



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA  
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL

Nádia Sandrine Ramos Santos Mota

**EFEITO ANTITUMORAL DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA E  
LONGA E ALCALOIDES  $\beta$ -CARBOLÍNICOS PRESENTES NA *PASSIFLORA  
EDULIS* F. *FLAVICARPA* DEGENER.**

Florianópolis

2020

Nádia Sandrine Ramos Santos Mota

**EFEITO ANTITUMORAL DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA E  
LONGA E ALCALOIDES  $\beta$ -CARBOLÍNICOS PRESENTES NA *PASSIFLORA*  
*EDULIS F. FLAVICARPA* DEGENER.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da  
Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de  
doutor em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dra Rozangela Curi Pedrosa

Coorientador: Prof. Dr. Maicon Roberto Kwiecinski

Florianópolis

2020

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

Ramos Santos Mota, Nádia Sandrine

Efeito antitumoral de ácidos graxos de cadeia média e longa e alcaloides  $\beta$ -carbolínicos presentes na *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener. / Nádia Sandrine Ramos Santos Mota ; orientador, Rozangela Curi Pedrosa, coorientador, Maicon Roberto Kwiecinski, 2020.

203 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Atividade citotóxica e antitumoral. 3. *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener. 4. Alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina. 5. Toxicologia molecular. I. Curi Pedrosa, Rozangela. II. Kwiecinski, Maicon Roberto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Nádia Sandrine Ramos Santos Mota

**EFEITO ANTITUMORAL DE ÁCIDOS GRAXOS DE CADEIA MÉDIA E  
LONGA E ALCALOIDES  $\beta$ -CARBOLÍNICOS PRESENTES NA *PASSIFLORA  
EDULIS F. FLAVICARPA* DEGENER.**

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

Prof. Dra Ariane Zamoner Pacheco De Souza  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Claus Tröger Pich  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Danilo Wilhelm Filho  
Universidade Federal de Santa Catarina

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

---

Prof. Dra Ariane Zamoner Pacheco De Souza  
Coordenador(a) do Programa

---

Prof. Dra Rozangela Curi Pedrosa  
Orientador(a)

Florianópolis, 2020.

## AGRADECIMENTOS

### **A todos que me acompanharam e ajudaram nesta caminhada.**

À minha família adorada que mesmo distante, fez-se presente a cada instante.  
Principalmente à minha querida mãe, pelo seu incondicional e verdadeiro amor.  
Aos meus amigos, por trazerem luz e alegria a minha vida.

À Universidade Federal de Santa Catarina.  
Ao Centro de Ciências Biológicas.  
Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica.  
Ao Departamento de Bioquímica.  
Ao Laboratório de Bioquímica Experimental – Labioex.

A CAPES pelo apoio financeiro que possibilitou a execução desse projeto.

À minha orientadora, Dra. Profa. Rozangela Curi Pedrosa, pela oportunidade de aperfeiçoamento pessoal, profissional e científico.

Aos meus colegas, Professores e funcionários do Departamento de Bioquímica.

Aos meus colegas e ex-colegas do LABIOEX, com que convivi nestes últimos anos, pela amizade, pelas trocas de experiências, pelos ensinamentos e aprendizado mútuo: Valdelúcia M. A. S. Grinevicius, Rodrigo C. Zeferino, Jean C. Benassi, Raquel G. Eckert, Daniela Coelho dos Santos, Tânila Siminski e Gabriela M. Almeida.

Ao Prof. Dr. Maicon R. Kwiecinski e à Dra. Profa. Karina B. Felipe pelo tempo disponibilizado e pelos vários ensinamentos técnicos e científicos.

À Profa. Dra. Tânia M. F. Günther pela supervisão no estágio de docência.

À Dra. Profa. Sandra R. Ferreira pela disponibilização dos extratos da *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener.

Ao Prof. Dr. Gustavo A. Micke e a pós-doutoranda Lizandra C. Bretanha pela realização da caracterização fitoquímica dos extratos da *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener.

À equipe do LAMEB-UFSC e do CEBIME-UFSC pelo suporte técnico.

Aos membros da banca pela avaliação desse trabalho.

*“Nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada”.*

*Chico Xavier*

## RESUMO

A extração supercrítica visando extrair compostos bioativos da torta de sementes de *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener (*P. edulis*) considerada como um dos resíduos da indústria alimentícia demonstrou ser uma forma eficiente de aproveitamento deste tipo de subproduto. As sementes de *P. edulis* são fontes promissoras de fitocompostos lipossolúveis, tais como os ácidos graxos. Estes apresentam diversas atividades farmacológicas, nomeadamente atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral. Além disso, estudos anteriores relatam a presença de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos nas espécies de *P. edulis*, especialmente o harmano e harmina, que também apresentam inúmeras atividades farmacológicas. Contudo, os prováveis mecanismos de ação responsáveis pelo efeito citotóxico e antitumoral da *P. edulis* ainda não estão totalmente elucidados. Neste contexto, a primeira parte deste trabalho teve como objetivo avaliar comparativamente o potencial efeito citotóxico e antitumoral dos extratos hidroalcoólico (HCE) e supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% etanol, SFEtOH) da torta de sementes da *P. edulis*, utilizando para isto modelos *in vitro* (células MCF-7) e *in vivo* (camundongos Balb/c inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich - TAE). Na segunda parte buscou-se analisar a citotoxicidade e o efeito antitumoral dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina, buscando os mecanismos moleculares responsáveis por tais efeitos. Para tal foram utilizados os ensaios *in vitro* (células MCF-7, HeLa, HepG2 e McCoy), moleculares (CT-DNA), *in silico* (ancoragem e dinâmica molecular) e *in vivo* (camundongos Balb/c inoculados com células de TAE). Na terceira parte avaliou-se a atividade antiproliferativa e antiangiogênica de ambos os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos, buscando também os mecanismos moleculares responsáveis por estes efeitos. Neste caso, utilizaram-se as células MCF-7 para a realização dos ensaios *in vitro* e os camundongos Balb/c inoculados com células de TAE foram utilizados nos ensaios *in vivo*. O extrato SFEtOH demonstrou ser mais ativo em termos de citotoxicidade comparativamente ao extrato HCE. De fato, o extrato SFEtOH apresentou maior citotoxicidade dose-tempo-dependente sobre as células MCF-7 (IC<sub>50</sub> em 72h = 264,6  $\mu$ g/mL). Além disso, o extrato SFEtOH inibiu o crescimento tumoral em 48,5% e aumentou a sobrevida dos animais tratados (200 mg/kg/dia) em aproximadamente 42%. Nas células do TAE, o extrato SFEtOH aumentou a atividade do ciclo redox da glutationa e diminuiu a atividade da TrxR, induzindo assim o estresse oxidativo nestas células com conseqüente oxidação de lipídios, proteínas e DNA, o que resultou na parada do ciclo celular na fase G2/M e indução de apoptose via mitocondrial. Estes resultados podem ser em parte atribuídos à presença de ácidos graxos de cadeia média e longa, tais como os ácidos láurico, palmítico, oleico, linoleico e mirístico. Adicionalmente, os resultados da segunda parte deste trabalho revelaram que ambos os alcaloides (harmano e harmina) foram citotóxicos para as células tumorais MCF-7, HeLa e HepG2 de maneira dose-tempo-dependente. No entanto, a harmina demonstrou ser mais seletiva que o harmano comparativamente às células normais (McCoy). As técnicas espectroscópicas (UV-Visível, fluorescência e dicroísmo circular) e as simulações de ancoragem (AutoDock Vina) e dinâmica molecular (GROMACS), seguida do ensaio do cometa em células MCF-7, demonstraram que a harmina foi capaz de intercalar-se entre os pares de bases do DNA nas regiões ricas em adenina e timina; e em conseqüência, causou danos irreparáveis que determinaram a fragmentação do DNA. Concomitantemente, a harmina modulou negativamente o mecanismo de reparo de DNA dependente de PARP1, cuja expressão foi diminuída em células MCF-7. Isto resultou na parada do ciclo celular na fase G2/M e apoptose via mitocondrial. Nos ensaios *in vivo*, a harmina diminuiu o crescimento tumoral em aproximadamente 31% e aumentou a sobrevida dos animais tratados (20mg/kg/dia) em 68,25% quando comparado com o controle negativo. Ademais, os dados da terceira parte deste trabalho demonstraram que, tanto o harmano quanto a harmina apresentaram atividade

antiproliferativa sobre as células MCF-7, porém a harmina exibiu um efeito antiproliferativo mais eficaz que o harmano. Além do mais, a harmina diminuiu a expressão e atividade de Akt, por conseguinte diminuiu o conteúdo de HIF-1 $\alpha$  independentemente do envolvimento de mTOR, além de diminuir a geração de EROs, levando assim a inibição da via de sinalização PI3K/Akt. Por fim, a harmina também apresentou atividade antiangiogênica *in vivo*. A dose de 20 mg/kg/dia de harmina inibiu a angiogênese em 42,72%, quando comparado com o controle negativo. Tendo em consideração os resultados obtidos conclui-se que, compostos isolados a partir da torta de sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener e o alcaloide  $\beta$ -carbólico harmina são possíveis promissores agentes antitumorais que podem ser utilizados futuramente como coadjuvantes aos quimioterápicos convencionais já utilizados na clínica.

**Palavras-chave:** *P. edulis*; harmina; ácidos graxos de cadeia média e longa; apoptose; atividade antitumoral.



## ABSTRACT

The application of supercritical extraction aiming to extract bioactive compounds from the seed cake of *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener (*P. edulis*) considered as one of the residues of the food industry has proven to be an efficient way of using this type of by-product. *P. edulis* seeds are promising sources of fat-soluble phyto-compounds, such as fatty acids. These have several pharmacological activities, namely anti-inflammatory, antimicrobial and antitumor activity. In addition, previous studies have reported the presence of  $\beta$ -carbolinic alkaloids in the species of *P. edulis*, especially harman and harmine, which also have several pharmacological activities. However, the probable mechanisms of action responsible for the *P. edulis* cytotoxic and antitumor effect are not yet fully understood. In this context, the first part of this work aimed to comparatively evaluate the potential cytotoxic and antitumor effect of hydroalcoholic (HCE) and supercritical (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% ethanol, SFEtOH) extracts from seed cake of *P. edulis*, using *in vitro* (MCF-7 cells) and *in vivo* (Balb/c mice inoculated with Ehrlich ascitic tumor cells - TAE) models. In the second part, we sought to analyze the cytotoxicity and the antitumor effect of the  $\beta$ -carbolinic alkaloids harman and harmine, researching for the mechanisms of action responsible for such effects. In which were used *in vitro* (MCF-7, HeLa, HepG2 and McCoy cells), molecular (CT-DNA), *in silico* (docking and molecular dynamics) and *in vivo* (Balb/c mice inoculated with TAE cells) assays. The SFEtOH extract was shown to be more active in terms of cytotoxicity compared to the HCE extract. In fact, the SFEtOH extract showed greater dose-time-dependent cytotoxicity on MCF-7 cells (IC<sub>50</sub> in 72h = 264.6  $\mu$ g/mL). In addition, the SFEtOH extract inhibited tumor growth by 48.5% and increased the survival of the treated animals (200 mg/kg/day) by approximately 42%. In TAE cells, the SFEtOH extract increased the activity of the redox cycle of glutathione and decreased the activity of TrxR, thus inducing oxidative stress in these cells with consequent oxidation of lipids, proteins and DNA, which resulted in the cell cycle arrest in the phase G2/M and apoptosis via mitochondrial. These results can be partly attributed to the presence of medium and long chain fatty acids, such as lauric, palmitic, oleic, linoleic and myristic acids. Additionally, the results of the second part of this work revealed that both alkaloids (harman and harmine) were cytotoxic to tumor cells MCF-7, HeLa and HepG2 in a dose-time-dependent manner. However, harmine proved to be more selective than harman compared to normal cells (McCoy). The spectroscopic techniques (UV-Visible, fluorescence and circular dichroism) and the simulations of docking (AutoDock Vina) and molecular dynamics (GROMACS), followed by the comet assay in MCF-7 cells, demonstrated that the harmine was capable of intercalated between base pairs of DNA in regions rich in adenine and thymine; and as a result, it caused irreparable damage that determined the DNA fragmentation. Concomitantly, the harmine negatively modulated the PARP1-dependent DNA repair mechanism, whose expression was decreased in MCF-7 cells. This resulted in the cell cycle arrest in the G2/M phase and apoptosis via mitochondrial. In *in vivo* assays, the harmine decreased tumor growth by approximately 31% and increased the survival of the treated animals (20 mg/kg/day) by 68.25% when compared to the negative control. In addition, the data from the third part of this work showed that both harman and harmine showed antiproliferative activity on MCF-7 cells, but harmine exhibited a higher antiproliferative effect. Furthermore, harmine decreased Akt expression and activity, therefore it decreased the HIF-1 $\alpha$  content regardless of mTOR and decreased also the generation of EROs, thus leading to inhibition of the PI3K / Akt signaling pathway. Lastly, harmine also showed antiangiogenic activity *in vivo*. Harmine (20 mg/kg/day) inhibited angiogenesis by 42.72%, when compared to the negative control. Taking into account the results obtained, it is concluded that compounds isolated from the seed cake of *P. edulis f. flavicarpa* Degener and

harmine are possible promising antitumor agents that can be used in the future as adjuvants to conventional chemotherapy drugs already used in the clinic.

**Keywords:** *P. edulis*; harmine; medium and long chain fatty acids; apoptosis; antitumor activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01.</b> Mecanismos de inativação da proteína pRb durante a progressão do ciclo celular .....	30
<b>Figura 02.</b> Inibição da atividade transcricional da proteína p53 .....	32
<b>Figura 03.</b> Esquema representativo da função canônica da telomerase .....	34
<b>Figura 04.</b> O papel de PARP-1 na resposta ao dano no DNA.....	39
<b>Figura 05.</b> As fases do ciclo celular e os respectivos complexos CDK/ciclina .....	40
<b>Figura 06.</b> A via extrínseca e intrínseca de apoptose .....	44
<b>Figura 07.</b> Representação esquemática da via PI3K/Akt/mTOR.....	47
<b>Figura 08.</b> Esquema representativo da ativação da mTOR pela proteína RHEB-GTPase.....	51
<b>Figura 09.</b> Regulação do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$ em condições de normóxia e hipóxia.....	53
<b>Figura 10.</b> Esquema representativo da reprogramação metabólica da glicose .....	55
<b>Figura 11.</b> O papel do anidrase carbônica IX (CAIX) na regulação do pH em células tumorais durante hipóxia .....	57
<b>Figura 12.</b> Esquema representativo da integração dos sistemas antioxidante enzimático .....	62
<b>Figura 13.</b> Modelo dos ciclos redox da glutatona e tiorredoxina, dependentes de NADPH .....	63
<b>Figura 14.</b> Lipoperoxidação de membranas celulares que apresentam maiores quantidade de ácidos graxos poli-insaturados; Reação em cadeia ( <i>beer</i> ) .....	65
<b>Figura 15.</b> Diagrama esquemático do equipamento e processo de extração supercrítica .....	66
<b>Figura 16.</b> Principais etapas da biossíntese dos alcaloides $\beta$ -carbolínicos - Reação de Mannich .....	70

<b>Figura 17.</b> Esquema representativo da biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -6s).....	75
<b>Figura 18.</b> Fluxograma de ensaio de docagem molecular .....	80
<b>Figura 19.</b> Esquema representativo da abordagem “ <i>unbiased</i> ” dinâmica molecular.....	83
<b>Figura 20.</b> Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico, antiproliferativo, pró-apoptótico e antitumoral dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener.....	96
<b>Figura 21.</b> Cromatogramas representativos de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) dos extratos (A) HCE e (B) SFEtOH.....	99
<b>Figura 22.</b> Atividade antitumoral dos extratos HCE e SFEtOH (100 e 200 mg/kg/dia, 9 dias) em camundungos Balb/c inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	103
<b>Figura 23.</b> Biomarcadores de estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes medidas em células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) tratadas com os extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia, 9 dias). .....	106
<b>Figura 24.</b> Avaliação do efeito dos extratos HCE e SFEtOH sobre o DNA das células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e avaliação da fosforilação da histona $\gamma$ H2AX.....	108
<b>Figura 25.</b> Avaliação do efeito dos extratos HCE e SFEtOH sobre o ciclo celular das células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e avaliação da expressão da proteína p53.....	110
<b>Figura 26.</b> Tipo de morte induzido pelos extratos HCE e SFEtOH nas células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	112
<b>Figura 27.</b> Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico, antiproliferativo, pró-apoptótico e antitumoral dos alcaloides $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina.....	123
<b>Figura 28.</b> Morfologia das células MCF-7 e o tipo de morte celular induzida pela harmina (27,88 $\mu$ M e 46,47 $\mu$ M, 72h), avaliado pelo método de coloração com iodeto de propídio e acridina laranja e visualizado por microscopia de fluorescência (Aumento de 400x).....	127
<b>Figura 29.</b> Efeitos da harmina (27,88 $\mu$ M e 46,47 $\mu$ M, 48h) no potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) das células MCF-7.....	128
<b>Figura 30.</b> Efeito modulatório da harmina (27,88 $\mu$ M, 48h) sobre as proteínas pró e antiapoptóticas nas células MCF-7.....	129

<b>Figura 31.</b> Avaliação do efeito de harmina sobre o ciclo celular das células MCF-7 e modulação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular (pRb, CDK2, ciclina A e ciclina B1).....	132
<b>Figura 32.</b> Efeito de harmine sobre o DNA de timo de vitelo (CT-DNA, 150 $\mu$ M) avaliado por espectroscopia UV-Visível.....	134
<b>Figura 33.</b> Efeito de harmine sobre o DNA de timo de vitelo (CT-DNA, 150 $\mu$ M) avaliado por espectroscopia de fluorescência.....	135
<b>Figura 34.</b> Efeito de harmine sobre o DNA de timo de vitelo (CT-DNA, 150 $\mu$ M) avaliado por espectroscopia de dicroísmo circular.....	136
<b>Figura 35.</b> Simulações de dinâmica molecular entre harmina e os nucleotídeos de DNA (PDB 1G3X).....	137
<b>Figura 36.</b> Predições de interações entre harmina e os nucleotídeos de DNA (PDB 1G3X), usando o AutoDock Vina e o GROMACS.....	138
<b>Figura 37.</b> Número de ligações de hidrogênio formadas entre harmina e os nucleotídeos de DNA (PDB 1G3X).....	139
<b>Figura 38.</b> Progressão distâncias de ligação de hidrogênio formada entre harmina e o nucleotídeo timina (dt620) do DNA (PDB 1G3X).....	139
<b>Figura 39.</b> Progressão do ângulo da ligação de hidrogênio formada entre harmina e o nucleotídeo timina (dt620) do DNA (PDB 1G3X) (ângulo médio = 49,4175°). ....	140
<b>Figura 40.</b> Energia de ligação ( $\Delta E$ ) do complexo DNA-harmina, calculada pelo método MM-PBSA.....	141
<b>Figura 41.</b> Cálculos de potenciais não ligados (interações de Van der Waals e interações eletrostáticas) que contribuem para a Energia Mecânica Molecular total calculada no vácuo.....	142
<b>Figura 42.</b> Energia livre de solvatação ( $\Delta G_{solv}$ ) do complexo DNA-harmina relacionada ao SASA, calculada com a MM-PBSA.....	143
<b>Figura 43.</b> Avaliação do efeito da harmina sobre o DNA das células MCF-7 e análise dos mecanismos de ação responsáveis por este efeito.....	145
<b>Figura 44.</b> Atividade antitumoral da harmina (10 e 20 mg/kg/dia, 9 dias) em camundongos Balb/c inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	147
<b>Figura 45.</b> Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico antiproliferativo e antiangiogênico do alcaloide $\beta$ -carbólico harmina.....	153

<b>Figura 46.</b> Atividade antiproliferativa de harmano e harmina sobre as células MCF-7 .....	155
<b>Figura 47.</b> Efeito de harmina sobre a via PI3K/Akt/mTOR em células MCF-7 .....	157
<b>Figura 48.</b> Indução da geração de EROs em células MCF-7 após 48h de tratamento com a harmina (27,88 $\mu$ M a 46,47 $\mu$ M).....	158
<b>Figura 49.</b> Captação de glicose em células MCF-7 após 48h de tratamento com a harmina (27,88 $\mu$ M a 46,47 $\mu$ M) .....	160
<b>Figura 50.</b> Atividade antiangiogênica de harmina (10 e 20 mg/kg/dia, 9 dias), em camundongos Balb/c inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) .....	162

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 01.</b> Reatividade e natureza química de espécies reativas.....	59
<b>Quadro 02.</b> Propriedades físico-químicas dos alcaloides $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina.....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01.</b> As principais espécies reativas endógenas e as respectivas reações químicas .....	60
<b>Tabela 02.</b> Taxa de reatividade de algumas espécies reativas com a metionina. Reação de segunda ordem realizada em água e pH neutro .....	61
<b>Tabela 3.</b> Citotoxicidade dos extratos da torta de sementes de <i>P. edulis f. flavicarpa</i> Degener (10 a 500 µg/mL) contra as células MCF-7, após 24h, 48h e 72h de incubação, avaliada pelo ensaio de MTT e realizada em triplicata.....	97
<b>Tabela 4.</b> Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS) representado como tempos de retenção (TR) por minutos e área de pico (%) de compostos bioativos presentes em HCE e SFEtOH.....	100
<b>Tabela 5.</b> Citotoxicidade e seletividade dos alcaloides β-carbolínicos harmano e harmina contra as células MCF-7, HeLa, HepG2 e McCoy após 48h e 72h de tratamento (0,1 a 1000 µM), avaliada pelo ensaio de MTT e realizada em triplicata.....	124



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4E-BP1	Proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução 4E
Apaf-1	Fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1
ATM	Ataxia telangiectasia mutada
ATP	Trifosfato de adenosina
ATR	Ataxia telangiectasia e relacionada à proteína Rad3
BE	Brometo de etídio
BER	Reparo de excisão de base
CAT	Catalase
CDKs	Cinases dependentes de ciclinas
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
DMEM	Meio Eagle Dulbecco modificado ( <i>Dulbecco's modified Eagle medium</i> )
DMSO	Dimetilsulfóxido, surfactante
DTNB	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
eIF4E	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESC	Extração com fluido supercrítico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FGF	Fatores de crescimento de fibroblastos
FKHR/AFX/FOX	Fatores de transcrição forkhead
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
GLUT1	Transportadores de glicose
GPx	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSK-3	Glicogênio sintase cinase-3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HeLa	Adenocarcinoma de colo do útero

HepG2	Carcinoma hepatocelular hepático
HR	Recombinação homóloga
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IKKs	Cinases IκB
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de propídio
K <sub>d</sub>	Constante de dissociação
McCoy	Fibroblastos normais
MCF-7	Carcinoma de mama humano
MCT1	Transportador monocarboxilato-1
MDR1	Gene multirresistência 1
MMPs	Metaloproteinases da matriz
mTOR	Serina/treonina-proteína cinase
MTT	Sal de 3-(4,5-dimetil-2-tiazol) 2,5-difenil-brometo de tetrazólio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADP	Nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo de fosfato reduzido
NER	Reparo de excisão de nucleotídeos
NFκB	Fator nuclear κB
NHEJ	União de extremidade não-homóloga
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	Poli (Adenosina difosfato-Ribose) polimerases
PBS	Salina tamponada com fosfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PDH	Piruvato desidrogenase
PDK1	Piruvato desidrogenase cinase 1
PD-L1	<i>Programmed death-ligand 1</i>
PGE1	Prostaglandina E1
PGE2	Prostaglandinas E2
PHDs	Prolil-4-hidroxilases
PI3K	Fosfoinosítídeo 3-cinase
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
Prxd	Peroxirredoxina (tiorredoxina peroxidase)
PTEN	Fosfatase PTEN (homólogo de fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10)
pVHL	Proteína supressora de tumores von Hippel-Lindau
RHEB-GTP	Proteína RHEB com atividade GTPase
RPM	Rotações por minuto
S6K1	Proteína ribossômica S6
SDS-PAGE	Poliacrilamida dodecil sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
TAE	Carcinoma ou tumor ascítico de Ehrlich
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase ( <i>tissue inhibitor metalloprotease</i> )
TIP3P	Potencial Intermolecular Transferível com 3 pontos ( <i>Transferable Intermolecular Potentials with 3 points</i> )
TLR	<i>Toll-like</i> receptor
TMRE	Éster etílico de tetrametil-rodamina
TNF	Fator de necrose tumoral
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral
Treg	Células T reguladoras
Trx	Tiorredoxina
TrxR	Tiorredoxina redutase
TSC1	Hamartina
TSC2	Tuberina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\Delta G^\circ$	Energia livre de Gibbs
$\Delta G_{\text{solv}}$	Energia livre de solvatação
$\Delta \Psi_m$	Potencial de membrana mitocondrial

## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	25
1.1CÂNCER.....	25
1.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO CÂNCER .....	26
1.2.1 Bases moleculares do câncer .....	26
1.2.1.1 Correlação entre câncer e proliferação celular .....	27
1.2.1.1.1 Proliferação sustentada .....	27
1.2.1.1.2 Evasão de supressores de crescimento tumoral .....	28
1.2.1.1.3 Potencial replicativo .....	33
1.2.1.2 Correlação entre câncer e Instabilidade genômica – Mecanismos de Reparo do DNA .....	34
1.2.1.2.1 Poli (ADP-Ribose) polimerases .....	37
1.2.1.3 Correlação entre câncer e Ciclo celular .....	40
1.2.1.4 Correlação entre câncer e Morte celular .....	42
1.2.1.5 Correlação entre câncer e Angiogenese .....	45
1.2.1.6 Correlação entre câncer e via PI3K/Akt/mTOR.....	47
1.2.1.7 Correlação entre câncer e reprogramação metabólica .....	54
1.2.1.8 Correlação entre câncer e Extresse oxidativo - sistema de defesas antioxidantes .....	58
1.3 EXTRAÇÃO COM O FLUIDO SUPERCRÍTICO E SEMENTES DE PASSIFLORA EDULIS F. FLAVICARPA DEGENER .....	66
1.4 ALCALOIDES $\beta$ -CARBOLÍNICOS .....	72
1.5 DOCKING E DINAMICA MOLECULAR .....	78
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>85</b>
2.1 Objetivo geral .....	85
2.2 Objetivos específicos .....	85
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>86</b>
3.1 ETAPA 1 - ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS DA TORTA DE SEMENTES DE <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> Degener E SUA CORRELAÇÃO COM A INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO.....	87
<b>3.1.1 Materiais e métodos</b> .....	<b>88</b>

