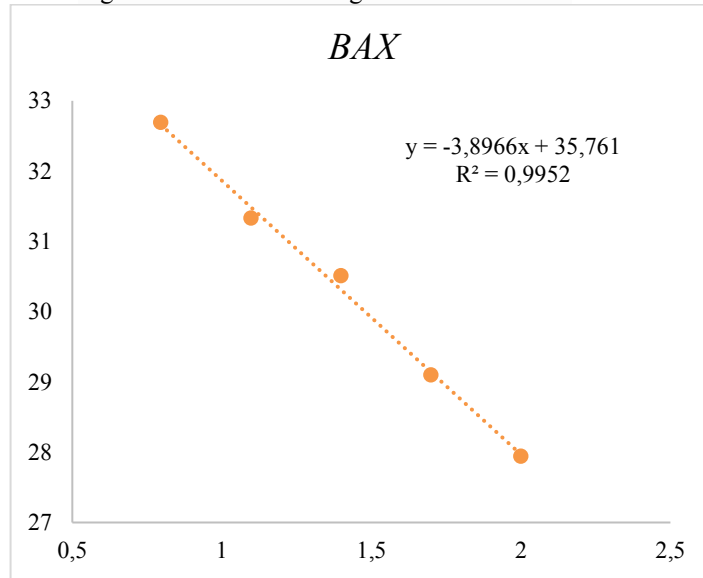
Figura 20. Coeficiente angular da reta do *FAS*

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

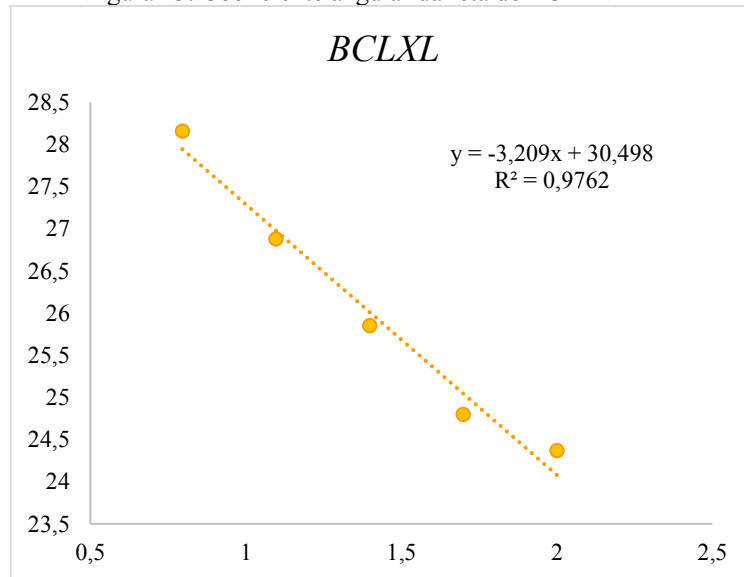
Figura 21. Coeficiente angular da reta do *BCL2*

Fonte: Elaborado pelo autor (2021).



Figura 22. Coeficiente angular da reta do *BAX*

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)

Figura 23. Coeficiente angular da reta do *BCLXL*

Fonte: Elaborado pelo autor (2021)