3.1.1.1	Reagentes e anticorpos.....	88
3.1.1.2	Preparação dos extratos.....	88
3.1.1.3	Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT .....	89
3.1.1.4	Caracterização fitoquímica dos extratos - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas – GC-MS.....	90
3.1.1.5	Estudo da atividade antitumoral in vivo, usando o modelo do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	91
3.1.1.6	Biomarcadores de defesas antioxidantes e danos oxidativos nas células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	92
3.1.1.7	Ensaio do Cometa - Fragmentação do DNA das células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	93
3.1.1.8	Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.....	94
3.1.1.9	Avaliação do tipo de morte celular induzida em células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	94
3.1.1.10	Ensaio de imunodeteção.....	95
3.1.1.11	Análise estatística.....	96
<b>3.1.2</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>97</b>
3.1.2.1	Efeito citotóxico dos extratos da <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener.....	97
3.1.2.2	Correlação entre a constituição fitoquímica dos extratos da <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener e a citotoxicidade.....	98
3.1.2.3	Atividade antitumoral in vivo dos extratos da <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener .....	102
3.1.2.4	Biomarcadores de estresse oxidativo e danos oxidativos em células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	104
3.1.2.5	Efeito dos extratos da <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener sobre o DNA das células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	107
3.1.2.6	Efeito dos extratos da <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener sobre o ciclo celular .....	109
3.1.2.7	Tipo de morte celular induzido pelos extratos da <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Degener nas células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).....	110
<b>3.1.3</b>	<b>Conclusões parciais .....</b>	<b>113</b>
3.2	ETAPA 2 - ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE ALCALOIDES $\beta$ -CARBOLÍNICOS E SUA CORRELAÇÃO COM A INDUÇÃO DE DANOS AO DNA, BLOQUEIO DO CICLO CELULAR E APOPTOSE.....	114
<b>3.2.1</b>	<b>Materiais e métodos.....</b>	<b>114</b>

3.2.1.1	Reagentes e anticorpos .....	114
3.2.1.2	Cultura de células.....	115
3.2.1.3	Ensaio de viabilidade celular.....	115
3.2.1.4	Avaliação do tipo de morte celular induzida nas células MCF-7.....	116
3.2.1.5	Ensaio de potencial de membrana mitocondrial.....	116
3.2.1.6	Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.....	117
3.2.1.7	Avaliação da interação do alcaloide $\beta$ -carbólico harmina com o DNA de timo de vitelo (CT-DNA).....	117
3.2.1.8	Estudo in silico: Simulação de ancoragem molecular e dinâmica molecular.....	118
3.2.1.9	Cálculos de energia MM-PBSA.....	119
3.2.1.10	Ensaio do cometa - Fragmentação do DNA das células MCF-7.....	120
3.2.1.11	Ensaio de Imunodeteção.....	120
3.2.1.12	Atividade antitumoral in vivo do alcaloide $\beta$ -carbólico harmina.....	121
3.2.1.13	Análise estatística.....	123
<b>3.2.2</b>	<b>Resultados e discussão.....</b>	<b>124</b>
3.2.2.1	Avaliação do efeito citotóxico e a seletividade dos alcaloides $\beta$ -carbólicos harmano e harmina.....	124
3.2.2.2	Avaliação da atividade pró-apoptótica do alcaloide $\beta$ -carbólico harmina nas células MCF-7 e análise dos mecanismos de ação responsáveis por esta atividade.....	126
3.2.2.3	Efeito do alcaloide $\beta$ -carbólico harmina sobre o ciclo celular das células MCF-7.....	130
3.2.2.4	Interação do alcaloide $\beta$ -carbólico harmina com o DNA de timo de vitelo (CT-DNA).....	133
3.2.2.5	Resultados do estudo in silico.....	136
3.2.2.6	Efeito do alcaloide $\beta$ -carbólico harmina sobre o DNA das células MCF-7 e análise dos mecanismos de reparo do DNA.....	143
3.2.2.7	Atividade antitumoral in vivo do alcaloide $\beta$ -carbólico harmina.....	146
<b>3.2.3</b>	<b>Conclusões parciais .....</b>	<b>148</b>
3.3	ETAPA 3 - ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTIPROLIFERATIVA E ANTIANGIOGÊNICA DE ALCALOIDES $\beta$ -CARBÓLÍNICOS E SUA CORRELAÇÃO COM A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/Akt .....	149
<b>3.3.1</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>149</b>
3.3.1.1	Reagentes e anticorpos .....	149

3.3.1.2	Cultura de células .....	150
3.3.1.3	Ensaio de proliferação celular .....	150
3.3.1.4	Ensaio de Imunodeteção .....	151
3.3.1.5	Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células MCF7.....	151
3.3.1.6	Ensaio de captação de glicose em células MCF7 .....	152
3.3.1.7	Avaliação da atividade antiangiogênica in vivo .....	152
3.3.1.8	Análise estatística .....	154
<b>3.3.2</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>154</b>
3.3.2.1	Avaliação do efeito antiproliferativo dos alcaloides $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina em células MCF-7 .....	154
3.3.2.2	Avaliação do efeito modulatório do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina sobre a via de sinalização PI3K/Akt em células MCF-7 .....	155
3.3.2.3	Indução intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células MCF7 tratadas com o alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina .....	158
3.3.2.4	Avaliação do efeito do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina sobre a captação de glicose em células MCF-7 .....	159
3.3.2.5	Atividade antiangiogênica in vivo do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina .....	161
<b>3.3.3</b>	<b>Conclusões parciais .....</b>	<b>162</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO DA TESE .....</b>	<b>163</b>
<b>5.</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>165</b>
5.1	PERSPECTIVAS.....	165
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>168</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>202</b>
7.1	ANEXO A - Artigo publicado.....	202
7.2	ANEXO B - Artigo aceito para publicação.....	203



# 1 . INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER

O câncer é considerado como um conjunto de mais de cem doenças que apresentam em comum o crescimento desordenado de células, que têm a capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes, podendo alcançar vasos sanguíneos e/ou linfáticos pelos quais podem disseminar-se e causar metástases em tecidos distantes. O surgimento de tumores metastáticos é uma das principais causas de morte em pacientes com câncer (COZZI, 2003; INCA, 2019).

Bioquimicamente, o câncer é considerado uma doença celular caracterizada pela desregulação e/ou desvio dos mecanismos de controle do ciclo celular, diferenciação, proliferação e morte, culminando na exacerbação da divisão celular, surgimento de células pouco diferenciadas e desenvolvimento de tumores, podendo estes serem benignos ou malignos (neoplasias) (De NEIRA, 2003).

Dados recentes do Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimaram que para o triênio de 2020-2022 surgirão aproximadamente 625 mil novos casos de câncer por ano no Brasil. Isto suporta a proposição do câncer como um grave problema de saúde pública (INCA, 2020). Ainda, o Brasil acompanha o padrão mundial dos tipos de neoplasias mais incidentes, em que, com exceção de câncer de pele do tipo não melanoma, os tumores de próstata (65,84%), cólon e de reto (20,52%) seguidos de traqueia, brônquio e pulmão (17,76%) são as neoplasias mais frequentes nos homens, enquanto que, os tumores de mama feminina (66,28%), cólon e reto (20,47%) e colo do útero (16,59%) são as neoplasias mais frequentes nas mulheres. Deve ser destacado que cerca de 60% dos casos de câncer diagnosticados no Brasil estão nos estágios 3 e 4 dentro de uma escala em que a fase terminal desta doença é o estágio 5 (INCA, 2020).

Como estratégia para o tratamento do câncer em geral empregam-se terapias combinadas, na qual são associados mais de um tipo de tratamento (excisão cirúrgica, radioterapia, terapia alvo, imunoterapia e quimioterapia). Entretanto, apesar do grande progresso científico e tecnológico decorrente do avanço das ciências biológicas e da saúde, as estratégias terapêuticas atuais ainda apresentam pontos críticos principalmente em termos de segurança, eficácia, eficiência terapêutica. Visto que, as terapias atuais estão frequentemente associadas a não erradicação total da patologia e/ou a elevada toxicidade e inespecificidade dos fármacos. Adicionalmente, relatos destacam uma acentuada ocorrência de

multirresistência celular aos quimioterápicos (JENDIROBA et al., 2002; ALMEIDA et al., 2005).

Desta forma, é imperativa a busca constante de novas alternativas terapêuticas, com maior seletividade, eficácia e eficiência, que possam modificar este panorama adverso. Com isso, estratégias terapêuticas que utilizam as plantas medicinais, como fontes importantes de compostos biologicamente ativos, têm despertado grande interesse no tratamento do câncer.

## 1.2 ASPECTOS BIOQUÍMICOS RELACIONADOS AO CÂNCER

### 1.2.1 Bases moleculares do câncer

Segundo Hanahan e Weinberg (2000), as células tumorais apresentam um conjunto de alterações em sua fisiologia e bioquímica que propiciam as condições essenciais para o crescimento maligno, especificamente a aquisição de autonomia de sinais para a proliferação celular, insensibilidade aos sinais inibitórios de proliferação, resistência à morte celular programada (particularmente a apoptose), capacidade ilimitada de replicação, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase.

Subjacentes a estas características, estudos posteriores revelaram novas características do câncer ou “*hallmarks*” nomeadamente a instabilidade do genoma, a reprogramação do metabolismo energético, a inflamação como promotor tumoral e a evasão da vigilância imunológica. Estes, por sua vez, demonstraram também serem pontos críticos e vantajosos no desenvolvimento e progressão de tumores (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

Além das células tumorais, o ambiente tumoral exibe uma heterogeneidade de células não tumorais (células do sistema imune, endoteliais e fibroblastos) que contribuem também para a aquisição de características tumorais marcantes, criando assim um ambiente propício para a progressão do tumor, o chamado “microambiente tumoral” (ECKHARDT et al., 2012).

Assim sendo, é importante destacar-se que, um conhecimento detalhado de todas as características do câncer traz inúmeras vantagens em relação ao desenvolvimento de fármacos antitumorais mais eficientes, eficazes e seletivos.

### 1.2.1.1 Correlação entre câncer e proliferação celular

#### 1.2.1.1.1 Proliferação sustentada

Em geral, as células normais requerem sinais mitogênicos para que possam sair do estado quiescente e iniciar a proliferação e divisão celular, garantindo assim a homeostase celular. Tais sinais provêm da ligação de classes distintas de moléculas de sinalização com os seus respectivos receptores transmembranares com atividade tirosina cinase expressos na superfície das células, como por exemplo, os fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e moléculas de adesão/interação célula-célula (HANAHAN, WEINBERG, 2000). Contudo, as células tumorais apresentam como característica principal a sua capacidade de sustentar a proliferação crônica, pois estas adquirem a habilidade de gerar muitos dos seus próprios sinais de proliferação, liberando-se assim da dependência de sinais derivados do meio externo (HANAHAN, WEINBERG, 2000-2011).

As células tumorais podem adquirir a capacidade de sintetizar fatores de crescimento aos quais são responsivos por meio da expressão de receptores cognatos, resultando assim em uma estimulação proliferativa autócrina (FEDI, TRONICK, AARONSON, 1997; HANAHAN, WEINBERG, 2011). Alternativamente, muitos dos sinais para proliferação são originados a partir das células do estroma em resposta aos sinais estimulatórios advindos das células tumorais, ou seja, regulação parácrina. Assim, as células do estroma tumoral produzem e secretam vários fatores de crescimento que sinalizam para a proliferação e sobrevivência celular (BHOWMICK, NEILSON, MOSES, 2004; CHENG et al., 2008).

Os receptores com atividade tirosina cinase também podem ser alvos de desregulação durante a tumorigênese, pois estes podem estar superexpressos na superfície celular, o que torna essas células hiperresponsivas a quantidades limitadas de fator de crescimento (FEDI, TRONICK, AARONSON, 1997; HANAHAN, WEINBERG, 2011). Ademais, alterações estruturais nos receptores de fatores de crescimento podem induzir a sinalização independente de ligante (HANAHAN, WEINBERG, 2011). Como é o caso de mutações na subunidade catalítica das isoformas de fosfoinositídeo 3-cinase (PI3-cinase), o que culmina na hiperativação da via PI3K/Akt e conseqüentemente no aumento da proliferação celular e sobrevivência das células tumorais (YUAN, CANTLEY, 2008; JIANG, LIU, 2009).

Evidências têm demonstrado que os mecanismos de *feedback* negativo também regulam a proliferação celular, garantindo de certa forma a homeostase celular (AMIT et al.,

2007; WERTZ, DIXIT, 2010). Um exemplo de *feedback* negativo bastante relevante envolve a fosfatase PTEN, que desfosforila o fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) em fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2), inibindo assim a via PI3K/Akt. Assim sendo, mutações com conseqüente perda de função da PTEN amplifica a sinalização da via PI3K/Akt, o que proporciona um descontrole no crescimento e proliferação celular, bem como induz um “sinal de sobrevivência” que protege as células tumorais de estímulos apoptóticos (YUAN, CANTLEY, 2008; JIANG, LIU, 2009).

Sendo assim, a desregulação dos mecanismos de *feedback* negativo também contribui para com que as células tumorais alcancem a independência proliferativa. Além disso, a perda dos mecanismos de *feedback* negativo pode promover o desenvolvimento de resistência adaptativa a agentes antitumorais que visam à sinalização mitogênica (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

#### *1.2.1.1.2 Evasão de supressores de crescimento tumoral*

Os sinais de inibição da proliferação celular podem ser gerados a partir de dois mecanismos distintos. As células em proliferação podem ser obrigadas a entrar no estado de quiescência, do qual, após sinais mitogênicos elas podem iniciar novamente a progressão do ciclo celular; ou então, as células podem ser induzidas a entrar no estado pós-mitótico, geralmente associado à aquisição de características específicas de diferenciação celular (HANAHAN, WEINBERG, 2000).

A nível molecular, as duas proteínas supressoras tumorais mais relevantes com atividade antiproliferativa são: i) a proteína associada ao retinoblastoma ou proteína retinoblastoma-1; e ii) a proteína p53 (*cellular tumor antigen p53*) (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

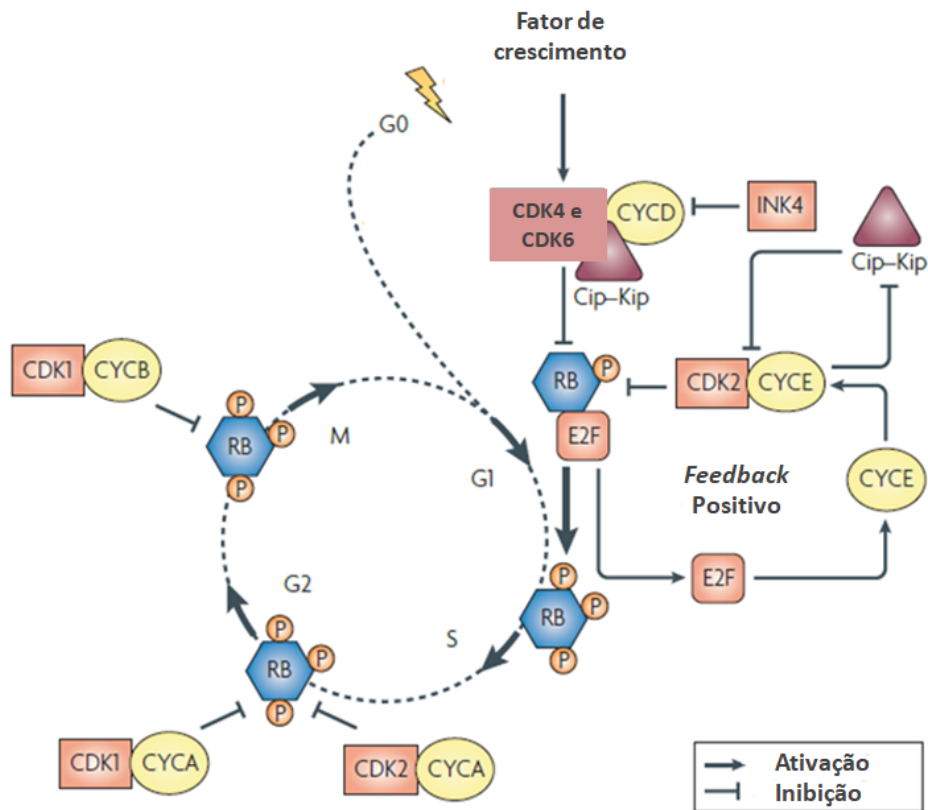
O retinoblastoma, um tumor maligno que se desenvolve na retina, mudou drasticamente a forma como o câncer é estudado e compreendido, pois a partir dele foi identificado o primeiro gene supressor tumoral, o gene RB1 que codifica as proteínas retinoblastoma-1 (LAPENNA, GIORDANO, 2009). A família RB é constituída por três isoformas que compreendem as proteínas retinoblastoma-1 (p105-Rb/p110-RB1/RB/pRb/Rb), retinoblastoma-like 1 (p107; codificado pelo gene RBL1) e retinoblastoma-like 2 (p130; codificado pelo gene RBL2) que compartilham homologia na sequência do domínio bipartido conhecido como o “*pocket domain*”. Através desse “*pocket domain*” as proteínas da família

RB interagem com os membros da família de fatores de transcrição E2F e com proteínas contendo um motivo LXCXE, tais como ciclina D e histona desacetilases (GIACINTI, GIORDANO, 2006; LAPENNA, GIORDANO, 2009). A família de fatores de transcrição E2F forma complexos heterodiméricos com o fator de transcrição DP1 e DP2, e juntos controlam a expressão de vários genes envolvidos na regulação do ciclo celular (DICK, RUBIN, 2013).

A função da proteína Rb é regulada através de alterações no seu estado de fosforilação mediados pelos complexos CDKs/ciclina, inibidores de CDKs e fosfatase (GIACINTI, GIORDANO, 2006).

A ação canônica da proteína Rb como supressora tumoral acontece quando a mesma está num estado hipofosforilado e é baseado em sua capacidade de inibir a síntese de proteínas essenciais para a progressão do ciclo celular, tais como CDK2 e ciclina A. Visto que, a proteína Rb se liga e bloqueia o domínio de transativação dos fatores de transcrição da família E2F, formando assim, um complexo inibitório destes e impedindo, desta forma, a proliferação celular (GIACINTI, GIORDANO, 2006; DICK, RUBIN, 2013). Por outro lado, a fosforilação da proteína Rb é iniciada pelo complexo CDK4/6/Ciclina D em resposta a sinais mitogênicos, o que permite a inativação da função repressora da proteína Rb com consequente dissociação do complexo RB1-E2F-DP (DICK, RUBIN, 2013). A dissociação do complexo RB1-E2F-DP permite que as células proliferem, tornando assim as mesmas insensíveis aos sinais antiproliferativos (HANAHAN, WEINBERG, 2000). A proteína Rb é mantida num estado hiperfosforilado até o fim da progressão do ciclo celular pelos demais complexos CDKs/Ciclina (Figura 01) (DICK, RUBIN, 2013).

**Figura 01.** Mecanismos de inativação da proteína Rb durante a progressão do ciclo celular.



Nota: Onde **G1**: fase pré-síntese de DNA; **S**: fase de síntese de DNA; **G2**: fase de pré-divisão do ciclo celular; **M**: fase de mitose; **G0**: fase de quiescência; **CDKs**: cinases dependentes de ciclinas; **CYCE**: ciclina E; **CYCA**: ciclina A; **CYCB**: ciclina B; **RB**: proteína retinoblastoma-1; **E2F**: fator de transcrição E2F; **INK4**: inibidores de CDKs da família INK4; **Cip-Kip**: inibidores de CDKs da família Cip/Kip. **Fonte**: LAPENNA, GIORDANO, 2009.

No entanto, embora classicamente a função supressora tumoral atribuída à proteína Rb seja em relação à inibição do ciclo celular via repressão da transcrição gênica mediada pelos fatores de transcrição E2F, evidências têm demonstrado que a proteína Rb também pode controlar a progressão do ciclo celular através de mecanismos independentes de E2F. Visto que, tanto a proteína Rb como as isoformas p107 e p130 são capazes de regular negativamente o ciclo celular através de mecanismos que envolvem a inibição direta ou indireta da atividade das cinases dependentes de ciclinas (CDKs) (MACALUSO, MONTANARI, GIORDANO, 2006; DICK, RUBIN, 2013).

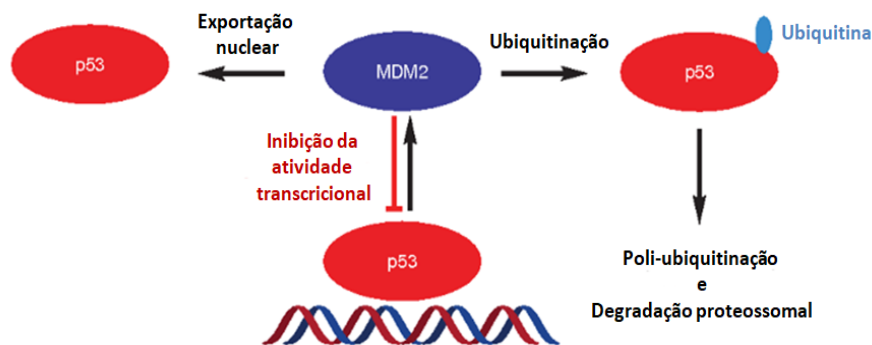
Além disso, a família das proteínas RB está envolvida em muitos outros processos celulares, como preservação da estabilidade cromossômica, indução da senescência, regulação

da diferenciação celular, angiogênese e apoptose, características estas também implicadas na sua função como supressor tumoral (INDOVINA et al., 2012 - 2015).

A inativação da função supressora tumoral da proteína Rb ocorre frequentemente nas células tumorais, seja diretamente por meio de mutações ou indiretamente através de desregulação da expressão ou atividade dos reguladores *upstream* da proteína Rb (SHERR, 1996). Como é o caso do fator de crescimento transformador beta (TGF $\beta$ ) que impede a fosforilação da proteína Rb pelos complexos ciclinas/CDKs através da indução de síntese dos inibidores de CDKs, p15<sup>INK4B</sup> e p21<sup>Cip1</sup> (HANNON, BEACH, 1994; DATTO et al., 1997).

O primeiro relato de p53 como um supressor de tumor foi em 1989 (BAKER et al., 1989; HOLLSTEIN et al., 1991). Desde então, inúmeros estudos relacionados à proteína p53 têm confirmado o seu papel essencial no controle do desenvolvimento e progressão do câncer. A proteína p53 (codificado pelo gene TP53) é frequentemente referida como o "guardião do genoma" devido ao seu papel central na resposta a danos no DNA (HAFNER et al., 2019). Sob uma condição não estressante, os níveis intracelulares da proteína p53 são normalmente baixos devido ao seu tempo de meia vida biológica curto, visto que a ubiquitina ligase E3 - MDM2 liga-se e marca a proteína p53 para a degradação proteossomal (Figura 02) (HAUPT et al., 1997; KUBBUTAT, JONES, VOUSDEN, 1997). No entanto, tanto os sinais de estresse extracelulares como intracelulares induzem a estabilização e ativação de p53 por mecanismos que envolvem a fosforilação do domínio de transativação e a acetilação e fosforilação do sítio alostérico (HICKMAN, MORONI, HELIN, 2002). A fosforilação dos resíduos de serina e treonina presentes na região amino-terminal da proteína p53, torna-a insensível ao MDM2. Com isso, a ligação de p53 a MDM2 é desfeita, levando-se assim, ao acúmulo da proteína p53 nas células (HAFNER et al., 2019).

**Figura 02.** Inibição da atividade transcricional da proteína p53.



Nota: Onde **p53**: proteína supressora tumoral p53; **MDM2**: ubiquitina ligase E3 - MDM2. **Fonte:** WANG et al., 2017.

Como exemplo de estressores celulares que podem induzir a ativação da proteína p53 pode-se citar os danos induzidos no DNA, hipóxia, ativação de oncogenes e estresse ribossômico. Uma vez ativada, a proteína p53 regula transcrionalmente inúmeros genes que estão envolvidos em vários processos biológicos, tais como, reparo de danos no DNA, parada do ciclo celular, senescência, morte celular e alterações metabólicas (HAGER, GU, 2014; HAFNER et al., 2019). Notavelmente, a ação da proteína p53 ativada é complexa e altamente dependente do microambiente, variando com o tipo de célula, assim como pela severidade e persistência das condições de estresse celular e dano genômico (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

Os alvos mais conhecidos da proteína p53 são os genes que codificam as proteínas *DNA damage-binding protein 2* (DDB2), proteína XPC (p125), p21<sup>Cip1</sup>, GADD45A, PUMA, Bax, frutose-2,6-bisfosfatase, aldeído desidrogenase-1A3 (ALDH1A3) e fosfatase-1 induzida por p53 (HAFNER et al., 2019). Ademais, o próprio MDM2 é um alvo transcricional de p53, formando assim um loop de *feedback* negativo chave no controle da expressão e níveis intracelulares dessa proteína (BARAK et al., 1993).

A proteína p53 está frequentemente mutada nas células tumorais, o que está relacionado com o ganho ou perda de função (KANDOTH et al., 2013; LAWRENCE, et al. 2014). Apesar disso, ainda é de interesse que compostos antitumorais regulem positivamente a função supressora tumoral da proteína p53, particularmente o *wild-type* p53, através do aumento da expressão gênica ou diminuição da degradação proteossomal.



### *1.2.1.1.3 Potencial replicativo*

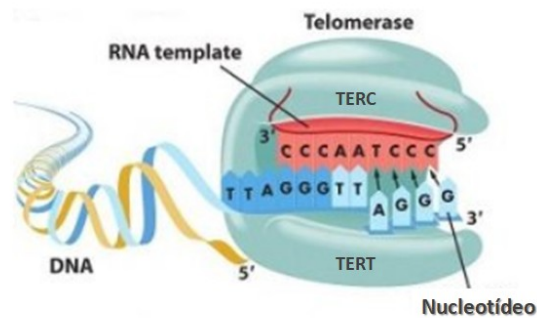
Hayflick reportou pela primeira vez em 1997 que células normais em cultura tinham um potencial replicativo finito, uma vez que estas, após um número determinado de duplicações paravam de se replicar e entravam em senescência (HAYFLICK, 1997). Com isso, foi demonstrado que a maioria das células normais é capaz de passar apenas por um limitado número de ciclos sucessivos de crescimento e divisão celular. Em contrapartida, as células tumorais apresentam um potencial replicativo ilimitado (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

No geral, as células normais, após atingirem o número finito de replicação, têm dois possíveis destinos: ou entram no estado de senescência ou então entram no estado de crise. A senescência é um processo irreversível pelo qual células metabolicamente ativas perdem a capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares. Já o estado de crise é caracterizado pela morte celular maciça (HANAHAN, WEINBERG, 2000- 2011).

Ao longo dos sucessivos ciclos de replicação e divisão celular os telômeros sofrem progressivo encurtamento do seu comprimento. Assim sendo, os telômeros perdem a capacidade de proteger as extremidades do DNA cromossômico, gerando assim uma desordem cariotípica associada à crise e levando, inevitavelmente, a célula afetada a morte (HANAHAN, WEINBERG, 2011). Todavia, a manutenção dos telômeros num comprimento acima de um limiar crítico é um dos mecanismos pelo qual as células tumorais garantem a replicação e proliferação celular ilimitada (HANAHAN, WEINBERG, 2000).

A telomerase, a DNA polimerase especializada que adiciona segmentos repetidos de hexanucleotídeos às extremidades do DNA telomérico (Figura 03), está superexpressa na grande maioria (85 a 90%) das células malignas (SHAY, BACCHETTI, 1997; HANAHAN, WEINBERG, 2000-2011). A superexpressão com consequente aumento da atividade das telomerasas em células tumorais está correlacionada com a resistência à indução de senescência e crise/apoptose nestas células. Contudo, a inibição da atividade das telomerasas resulta em um encurtamento dos telômeros e redução da proliferação celular (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

**Figura 03.** Esquema representativo da função canônica da telomerase.



Nota: Onde subunidade proteica **TERC**: componente RNA da telomerase; subunidade proteica **TERT**: transcriptase reversa da telomerase. **Fonte:** CHATTERJEE, 2017.

Novas funções das telomerasas (funções não canônicas), em particular, da subunidade proteica TERT (Transcriptase reversa da telomerase), foi correlacionada com a capacidade desta em amplificar a sinalização da via Wnt, servindo como cofator do complexo de fator de transcrição  $\beta$ -catenina-TCF/LEF (fator de célula T/*lymphoid enhancer factor*) (PARK et al., 2009). Ademais, a subunidade proteica TERT das telomerasas também aumenta a proliferação celular e a resistência a apoptose através de mecanismos que envolvem o reparo do dano ao DNA e a função da RNA polimerase dependente de RNA (MASUTOMI et al., 2005; MAIDA et al., 2009). Sendo assim, estudos estão evidenciando que a manutenção dos telômeros pelas telomerasas seria somente mais uma das diversas funções pelas quais esta enzima contribui para a tumorigênese.

### **1.2.1.2 Correlação entre câncer e instabilidade genômica – mecanismos de reparo do DNA**

A instabilidade genômica confere vantagem seletiva aos subclones de células tumorais, proporcionando assim vantagem em termos de crescimento, proliferação celular e sobrevivência (HANAHAN, WEINBERG, 2011). É importante notar que as células tumorais sofrem sucessivas mutações/alterações genéticas e epigenéticas ao longo do processo de tumorigênese/carcinogênese (PELLICANO, MUKHERJEE, HOLYOAKE, 2014).

Por conseguinte, a tumorigênese pode ser retratada como uma sucessão de expansões clonais desencadeadas pela aquisição aleatória de mutações em genes especiais. Alterações nos proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes reguladores de apoptose e genes de

reparo do DNA podem levar a multiplicação e divisão celular exacerbada, desvio de apoptose e o não reparo dos danos não letais no DNA, resultando na malignização das células normais (RIVOIRE et al., 2006). Além do mais, a inativação de genes supressores tumorais também pode ser adquirida através de mecanismos epigenéticos tais como metilação de DNA e modificações de histonas (BERDASCO, ESTELLER, 2010).

A aquisição de sucessivas mutações necessárias para a malignização das células normais tais como mutações pontuais, deleções, inserções, translocações e ampliações cromossômicas ocorrem devido a mutações genéticas herdadas ou devido à exposição a agentes mutagênicos/carcinogênicos (DEVI, 2001; MARTINEZ et al., 2003). Como exemplos de carcinógenos temos a radiação ionizante, a poluição, o tabagismo, o alcoolismo, a excessiva exposição ao sol, o tipo de alimentação, a exposição a agentes infecciosos, o uso de medicamentos, dentre outros (AUDIC, HARTLEY, 2004; SOTO, SONNENSCHIN, 2004). Além do mais, o aumento da taxa de mutações pode ser resultado da desregulação dos mecanismos responsáveis pela manutenção da integridade genômica (SIGAL, ROTTER, 2000; JACKSON, BARTEK, 2009), como é o caso de mutações no gene TP53 que codifica a proteína p53 (LANE, 1992).

Fisiologicamente, estima-se que uma única célula normal pode adquirir diariamente cerca de  $10^5$  lesões no seu DNA. No entanto, quando o dano é excessivo estas células são submetidas à morte celular por apoptose (HOEIJMAKERS, 2009). Porém, as células tumorais, com o intuito de sobreviverem e não entrarem em processo de morte, iniciam uma série de mecanismos distintos e interligados para reparar os danos no DNA (LORD, ASHWORTH, 2012; MAJIDINIA, YOUSEFI, 2017).

Os mecanismos de reparo do DNA são genericamente chamados de *DNA damage response* (DDR); e são divididos em dois grupos distintos: os que reparam os danos induzidos ao DNA que levam a quebra de fita simples e os que reparam os danos que promovem quebras de fita dupla do DNA. São estes: o reparo de excisão de base (BER), reparo de excisão de nucleotídeos (NER), recombinação homóloga (HR) e união de extremidade não-homóloga (NHEJ) (CURTIN, 2012; GOLDSTEIN, KASTAN, 2015).

O reparo de excisão de base (BER) é responsável principalmente pela identificação e substituição de bases (nucleotídeos) especificamente danificadas (DAVID, O'SHEA, KUNDU, 2007). As reações de oxidação, alquilação e desaminação induzem pequenas lesões às bases do DNA. Contudo, tais lesões ainda não são capazes de levar a distorção da hélice dessa macromolécula (KROKAN, BJORAS, 2013).

A via de reparo de excisão de nucleotídeos (NER) é responsável pelo reparo de danos induzidos ao DNA que levam inevitavelmente a distorção da hélice do mesmo (LORD, ASHWORTH, 2012) e é dividida em duas sub-vias: NER acoplada à transcrição (TC-NER ou TCR) e NER genômica global (GG-NER ou GGR), nas quais a TC-NER ocorre quando a transcrição é bloqueada devido a danos no DNA, enquanto que, a via GG-NER funciona independentemente do procedimento de transcrição (SPIVAK, 2015). A TC-NER e GG-NER diferem entre si somente em termos de como elas reconhecem os danos induzidos no DNA, porém compartilham o mesmo processo de excisão da lesão (remoção dos nucleotídeos danificados) e reparo (incorporação de sequências de nucleotídeos sem danos) (SPIVAK, 2015).

Diferentes insultos ao DNA, como por exemplo, agentes intercalantes e espécies reativas de oxigênio podem levar a quebra de fita simples do DNA; e caso combinados a distúrbios nas forquilhas de replicação podem resultar em quebras de fita dupla do DNA (RANJHA, HOWARD, CEJKA, 2018). A inibição da atividade das enzimas topoisomerases é um dos mecanismos mais bem conhecidos que induzem quebras de fita dupla do DNA por interferir nos processos de replicação e empacotamento de DNA (POMMIER et al., 2010). Em resposta a quebra de fita dupla, as células respondem ativando uma das duas vias: a via de recombinação homóloga (HR) ou a via de união de extremidade não-homóloga (NHEJ) (POMMIER et al., 2010; LORD, ASHWORTH, 2012).

A via de recombinação homóloga (HR) propicia o reparo de danos no DNA que acontecem no final da fase S e na fase G2 do ciclo celular. A HR utiliza uma cromátide-irmã homóloga como molde/modelo para sintetizar o novo DNA, sendo assim este mecanismo é amplamente preciso e acurado. Os genes RAD51, XRCC2, XRCC3, PRA BRCA1, BRCA2 e PALB2 codificam proteínas chave que estão envolvidas no processo de reparo do DNA via recombinação homóloga (MOYNAHAN, JASIN, 2010; RANJHA, HOWARD, CEJKA, 2018).

No entanto, a via de reparo de DNA união de extremidade não-homóloga (NHEJ) acontece independentemente da fase S e G2 do ciclo celular e não utiliza um modelo homólogo para sintetizar o novo DNA. Neste caso, a síntese do DNA é realizada por polimerases e por fim as ligases ligam as extremidades não-homólogas (LIEBER, 2010; LORD, ASHWORTH, 2012; RADHAKRISHNAN, JETTE, LEES-MILLER, 2014). As principais proteínas envolvidas neste processo são: o heterodímero Ku (Ku 70/ Ku 80), a subunidade catalítica da proteína cinase dependente de DNA (DNA-PKcs), Artemis, XRCC4,

DNA ligase IV e o XRCC4-*like factor* (XLF) (LIEBER, 2010, RADHAKRISHNAN, JETTE, LEES-MILLER, 2014).

É importante destacar que os mecanismos de reparo do DNA (BER, NER, HR e NHEJ) são cruciais para manter a integridade genética de células normais em condições fisiológicas. Contudo, paradoxalmente, células tumorais utilizam estes mecanismos como meio de escape dos processos de morte celular, o que culmina inevitavelmente na resistência a quimioterápicos, principalmente os que têm o DNA como alvo molecular. Para tanto, abordagens terapêuticas que têm como foco diminuir o reparo do DNA de células tumorais é estratégico para a terapia do câncer.

#### 1.2.1.2.1 Poli (ADP-Ribose) polimerases

Um dos pilares dos mecanismos de reparo do DNA é a família das Poli (Adenosina difosfato-Ribose) polimerases (PARP), que desempenham um papel central no reparo do DNA empregando a via de reparo de excisão de base (BER) (ROULEAU et al., 2010; CSEH et al., 2017).

De acordo com os dados estruturais atualmente disponíveis na literatura, existem 17 proteínas nesta família. Com exceção de PARP-4, todas as demais PARPs apresentam o domínio catalítico C-terminal conservado (ANWAR, ASLAM, ANWAR, 2015; CSEH et al., 2017). Dentre os membros da família PARP, somente a PARP-1, -2 e -3 são ubiquamente expressas pelas células e são as únicas isoformas desta família ativadas por danos induzidos ao DNA (LANGELIER, RICCIO, PASCAL, 2014).

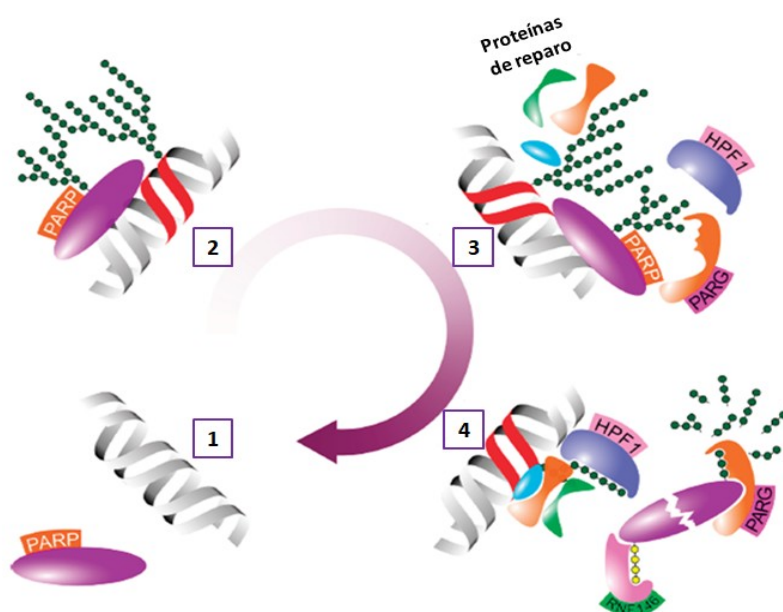
A PARP-1 é o membro melhor estudado e caracterizado da família PARP. Esta é uma proteína de 116 kDa composta por 6 domínios (domínio A - F), cada um com funções distintas (KAMESHITA et al., 1984). O domínio A (domínio de ligação ao DNA) é responsável pelo reconhecimento de *loci* do DNA danificado através de dois motivos de dedo de zinco. O domínio B é responsável pela localização nuclear da PARP-1 e direciona-a para o núcleo em caso de danos no DNA. Este também é o sítio onde a caspase-3 cliva a PARP-1 (DECKER, ISENBERG, MULLER, 2000). Já o domínio C é responsável pela conformação adequada da PARP-1 (TAO et al., 2008). O domínio D regula a atividade enzimática da PARP-1 através de um *feedback* negativo mediada por modificações pós-traducionais autorreguladoras que envolvem os resíduos de glutamato, aspartato e lisina, o que leva ao relaxamento da ligação da PARP-1 com o DNA (DESMARAIS et al., 1991; ALTMAYER et

al., 2009). O domínio E e F juntos constituem o sítio catalítico, onde se liga a nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) e catalisa a PARilação ou *PARylation* (LANGELIER et al., 2011).

A PARP-1 ativada cliva  $\text{NAD}^+$  em nicotinamida e ADP-ribose. Em seguida a PARP-1 sofre uma reação de “auto-PARilação” por meio do qual cerca de 50 a 200 unidades de ADP-ribose são ligadas covalentemente aos resíduos de glutamato, aspartato ou lisina, formando assim cadeias longas e ramificadas de poli (ADP-ribose) denominadas de cadeia PAR (SATOH, LINDAHL, 1992; ALTMAYER et al., 2009). A cadeia PAR tem uma carga líquida negativa que promove o recrutamento de proteínas de reparo envolvidas na via da BER para o local do dano ao DNA e facilita a remoção da PARP-1 dos locais de dano, permitindo o acesso a outras proteínas de reparo (HUBER et al., 2004; KUMMAR et al. 2012).

O término da PARilação e dissociação de PARP-1 do DNA danificado são pontos críticos que determinam o início do reparo do DNA pelas proteínas de reparo. Para tanto, a PARP-1 adiciona unidades de ADP-ribose no domínio D, o que resulta na dissociação de PARP-1 do DNA e finalização da PARilação. Um da reguladora chave desta etapa é o fator-1 de PARilação de Histona (HPF1) que determina o tempo retenção da PARP-1 no DNA através da regulação da ADP-ribosilação de histonas e automodificação da PARP-1 (GIBBS-SEYMOUR et al., 2016). A ligação de poli (ADP-ribose) glicohidrolase (PARG) a PARP-1 leva ao encurtamento da cadeia PAR através da remoção sucessiva de unidades de ADP-ribose, impedindo que a PARP-1 se ligue novamente ao DNA danificado (SATOH, POIRIER, LINDAHL, 1994). Por fim, a PARP-1 é ubiquitinada pela *Ring finger protein 146* (RNF146) e marcada para a degradação proteossomal (Figura 04) (KANG et al., 2011).

**Figura 04.** O papel de PARP-1 na resposta ao dano no DNA.



Nota: Onde **1)** DNA intacto; **2)** Reconhecimento do *loci* de DNA danificado; **3)** Recrutamento de proteínas de reparo; **4)** Dissociação de PARP-1 do DNA. **PARP**: poli (adenosina difosfato-ribose) polimerase-1; **HPF1**: fator de PARilação de histona 1; **PARG**: poli (ADP-ribose) glicohidrolase; **RNF146**: *Ring finger protein 146*. Os polímeros verde e amarelo representam a cadeia PAR e cadeia de poliubiquitina, respectivamente. **Fonte**: CSEH et al., 2017.

Além de seu papel na via de reparo BER, a PARP-1 tem sido implicada nas vias de reparo HR e NHEJ, o que sugere um papel mais amplo da PARP-1 nos mecanismos gerais de reparo do DNA (HUBER et al. 2004; KUMMAR et al. 2012). Além do mais, a PARP-1 é superexpressa em uma variedade de cânceres e tem sido relacionada com o mal prognóstico dos pacientes, principalmente os diagnosticados com câncer de mama (ROJO et al., 2012). Logo, com base no seu papel central nos mecanismos de reparo do DNA, a PARP-1 tem sido considerada como um potencial alvo molecular nas terapias antitumorais.

Assim sendo, com o intuito de interromper o reparo do DNA nas células tumorais visando inibir a atividade das PARPs surgiram os inibidores de PARP, que mimetizam a porção nicotinamida do  $\text{NAD}^+$  e ligam-se ao domínio catalítico da PARP, inibindo a sua atividade enzimática com subsequente libertação da PARP do DNA (KUMMAR et al. 2012; AKTAS et al., 2019). Como consequência, há um bloqueio no recrutamento de proteínas de reparo para o *loci* do DNA danificado, ocorrendo assim à inibição do reparo do DNA (KUMMAR et al. 2012). A olaparibe, veliparibe, rucaparibe, niraparibe e talazoparibe são exemplos de inibidores de PARP-1/2 (ANWAR, ASLAM, ANWAR, 2015).

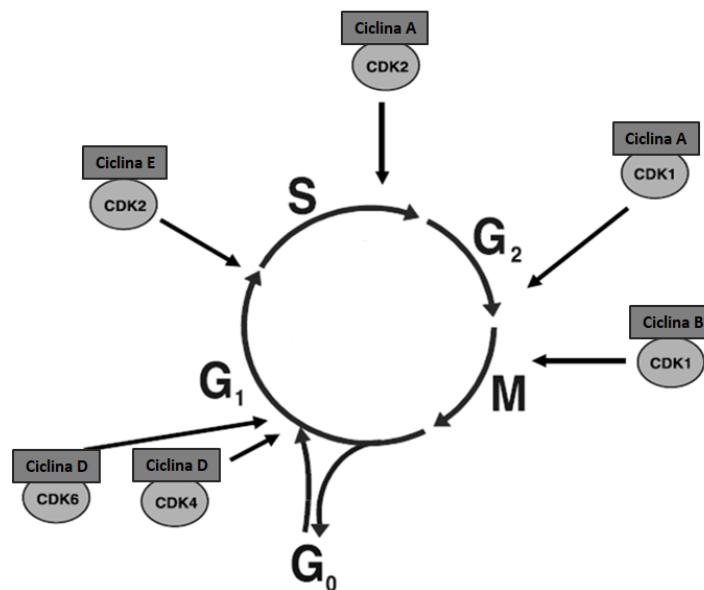
### 1.2.1.3 Correlação entre câncer e ciclo celular

A divisão celular é um processo pelo qual uma célula é dividida em duas células-filhas, processo este altamente regulado. A progressão do ciclo celular, propriamente dita, é regulada por fosforilação de proteínas específicas pelas cinases dependentes de ciclinas (CDKs) e desfosforilação por fosfatases seguida de degradação proteossomal (BAI, LI, ZHANG, 2017).

O ciclo celular é classicamente dividido em duas fases distintas: a interfase, que compreende as fases G<sub>1</sub> (pré-síntese de DNA), S (síntese de DNA) e G<sub>2</sub> (pré-divisão) do ciclo celular; e mitose, que compreende fase M, na qual as células sofrem a divisão celular. Após a interfase, as células podem retornar para a fase de quiescência caso não haja estímulos mitogênicos (G<sub>0</sub>/sub-G<sub>1</sub>) (NORBURY, NURSE, 1992).

Cada fase do ciclo celular é estritamente regulada pelas ciclinas e CDKs, que pertencem a uma família bem conservada de proteínas serina/treonina cinases. As ciclinas se ligam e regulam positivamente as CDKs, ativando-as. Uma vez ativadas, as CDKs fosforilam substratos chave que promovem à progressão do ciclo celular (Figura 05) (MALUMBRES, 2011; BAI, LI, ZHANG, 2017).

**Figura 05.** As fases do ciclo celular e os respectivos complexos CDK/ciclina.



Nota: Onde **G<sub>1</sub>**: fase pré-síntese de DNA; **S**: fase de síntese de DNA; **G<sub>2</sub>**: fase de pré-divisão do ciclo celular; **M**: fase de mitose; **G<sub>0</sub>**: fase de quiescência; **CDKs**: cinases dependentes de ciclinas. **Fonte:** VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003.



A atividade das CDKs varia ao longo do ciclo celular dependendo do nível de expressão das ciclinas, pois diferentes ciclinas são expressas em diferentes fases do ciclo celular. Assim, diferentes complexos CDKs/ciclina funcionam em fases distintas do ciclo celular, como por exemplo, o complexo CDK2/ciclina E regula a progressão da fase G1 para S, e CDK1/ciclina B está associada à entrada das células na fase M (BAYLISS et al., 2012; BAI, LI, ZHANG, 2017).

Todavia, as CDKs também são reguladas negativamente pelos inibidores de CDKs, comumente referidos como “CKIs” (BESSON, DOWDY, ROBERTS, 2008). Existem duas famílias distintas de CKIs: a família INK4 e a família Cip/Kip (CHIM et al., 2006). CDK4 e CDK6 são inibidas especificamente pelos inibidores p16<sup>INK4a</sup>, p15<sup>INK4b</sup>, p18<sup>INK4c</sup> e p19<sup>INK4d</sup>, impedindo assim a formação dos complexos CDK4/6/ciclina D (CÁNEPA et al., 2007). Enquanto que, os inibidores p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> e p57<sup>Kip2</sup> formam complexos heterotriméricos com as CDK1 e CDK2 complexados com as ciclinas B, E e A (ULLAH, LEE, DEPAMPHILIS, 2009).

Após estímulos mitogênicos, as células quiescentes (fase G0) são sinalizadas para iniciar o ciclo celular, entrando assim na fase G1, onde CDK4 e CDK6 formam complexos ativos com ciclina D e iniciam a fosforilação da proteína Rb (p105-Rb), o que inativa sua função como repressor transcricional e permite que os fatores de transcrição da família E2F aumentem a expressão gênica de proteínas necessárias para a transição de fase G1 para S. Isso inclui a expressão de CDK2, ciclina E e A. O complexo CDK2/ciclina E assim como os subsequentes complexos CDK1/2/ciclina A e CDK1/ciclina B continuam mantendo a proteína Rb num estado hiperfosforilado até o final da mitose, garantindo assim a progressão do ciclo celular (LAPENNA, GIORDANO, 2009; DICK, RUBIN, 2013).

No caso de danos induzidos ao DNA, as proteínas sensores de dano ao DNA, proteínas serina-treonina cinases ATM e ATR e seus efetores *downstream* (CHK1: *checkpoint kinase 1*; CHK2: *checkpoint kinase 2*), induzem a parada do ciclo celular e/ou morte celular via apoptose, dependendo da extensão do dano (SHILOH, 2003; LAPENNA, GIORDANO, 2009). Tanto ATM como ATR podem fosforilar e ativar o fator de transcrição p53, diretamente ou por meio de ativação prévia do CHK2. Por sua vez, a proteína p53 induz a expressão do inibidor de CDK2, a p21<sup>CIP1</sup> cuja atividade impede que as células danificadas entrem na fase S. Contudo, caso as células danificadas consigam passar pelo primeiro *checkpoint* e entrar na fase S, estas são forçadas a parar o ciclo celular por meio de um mecanismo que envolve outro efetor ATM-ATR, o CHK1. O CHK1 fosforila a fosfatase

CDC25C, fornecendo assim um sinal que leva a sua migração para o citoplasma, impedindo desta forma a remoção de dois fosfatos inibitórios da CDK1, o que impede a entrada das células na fase de mitose (SHILOH, 2003).

Embora haja *crosstalk* entre as vias de sinalização ATM-CHK2 e ATR-CHK1, a via ATM-CHK2 regula predominantemente o *checkpoint* da fase G1, enquanto que, a via ATR-CHK1 regula os *checkpoints* da fase S e G2 (SHILOH, 2003).

Frequentemente, os genes relacionados com o ciclo celular estão mutados nas células tumorais, o que resulta na desregulação dos mecanismos que controlam a progressão do mesmo, culminando assim na proliferação celular exacerbada (BAI, LI, ZHANG, 2017). Estudos demonstram que, a superexpressão de ciclinas e/ou CDKs estão relacionadas com o surgimento de alguns tipos de cânceres (HANAHAN, WEINBERG, 2011). Dado que, a desregulação da expressão tanto das ciclinas como das CDKs estimulam a proliferação celular independente de sinais mitogênicos ou simplesmente provocam o desvio dos *checkpoints* essenciais para prevenir a propagação do ciclo celular em caso de danos no DNA (SHANKLAND, WOLF, 2000; DANESH et al., 2002).

Por exemplo, a superexpressão de CDK2, ciclina E e ciclina A, ou então, a perda de seus inibidores endógenos da família Cip/Kip estão relacionados com o desenvolvimento e progressão de diferentes tipos de neoplasias malignas, incluindo sarcoma, melanoma, osteossarcoma e carcinomas de pâncreas, ovário, mama, pulmão e tireoide (LAPENNA, GIORDANO, 2009). Da mesma forma, a superexpressão de ciclina B com consequente aumento da atividade de CDK1 é frequentemente encontrada numa variedade de tumores, tais como carcinomas de mama (AALTONEN et al., 2009), cólon (BONDI et al., 2005), próstata (LIU, KAO, HUANG, 2008) e tireoide (NAR et al., 2012).

#### **1.2.1.4 Correlação entre câncer e Morte celular**

A morte celular é um processo fisiológico necessário para remover células indesejadas ou danificadas e está interligada com a sobrevivência e a proliferação celular (PRADELLI, BÉNÉTEAU, 2010; CHAABANE et al., 2013). Os distintos tipos de morte celular apresentam características morfológicas e bioquímicas específicas, o que os diferencia entre si. Assim sendo, as células podem ser levadas a morte por diferentes mecanismos de morte celular, tais como a apoptose e necrose (SUROVA, ZHIVOTOVSKY, 2013). É importante

destacar que, qualquer descontrolo sobre tais processos pode resultar na promoção, desenvolvimento e progressão de tumores (RICCI, ZONG, 2006).

A apoptose é ativada em resposta ao estresse celular, particularmente devido à indução de danos irreparáveis ao DNA; e é controlada tanto por reguladores *upstream* como por efetores *downstream* (ADAMS, CORY, 2007; SUROVA, ZHIVOTOVSKY, 2013). Os reguladores *upstream* são divididos em duas vias interconectadas parcialmente: i) a via extrínseca, que recebe e processa sinais indutores de morte extracelulares; e ii) a via intrínseca, que detecta e integra uma variedade de sinais de origem intracelulares (OUYANG et al., 2012; CHAABANE et al., 2013). Cada uma das vias culmina na ativação de proteases normalmente latentes, que iniciam uma cascata de proteólise envolvendo caspases efetoras responsáveis pela fase de execução da apoptose propriamente dita (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

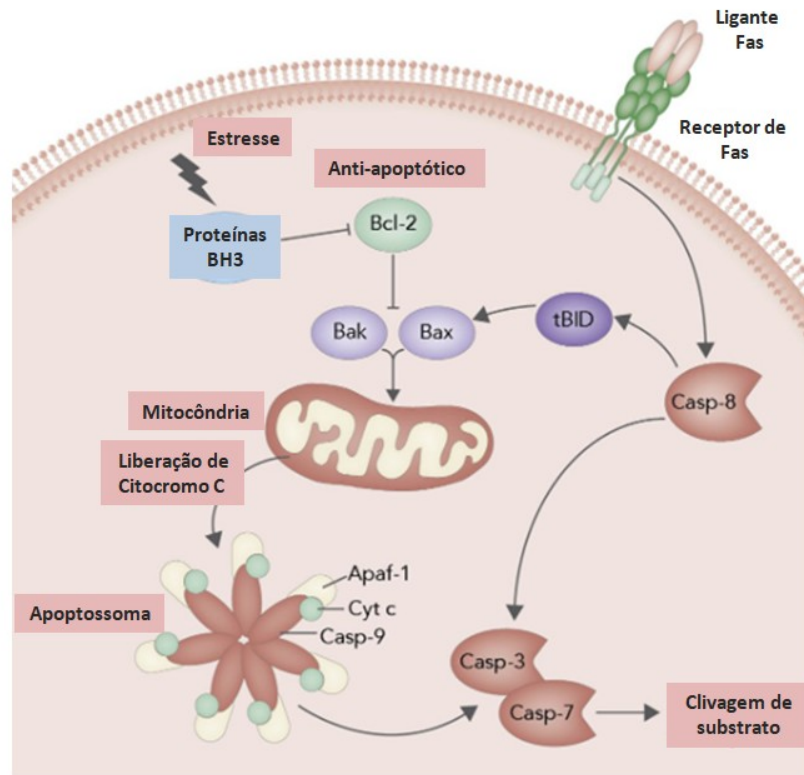
A via extrínseca é desencadeada pela ativação de receptores de morte expressos na superfície celular, como o receptor de Fas. A ligação do Fas ao seu receptor forma um complexo de morte, recruta a proteína contendo o domínio de morte (FADD) e a pró-caspase-8, formando um complexo sinalizador indutor de morte (DISC), que consequentemente, ativa a caspase-8 que, por sua vez ativa a pró-caspase-3, levando a morte celular (DEWSON, KLUCK, 2009; OUYANG et al., 2012).

Na via intrínseca, os sinais que interligam os reguladores *upstream* como os efetores *downstream* são controlados pelo desbalanço da expressão e atividade das proteínas pró e antiapoptóticas da família Bcl-2 (ADAMS, CORY, 2007). Consta na família Bcl-2 as proteínas pró-apoptóticas Bax, Bak, Bad, Bcl-XS, Bid, Bik, Bim e HRK, além das proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Bfl-1 e Mcl-1 (OUYANG et al., 2012).

Após a sinalização para a ocorrência de apoptose via mitocôndria (via intrínseca), as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak expõem os domínios de interação proteína-proteína, denominados de domínios BH3, e ligam-se umas às outras através desses domínios, formando assim o poro de transição da permeabilidade mitocondrial (MPT), o que interrompe a integridade da membrana mitocondrial externa e causa a liberação de proteínas solúveis de sinalização pró-apoptóticas, tais como citocromo *c* e fator indutor de apoptose, além de contribuir para a perda ou redução do potencial de membrana mitocondrial (WILLIS, ADAMS, 2005; ADAMS, CORY, 2007). O citocromo *c*, por sua vez, liga-se ao Apaf-1 (fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1), trifosfato de desoxiadenosina (dATP) e pró-caspase-9, formando um complexo de ativação de caspases (apoptossomo), com a consequente

ativação de caspase-9, que recruta e cliva as caspases efetoras (-3, -6, e -7), ativando-as. Em seguida, as caspases efetoras clivam as suas proteínas alvo resultando na morte celular (Figura 06) (WANG, LIU, CUI, 2005; DEWSON, KLUCK, 2009).

**Figura 06.** As vias extrínseca e intrínseca da apoptose.



Nota: Onde **Apaf-1**: fator ativador de proteases pró-apoptóticas 1; **Cyt c**: citocromo *c*. **Casp-3**: caspase-3; **Casp-7**: caspase-7; **Casp-8**: caspase-8; **Casp-9**: caspase-9. **Fonte**: MCARTHUR, CHAPPAZ, KILE, 2018.

Como consequência da ativação das vias de apoptose, as células sofrem alterações morfológicas e bioquímicas específicas culminando no encolhimento citoplasmático (*shrinkage* celular), condensação de cromatina (picnose), fragmentação do núcleo, desestruturação da membrana celular (*membrane blebbing*), formação de corpos apoptóticos, externalização das fosfatidilserinas e perda de adesão célula-célula e célula-matriz (OUYANG et al., 2012). Em seguida, os corpos apoptóticos são fagocitados pelas células do sistema imune e degradados dentro dos fagolisossomas, o que impede que os constituintes celulares sejam extravasados para o tecido intersticial adjacente e cause uma inflamação local (ELMORE, 2007).

Uma vez ativada, a proteína p53 pode regular tanto a via intrínseca como a via extrínseca através da regulação positiva de proteínas pró-apoptóticas como a PUMA,

p53AIP1, Bax e Apaf-1, bem como os receptores 1 e 2 de TRAIL (ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral -TNF), além de regular também os receptores Fas e os ligantes Fas (HOCK, VOUSDEN, 2012).

Os homólogos de p53, p73 e p63, também estão envolvidos na indução de apoptose em resposta a danos induzidos no DNA. A proteína p73 induz apoptose via mitocondrial através da regulação da expressão de PUMA e Bax. Ademais, ele compartilha muitos dos genes-alvo de p53, que codificam proteínas pró-apoptóticas tais como Noxa, caspase-6 e Fas. A p73 pode induzir apoptose mesmo na ausência da p53, demonstrando assim um mecanismo de morte celular independente desta última (FLORES et al., 2002). Ou seja, dependendo do tipo de dano, bem como do tipo de célula, tanto os mecanismos dependentes de p53 como os independentes podem ser ativados por danos induzidos no DNA e desencadear a morte por apoptose (SUROVA, ZHIVOTOVSKY, 2013).

As células tumorais normalmente desenvolvem uma variedade de estratégias que evitam o desencadeamento da apoptose. Uma das estratégias mais comuns é a mutação no gene supressor tumoral TP53 com subsequente perda da atividade da proteína p53. Adicionalmente, as células tumorais podem aumentar a expressão de proteínas antiapoptóticas, tais como a Bcl-2 e Bcl-xL, regulando assim negativamente as proteínas pró-apoptóticas Bax, Bim e PUMA; além de conseguirem também interferir na via de morte induzida por ligante extrínseco (HANAHAN, WEINBERG, 2011).

Estudos pré-clínicos *in vivo* demonstraram que, a inibição de PARP-1, RIP1, calpaínas e catepsinas inibiram ou minimizaram a ocorrência de necrose (KROEMER, MARTIN, 2005). Todavia, é de conhecimento que muitos dos quimioterápicos convencionais utilizados na clínica induzem a morte celular por necrose, porém, sendo a apoptose considerada uma morte celular "limpa", por não promover a inflamação, a torna um dos objetivos primordiais que se busca alcançar com uma quimioterapia mais seletiva.

#### **1.2.1.5 Correlação entre câncer e Angiogênese**

O oxigênio e os nutrientes são essenciais para as funções celulares e sobrevivência; Estes, por sua vez, são fornecidos aos tumores pela neovasculaturização associada ao tumor, gerada pelo processo de angiogênese (HANAHAN, WEINBERG, 2000- 2011). Este processo é caracterizado pelo surgimento e crescimento de novos vasos sanguíneos, sendo este regulado positivamente ou negativamente pelos sinais pró-angiogênicos ou antiangiogênicos,

respectivamente (BERGERS, BENJAMIN, 2003; BAERISWYL, CHRISTOFORI, 2009). Alguns desses reguladores angiogênicos são proteínas sinalizadoras (fatores solúveis) que se ligam á receptores de tirosina cinase transmembranares exibidos na superfície das células endoteliais (FEDI, TRONICK, AARONSON, 1997; VEIKKOLA, ALITALO, 1999). Como exemplo de fatores pró-angiogênicos têm-se: o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e os fatores de crescimento de fibroblastos (FGF1/2) (BAERISWYL, CHRISTOFORI, 2009). Como exemplo de fatores antiangiogênicos têm-se: a trombospondina-1 (TSP-1) (KAZEROUNIAN, YEE, LAWLER, 2008).

A angiogênese é induzida já nos estágios iniciais da tumorigênese, o que contrapõem a ideia inicial de que este processo seria importante apenas nos estágios mais avançados da tumorigênese (HANAHAAN, FOLKMAN, 1996; RAICA, CIMPEAN, RIBATTI, 2009). Durante o desenvolvimento e progressão do tumor, há ocorrência do processo chamado de “*angiogenic switch*” caracterizado pelo surgimento contínuo de novos vasos sanguíneos a partir de vasos quiescentes, o que contribui para crescimento do tumor em expansão (HANAHAAN, FOLKMAN, 1996).

Os tumores parecem ativar a “*angiogenic switch*” alterando o equilíbrio entre os fatores pró-angiogênicos e antiangiogênicos através de estratégias que envolvem a transcrição gênica. Frequentemente, os tumores superexpressam a VEGF e/ou FGFs, enquanto que, a expressão de trombospondina-1 é regulada negativamente (HANAHAAN, FOLKMAN, 1996; VOLPERT, DAMERON, BOUCK, 1997). Ademais, muitos tumores também têm os níveis da citocina antiangiogênica *interferon-β* reduzidos (VOLPERT, DAMERON, BOUCK, 1997).

Evidências demonstram que, alguns tumores que, por exemplo, superexpressam os oncogenes Ras e Myc regulam positivamente a expressão de fatores pró-angiogênicos, enquanto que em outros tumores, tais sinais pró-angiogênicos são produzidos indiretamente por células do sistema imune inato presentes no microambiente, como macrófagos, neutrófilos, mastócitos e progenitores mielóides associados ao tumor. Portanto, as células inflamatórias não só contribuem para a “*angiogenic switch*” como também ajudam a sustentar a angiogênese associada ao crescimento do tumor, além de facilitarem a invasão local (VOLPERT, DAMERON, BOUCK, 1997; HANAHAAN, WEINBERG, 2011).

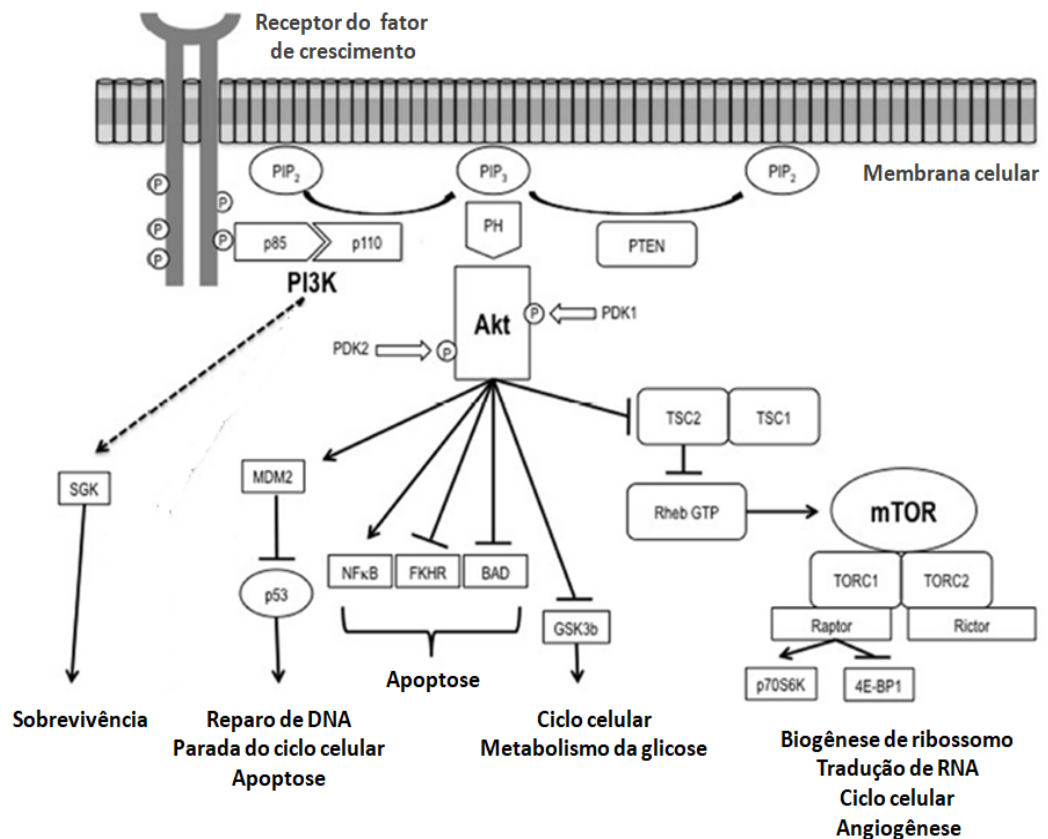
Sendo que a angiogênese tumoral ocorre em quase todos os tipos de câncer, este processo trata-se de um alvo molecular excepcionalmente atrativo. Contudo, alguns pontos precisam ser levados em consideração, pois existem evidências que indicam que diferentes

tipos de células tumorais usam estratégias moleculares distintas para ativar a “*angiogenic switch*” (HANAHAN, WEINBERG, 2000). Neste sentido, a abordagem mais adequada seria utilizar fármacos com atividade antiangiogênica que foram desenvolvidos especificamente para um determinado tipo de tumor humano.

### 1.2.1.6 Correlação entre câncer e via PI3K/Akt/mTOR

O microambiente tumoral é conhecido por ser um ambiente intrinsecamente estressante (caracterizado pelo limitado suprimento de nutrientes e oxigênio, bem como pelo baixo pH) (PORTA, PAGLINO, MOSCA, 2014). A via PI3K/Akt é conhecida por ser uma reguladora chave da sobrevivência durante o estresse celular (DATTA, BRUNET, GREENBERG, 1999). Assim sendo, tal via tem um papel crucial no desenvolvimento do câncer (Figura 07) (PORTA, PAGLINO, MOSCA, 2014).

**Figura 07.** Representação esquemática da via PI3K/Akt/mTOR.



Nota: Onde **PIP<sub>2</sub>**: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato; **PIP<sub>3</sub>**: fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato; **PI3K**: fosfatidilinositol-3-cinases; **p110**: subunidade catalítica de PI3K; **p85**: subunidade reguladora de PI3K; **PTEN**:

fosfatase PTEN; **PH**: domínio de homologia de pleckstrina; **PDK1/2**: cinases ativadoras de Akt; **TSC1**: hamartina; **TSC2**: tuberina; **RHEB-GTP**: proteína RHEB com atividade GTPase; **mTOR**: serina/treonina-proteína cinase; **TORC1**: mTORC1; **TORC2**: mTORC2; **p70S6K**: proteína ribossômica S6; **4E-BP1**: proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução 4E; **SGK**: cinase regulada por soro e glicocorticoide (*serum and glucocorticoid-regulated kinase*); **p53**: proteína supressora tumoral p53; **MDM2**: ubiquitina ligase E3 - MDM2; **NFκB**: fator nuclear κB; **FKHR**: fatores de transcrição forkhead (FKHR/AFX/FOX); **BAD**: proteína pró-apoptótica; **GSK-3**: glicogênio sintase cinase-3. **Fonte**: PORTA, PAGLINO, MOSCA, 2014.

A ativação contínua da via PI3K/Akt/mTOR resulta em uma profunda desregulação dos mecanismos de crescimento e sobrevivência celular, o que promove vantagem competitiva de crescimento, capacidade metastática, além da indução de angiogênese e resistência à quimioterapia. Ademais, a atividade da PI3K tem sido associada a uma variedade de tumores humanos, incluindo câncer de mama, câncer de pulmão, melanomas, leucemia, entre outros (PORTA, PAGLINO, MOSCA, 2014).

As fosfatidilinositol-3-cinases (PI3Ks) constituem uma família de lipase cinase caracterizada pela capacidade de fosforilar o grupo 3'-OH do anel inositol em fosfatidilinositóis, gerando assim segundos mensageiros que controlam atividades e propriedades celulares como a proliferação, sobrevivência, motilidade e morfologia (FRUMAN, MEYERS, CANTLEY, 1998; BADER et al., 2005). A família de proteínas PI3K é dividida em três classes (classe I, II e III), que diferem entre si em estrutura, preferência por substrato, distribuição tecidual, mecanismo de ativação e função (VANHAESEBROECK, WATERFIELD, 1999).

Na regulação da proliferação e tumorigênese, as proteínas PI3K mais relevantes são aquelas que pertencem à classe I, que é constituída por heterodímeros compostos por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade adaptador/reguladora (p85). As PI3Ks de classe I estão divididas em duas subclasses: i) a subclasse IA (PI3K $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\delta$ ), que é ativada por receptores com atividade de proteína tirosina cinase, e ii) a subclasse IB (PI3K $\gamma$ ), que é ativada por receptores acoplados a proteína G (FRUMAN, MEYERS, CANTLEY, 1998; BADER et al., 2005).

Nas células em quiescência, a subunidade reguladora p85 está associada à subunidade catalítica p110, efetuando assim uma ação inibidora sobre esta. No entanto, após os receptores com atividade de proteína tirosina cinase serem ativados por fatores de crescimento ocorre uma autofosforilação dos resíduos de tirosina. Em seguida, os domínios SH2 da subunidade reguladora p85 se ligam à tirosina fosforilada destes receptores,



revertendo assim à inibição da subunidade catalítica p110. Isso leva à ativação alostérica da subunidade p110 com subsequente recrutamento para a membrana plasmática (OKKENHAUG, VANHAESEBROECK, 2001).

A subunidade p110 apresenta alta afinidade para o substrato fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP2). Este é fosforilado e convertido no segundo mensageiro fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), que então recruta proteínas de sinalização com domínios de homologia de pleckstrina (PH) para a membrana. Entre estes se encontra a serina-treonina cinase Akt, bem como as suas cinases ativadoras PDK1/2 (cinase dependente de 3- fosfoinosítídeo) (CORVERA, CZECH, 1998; FRESNO-VARA et al., 2004).

O PIP3 também é substrato da fosfatase PTEN (homólogo de fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10), que desfosforila o PIP3 e gerar novamente o PIP2. O PTEN atua como um regulador negativo da sinalização PI3K/Akt e funciona como um supressor tumoral, inibindo o crescimento celular e aumentando a sensibilidade celular a apoptose (LU et al., 1999; WISHART, DIXON, 2002). Assim, a perda da atividade da PTEN leva à ativação constante da via PI3K/Akt (PORTA, PAGLINO, MOSCA, 2014).

A PDK1 fosforila a Akt, tornando-a ativa. A Akt ativada é o principal mediador da sinalização iniciada por PI3K e possui vários substratos, por exemplo: mTOR, Bad, pró-caspase-9, cinase I- $\kappa$ B (IKK), CREB, família de fatores de transcrição forkhead (FKHR / AFX / FOX), glicogênio sintase cinase-3 (GSK-3) e os inibidores de cinase dependentes de ciclina p21<sup>Cip1</sup> e p27<sup>Kip1</sup>, dentre outros. O IKK e CREB são ativados diretamente pela fosforilação de Akt, enquanto que, Bad, pró-caspase-9, FOX e GSK-3 são inativados (CHANG et al., 2003; PORTA, PAGLINO, MOSCA, 2014).

Vários fatores de transcrição que regulam a proliferação e crescimento celular são controlados pela via PI3K/Akt, particularmente as proteínas FOXO (forkhead box) e o fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (BADER et al., 2005). Os fatores de transcrição FOXO, uma das subclasses da família de proteínas FOX, regulam o ciclo celular, a apoptose, o reparo do DNA e a proteção contra danos oxidativos. Faz parte dessa subclasse os fatores de transcrição FOXO1 (FKHR), FOXO3A (FKHRL1), FOXO4 (AFX) e FOXO6 (VOGT, JIANG, AOKI, 2005). Um dos papéis de destaque das proteínas FOXO nucleares é a indução de parada do ciclo celular na fase G1 através da redução da expressão de ciclina D1/2 e aumento da expressão dos inibidores de cinase dependentes de ciclina p21<sup>Cip1</sup> e p27<sup>Kip1</sup> (MEDEMA et al., 2000).

A Akt inibe a transcrição gênica mediada pelas proteínas FOXO nucleares através de fosforilação, interrompendo assim a associação das proteínas FOXO nucleares com os coativadores p300-CBP (proteína de ligação a CREB), o que interfere com a ligação dos complexos FOXO-p300-CBP ao DNA. Ademais, a fosforilação das proteínas FOXO nucleares pela Akt medeia a sua interação com as proteínas 14-3-3 (BRUNET et al., 1999; BROWNAWELL et al., 2001). Uma vez fosforilada, as proteínas FOXO nucleares são exportadas para fora do núcleo e são marcadas para degradação proteossomal (HUANG et al., 2005).

Enquanto que, as proteínas FOXO são inativadas pela sinalização de Akt, o fator de transcrição NF $\kappa$ B é ativado pela mesma. No contexto do câncer, o fator NF $\kappa$ B regula positivamente a proliferação, sobrevivência, angiogênese, invasão celular e quimiorresistência (AGGARWAL, 2004; NAKANISHI, TOI, 2005). O fator NF $\kappa$ B é regulado negativamente pelo inibidor I $\kappa$ B através do qual é mantido no citosol onde é incapaz de regular a transcrição gênica. A regulação positiva de NF $\kappa$ B ocorre através das cinases I $\kappa$ B (IKKs), que fosforilam I $\kappa$ B e a marcam para degradação proteossomal. As IKKs são fosforiladas e ativadas pela Akt. O fator de transcrição NF $\kappa$ B, agora dissociado do inibidor I $\kappa$ B, migra do citosol para o núcleo onde se dimeriza com REL-A (p65) e promove a transcrição de vários genes essenciais para o desenvolvimento do câncer (AGGARWAL, 2004).

Outros reguladores transcricionais cujas atividades são afetadas direta ou indiretamente pela Akt incluem o MIZ1 (*Myc interacting zinc-finger protein 1*), p53, proteína ativadora 1 (AP1), *c-myc*,  $\beta$ -catenina e o fator-1 $\alpha$  induzido por hipóxia (HIF1 $\alpha$ ) (BADER et al., 2005).

A Akt inibe a atividade da p53 por meio de um mecanismo que envolve a proteína MDM2, o que conseqüentemente aumenta a degradação proteossomal desta proteína supressora tumoral (MAYO, DONNER, 2001).

O GSK-3 é um dos substratos da via PI3K/Akt que está constitutivamente ativada em células quiescentes. A GSK-3 fosforila e inativa inúmeras proteínas, tais como o glicogênio sintase, ciclina D, *c-myc* e  $\beta$ -catenina (CANTLEY, 2002). Contudo, a atividade de GSK-3 é inibida pela fosforilação mediada por Akt (WEI et al., 2005).

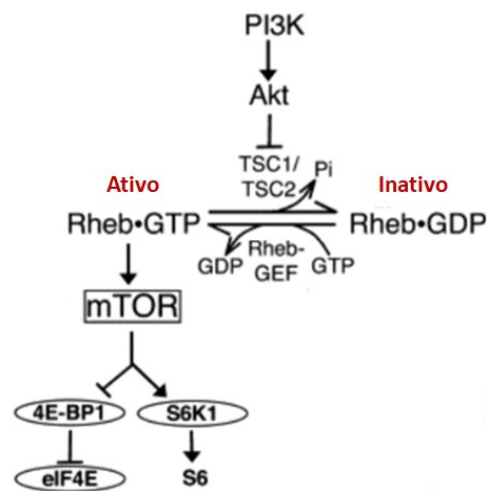
Datta e colaboradores em 1997 demonstraram que a Akt também é capaz de modular a atividade de Bad, um dos membros da família de proteínas Bcl-2 com atividade pró-apoptótica, ao fosforilar a serina 112 (S112), o que resulta na dissociação do complexo Bad-

Bcl-2 e subsequente ligação de Bad a proteína 14-3-3. A dissociação do complexo Bad-Bcl-2 está associada à sobrevivência celular.

A atividade de mTOR é regulada por reguladores *upstream*. Sinais transmitidos por meio da via PI3K/Akt regulam positivamente a atividade da mTOR. No entanto, o PTEN e o complexo de esclerose tuberosa (TSC) regulam negativamente a sua atividade (HAY, SONENBERG, 2004).

A TSC é um complexo heterodimérico, composto por TSC1 (hamartina) e TSC2 (tuberina), que funciona como um complexo proteico que inibe a atividade GTPase da pequena proteína RHEB (INOKI et al., 2003). O TSC2 é diretamente fosforilado e inativado pela Akt, o que resulta no aumento da atividade de RHEB-GTPase, que por sua vez, fosforila e ativa mTOR (Figura 08) (INOKI et al., 2002-2003).

**Figura 08.** Esquema representativo da ativação da mTOR pela proteína RHEB-GTPase.



Nota: Onde **PI3K**: fosfatidilinositol-3-cinases; **TSC1**: hamartina; **TSC2**: tuberina; **RHEB-GTP**: proteína RHEB com atividade GTPase; **mTOR**: serina/treonina-proteína cinase; **S6K1**: proteína ribossômica S6; **4E-BP1**: proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução 4E; **eIF4E**: Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E.  
**Fonte:** TEE et al., 2013.

Existem dois complexos distintos de mTOR, o mTORC1 e mTORC2. O complexo mTORC1 é composto por mTOR, Raptor, mLST8 e PRAS40, enquanto que, o complexo mTORC2 é composto por mTOR, Rictor, Sin1 e mLST8 (HAY, SONENBERG, 2004, MEMMOTT, DENNIS, 2009).

O mTORC1, quando ativado por fosforilação mediada pela pequena proteína RHEB, regula a síntese de proteínas através da fosforilação e ativação da proteína ribossômica S6

(cinase p70 S6) e inativação do 4EBP (proteína de ligação ao fator de iniciação da tradução 4E) (INOKI et al., 2002; HAY, SONENBERG, 2004). As proteínas 4EBP são reguladores negativos da síntese proteica, pois interagem com o fator de iniciação da tradução 4E, impedindo assim a formação do complexo de iniciação traducional 4F, que depende da disponibilidade de 4E. A fosforilação de 4EBP por mTORC1 promove a dissociação do complexo 4EBP-4E. Uma vez livre, o 4E recruta a proteína *scaffold* 4G e a RNA helicase 4A, construindo assim um complexo de iniciação da tradução e dando início à síntese de diversas proteínas, tais como, a ciclina D1 e o HIF1 (GINGRAS et al., 1998; ABRAHAM, 2004).

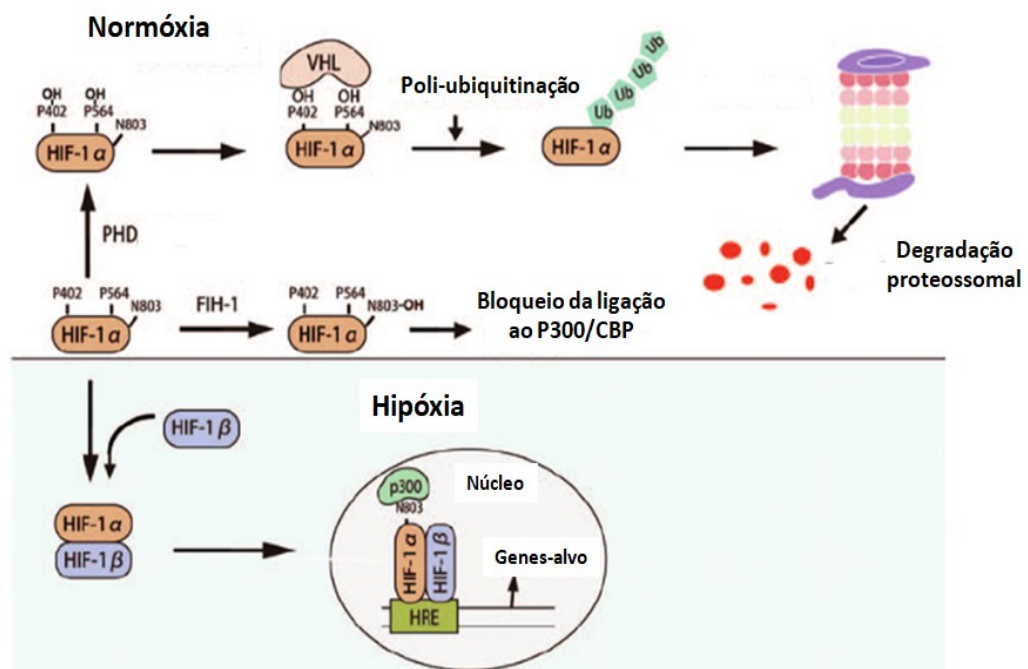
A resposta celular à hipóxia é mediada principalmente pelos fatores induzidos por hipóxia (HIFs), que desempenha a função de fatores de transcrição que regulam a expressão gênica de várias proteínas envolvidas nos processos de adaptação e progressão tumoral (WIGERUP, PÅHLMAN, BEXELL, 2016).

Os fatores de transcrição HIF são compostos por duas subunidades: a subunidade  $\alpha$  e a subunidade  $\beta$ , ambas pertencentes à família de proteínas hélice-alça-hélice básica (HLH)-PER-ARNT-SIM (bHLH-PAS). A subunidade  $\alpha$  é sensível ao oxigênio, enquanto a subunidade  $\beta$  (HIF-1 $\beta$ ), sendo menos sensível ao oxigênio, é ubiquamente expressa (BERSTEN et al., 2013). Em relação à subunidade  $\alpha$ , existem três isoformas distintas: HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$  e HIF-3 $\alpha$  (WANG et al., 1995).

Na presença de oxigênio, os resíduos de prolina conservados na subunidade  $\alpha$  são hidroxilados pelos prolil-4-hidroxilases (PHDs) pertencentes à superfamília da oxigenase dependente de 2-oxoglutarato. A hidroxilação da subunidade  $\alpha$ , a torna alvo da proteína supressora de tumores von Hippel-Lindau (pVHL), que subsequentemente marca a subunidade  $\alpha$  para degradação proteossomal via adição de ubiquitina (JAAKKOLA et al., 2001; SCHOFIELD, RATCLIFFE, 2004).

Em contrapartida, no estado de hipóxia, as proteínas PHDs não conseguem hidroxilar a subunidade  $\alpha$ , que conseqüentemente é estabilizada, translocada para o núcleo onde se dimeriza com o HIF-1 $\beta$ , formando assim o fator de transcrição HIF que se liga aos elementos responsivos à hipóxia (HREs) nas regiões promotoras dos genes e promove a transcrição de genes relevantes para o desenvolvimento e progressão tumoral (Figura 09) (JAAKKOLA et al., 2001; SEMENZA, 2003).

**Figura 09.** Regulação do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  em condições de normóxia e hipóxia.



Nota: Onde **HIF-1 $\alpha$** : fator induzido por hipóxia - subunidade  $\alpha$ ; **HIF-1 $\beta$** : fator induzido por hipóxia - subunidade  $\beta$ ; **PHD**: proteína prolil-4-hidroxilase; **VHL**: proteína supressora de tumores von Hippel-Lindau; **p300/CBP**: proteínas de ativação transcricional; **CBP**: *CREB-binding protein*; **HRE**: elemento responsivo à hipóxia. **Fonte:** LIN et al., 2014.

A hipóxia promove a glicólise aeróbica aumentando tanto a captação de glicose quanto a expressão de enzimas glicolíticas (IYER et al., 1998). O fator HIF-1 $\alpha$  atua diretamente no gene que codifica a piruvato desidrogenase cinase 1 (PDK1), enzima esta responsável pela inibição da piruvato desidrogenase (PDH) que catalisa a conversão do piruvato á acetil-CoA. Portanto, o aumento da expressão de PDK1 contribui para a glicólise aeróbica (KIM et al., 2006). Ademais, o fator HIF-1 $\alpha$  regula a expressão e atividade dos transportadores de glicose (GLUT-1 e GLUT-3) e enzimas glicolíticas tais como hexocinases e fosfofrutocinases (BRAHIMI-HORN et al., 2011; SEMENZA, 2003).

Em resposta a hipóxia, os fatores pró-angiogênicos VEGF, fator de crescimento derivado de plaquetas  $\beta$  (PDGF- $\beta$ ), angiopoietina-2 e fator-1 $\alpha$  derivado do estroma (SDF-1 $\alpha$ ) são secretados no microambiente tumoral, promovendo assim a neoangiogênese (FORSYTHE et al., 1996; KELLY et al., 2003; CERADINI et al., 2004).

Estudos têm demonstrado que, os fatores HIFs medeiam a quimiorresistência através de mecanismos que envolvem a ativação do gene multirresistência 1 (MDR1), que codifica a

glicoproteína-P pertencente à família dos transportadores de cassetes de ligação de ATP (ABC) e funciona como uma “bomba de efluxo” para fármacos e xenobióticos no núcleo celular. Logo, a expressão da glicoproteína-P pode diminuir a concentração intracelular de vários fármacos antitumorais e contribui para a quimiorresistência induzida por hipóxia (COMERFORD et al., 2002).

Desta forma, a hipóxia tumoral e os fatores HIFs contribuem para a proliferação celular exacerbada, evasão de apoptose, reprogramação metabólica, imunossupressão, instabilidade genômica, angiogênese, invasão e metástase. Para além de favorecerem o surgimento da resistência à quimioterapia (WIGERUP, PÅHLMAN, BEXELL, 2016).

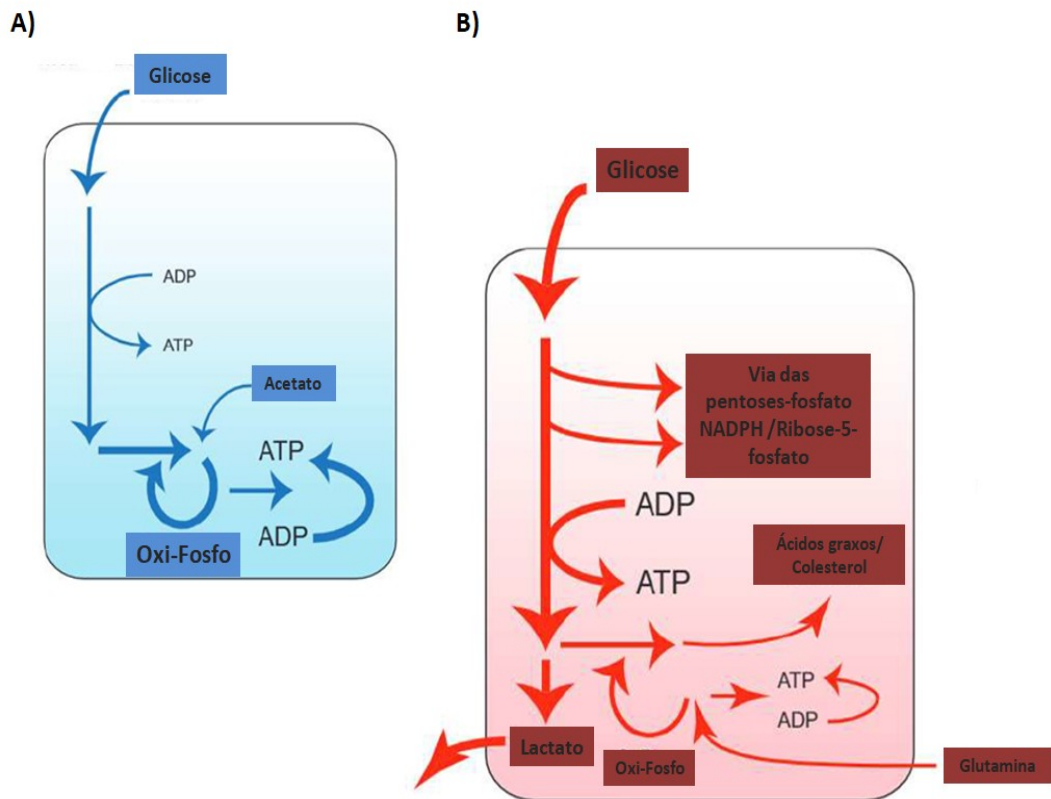
### **1.2.1.7 Correlação entre câncer e reprogramação metabólica**

A reprogramação metabólica refere-se a alterações no metabolismo energético de células tumorais, com o intuito de atender às necessidades energéticas e de anabolismo destas células (SINGH et al., 2018).

Na presença de oxigênio, células normais ou diferenciadas preferencialmente metabolizam a glicose gerando acetil-CoA que é então submetida à oxidação no ciclo de ácido tricarboxílico (TCA). Os elétrons extraídos das reações oxidativas do ciclo TCA são transportados através de  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  e  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$  para a cadeia de transporte de elétrons, criando assim um gradiente eletroquímico que resulta na produção de energia (adenosina trifosfato - ATP) (PAVLOVA, THOMPSON, 2016). Somente uma pequena quantidade de ácido láctico ou lactato é produzida durante os processos metabólicos que culminam na fosforilação oxidativa. No entanto, células normais ou diferenciadas em condição de hipóxia produzem grandes quantidades de lactato por via da glicólise anaeróbica (DAR et al., 2017).

No início da década de 1920, o famoso “efeito Warburg” ou “glicólise aeróbica” foi proposto pela primeira vez pelo bioquímico e fisiologista alemão Otto Warburg (KATO et al., 2018). Ainda que na presença de oxigênio, as células tumorais preferencialmente utilizam a glicólise para o metabolismo de glicose e obtenção de energia (ATP), em vez de utilizar a fosforilação oxidativa via mitocôndria (KATO et al., 2018). Destacando-se que, o excesso de piruvato é convertido pelas células tumorais em lactato, que, por sua vez, é secretado para o microambiente extracelular (Figura 10) (PAVLOVA, THOMPSON, 2016).

**Figura 10.** Esquema representativo da reprogramação metabólica da glicose.



Nota: Onde **(A)** O metabolismo energético das células normais; **(B)** O metabolismo energético das células tumorais - Efeito Warburg; **Oxi-Fosfo:** Fosforilação oxidativa; **Fonte:** PAVLOVA, THOMPSON, 2016.

Presumindo que, o principal uso de glicose nas células seria para gerar ATP, Warburg e muitos outros pesquisadores interpretaram erroneamente o “efeito Warburg” como sendo um “dano irreversível da respiração”, deixando as células tumorais com uma forma consideravelmente menos eficiente de gerar ATP (WARBURG, 1956). No entanto, estudos posteriores demonstraram que, em geral, as células tumorais possuem mitocôndrias funcionais e mantêm a sua capacidade de realizar a fosforilação oxidativa (CAVALLI, VARELLA-GARCIA, LIANG, 1997; TAN et al., 2015). De fato, ao invés de ser uma adaptação a um defeito na respiração celular, o “efeito Warburg” é um estado metabólico regulado e pode trazer benefícios durante um período de demanda aumentada da biossíntese (PAVLOVA, THOMPSON, 2016).

A glicólise é classicamente descrita como uma cadeia única de eventos moleculares que leva à geração de piruvato. Contudo, vários intermediários glicolíticos podem ser desviados para vias adjacentes, gerando diversos precursores biossintéticos. Destacando-se desta forma a via das pentoses-fosfato, na qual a glicose-6-fosfato é parcialmente oxidada

para gerar NADPH e ribose-5-fosfato, um componente estrutural dos nucleotídeos. A transcetolase 1 (TKTL1) e transaldolase (TALDO) são enzimas chave da via das pentoses-fosfato e estão frequentemente superexpressas em células tumorais (XU et al., 2009; WANG et al., 2011).

A atividade da glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD), enzima limitante da via das pentoses-fosfato, é regulada negativamente pela *wild-type* p53. Tal inativação inibe a via das pentoses-fosfato com consequente diminuição da síntese de nucleosídeos trifosfato, o que influencia diretamente o reparo do DNA, forçando assim a parada do ciclo celular e possivelmente desencadeando a morte celular (JIANG et al., 2011).

Recentemente, estudos têm demonstrado que a elevação acentuada do consumo de glicose pelas células tumorais está relacionada à regulação da proliferação celular, o ciclo celular, reparo do DNA e mecanismo de resistência à quimioterapia (VALLEE et al., 2018; SU et al., 2018).

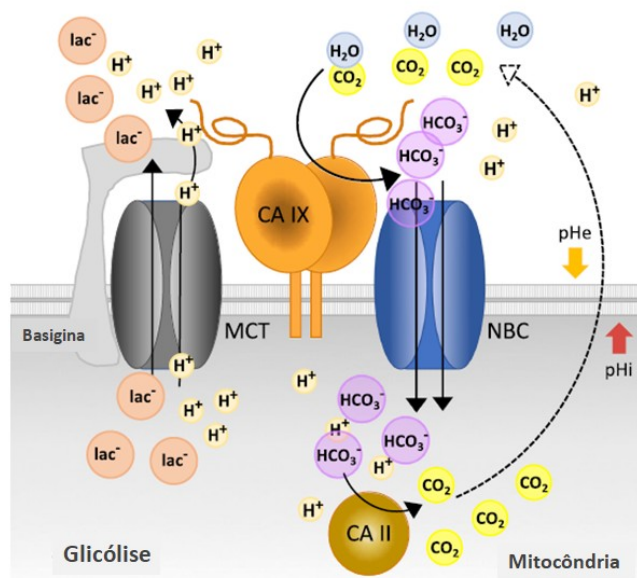
Quando células tumorais metabolizam mais glicose do que o necessário para o suporte bioenergético, parte dessa glicose é convertida em acetil-CoA, substrato essencial para enzimas que acetilam as histonas e outras proteínas. A acetilação da histona aumenta a acessibilidade dos complexos transcricionais ao DNA genômico, permitindo assim a ocorrência da transcrição gênica (CAI et al., 2011). Além disto, a Akt constitutivamente ativada aumenta a acetilação total de histonas, intensificando ainda mais a expressão gênica (LEE et al., 2014). Adicionalmente, muitos genes envolvidos na regulação do metabolismo da glicose contribuem para o reparo do DNA. Mutações no gene que codifica PFKFB3 (6-fosfofruto-2-cinase/frutose-2,6-bisfosfatase 3) aumentam significativamente a glicólise, que por sua vez, aumenta o reparo do dano ao DNA induzido por quimioterapia e/ou radioterapia, contribuindo assim para o surgimento de resistência a terapia. Além disso, o aumento da glicólise induzida pela PFKFB3 ativa à via PI3K/Akt, o que favorece a proliferação e sobrevivência das células tumorais (SHI et al., 2018).

A estabilização do HIF-1 $\alpha$  (fator-1 $\alpha$  induzido por hipóxia) pelo microambiente tumoral em hipóxia aumenta a expressão de piruvato desidrogenase cinase-1 (PDK1) e do transportador monocarboxilato-1 (MCT1) (KIM et al., 2006; PAPANDREOU et al., 2006). Este, por sua vez, facilita o efluxo de lactato para o espaço extracelular, o que contribui para a adaptação metabólica das células proliferativas (WAHLSTROM, HENRIKSSON, 2015; PATE et al., 2014).



A secreção de lactato para o microambiente tumoral através do MCT1 é acoplada ao co-transporte de  $H^+$ , o que contribui para a acidificação do mesmo. Ademais, o dióxido de carbono ( $CO_2$ ) gerado a partir das reações de descarboxilação mitocondrial reforça ainda mais a acidificação do microambiente tumoral. Visto que, o  $CO_2$  é convertido pelas anidrases carbônicas em  $H^+$  e bicarbonato ( $HCO_3^-$ ) (SWIETACH et al., 2007). O microambiente tumoral em estado de hipóxia aumenta a expressão das anidrases carbônicas, em particular a isoforma anidrase carbônica IX (CAIX) (Figura 11) (SVASTOVA et al., 2004).

**Figura 11.** O papel do anidrase carbônica IX (CAIX) na regulação do pH em células tumorais durante hipóxia.



Nota: Onde **MCT**: Transportador monocarboxilato; **NBC**: Transportador de bicarbonato; **CAIX**: Anidrase carbônica IX; **CAII**: Anidrase carbônica II; **pHi**: pH intracelular; **pHe**: pH extracelular; **Fonte**: PASTOREKOVA, GILLIES, 2019.

O aumento da acidificação do microambiente tumoral estimula a atividade proteolítica das metaloproteinases da matriz (MMPs) e das catepsinas, promovendo assim a degradação dos componentes da matriz extracelular e aumentando a invasão tumoral (MARTÍNEZ-ZAGUILÁN et al., 1996; ROTHBERG et al., 2013).

O acúmulo de lactato extracelular também é fundamental para a promoção da angiogênese. Dado que, o lactato promove a estabilização do HIF-1 $\alpha$ , ativa a via PI3K/Akt e o fator de transcrição NF $\kappa$ B, bem como induz a secreção de VEGF (CONSTANT et al., 2000; VÉGRAN et al., 2011; SONVEAUX et al., 2012).

A alta produção de lactato, como consequência da intensa ativação da glicólise aeróbica, contribui ainda com a imunossupressão, culminando na exacerbação da proliferação celular, invasão, migração e resistência à terapia (WANG et al., 2018). Adicionalmente, o metabolismo aberrante da glicose tem sido correlacionado com o mau prognóstico de paciente com câncer (LIN et al., 2019).

Os inibidores metabólicos reduzem os níveis de metabolitos da via glicolítica, via das pentoses e via de biossíntese de nucleotídeos, o que diminui a resistência das células tumorais ao impedir o reparo de danos induzidos ao DNA, aumentando assim a resposta ao quimioterápico e à radioterapia (FURUKAWA et al., 2018). Contudo, embora alguns inibidores metabólicos tenham sido aprovados para uso clínico, a maioria destes inibidores carece de especificidade, além de apresentarem problemas em nível de eficácia (LIN et al., 2019).

#### **1.2.1.8 Correlação entre câncer e Estresse oxidativo - sistema de defesas antioxidantes**

O conceito de "estresse" foi proposto pela primeira vez por Hans Selye em 1936 num estudo que investigava as respostas adaptativas da glândula adrenal (ou glândula suprarrenal) (SELYE, 1936). Em 1976, Hans Selye definiu o estresse como sendo uma resposta inespecífica do corpo a qualquer demanda (SELYE, 1976). Contudo, somente em 1985 foi criado pela primeira vez o conceito de “estresse oxidativo”, sendo este descrito como um distúrbio no equilíbrio pró-oxidante-antioxidante em favor do primeiro (SIES, 1985). Assim, no estresse oxidativo existe um desbalanço entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes. O quadro 01 apresenta as chamadas espécies reativas, ilustrando a enorme gama de reatividade e natureza química das mesmas.

O estresse oxidativo paradoxalmente apresenta dois lados, que compreende: i) o estresse oxidativo mantido em nível fisiológico (*eustresse*) que é crucial para o controle de vários processos biológicos vitais através da sinalização redox; e, ii) o estresse oxidativo em níveis tóxicos (*distress*) que causa danos às biomoléculas, como lipídios, proteínas e o DNA (LUSHCHAK, 2014; SIES, BERNDT, JONES, 2017).

As espécies reativas em elevadas concentrações foram associadas ao surgimento de muitas patologias, como o câncer, distúrbios neurológicos, doenças cardíacas e pulmonares,

dentre outros (ASAMI et al., 1997; DHALLA, TEMSAH, NETTICADAN, 2000; JENNER, 2003).

Geralmente, o estresse oxidativo ocorre principalmente em condições de depleção dos níveis de antioxidantes ou devido ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular (BIRBEN et al., 2012).

**Quadro 01.** Reatividade e natureza química de espécies reativas.

<b>Radicais Livres</b>	<b>Não Radicais</b>
<b>Espécies reativas de oxigênio (EROs)</b>	
Ânion superóxido ( $O_2^{\cdot -}$ )	Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )
Radical hidroxil ( $HO^{\cdot}$ )	Hidroperóxido orgânico (ROOH)
Radical peroxil ( $ROO^{\cdot}$ )	Oxigênio molecular singlete ( $O_2^1\Delta g$ )
Radical alcoxilo ( $RO^{\cdot}$ )	Carbonilo eletronicamente excitado (RCO)
	Ozônio ( $O_3$ )
<b>Espécies reativas de nitrogênio</b>	
Óxido nítrico / monóxido de nitrogênio ( $NO^{\cdot}$ )	Nitrito ( $NO_2^-$ )
	Ânion nitroxil ( $NO^-$ )
Dióxido de nitrogênio ( $NO_2^{\cdot}$ )	Peroxinitrito ( $ONOO^-$ )
	Peroxinitrato ( $O_2NOO^-$ )
	Nitrosoperoxicarbonato ( $ONOOCO_2^-$ )
<b>Espécies reativas de enxofre</b>	
Radical <i>Thiyl</i> ( $RS^{\cdot}$ )	Tiol ( $RSH$ ), tiolato ( $RS^-$ ) [por exemplo, glutathiona ( $GSH$ ), tioredoxina ( $Trx$ )]
	Dissulfeto ( $RSSR$ ) [por exemplo, $GSSG$ e proteína-SSG]
	Sulfenato ( $RSO^-$ )
	Sulfinato ( $RSO_2^-$ )
	Sulfonato ( $RSO_3^-$ )
	Sulfeto de hidrogênio ( $H_2S$ )
	Polissulfeto ( $H_2S_x$ ), $x \geq 2$ ; $RSSH$

Fonte: Adaptado de SIES, BERNDT, JONES, 2017.

As EROs são geradas continuamente por organismos aeróbicos vivos como resultado do metabolismo celular normal. As EROs são moléculas ou íons altamente reativos formados a partir da redução incompleta do oxigênio. Quando em altas concentrações, as EROs podem causar danos a macromoléculas importantes, tais como os carboidratos, ácidos nucleicos, lipídios e proteínas, podendo resultar em alterações estruturais e perda de funções (BIRBEN et al., 2012).

As EROs podem ser classificadas em radicais livres e em espécies reativas não radicalares. Os radicais livres são moléculas contendo um ou mais elétrons desemparelhados em seus orbitais mais externos, o que confere reatividade a tais moléculas e permite a transferência de elétrons para moléculas vizinhas. São exemplos de radicais livres: o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ), radical peroxil ( $ROO^{\bullet}$ ) e o radical alcóxil ( $RO^{\bullet}$ ) (BIRBEN et al., 2012; SIES, BERNDT, JONES, 2017). Em contrapartida, as espécies reativas não radicalares não possuem elétrons livres, sendo assim são quimicamente menos instáveis que os radicais livres, mas também podem reagir com moléculas vizinhas, como exemplo têm-se o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (CAROCHO, FERREIRA, 2013; SIES, BERNDT, JONES, 2017). A tabela 01 apresenta resumidamente as equações das reações químicas das principais espécies reativas endógenas.

**Tabela 01.** As principais espécies reativas endógenas e as respectivas reações químicas.

Oxidante	Equação de Reação
Ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	$NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\bullet-} + H^+$
Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )	$2O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$
	$Hipoxantina + H_2O + O_2 \leftrightarrow xantina + H_2O_2$
	$Xantina + H_2O + O_2 \leftrightarrow \text{ácido úrico} + H_2O_2$
Radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ )	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + HO^{\bullet}$
Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )	$H_2O_2 + Cl^- \rightarrow HOCl + H_2O$
Radical peroxil ( $ROO^{\bullet}$ )	$R^{\bullet} + O_2 \rightarrow ROO^{\bullet}$
Radical hidroperoxil ( $HOO^{\bullet}$ )	$2O_2^{\bullet-} + H_2O \leftrightarrow HOO^{\bullet} + OH^-$

Fonte: Adaptado de BIRBEN et al., 2012.

Dentre as EROs, há um destaque especial para o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BIRBEN et al., 2012). Nota-se que, o

peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) sendo uma espécie reativa não radicalar, reage de forma relativamente lenta com as biomoléculas, enquanto que, o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) sendo radicais livres são notavelmente mais reativos (Tabela 02) (WINTERBOURN, 2013). Por este motivo, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) consegue se difundir do local de sua geração e alcançar um alvo mais reativo a certa distância, ao passo que espécies mais reativas não conseguem. Assim, o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é considerado o principal segundo mensageiro da sinalização redox (RECZEK, CHANDEL, 2015).

**Tabela 02.** Taxa de reatividade de algumas espécies reativas com a metionina. Reação de segunda ordem realizada em água e pH neutro.

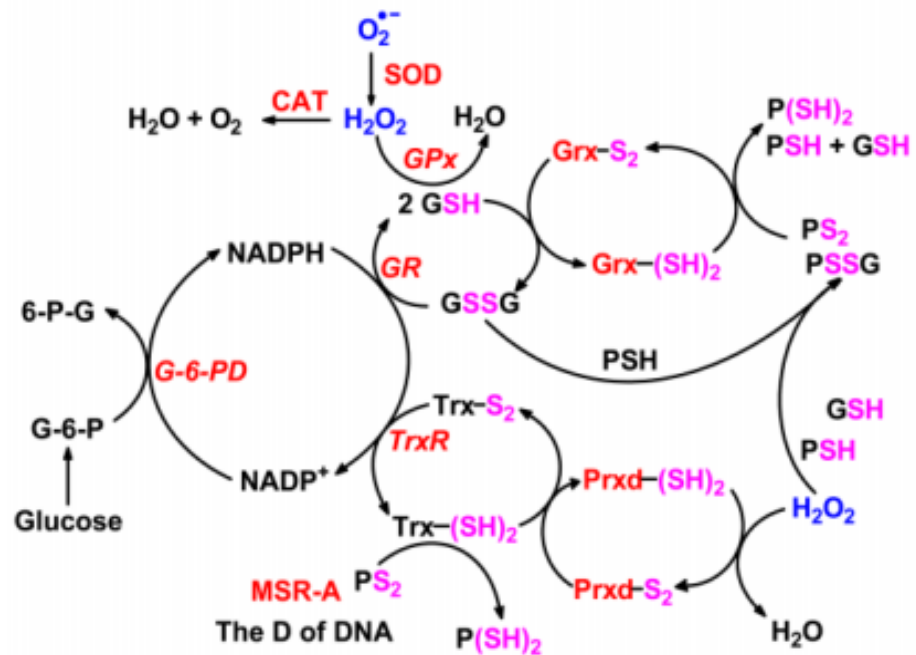
Oxidante	Taxa constante ( $L mol^{-1} s^{-1}$ )
Radical hidroxil ( $HO^{\bullet}$ )	$7 \times 10^9$
Ácido hipocloroso ( $HOCl$ )	$4 \times 10^7$
Ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )	<0,3
Radical peroxil ( $ROO^{\bullet}$ )	$<5 \times 10^{-1}$
Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )	$2 \times 10^{-2}$

Fonte: Adaptado de SIES, BERNDT, JONES, 2017.

Estudos demonstraram uma integração no metabolismo celular frente ao estresse oxidativo em níveis tóxicos. Tal integração visa minimizar a ocorrência de danos às macromoléculas. Para tanto, as células têm sistemas moleculares que incluem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (BIRBEN et al., 2012).

Dentre as enzimas antioxidantes, há um destaque especial para aquelas responsáveis pela remoção do ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e dos peróxidos lipídicos gerados como resultado da peroxidação lipídica de membranas. Neste sistema encontram-se as enzimas catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx), tiorredoxina (Trx), tiorredoxina (TrxR) redutase e peroxirredoxina (tiorredoxina peroxidase, Prxd) (Figura 12) (BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013).

**Figura 12.** Esquema representativo da integração dos sistemas antioxidante enzimático.



Nota: Onde CAT: catalase; GSSG: glutatona dissulfeto; GSH: glutatona reduzida; GR: glutatona redutase; GPx: glutatona peroxidase; PS2: ligação dissulfeto de proteína; Prxd: peroxiredoxina; PSH: proteína reduzida; SOD: superóxido dismutase; TrxR: tiorredoxina redutase; Trx-S2: tiorredoxina-(S-S); Trx-(SH)2: tiorredoxina-(SH)2. Fonte: BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013.

Para a modulação do estresse oxidativo as células também utilizam os antioxidantes não enzimáticos exógenos que incluem compostos de baixo peso molecular, tais como as vitaminas (vitaminas C e E) e o  $\beta$ -caroteno. Além destes, existem os antioxidantes endógenos como o ácido úrico e a glutatona reduzida (GSH), um tripeptídeo (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinil-L-glicina) que contém um grupo tiol (sulfidril, -SH) (BIRBEN et al., 2012; BUETTNER; WAGNER; RODGERS, 2013).

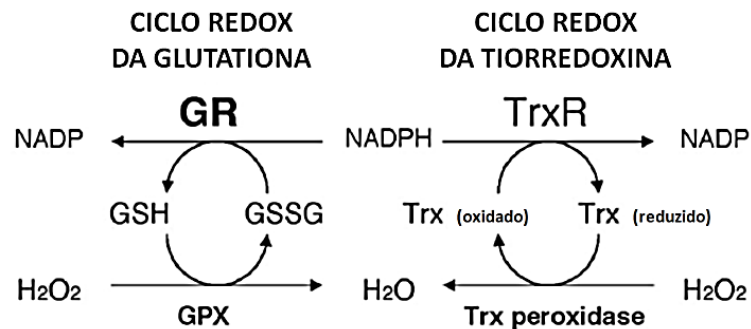
A glutatona reduzida (GSH) é encontrada em altas concentrações em todos os compartimentos celulares, por esta razão é considerada o principal antioxidante solúvel em células normais. De fato, o ciclo redox da glutatona (GSH/GSSG) é considerado como um dos principais reguladores do estresse oxidativo (MASELLA et al., 2005).

A GSH promove a redução de espécies oxidantes, tais como o peróxido de hidrogênio e os peróxidos lipídicos, por meio da ação da enzima glutatona peroxidase (GSH-Px ou GPx). A GSH doa seu elétron para  $H_2O_2$ , reduzindo-o a  $H_2O$  e  $O_2$ , o que leva à formação de sua forma oxidada a glutatona dissulfeto (GSSH). Esta forma, por sua vez, pode ser convertida novamente a GSH pela glutatona redutase (GR). Neste caso, trata-se de uma

reação dependente de NADPH (CHANCE et al., 1979; CURELLO et al., 1985). Adicionalmente, a GSH tem uma ação protetora sobre a membrana celular. Dado que, através da ação da GPx, a GSH doa prótons aos lipídios de membrana, protegendo-os assim de ataques dos oxidantes e, desta forma, impede a peroxidação lipídica (CURELLO et al., 1985).

Além da glutathiona redutase (GR), as enzimas tiorredoxina (Trx), tiorredoxina redutase (TrxR) e peroxirredoxina (Prxd) também requerem o NADPH como equivalente redutor, ou seja, cofator. O NADPH intracelular, por sua vez, é gerado pela redução de  $\text{NADP}^+$  pela glicose-6-fosfato desidrogenase, enzima limitante da velocidade da via das pentoses fosfato. Portanto, a glicose-6-fosfato desidrogenase ao gerar NADPH tornar-se um determinante crítico do ciclo redox da glutathiona (GSH/GSSG) e da atividade das demais enzimas antioxidantes (Figura 13) (DICKINSON, FORMAN, 2002).

**Figura 13.** Modelo dos ciclos redox da glutathiona e tiorredoxina, dependentes de NADPH.



Nota: Onde **GR**: glutathiona redutase; **TrxR**: tiorredoxina redutase; **GPx**: glutathiona peroxidase; **GSSG**: glutathiona oxidada; **GSH**: glutathiona reduzida; e **Trx**: tiorredoxina. **Fonte:** HOJO et al., 2002.

A oxidação do DNA é um dos principais responsáveis pela ocorrência da instabilidade do genoma. Adicionalmente, a hidrólise e a metilação do DNA também contribuem para a instabilidade genômica (SIES, BERNDT, JONES, 2017). Estudos têm demonstrado que altas concentrações de EROs podem induzir: a) a quebra de fita simples ou quebra de dupla fita do DNA; b) modificações nas purinas e pirimidinas; c) a degradação de bases; d) a ocorrência de mutações, deleções e translocações; sendo que a maioria destas modificações do DNA são altamente relevante para o processo de carcinogênese (BIRBEN et al., 2012).

Entre as bases do DNA, a mais suscetível a danos oxidativos é a guanina. A formação de 8-oxo-7,8-di-hidroguanina, também chamada de 8-oxoguanina (8-oxo-G) ou 8-hidroxiguanina (8-OH-G), tem sido considerada como o principal dano mutagênico que

ocorre devido ao estresse oxidativo. Visto que, a 8-OH-G se párea normalmente com a adenina e não com a citosina como ocorre em condições normais durante a replicação do DNA (FREUDENTHAL et al., 2012).

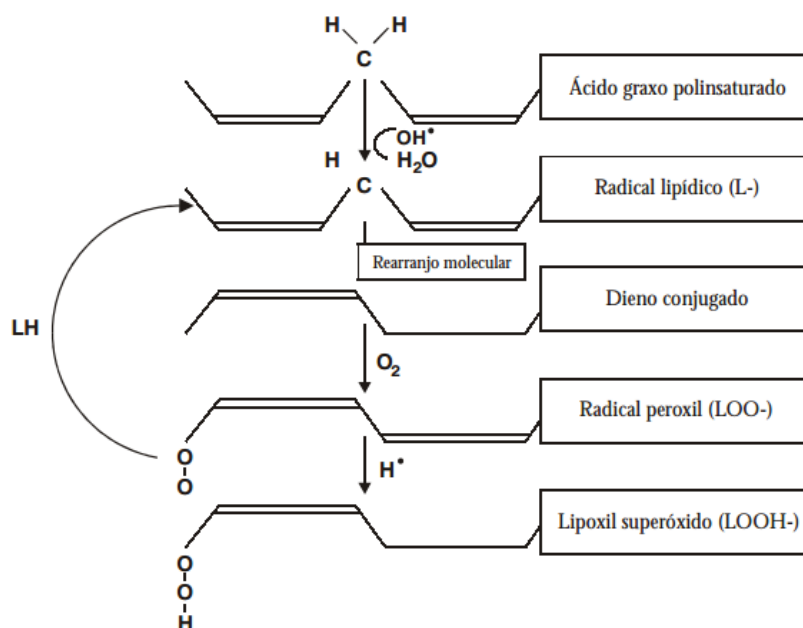
O estresse oxidativo também causa danos aos carboidratos. É importante destacar-se que, a indução de danos oxidativos na estrutura molecular da ribose, um dos constituintes dos ácidos nucleicos, resulta em clivagem/fragmentação do DNA, ou seja, quebras das fitas do DNA (SIES, BERNDT, JONES, 2017).

Ademais, a geração de EROs também pode induzir a peroxidação lipídica/lipoperoxidação, o que leva ao rompimento do arranjo da bicamada lipídica da membrana celular e conseqüentemente pode inativar receptores e enzimas ligados à membrana, para além de aumentar a permeabilidade tecidual (GIROTTI, 1985). Como exemplo de produtos da oxidação de lipídios têm-se os hidroperóxidos lipídicos (LOOH), hidróxidos lipídicos (LOH), epóxidos (incluindo produtos de oxidação do colesterol), isoprostanos e malondialdeído (MDA), dentre outros (NIKI, 2014).

É de conhecimento que, o estresse oxidativo pode causar uma maior quantidade de danos às membranas celulares onde existir uma maior prevalência de ácidos graxos poli-insaturados formando a porção apolar dos fosfolipídios na bicamada lipídica. Visto que, os ácidos graxos poli-insaturados apresentam grupos metilênicos (-CH<sub>2</sub>-) entre as duplas ligações, o que os tornam mais susceptíveis a ataques de oxidantes (Figura 14) (LOUREIRO et al., 2002).



**Figura 14.** Lipoperoxidação de membranas celulares que apresentam maiores quantidade de ácidos graxos poli-insaturados; Reação em cadeia (*beer*).



Fonte: Adaptado de LOUREIRO et al., 2002.

As EROs também podem causar a fragmentação das cadeias polipeptídicas, alterações na carga elétrica das proteínas e oxidação de aminoácidos específicos, aumentando assim a suscetibilidade destes à proteólise. As proteínas que contêm resíduos de cisteína e/ou metionina e as enzimas que têm metais nos seus sítios ativos ou perto dos seus sítios ativos são especialmente mais suscetíveis à oxidação. Como consequência, tais proteínas e enzimas podem sofrer alterações conformacionais, culminando em seu desdobramento (desnaturação), perda de função e degradação (DEAN, ROBERTS, JESSUP, 1985; BIRBEN et al., 2012).

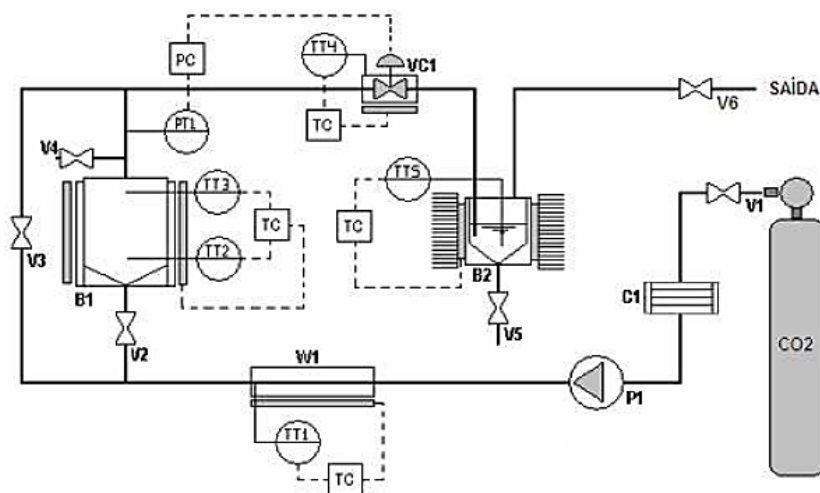
Atualmente, diversos fármacos anticancerígenos têm como estratégia primordial a geração intracelular de EROs acima do limite máximo tolerado pelas células tumorais, o que inevitavelmente leva tais células à morte. Têm-se como exemplo de antitumorais que utilizam o estresse oxidativo como estratégia terapêutica: a bleomicina, doxorubicina, cisplatina e etoposídeo (WONDRAK, 2009).

Curiosamente, muitos compostos considerados como antioxidantes quando usados em altas doses agem como agente pró-oxidante e não como um antioxidante, como é o caso do ascorbato (vitamina C) (RECZEK, CHANDEL, 2015). Portanto, na maioria das vezes o que determina o efeito pró-oxidante ou antioxidante de um composto é a concentração ou dose utilizada.

### 1.3 EXTRAÇÃO COM O FLUIDO SUPERCRÍTICO E SEMENTES DE *PASSIFLORA EDULIS* F. *FLAVICARPA* DEGENER

A extração com fluido supercrítico (ESC) é considerada uma tecnologia de extração verde que se baseia no uso de solventes acima das condições críticas de pressão e temperatura. Nestas condições, os solventes utilizados na ESC ganham características físico-químicas peculiares entre gases e líquidos, transformando-se num fluido supercrítico que possui densidade maior que a dos gases, mas mantêm a viscosidade similar a dos gases e difusividade intermediária (SÁNCHEZ-CAMARGO et al., 2014). A figura 15 representa um diagrama esquemático do processo e equipamento de ESC.

**Figura 15.** Diagrama esquemático do equipamento e processo de extração supercrítica.



Nota: Onde **C1**: Condensador; **P1**: Bomba de alta pressão; **W1**: Pré-aquecedor; **B1**: Vaso de extração; **B2**: Vaso de separação; **VC1**: Válvula de expansão micrométrica; **TC**: Controlador de temperatura; **V1 a V6**: Válvulas;  
**Fonte:** CASSEL et al., 2010.

Apesar de poder empregar-se uma variedade de solventes em condições supercríticas, o dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) é o principal solvente utilizado na ESC. O  $\text{CO}_2$  apresenta algumas vantagens, tais como ser barato e facilmente disponível, não tóxico, não inflamável e explosivo (HERRERO et al., 2015).

O fato do  $\text{CO}_2$  ser considerado um solvente não tóxico permite que o extrato obtido possa ser utilizado sem necessidade de outras etapas de purificação, o que é o oposto da extração com solventes orgânicos (REVERCHON, DE MARCO, 2006). Além do mais, o  $\text{CO}_2$  é reconhecido como seguro pela FDA (*Food and Drug Administration*) e pela EFSA

(*European Food Safety Authority*). De acordo com a pressão e temperatura, o CO<sub>2</sub> apresenta alta difusividade que combinada a sua eficácia de arraste permite a recuperação de analitos mais simples e sem contaminação por solventes orgânicos (HERRERO et al., 2009).

A ESC por utilizar baixas temperaturas e um meio de extração não oxidante (CO<sub>2</sub>) permite a extração de compostos termicamente lábeis e/ou facilmente oxidados, evitando assim a degradação dos mesmos (HERRERO et al., 2009). Levando em consideração a natureza e as propriedades físicas do CO<sub>2</sub> em condições supercríticas, a ESC com CO<sub>2</sub> extrai principalmente compostos não polares, como ácidos graxos, esteróis, carotenóides e tocoferóis (HERRERO et al., 2015).

Contudo, essa técnica também tem sido aplicada na extração de compostos bioativos mais polares, tais como compostos fenólicos (SANJAYA et al., 2014) e alguns alcaloides (XIAO et al., 2010). Porém nesse caso, é inevitável o uso de pequenas quantidades de modificadores de polaridade orgânicos (co-solventes) que alteram a polaridade do fluido supercrítico e aumentam o seu poder de solvatação para obter o analito de interesse. O etanol e a mistura etanol/água são exemplos de co-solventes frequentemente utilizados nesse tipo de extração (HERRERO et al., 2009-2015).

Portanto, a ESC é limitada principalmente pela solubilidade dos compostos-alvo no solvente. Contudo, os mecanismos de transferência de massa e o local onde o analito de interesse está localizado na matéria-prima também são de extrema importância (REVERCHON, DE MARCO, 2006). Neste sentido a ESC é uma alternativa valiosa para as técnicas de extração convencionais, tendo em consideração todas as vantagens apresentadas pela própria técnica, principalmente a alta seletividade e pureza, além da economia de tempo e de solventes, para além de possibilitar a análise de pequenas quantidades de material vegetal (MICIE et al., 2011).

A ESC tem sido amplamente utilizada para o reaproveitamento de subprodutos da indústria alimentícia que normalmente não têm qualquer valor comercial. Como é o caso das sementes do maracujá-amarelo pertencentes à espécie *Passiflora edulis* forma *flavicarpa* Degener (*P. edulis*), gênero *Passiflora* e família *Passifloraceae*. Sendo assim, a ESC tem sido usada com sucesso na recuperação e concentração de compostos de alto valor agregado extraídos a partir das sementes de maracujá (VIGAN et al., 2016).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) são cultivadas cerca de 700 toneladas de maracujá-amarelo por ano no Brasil, sendo este usado principalmente na

produção industrial de suco e adoçantes, o que gera uma grande quantidade de subprodutos/resíduos, incluindo as sementes (DOS SANTOS et al., 2019).

As sementes de *P. edulis* são fontes promissoras de óleos vegetais constituídos principalmente de triacilgliceróis (ácidos graxos) e fitocompostos lipossolúveis, sendo que, os ácidos oleico (C18:1) e linoleico (C18:2) são geralmente os principais ácidos graxos encontrados em tais sementes (ORSAVOVA et al., 2015). Adicionalmente, outros estudos também reportaram a presença dos ácidos láurico (C12:0), mirístico (C14:0), palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1), esteárico (C18:0) e  $\alpha$ -linolênico (C18:3), entre outros. Nota-se que, com exceção do ácido láurico (cadeia média) os demais ácidos graxos são de cadeia longa (BARRALES, REZENDE, MARTÍNEZ, 2015; KADOCHI et al., 2017). Dado que, os ácidos graxos são classificados de acordo com o número de átomos de carbono. Os ácidos graxos de cadeia curta contêm de 4 a 6 carbonos, os ácidos graxos de cadeia média de 8 a 12 carbonos, os ácidos graxos de cadeia longa de 14 a 18 carbonos e por fim, os ácidos graxos de cadeia muito longa são ácidos graxos com mais de 20 átomos de carbono (AKOH, MIN, 2008).

Além disso, os ácidos graxos também podem ser classificados de acordo com a presença e o número de ligações duplas em sua cadeia de carbono, sendo assim classificados como saturados ou insaturados. Os ácidos graxos saturados apresentam somente ligações simples entre os átomos de carbono, enquanto que, os ácidos graxos insaturados possuem duplas ligações entre os átomos de carbono e são subdivididos em: i) ácidos graxos monoinsaturados, que possuem uma única ligação dupla; e ii) ácidos graxos poli-insaturados, que contêm mais de uma ligação dupla (AKOH, MIN, 2008).

Os ácidos graxos saturados e os monoinsaturados são sintetizados endogenamente a partir de acetil-CoA, enquanto que, os ácidos graxos poli-insaturados são necessariamente obtidos da dieta, sendo assim considerados ácidos graxos essenciais, uma vez que não podem ser sintetizados pelos humanos (DIERGE, FERON, 2019).

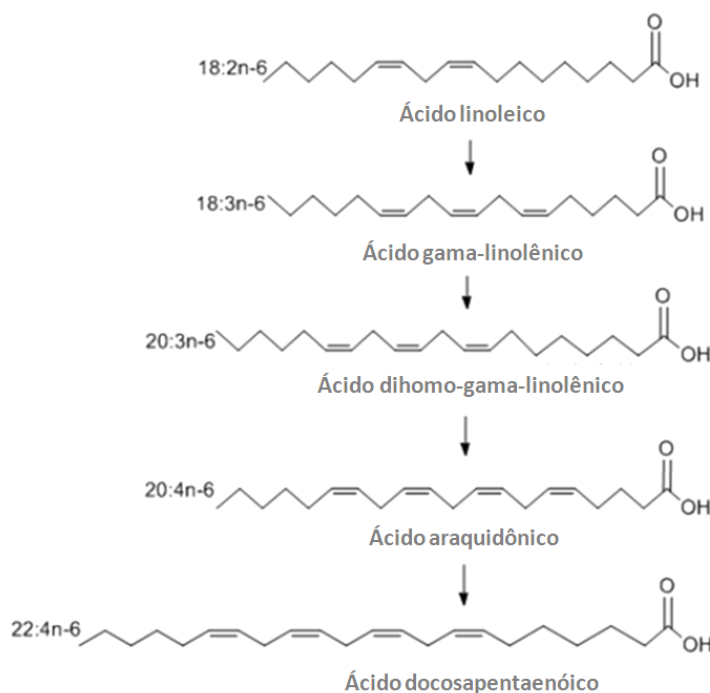
Nos últimos anos, os ácidos graxos têm despertado a atenção dos pesquisadores. Visto que, estes além de serem um dos componentes de membrana, participam do metabolismo energético e são precursores de várias moléculas de sinalização (DIERGE, FERON, 2019). Além disso, é importante destacar que inúmeros estudos têm apontado diversos efeitos biológicos dos ácidos graxos, por exemplo, o ácido láurico e o ácido palmítico apresentam atividade antitumoral (ENGELBRECHT et al., 2008; TAKAYAMA et al., 2009; KADOCHI et al., 2017).

Segundo Lappano e colaboradores (2017), o ácido láurico apresenta atividade antiproliferativa e pró-apoptótica contra células de câncer de mama (SkBr3) e células de câncer de endométrio, uma vez que o ácido láurico induziu nestas células a geração de EROs, além de regular positivamente o inibidor de cinase dependente de ciclina p21<sup>Cip1/WAF1</sup>. Este estudo confirmou os resultados reportados por Fauser e colaboradores (2013), onde demonstraram que o ácido láurico também aumentou significativamente as EROs, causou a parada do ciclo celular nas fases S e G2/M e induziu a apoptose em células de câncer de colón (Caco-2) e de intestino delgado (IEC-6).

O ácido palmítico inibiu a proliferação celular de maneira dose-dependente e induziu a apoptose em células MDA-MB-231 ao diminuir a atividade de fosfatidilinositol 3-cinase (PI3-K) (HARDY, LANGELIER, PRENTKI, 2000). Adicionalmente, estudo realizado em células de carcinoma do cólon humano (HCT116) demonstrou que o ácido palmítico teve a capacidade de induzir a geração de EROs e ativar a p53 de maneira dose-tempo-dependente, o que culminou no aumento da expressão de p21 e Sesn2. O p21 contribuiu para a parada do ciclo celular, enquanto que, o Sesn2, mesmo funcionando como um fator antioxidante em resposta as EROs induzidas pelo ácido palmítico, não conseguiu impedir que as células entrassem em morte celular por apoptose e houvesse fragmentação de DNA (YU, QIAN, 2014).

O ácido  $\alpha$ -linolênico [C18:3 ( $\omega$ -3)] e o ácido linoleico [C18:2 ( $\omega$ -6)] são considerados ácidos graxos poli-insaturados essenciais. Visto que, a enzima *delta-6 desaturase* (D6D), que adiciona a ligação dupla na posição n-3 ou n-6 desses ácidos graxos, está ausente nos mamíferos. Ademais, os ácidos  $\alpha$ -linolênico e linoleico não são interconversíveis entre si. No entanto, ao longo do processo de metabolismo do ácido linoleico as enzimas *elongase*, *delta-5 desaturase* (D5D) e *delta-6 desaturase* (D6D) são responsáveis pelas reações sequencias que introduzem as ligações duplas e estendem a cadeia de carbono, convertendo o ácido linoleico em ácido  $\gamma$ -linolênico [C18:3 ( $\omega$ -6)] e ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico; em seguida estes são convertidos em ácido araquidônico e ácido docosapentaenóico (Figura 16). Ao passo que, o ácido  $\alpha$ -linolênico é convertido nos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) (DIERGE, FERON, 2019).

**Figura 16.** Esquema representativo da biossíntese dos ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -6s).



**Fonte:** Adaptado de DIERGE, FERON, 2019.

Estudos têm relatado os efeitos benéficos dos ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico na saúde humana, com destaque especial para o efeito antitumoral. De acordo com Chamras e colaboradores (2002), estes dois ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -3s) inibiram significativamente a proliferação de células MCF-7 através da modulação dos processos celulares envolvidos no crescimento e diferenciação celular. Adicionalmente, tais ácidos graxos demonstraram ter um potencial efeito imunomodulatório. Dado que, o tratamento com os ácidos eicosapentaenóico e docosahexaenóico realizado em camundongos inoculados com células de câncer de próstata culminou na diminuição do número de macrófagos associados ao tumor (tipo M2) presentes no tecido tumoral. Além disso, a expressão gênica de marcadores de M2 nos macrófagos isolados também foi reduzida (LIANG et al., 2019).

Evidências crescentes sugerem que, os ácidos linoleico,  $\gamma$ -linolênico e dihomo- $\gamma$ -linolênico possuem certa atividade antitumoral, sendo capazes de induzir a morte celular por apoptose e inibir a proliferação celular. Portanto, estes ácidos graxos podem ser considerados uma fonte alimentar promissora para a prevenção e terapia do câncer (YU, QIAN, 2014). No entanto, os ácidos linoleico,  $\gamma$ -linolênico e dihomo- $\gamma$ -linolênico são efetivamente convertidos em ácido araquidônico por uma série de enzimas do metabolismo de ácidos graxos (DIERGE,

FERON, 2019); e estudos têm correlacionado o ácido araquidônico à promoção tumoral (YU, QIAN, 2014).

Portanto, uma possível estratégia eficaz para desencadear a atividade antitumoral do ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico seria impedir a conversão deste em ácido araquidônico. Sendo assim, o controle do metabolismo de ácidos graxos favorecendo a síntese dos ácidos  $\gamma$ -linolênico e dihomo- $\gamma$ -linolênico e limitando a geração de ácido araquidônico, tornar-se-ia crucial. Dessa forma, segundo Yu e Qian (2014), a regulação da atividade da enzima D5D com o intuito de favorecer a síntese e acúmulo do ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico seria uma estratégia terapêutica bastante promissora.

Paradoxalmente, há evidências na literatura que relatam o efeito citotóxico e antiproliferativo do ácido araquidônico, onde este foi citotóxico e pôde inibir a proliferação de células de câncer de mama (MCF-7) e células de carcinoma cervical humano (KB-3-1 e KB-Ch (R) -8-5) (CHAMRAS et al., 2002; DAS, MADHAVI, 2011).

Por meio de uma peroxidação lipídica mediada por radicais livres, as cicloxigenases (COXs) catalizam uma série de reações que convertem os ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -6s) em dois tipos de prostaglandinas, as da série 1 e 2. Estes, por sua vez, possuem inúmeras atividades biológicas. Diversos estudos têm proposto que os ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -6s) são capazes de regular a proliferação e crescimento de células tumorais, dependendo do nível de COX (YU, QIAN, 2014). Tendo como exemplo, o ácido linoleico e o ácido araquidônico, os quais diminuíram de maneira dose-dependente a proliferação celular em linhagens de células que supreeexpressam a COX (por exemplo, células Caco), enquanto que, não possuíram efeito em células com baixa expressão desta enzima (por exemplo, HT-29) (DOMMELS et al., 2003).

Além das prostaglandinas, uma série de metabolitos intermediários reativos derivados do ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico é gerada durante a peroxidação lipídica catalisada por COX. Evidências indicam que estes metabolitos reativos, de certa forma, são responsáveis pela atividade antitumoral dos ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -6s) (YU et al., 2009; GU et al., 2013). Segundo Xu e colaboradores (2014), os metabolitos reativos gerados a partir do ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico provocaram a inibição da proliferação e crescimento celular por meio do bloqueio do ciclo celular e indução de apoptose em células de câncer de cólon humano (HCA-7). Assim, este trabalho forneceu pela primeira vez evidências de que os metabolitos reativos derivados do ácido dihomo- $\gamma$ -linolênico sejam muito provavelmente os principais responsáveis pela atividade antitumoral dos ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -6s).

Estes metabolitos reativos contribuem muito mais que as prostaglandinas para a atividade antitumoral dos ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -6s) (YU, QIAN, 2014).

Evidências têm demonstrado que, o ácido  $\gamma$ -linolênico exibe atividade antitumoral, tanto *in vitro* como *in vivo*. O ácido  $\gamma$ -linolênico demonstrou ser citotóxico e altamente seletivo para as células tumorais, incluindo as células de câncer de mama humano (ZR-75-1), câncer de pulmão (A549) e câncer de próstata (PC-3). Em contrapartida, pouco afetou a proliferação das células normais (fibroblastos humanos) (BEGIN et al., 1986).

Além dos ácidos graxos, há relatos da presença de esteróis, compostos fenólicos, carotenóides e tocoferóis nas sementes de *P. edulis* (PIOMBO et al., 2006; DE SANTANA et al., 2015), sendo estes também citados na literatura como compostos bioativos com atividade antioxidante, antiproliferativa e antitumoral (DE NEIRA, 2003; ROWE et al., 2004). Adicionalmente, os carotenoides, principalmente do tipo  $\beta$ -caroteno (precursor essencial do retinol e da vitamina A), ativam o sistema imunológico (LAI et al., 2014).

Em vista disso, o uso da ESC com o intuito de extrair compostos de interesse, que apresentam atividade farmacológica importante, pode ser uma forma eficiente de se utilizar as sementes do maracujá-amarelo desperdiçadas durante as atividades industriais (HERRERO et al., 2009; MATSUI et al., 2010).

Todavia, é importante notar-se que várias partes da *P. edulis* são biologicamente ativas onde o extrato do fruto tem demonstrado atividade anti-inflamatória, antitumoral, citotóxica, antiproliferativa, antioxidante, antimicrobiana, antiviral, antifúngica, anti-hipertensiva, hipoglicêmica, hipolipidêmica, hipocolesterolêmica, cicatrizante, anticoagulante, ansiolítica, anticonvulsivante, sedativa, hipnótica, antidepressiva, antiespasmática e antitussígena (MONTANHER et al., 2007; LAM, NG, 2009; INGALE, HIVRALE, 2010; MATSUI et al., 2010; DEVAKI et al., 2011; SATO et al., 2012).

#### 1.4 ALCALOIDES $\beta$ -CARBOLÍNICOS

Nas últimas décadas, muitos estudos têm-se focado em identificar e investigar os efeitos biológicos e farmacológicos de compostos biologicamente ativos encontrados em plantas medicinais. Neste contexto, os alcaloides têm sido relatados como um dos principais grupos de fitocompostos obtidos de fontes naturais (BOUAYAD et al., 2011). Os alcaloides são compostos naturais nitrogenados de caráter básico, farmacologicamente ativos,



classificados de acordo com as vias biossintéticas e estruturas químicas. Estes podem ser classificados em alcaloides esteróidais, indólicos, aporfínicos, tropânicos e isoquinolínicos, entre outros. Destacando-se que, a estrutura química basicamente determina a atividade biológica desses compostos (LU et al., 2013).

Os alcaloides da Vinca, vincristina e vimblastina, derivados de vinca rosea - *Catharanthus roseus*, são dois bons exemplos de compostos alcaloides com propriedades antineoplásicas utilizados amplamente na prática clínica (NOBLE, BEER, CUTTS, 1958; SHAMS et al., 2009). Tanto a vincristina quanto a vimblastina são normalmente utilizadas em terapia combinada com outros quimioterápicos para o tratamento de vários tipos de câncer. Assim, a vincristina é usada no tratamento de alguns mielomas, linfomas e leucemias (SAJJAD, 2012), enquanto que, a vimblastina é usada no tratamento do câncer de mama (OSPOVAT, 2009) e do linfoma de Hodgkin (SOUZA et al., 2010).

As  $\beta$ -carbolinas pertencem ao grupo dos alcaloides indólicos, que além de apresentarem um núcleo indólico, possuem um anel piridínico (PIECHOWSKA, ZAWIRSKA-WOJTASIAK, MILDNER-SZKUDLARZ, 2019). Os primeiros alcaloides indólicos foram descobertos e identificados a partir de sementes de *Peganum harmala* e foram denominados como alcaloides indólicos de harmala, sendo estes a harmalina, harmano, harmol, harmalol, harmina e harmalano. Adicionalmente também foram identificados os alcaloides quinazolínicos, incluindo vasicina e desoxvasicina (DIWAN, 2013). Estudos relatam que, os alcaloides da semente de *Peganum harmala* apresentam diferentes tipos de atividades farmacológicas, tais como a atividade antibacteriana, antiparasitária e antitumoral (ZAKER, ODY, ARJMAND, 2008; DIWAN, 2013).

Os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos são caracterizados por apresentarem ampla atividade biológica, possuindo propriedades farmacológicas importantes. Inicialmente, inúmeros pesquisadores investigaram os efeitos dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos no sistema nervoso central. No entanto, recentemente o interesse nestes alcaloides e seus derivados têm-se focado majoritariamente nas demais atividades biológicas, nomeadamente as atividades antimicrobiana, antiparasitária, antiviral e antitumoral, entre outras (ZHENG et al., 2000; BOUAYAD et al., 2011).

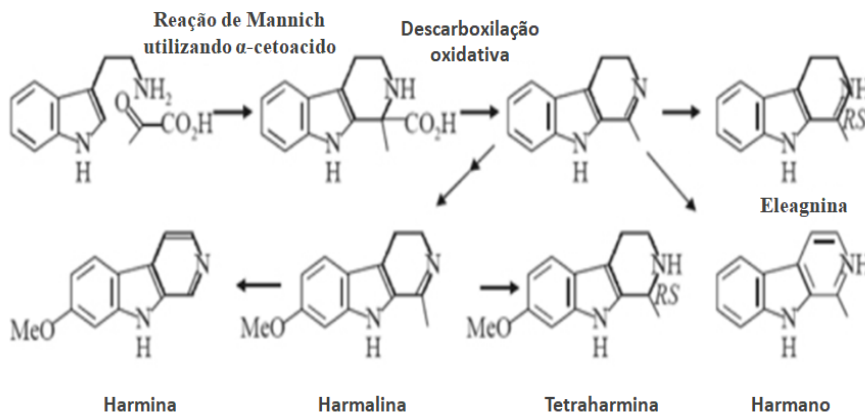
Contudo é importante ressaltar que, os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos exibem efeitos psicofarmacológicos pela ligação a receptores de benzodiazepínicos, imidazolina, serotonina e opiáceos, bem como pela inibição das monoamina oxidases (MAO) (GLENNON et al., 2000; HERRAIZ et al., 2010). Além do mais, alguns alcaloides  $\beta$ -carbolínicos facilitam a

transmissão dopaminérgica e interagem com os receptores dopaminérgicos D1 e D2 no estriado (FARZIN et al., 2011).

Os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos possuem uma distribuição bastante diversificada. São encontrados principalmente em plantas das famílias Zygophyllaceae, Malpighiaceae, Passifloraceae, Leguminosae, Myristicaceae e Elaeagnaceae (TSUCHIYA, SHIMIZU, IINUMA, 1999). Nota-se que, tanto na *Passiflora incarnata L.* e como na *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener foram verificadas a presença de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos, mais especificamente o harmano, harmina, harmol e harmalina. Estes alcaloides foram encontrados em todas as partes da planta, exceto nas raízes (DHAWAN, DHAWAN, SHARMA, 2004; ZERAIK et al., 2010).

Nos vegetais, a biossíntese dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos se dá pela via do chiquimato (forma aniônica do ácido chiquímico), em que o chiquímico é gerado a partir dos precursores fosfoenolpiruvato e eritrose-4-fosfato derivados da glicólise e da via das pentoses fosfato (NIKAM, NITNAWARE, AHIRE, 2013). O chiquimato, por sua vez, é convertido no aminoácido aromático triptofano, que é descarboxilado e convertido em triptamina. Por intermédio da reação de Mannich, a triptamina sofre uma reação de condensação com aldeído ou  $\alpha$ -cetoácido, gerando o intermediário 1-metil-1,2,3,4-tetraidro- $\beta$ -carbolina-1-ácido carboxílico. Em seguida, este aminoácido sofre uma reação de descarboxilação, originando o harmalano, o precursor direto dos alcaloides harmalina, harmano, eleagnina (tetrahidroharmano). Por fim, a harmalina pode ser convertida em harmina e tetrahidroharmina (Figura 17) (HUSSON, 1985; NIKAM, NITNAWARE, AHIRE, 2013).

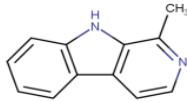
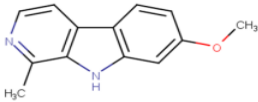
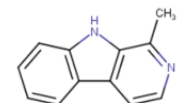
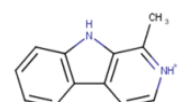
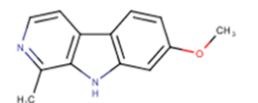
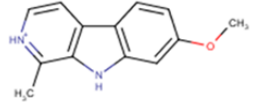
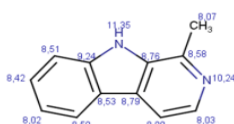
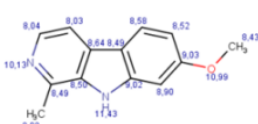
**Figura 17.** Principais etapas da biossíntese dos alcaloides  $\beta$ -carbólicos - Reação de Mannich.



**Fonte:** Adaptado de HUSSON, 1985.

Os alcaloides  $\beta$ -carbólicos, testados no presente estudo, harmano e harmina são constituídos pelo sistema tricíclico pirido (3,4-b) indol, que consiste nos anéis de benzeno, pirrol e piridina. Ambos apresentam uma metila na posição 1 e apenas se diferem, uma da outra, devido a presença de um grupo metóxi na posição 7 da harmina (ZHENG et al., 2000). As propriedades físico-químicas de harmano e harmina estão apresentadas no quadro 02.

**Quadro 02.** Propriedades físico-químicas dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina.

Composto	Harmano	Harmina
Estrutura química		
Nome IUPAC	1-metil-9H-pirido [3,4-b] indol	7-metoxi-1-metil-9H-pirido [3,4-b] indol
Fórmula molecular	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O
Peso molecular	182,23 g/mol	212,25 g/mol
Log P	2,00	1,85
Log D	1,99	1,82
Equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB)	4,21	5,84
Solubilidade (LogS)	-2,99	-3,02
Tautômeros	Distribuição: 96%  Distribuição: 4% 	Distribuição: 95%  Distribuição: 5% 
Área de superfície polar	28,68	37,91
Interações de Hidrogênio	Doador = 1 Aceptor = 1	Doador = 1 Aceptor = 2
Área de superfície de Van der Waals	263,08	311,13
Polarizabilidade molecular	24,11	26,53
Eletronegatividade orbital		

Fonte: MarvinSketch 18.16

Estudos realizados ao longo dos anos demonstraram que, os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos, harmano e harmina, apresentam vários efeitos farmacológicos, tais como anti-inflamatório, antimicrobiano, antiparasitário, antifúngico, antiplasmodial, antiviral,

antioxidante, citotóxico e antitumoral (ZAKER, OODY, ARJMAND, 2007; PATEL et al., 2012; LI et al., 2016; ZHANG et al., 2016).

Outros estudos demonstraram que, mais especificamente a harmina apresenta atividade contra *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* através de mecanismos que envolvem a fragmentação do DNA, alteração do potencial da membrana mitocondrial, inibição da biossíntese de proteínas e polimerização de microtúbulos, além de afetar a fluidez das membranas (ABE et al., 2002; ROSENKRANZ, WINK, 2008). Ademais, a harmina apresentou atividade anti-inflamatória por inibir a expressão do TNF $\alpha$  e suprimir a produção de interleucina-6 (YAMAZAKI, KAWANO, 2011).

A harmina também possui atividade antidepressiva e ansiolítica por inibir as monoamina oxidases (MAO) e por atuar como agonista dos receptores de serotonina (5-hidroxitriptamina receptor 2A, 5-HT<sub>2A</sub>) e imidazolina (I1 e I2) (GLENNON et al., 2000; RÉUS et al., 2010-2012). Ademais, a harmina é um potente inibidor da cinase de dupla-especificidade regulada via fosforilação da tirosina (DYRK), o que demonstra uma atividade anti-Alzheimer para este alcaloide (FROST et al., 2011; FILALI et al., 2014).

Estudos *in vitro* demonstraram que, os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos são agentes intercaladores de DNA, pois estes apresentam características estruturais essenciais (pequeno, planar e aromático) que proporcionam a sua intercalação entre os pares de bases do DNA e consequentemente induzem a fragmentação dessa macromolécula (ROBERTS, WINK, 1998; BOEIRA et al., 2002; WINK, 2007). Diferentes tipos de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos apresentam variação na afinidade deste de se ligar ao DNA; e estão na ordem de harmina > harmalol > harmalina > harmano (NAFISI et al., 2010). Além disso, a harmina, harmalina e harmano inibem direta ou indiretamente o reparo de excisão de base (BER), o que leva a alteração na replicação do DNA e na atividade das proteínas envolvidas nos processos de reparo do DNA (REMSSEN, CERUTTI, 1979). Adicionalmente, o harmano e a harmina inibem a atividade das topoisomerasas e telomerasas, o que contribui de certa forma para a atividade citotóxica e antiproliferativa exibida por esses dois alcaloides em estudos realizados com células tumorais (SOBHANI, EBRAHIMI, MAHMOUDIAN, 2002, SONG et al., 2004; ZHAO, WINK, 2013).

Por outro lado, dependendo do tipo de dano induzido às macromoléculas e do tipo de células, os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos podem induzir a apoptose tanto pela via intrínseca como pela via extrínseca, o que contribui para a inibição do crescimento e progressão tumoral (HAMSA, KUTTAN, 2011; ZHANG et al., 2015).

Nos últimos anos, os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos têm despertado a atenção dos pesquisadores por causa de sua atividade antiangiogênica. Estudo *in vivo* realizado em camundongos C57BL/6 inoculados com as células de melanoma B16F-10 (que induzem angiogênese) demonstrou que a harmina apresenta uma forte atividade antiangiogênica. Visto que, a harmina diminuiu significativamente os fatores pró-angiogênicos, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias. Em contrapartida, a harmina aumentou os fatores antitumorais interleucina-2 (IL-2) e o inibidor tecidual de metaloproteinase (*tissue inhibitor metalloprotease* - TIMP). Além disso, os fatores de transcrição NF $\kappa$ B, CREB, ATF-2 (*activating transcription factor 2*) que estão envolvidos na progressão tumoral e angiogênese também foram inibidos pela harmina (HAMSA, KUTTAN 2010).

Posto isso, ainda assim, os mecanismos de ação responsáveis pelos efeitos antitumorais dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos (harmano e harmina) não estão totalmente elucidados. Sendo assim, é necessário investigar mais detalhadamente estes dois alcaloides, podendo estes virem a ser possíveis promissores compostos líder com atividade tumoral usados na clínica como coadjuvante na terapia do câncer.

## 1.5 DOCKING E DINAMICA MOLECULAR

O uso de estudos *in silico* permite a triagem virtual de milhões de compostos em um curto período de tempo, reduzindo assim os custos iniciais da identificação de compostos-protótipos (compostos-líder), além de aumentar as chances de encontrar possíveis promissores compostos com atividade farmacológica de interesse. Atualmente, inúmeras técnicas de modelagem molecular visando facilitar o processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos já são conhecidas, sendo estas classificadas em abordagens baseadas em estrutura de biomoléculas e abordagens baseadas em ligantes (PINZI, RASTELLI, 2019).

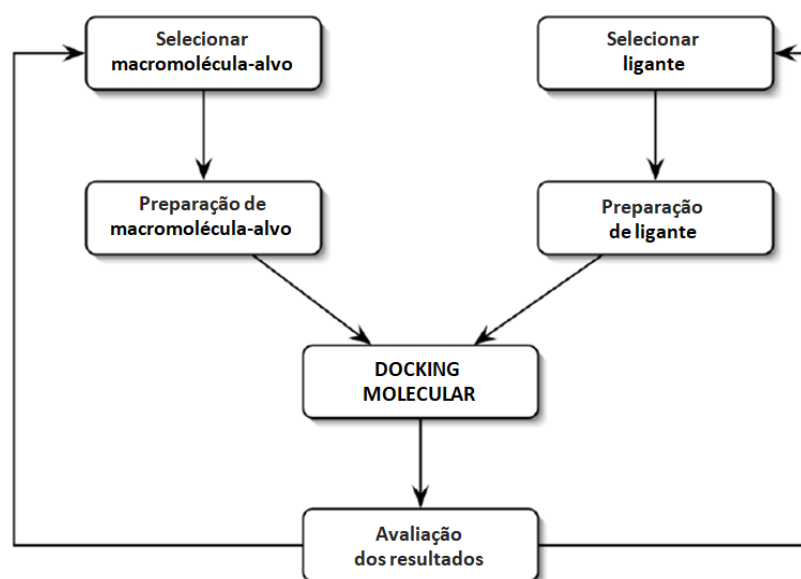
O *docking*/ancoragem molecular é um dos principais métodos *in silico* baseados em estruturas e tornou-se uma etapa imprescindível no desenvolvimento de novos fármacos através da identificação de potenciais novos compostos-líder de interesse terapêutico (PINZI, RASTELLI, 2019). Embora tenha sido originalmente desenvolvido devido à carência de informações mais concisas em relação à biologia molecular estrutural que viesse ajudar a elucidar os mecanismos de reconhecimento molecular entre pequenas moléculas e

macromoléculas, os usos e aplicações da ancoragem molecular no desenvolvimento de fármacos mudaram bastante ao longo dos anos (HENDLICH, 1998; BERMAN et al., 2000).

A evolução do mundo tecnológico computacional e a crescente facilidade de acesso a bancos de dados de pequenas moléculas e proteínas impulsionaram ainda mais o uso da ancoragem molecular (MORRIS, LIM-WILBY, 2018). Atualmente, a ancoragem molecular tem uma ampla variedade de usos e aplicações na descoberta e desenvolvimento de fármacos, tais como nos estudos de relação estrutura-atividade (SAR), identificação e otimização de moléculas ou composto-líder, reposicionamento de fármacos, identificação de alvos a posteriori (reverse screening) e design de ligante multialvo (KINNINGS et al., 2009; LEE, LEE, KIM, 2016; MORRIS, LIM-WILBY, 2018). Adicionalmente, a ancoragem molecular propicia uma melhor compreensão em relação aos diferentes alvos moleculares envolvidos numa determinada doença, o que também é crucial para a farmacologia e o desenvolvimento de fármacos em geral (ANIGHORO, BAJORATH, RASTELLI, 2014).

Geralmente, a ancoragem molecular é realizada entre uma pequena molécula (ligante) e uma macromolécula-alvo; e tem como objetivo predisser/prever com precisão a interação/ligação mais favorável (de menor energia) entre o composto químico ligante e a macromolécula-alvo, além de estimar corretamente a força de ligação, levando em consideração os prováveis modos de ligação (ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas, interação de van der Waals, dentre outras) e a afinidade de ligação (WASZKOWYCZ, CLARK, GANCIA, 2011; MORRIS, LIM-WILBY, 2018). A figura 18 apresenta um fluxograma com as etapas gerais do procedimento de ancoragem molecular entre composto químico ligante e a macromolécula-alvo.

**Figura 18.** Fluxograma de ensaio de ancoragem molecular.



**Fonte:** Adaptado de MORRIS, LIM-WILBY, 2018.

De fato, algumas bases de dados de acesso livre fornecem as estruturas de macromoléculas previamente depositadas nas mesmas. Entre estas se destacam a RCSB Protein Data Bank (PDB) (BERMAN et al., 2000) e/ou na *Word ide Protein Data Bank* (pRb) (BERMAN et al., 2007; BERMAN; BURLEY; KLEYWEGT, 2016) e a *UniProt Knowledgebase* (UniProtKB) (HOLLIDAY et al. 2015; THE UNIPROT CONSORTIUM, 2017).

Os dados físico-químicos de fármacos e compostos (naturais ou sintéticos) podem ser obtidos a partir de bases de dados de livre acesso como PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>); ZINC.docking.org (<http://zinc.docking.org>) (IRWIN et al., 2012; STERLING, IRWIN, 2015); DrugBank (<http://www.drugbank.ca>) (WISHART et al., 2018) e Base de dados Integrity da Clarivate com acesso através do portal CAPES (<https://integrity-clarivate.ez46.periodicos.capes.gov.br>). Além disto, informações estruturais dos ligantes também podem encontradas nas bases de dados PDB e ChEMBL Database (Chemical Biology) (compound report card) ([https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound\\_report\\_card](https://www.ebi.ac.uk/chembl/compound_report_card)).

Em relação aos programas de simulação de ancoragem molecular mais frequentemente utilizados têm-se: a) AutoDock (GOODSELL, OLSON, 1990; MORRIS et al., 1998) <http://autodock.scripps.edu>; b) DOCK (KUNTZ, 1982; EWING, KUNTZ, 1997) <http://dock.compbio.ucsf.edu/>; c) FlexX (RAREY et al., 1996)



<http://www.biosolveit.de/FlexX>; d) GOLD (JONES et al., 1997) [http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life\\_sciences/gold/](http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/gold/); e, e) ICM (ABAGYAN, TOTROV, KUZNETZOV, 1994) <http://www.molsoft.com/docking.html>.

É importante destacar que, os dados teóricos gerados a partir da ancoragem molecular devem ser complementados com a dinâmica molecular, a fim de validar e refinar ainda mais os resultados/dados obtidos a partir dos complexos modelados *in silico* durante a ancoragem molecular (SALMASO, MORO, 2018). Segundo Sant'Anna (2002), as simulações de dinâmica molecular são procedimentos de simulação computacional do movimento de átomos de uma molécula ou de moléculas em meio líquido onde devem ser consideradas as leis de movimento de Newton aplicando campos de força que permitam efetuar cálculos das forças atuantes.

Geralmente, a dinâmica molecular explora os mecanismos pelos quais a molécula ligante interage com as macromoléculas (FRENKEL, SMIT, 2001). Por outro lado, sabe-se que tendo conhecimento da posição do ligante dentro do *pocket* da macromolécula-alvo é possível investigar-se através da dinâmica molecular o processo reverso a ancoragem, processo este denominado de desacoplamento do ligante (DE VIVO, CAVALLI, 2017).

Durante as simulações de dinâmica molecular, as metodologias e os procedimentos realizados normalmente levam em consideração quatro principais fatores: a) a flexibilidade total da macromolécula-alvo, que é livre para se mover durante a simulação; b) a solvatação completa da molécula ligante, que é essencial para avaliar as interações mediadas pela água que ocorrem durante a ancoragem do ligante; c) a temperatura do sistema, que normalmente é mantida em 37°C; e, por fim, d) a imagem em nível atômico da ancoragem e desacoplamento do ligante, o que permite revelar as interações transitórias entre o ligante e os resíduos da macromolécula-alvo (DE VIVO et al., 2016). A dinâmica molecular nitidamente leva em consideração todos esses fatores, o que permite analisar e quantificar o equilíbrio entrópico, que por sua vez, define a termodinâmica e a cinética das interações entre o ligante e a macromolécula-alvo (DE VIVO et al., 2016).

Em termos de termodinâmica, a energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) é a grandeza de maior relevância na dinâmica molecular; e está associada à constante de dissociação experimental  $K_d$  através da seguinte equação (GILSON et al., 1997):

$$\Delta G^\circ_b = k_B T \ln (K_d/C^0)$$

Onde:  $KB$  = constante de Boltzmann;  $T$  = temperatura ( $^{\circ}C$ );  $K_d$  = constante de dissociação;  $C^0$  = concentração padrão.

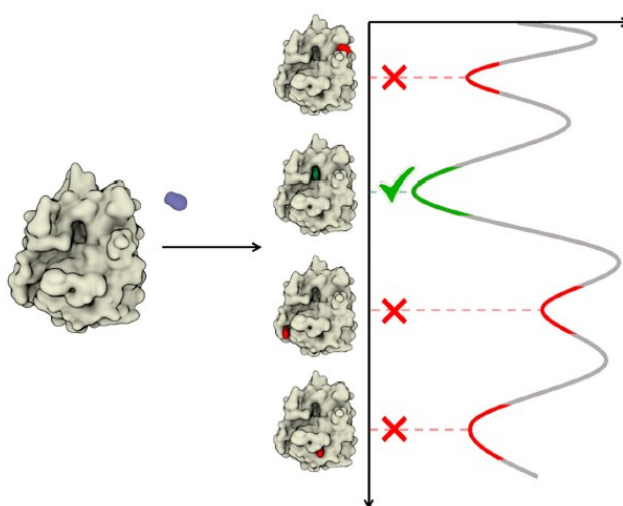
No decorrer da simulação de dinâmica molecular é obtido também outro parâmetro de alta relevância, a cinética relacionada à ancoragem e desacoplamento do ligante, onde são estimadas as taxas de associação ( $k_{on}$ ) e dissociação ( $k_{off}$ ) da ligação do ligante a macromolécula (COPELAND, POMPLIANO, MEEK, 2006). O equilíbrio entre as taxas de associação e dissociação indicam o tempo no qual o ligante provavelmente permanecerá ligado à macromolécula, gerando assim o seu efeito farmacológico. Desta forma, valores menores de dissociação significam um efeito farmacológico mais prolongado. Contudo dependendo do contexto e do alvo molecular, valores baixos de  $k_{off}$  podem culminar no almejado aumento da eficácia de possíveis novos fármacos, ou paradoxalmente, levar ao aumento de efeitos adversos de certos compostos (PAN et al., 2013).

Em condição de equilíbrio, a constante de dissociação  $K_d$  ( $K_d = k_{off}/k_{on}$ ) correlaciona os parâmetros de cinética e termodinâmica (LU, TONGE, 2010). Um composto com alto poder de ligação apresenta um  $K_d$  considerado “ótimo”, normalmente em nível nanomolar, onde a razão  $k_{off}/k_{on}$  demonstra que o desacoplamento do ligante é mais lento que a ligação em si. Contudo, nos estudos *in vivo* não é possível manter-se a condição de equilíbrio. Com isso, a razão  $k_{off}/k_{on}$  não pode ser mantida. Assim sendo, nos estudos *in vivo* a cinética torna-se mais relevante do que a termodinâmica em relação a prever com precisão a eficácia do efeito do composto *in vivo* (COPELAND, POMPLIANO, MEEK, 2006). Nesses casos, deve-se combinar a otimização do constante  $K_d$  com o  $k_{off}$  (tempo de residência da ligação) a fim de melhor prever a eficácia do composto. Por outro lado, um composto com fraco poder de ligação apresenta um  $K_d$  considerado sub-ótimo (micromolar). Nesses casos, deve-se otimizar o  $k_{off}$  a fim de superar a potencial falta de eficácia do composto (DE VIVO, CAVALLI, 2017).

Recentemente, o “*unbiased*” dinâmica molecular é a abordagem mais bem estabelecida para simular a ligação de um ligante ao seu alvo molecular. Esta abordagem reconstrói toda a trajetória de ligação do ligante, totalmente solvatado em água, até a sua posição final de ligação na macromolécula-alvo (Figura 19). Nota-se que, durante essas simulações de dinâmica molecular, o ligante fica livre para se difundir na caixa de simulação e encontrar seu próprio caminho até o *pocket* da macromolécula-alvo (DE VIVO, CAVALLI, 2017).

Entretanto já é de conhecimento que, a probabilidade de uma pequena molécula se ligar ao *pocket* de uma macromolécula pode ser bem baixa, sendo então considerado um evento raro, especialmente quando se trata de ligantes com baixas taxas de  $k_{on}$ . Portanto, a abordagem mais adequada para resolver tal obstáculo foi colocar mais de uma molécula de ligante dentro da caixa de simulação, aumentando desta forma a probabilidade de ocorrência de uma ligação entre o ligante e a macromolécula-alvo (GIOIA et al., 2017).

**Figura 19.** Esquema representativo da abordagem “*unbiased*” dinâmica molecular.



Nota: Onde (X): posição incorreta; (✓): posição correta de ligação do ligante no *pocket* da macromolécula-alvo (posição de menor energia de ligação). **Fonte:** GIOIA et al., 2017.

Os avanços nas tecnologias computacionais, principalmente dos clusters baseados em GPU (Graphics Processing Unit - GPU) e o surgimento de melhores algoritmos para cálculos de alto nível, permitiram que as simulações de dinâmica molecular pudessem programar estratégias de descoberta de medicamentos baseada na estrutura que levassem em consideração a flexibilidade estrutural dos sistemas ligante-macromolécula-alvo. Uma vez que, mudanças conformacionais nas macromoléculas, por exemplo, proteínas e DNA estão frequentemente associadas à ligação destes ao ligante (DE VIVO et al., 2016).

Atualmente, é possível a realização de simulações de dinâmica molecular de até alguns milissegundos (LANE et al., 2013). No entanto, durante a simulação de dinâmica molecular é normalmente necessária a avaliação de várias trajetórias diferentes (movimento do ligante) a fim de adquirir uma estatística adequada a ponto de fornecer previsões precisas

da simulação, o que demonstra a acurácia deste tipo de estudo *in silico* (DE VIVO, CAVALLI, 2017).

Previamente a simulação de dinâmica molecular é imprescindível à realização da ancoragem molecular (*docking*) para prever e identificar a posição correta (melhor pose) de ligação do ligante no *pocket* da macromolécula-alvo, o que reflete diretamente no cálculo da energia livre de Gibbs ( $\Delta G^\circ$ ) e cinética associada à formação do complexo entre o ligante e a macromolécula-alvo, determinando assim a afinidade desta interação. O uso da melhor pose de ligação ligante-macromolécula-alvo na dinâmica molecular proporciona alcançar uma previsão mais acurada e precisa da cinética de ligação (DE VIVO, CAVALLI, 2017). Esta abordagem, combinação sequencial de ancoragem molecular e dinâmica molecular, já está bem estabelecida nas fases iniciais dos estudos que investigam possíveis e promissores novos compostos-líder com atividade terapêutica de interesse, diminuindo dessa forma os custos e tempo dispensados nas pesquisas laboratoriais (AMARO et al., 2018).

As simulações de dinâmica molecular que se iniciam com os resultados da ancoragem molecular são normalmente utilizadas para validar ou refinar os resultados teóricos da ancoragem molecular. Principalmente do ponto de vista estrutural, as simulações de dinâmica molecular podem revelar modos de ligação instáveis, apontando ligações do ligante que são fisicamente inviáveis, além de possivelmente identificar novos modos de ligação (SAKANO et al., 2015). Adicionalmente, o pós-processamento através da dinâmica molecular também pode ser usado para refinar a energia estimada pela ancoragem molecular, processo este denominado de *re-scoring*. Têm-se como exemplo de métodos de *re-scoring* a Energia de interação linear (*Linear Interaction Energy* - LIE) (DECHERCHI et al., 2015), Perturbação de energia livre (*Free-Energy Perturbation* - FEP) (ZWANZIG, 1954), Integração termodinâmica (*Thermodynamic Integration* - TI) (KIRKWOOD, 1935), Área de Superfície de Poisson-Boltzmann de Mecânica Molecular (*Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area* - MM-PB) e Área de Superfície Generalizada de Mecânica Molecular (*Molecular Mechanics-Generalized Born Surface Area* - GB-SA) (DECHERCHI et al., 2015).

Atualmente, os códigos de simulação de dinâmica molecular mais utilizados são AMBER (CASE et al., 2012), CHARMM (BROOKS et al., 2009), GROMACS (HESS et al., 2008), NAMD (NELSON et al., 1996), ACEMD (HARVEY, GIUPPONI, FABRITIIS, 2009), Desmond (GUO et al., 2010), DL\_POLY (TODOROV, SMITH, TRACHENKO, 2006) e LAMMPS (PLIMPTON, 1995).

Nos dias atuais, ainda há algumas questões em relação à dinâmica molecular que precisam ser resolvidas, como a falta de padrões de representação e a dificuldade em armazenar e transmitir a enorme quantidade de dados de trajetória gerados durante as simulações, o que normalmente exige a utilização de supercomputadores. Apesar disso, a dinâmica molecular é uma ferramenta de pesquisa bastante valiosa que ajuda a entender os diversos processos biológicos envolvidos em determinadas doenças, além de ser altamente relevante no desenvolvimento de novos fármacos (HOSPITAL et al., 2015).

É importante salientar-se que, por mais que as simulações de ancoragem e dinâmica molecular nos forneçam previsões precisas das interações entre o composto químico ligante e a macromolécula-alvo, ainda assim se faz necessário combinar os estudos *in silico* com resultados experimentais, para que dessa forma se tenha informações mais acuradas e compatíveis com os processos biológicos.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o potencial efeito antitumoral de extratos da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener rico em ácidos graxos de cadeia média e longa, além de avaliar a atividade antitumoral de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos utilizando modelos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*.

### 2.2. Objetivos específicos

Utilizando os extratos da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener, buscou-se avaliar:

- A citotoxicidade sobre a linhagem celular de câncer de mama MCF-7, selecionando o mais citotóxico;
- A atividade antitumoral *in vivo* em camundongos Balb/c, inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE);
- Os biomarcadores de defesas antioxidantes e de estresse oxidativo nas células do TAE;

- A fragmentação do DNA das células do TAE;
- A capacidade de interferir e/ou induzir a parada do ciclo das células do TAE;
- O tipo de morte celular induzida (apoptose/necrose) nas células do TAE;
- A expressão de proteínas envolvidas nos processos de dano ao DNA ( $\gamma$ H2AX), bloqueio do ciclo celular (p53) e morte celular (Bax e Bcl-xL) nas células do TAE.

Utilizando os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina, buscou-se avaliar:

- A citotoxicidade sobre as linhagens de células tumorais (MCF-7, HeLa, HepG2) e não tumorais (McCoy), selecionando o mais citotóxico e seletivo;
- A atividade antiproliferativa sob as células tumorais MCF-7;
- A interação com o DNA de timo de vitelo (CT-DNA);
- A fragmentação do DNA das células MCF-7;
- A capacidade de interferir e/ou induzir a parada do ciclo celular nas células MCF-7;
- O tipo de morte celular induzida (apoptose/necrose) sob as células MCF-7;
- O potencial de membrana mitocondrial;
- A captação de glicose nas células MCF-7;
- A expressão de proteínas envolvidas nos processos de reparo do dano induzido ao DNA (PARP1), proliferação celular e sobrevivência (via PI3K/Akt), controle do ciclo celular (pRb, CDK2, ciclina A e B1) e indução de apoptose (Bcl-xL, Bax e p53) em células MCF-7;
- A atividade antitumoral *in vivo* em camundongos Balb/c, inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich;
- O efeito antiangiogênico *in vivo* em camundongos Balb/c, inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para facilitar a apresentação e discussão dos dados obtidos os resultados foram apresentados em três etapas, a saber:

**Etapa 1** - Resultados sobre o efeito antitumoral do extrato supercrítico e convencional da torta de sementes de *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener associados à indução do estresse oxidativo por ácidos graxos de cadeia média e longa, apresentados na forma de artigo publicado no periódico *Food Chemistry and Toxicology* (Anexo A).

**Etapa 2** - Resultados sobre o efeito citotóxico e antitumoral de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos associados à indução de danos ao DNA, culminando no bloqueio do ciclo celular e apoptose mitocondrial. Tais resultados foram apresentados na forma de artigo enviado e aceito para publicação no periódico *International journal of functional nutrition* (Anexo B).

**Etapa 3** - Resultados sobre o efeito citotóxico, antiproliferativo e antiangiogênico de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos associados à inibição da via de sinalização PI3K/Akt. Os resultados foram apresentados na forma de artigo a ser enviado para apreciação pelo periódico *International journal of oncology*.

### 3.1 ETAPA 1 - ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATOS DA TORTA DE SEMENTES DE *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener E SUA CORRELAÇÃO COM A INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO

Inicialmente, os extratos hidroalcoólico (convencional) e supercríticos da torta de sementes de *Passiflora edulis f. flavicarpa* Degener foram submetidos à triagem de citotoxicidade através do ensaio MTT, utilizando-se a linhagem de células de câncer de mama MCF-7. Do qual, foi selecionando o extrato mais citotóxico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH - SF<sub>2</sub>EtOH) para dar continuidade aos demais ensaios, comparando o efeito deste com o extrato convencional (HCE) e doxorrubicina. Os extratos foram quimicamente caracterizados e foram avaliados quanto à atividade antitumoral *in vivo* utilizando camundongos Balb/c, inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE). Além disso, buscou-se investigar os possíveis mecanismos responsáveis pela atividade antitumoral apresentado por estes extratos.

### 3.1.1 Materiais e métodos

#### 3.1.1.1 Reagentes e anticorpos

A agarose, iodeto de propídio (PI), laranja de acridina, sal de tetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), albumina sérica bovina (BSA), ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB), 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH), ácido tiobarbitúrico (TBA) e o coquetel inibidor de proteases foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Os antibióticos, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), solução salina tamponada com fosfato (PBS) e o soro fetal bovino (FBS) foram adquiridos da Gibco (EUA). O kit de iodeto de propídio (PI)/ribonuclease A (RNase) foi adquirido da Immunostep (Salamanca, Espanha). O coquetel inibidor de fosfatases foi adquirido da Calbiochem (Merck Biosciences). Os anticorpos policlonais de coelho criados contra  $\gamma$ H2AX (Cat. Sc-101696), p53 (Cat. Sc-6243) e actina (Cat. Sc-7210); e os anticorpos monoclonais de camundongo criados contra Bax (Cat. Sc-7480) e Bcl-xL (Cat. Sc-8392) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (EUA). O anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho (Cat. AP132P) e anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de camundongo (Cat. AP181P), para além do kit de detecção de quimioluminescência para anticorpos acoplados à HRP vieram da Merck Millipore (EUA). Todos os demais reagentes químicos foram usados com grau de pureza atendendo as normas da *American Chemical Society* (ACS).

#### 3.1.1.2 Preparação dos extratos

As sementes da *P. edulis f. flavicarpa* Degener (*P. edulis*), fornecidas pela empresa Extrair Óleos Naturais, Rio de Janeiro, Brasil, foram moídas e submetidas à extração de óleo por prensagem, obtendo assim, a torta de sementes (subproduto). A torta de sementes foi submetida à maceração a temperatura ambiente numa proporção de amostra-solvente 1:5, durante sete dias ao abrigo da luz (frasco de vidro âmbar), agitando-se o mesmo uma vez por dia. Como solvente foi utilizado uma mistura de etanol/H<sub>2</sub>O (1/1, v/v). Após a extração, o sistema foi filtrado e o solvente evaporado utilizando-se um rotaevaporador sob a pressão reduzida e 45°C de temperatura, obtendo-se assim o extrato bruto/convencional (extrato hidroalcoólico, HCE). O rendimento do procedimento de extração por maceração foi de cerca de 6%, considerando a massa do material de partida (OLIVEIRA et al., 2016).



As extrações com fluido supercrítico foram realizadas usando o CO<sub>2</sub> 99,9% puro entregue na pressão desejada (White Martins, Brasil). O procedimento experimental consistiu na deposição de 10g da torta de sementes da *P. edulis*, usadas para formar o leito fixo para a extração de alta pressão, em condições controladas de temperatura, pressão e taxa de fluxo de solvente. As condições de extração foram realizadas a 250 e 300 bares de pressão a 40°C de temperatura, com ou sem adição de co-solvente (etanol 5%), a uma taxa de fluxo constante de 0,5 kg CO<sub>2</sub>/h em 3h de extração. Em seguida, o solvente foi evaporado utilizando-se um rotaevaporador sob pressão reduzida e 45°C de temperatura. Foram obtidos quatro extratos supercríticos diferentes e os rendimentos de extração ficaram em torno de 5%. O procedimento foi repetido até a obtenção de extratos suficientes para a execução de ensaios de atividade biológica (MICHIELIN et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016).

Os extratos hidroalcoólico e supercríticos da torta de sementes da *P. edulis* foram produzidos e gentilmente cedidos pela equipe da Prof.<sup>a</sup> Dra. Sandra R.S. Ferreira do Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC), situado no Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico (CTC) da UFSC.

### 3.1.1.3 Avaliação da citotoxicidade pela redução do MTT

A atividade citotóxica dos extratos foi avaliada por meio do ensaio de viabilidade celular pelo método de coloração do sal de tetrazólio (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio, MTT) (MOSMANN, 1983). As células de câncer de mama MCF-7 foram obtidas a partir do banco de células de Rio de Janeiro, Brasil. As células MCF-7 foram cultivadas em DMEM (meio de Eagle modificado por Dulbecco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL); e mantidas a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. As células foram semeadas (10<sup>4</sup> células/poço) em placas de 96 poços e após atingirem 80% de confluência, as mesmas foram expostas á concentrações de 10-500 µg/mL dos extratos da *P. edulis* por 24h, 48h e 72h. O veículo de dissolução dos extratos (meio DMEM com 1% de dimetilsulfóxido – DMSO) foi utilizado como controle. Após finalizar o tratamento, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS e incubadas por 2h com uma solução de MTT (100 µl/poço; 0,5 mg/mL). Em seguida, o MTT excedente foi removido e adicionou-se 100 µl/poço de DMSO para solubilizar os cristais de formazan. Por fim, efetuou-se a leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 550nm, empregando o leitor de microplacas (TECAN Infinity

M200). Nota-se que, a densidade óptica (absorbância) observada era diretamente proporcional ao número de células vivas (MOSMANN, 1983).

Com os valores de absorbância obtidos foi possível calcular a percentagem de viabilidade celular (percentual de redução do MTT), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \text{Abs.}_{\text{teste}} \times 100 / \text{Abs.}_{\text{Controle}}$$

Onde os valores dos controles negativos foram considerados como sendo 100% de redução do sal de tetrazólio. Os valores de concentração efetiva  $CE_{50}$  foram calculados usando o software Graph Pad Prism 6 (San Diego, EUA).

#### *3.1.1.4 Caracterização fitoquímica dos extratos - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas – GC-MS.*

A constituição fitoquímica dos extratos foi avaliada por cromatografia gasosa, utilizando um sistema de cromatografia (modelo 7820A), acoplada a um espectrofotômetro de massa (modelo 5975 MSD) (Agilent Technologies, EUA). O procedimento experimental usou como solvente de extração o hélio sob pressão (5 psi) e temperatura (280°C) controlada. A separação dos compostos foi feita através do modo de injeção Split de amostras dos extratos (1 µL; 1 mg/mL) no interior de uma coluna capilar HP5 MS (25 m × 250 µm × 25 µm, Agilent, EUA), onde foi utilizada uma taxa de fluxo constante do solvente de extração na proporção de 5:1 (5 mL/min). A temperatura do forno da coluna foi programada para aumentar de 50°C a 260°C, com taxa de incremento de 4°C por minuto (4°C/min). A aquisição dos dados espectrais foi efetuada através de um modelo de varredura, considerando intervalos previamente estabelecidos (30–750 Da). Levando em consideração os tempos de retenção (TR) e comparando os espectros de massa com a biblioteca de espectros de massa Wiley 6.0 (EUA) e a literatura (ADAMS, 2007) foi possível identificar os compostos presentes nos extratos. A quantificação dos fitoconstituintes foi realizada a partir dos perfis dos cromatogramas, usando para tal as áreas de picos relativos (%).

Estas análises foram realizadas pela pós-doutoranda Lizandra C. Bretanha no LABEC - Laboratório de Eletroforese Capilar situado no Departamento de Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas (CFM) da UFSC, sob a coordenação do Prof. Dr. Gustavo A. Mücke.

### 3.1.1.5 Estudo da atividade antitumoral *in vivo*, usando o modelo do tumor ascítico de Ehrlich (TAE)

A atividade antitumoral *in vivo* dos extratos foi avaliada usando camundongos isogênicos Balb/c (*Mus musculus*), machos ( $20 \pm 2$  g), obtidos por reprodução controlada pelo Biotério Setorial do Laboratório de Bioquímica Experimental- LABIOEX. Os camundongos foram mantidos sobre condições ideais controladas (ciclo claro-escuro de 12h,  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , aproximadamente 60% umidade do ar), recebendo ração comercial padrão e água *ad libitum*. Todos os procedimentos com os animais foram realizados em conformidade com os princípios internacionalmente aceitos para uso e cuidados com animais de laboratório (publicação NIH # 85-23, revisada em 1985). Este protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (CEUA-PP00784).

Para a determinação das doses a serem utilizadas no experimento, primeiramente, foi realizada uma triagem de doses usando camundongos saudáveis. Doses dos extratos acima de 200 mg/kg/dia causaram sintomas de toxicidade, como ereção dos pelos, inatividade e perda de apetite. Portanto, as doses de 100 e 200 mg/kg/dia foram escolhidas para dar seguimento aos experimentos.

O dia da indução do tumor foi considerado dia zero e, nesta data, todos os animais foram pesados (g) e a circunferência abdominal (cm) foi medida. Os camundongos foram inoculados com células do TAE (linhagem celular murina derivada de carcinoma ascítico de Ehrlich,  $5 \times 10^6$  células/mL; 200  $\mu\text{L}$ ) via intraperitoneal. Após 24h, os camundongos foram divididos em seis grupos ( $n = 12$ ): um grupo controle negativo tratado somente com salina contendo 1,0% de DMSO, um controle positivo tratado com doxorrubicina (1,2 mg/kg/dia), conforme anteriormente reportado por Hossain e colaboradores (2012) e quatro grupos de teste que foram tratados com os extratos HCE ou SFEtOH nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia, respectivamente. Os tratamentos foram administrados por via intraperitoneal (50  $\mu\text{l}$ ) durante nove dias consecutivos. Vinte e quatro horas após as últimas doses de tratamento, os camundongos foram pesados e as circunferências abdominais foram medidas novamente.

A inibição do crescimento tumoral foi calculada usando a equação reportada por Felipe e colaboradores (2014): Inibição do crescimento do tumor (%) = [(variação na circunferência abdominal do grupo tratado x 100) / variação na circunferência abdominal do grupo controle] - 100.

Posteriormente, os camundongos foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, retirando-se o líquido ascítico para a realização de análises bioquímicas e citológicas.

Nota-se que, o tratamento foi repetido novamente a fim de avaliar a sobrevivência dos camundongos tratados, para isso usou-se o método de Kaplan-Meier (KAPLAN, MEIER, 1958), complementado com o teste de Log-rank (PETO, PETO, 1972).

### *3.1.1.6 Biomarcadores de defesas antioxidantes e danos oxidativos nas células do TAE*

Nestas determinações foram empregadas amostras de líquido ascítico coletado da cavidade intraperitoneal dos animais inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich e tratados com os extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia) por 9 dias consecutivos.

Nota-se que, para as determinações de peroxidação lipídica (TBARS), proteína carbonilada (PC), glutatona peroxidase (GPx) e tioredoxina redutase (TrxR), as amostras do líquido ascítico foram diluídas no tampão de homogenato universal (0,2M Tampão fosfato, pH = 7,4; 0,1% de Triton X-100 e 150 mM de NaCl). Enquanto que, para a determinação do conteúdo de glutatona reduzida (GSH), as amostras do líquido ascítico foram diluídas em ácido tricloroacético (TCA; 12%), sendo a diluição feita na proporção de 1:5 (v/v).

Previamente as análises propriamente ditas, as amostras já diluídas nos tampões foram centrifugadas (5 min a 5000rpm) e somente o sobrenadante foi usado para a realização das medidas dos biomarcadores de estresse oxidativo.

A peroxidação lipídica foi estimada através da medida do conteúdo de substâncias reativas (malondialdeído, MDA) ao ácido tiobarbitúrico (TBA) (BIRD; DRAPER, 1984). Neste ensaio, as amostras foram mantidas em banho maria por 1h a 100 °C, no qual cada molécula de MDA presente nas amostras pode formar aduto com duas moléculas de TBA preparado em tampão Tris-HCl (60 mM; pH = 7,4), formando, dessa forma, um pigmento de coloração rosa que é mensurável no comprimento onda de 535 nm.

O dano oxidativo às proteínas foi quantificado avaliando-se os níveis de proteína carbonilada (LEVINE et al., 1990). Durante a ocorrência do estresse oxidativo, grupos carbonil ( $R-C=O$ ) são introduzidos nos resíduos de aminoácidos de proteínas. Tais modificações podem ser detectadas usando-se o reagente 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNPH) (10 mM). Visto que, os grupos carboxílicos das proteínas reagem covalentemente com os

grupos amina (-NH<sub>2</sub>) do reagente DPNH, resultando na formação de 2,4-dinitrofenil-hidrazona que pode ser mensurada espectrofotometricamente no comprimento onda de 370 nm.

A atividade da glutatona peroxidase (GPx) foi determinada através do ensaio de redução de terc-butil-hidroperóxido (FLOHÉ, GUNZLER, 1984). A GPx dismuta o terc-butil-hidroperóxido, gerando a glutatona dissulfeto (GSSG), que por sua vez, é convertida novamente ao seu estado reduzido (2GSH) pela ação da glutatona redutase (GR) que oxida o NADPH. A diminuição do conteúdo de NADPH foi registrada espectrofotometricamente a 340 nm.

O conteúdo de glutatona reduzida (GSH) foi estimado através da reação de grupos tióis presentes nas amostras com o ácido 2-ditionitrobenzóico (DTNB) (BEUTLER et al., 1963). A formação do ânion tiolato correspondente é proporcional ao conteúdo de GSH e pode ser determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 412 nm.

A atividade da tiorredoxina redutase (TrxR) foi avaliada através do ensaio de redução do ácido 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB) com NADPH, o que resulta na formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) (ARNÉR et al., 1999). O conteúdo de TNB livre derivado de tióis livres foi determinado por espectrofotometria no comprimento de onda de 412 nm.

Todas as dosagens foram normalizadas com o conteúdo proteico utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

### *3.1.1.7 Fragmentação do DNA das células do TAE*

Os efeitos dos extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia) sobre o DNA das células de TAE foram avaliados através do ensaio do cometa realizado em condições alcalinas (SINGH et al., 1988). As células foram ressuspensas em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%), depositadas em lâminas histológicas pré-cobertas com uma fina camada de agarose (1,5%) e incubadas por 10 min a -8°C. As lâminas foram imersas por 2h em uma solução de lise (2,5 M NaCl; 10 mM Tris; 100 mM EDTA; 1% Triton X-100 e 10% DMSO; pH = 10,0) e depois submetidas à eletroforese horizontal (25V e 300mA) por 20 min a 8 °C em um tanque contendo o tampão alcalino (300 mM NaOH; 1 mM EDTA; pH = 13,0). Logo após, as lâminas foram lavadas com uma solução neutralizante (0,4 M Tris HCl; pH = 7,5), seguida por água, repetindo este processo por três vezes em intervalos de cinco minutos. Uma solução

de fixação (15% TCA ou ácido tricloroacético; 5% ZnSO<sub>4</sub>; 5% glicerol) foi adicionada por 10 minutos. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas com água e secas em temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram coradas (0,1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,1% AgNO<sub>3</sub>, 0,25% ácido tungstossílico, 0,15% formaldeído, 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, v/v) e visualizadas no microscópio Olympus, modelo BX41 (Japão). O dano no DNA foi expresso como índice de dano, levando em consideração um escore de 0 a 4 (0 - núcleos não danificados; 4 - núcleos danificados ao máximo) (ROSS et al., 1995).

#### *3.1.1.8 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo*

O efeito dos extratos sobre o ciclo celular das células de TAE foi analisado por citometria de fluxo, em que a intensidade de fluorescência do iodeto de propídio é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA das células em cada fase do ciclo celular (G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M) (DE NEIRA, 2003).

As células do fluido ascítico dos animais tratados com os extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia, 9 dias) foram coletadas, lavadas com solução salina e centrifugadas (10 min a 1000rpm). A seguir, as células de TAE foram fixadas durante a noite em 200 µL de etanol (70%) a -20 °C, para aumentar a permeabilidade da membrana celular ao iodeto de propídio, um fluorocromo que interage com DNA por intercalação entre as bases do DNA. No dia seguinte, as células de TAE foram lavadas novamente com tampão fosfato (PBS) contendo 2% de albumina e incubadas por 15 min em temperatura ambiente com uma solução de iodeto de propídio/RNase (ribonuclease A 0,2 mg/mL, iodeto de propídio 50 µg/mL). O citômetro de fluxo BD FACS Canto II (BD Biosciences, EUA) foi utilizado para a mensuração da fluorescência e o percentual de células em cada fase do ciclo celular. De acordo com o conteúdo de DNA, as células foram categorizadas em cada fase do ciclo celular. Os dados foram processados usando o Flowing Software 2.5.0 (Finlândia).

#### *3.1.1.9 Avaliação do tipo de morte celular induzida em células do TAE*

A detecção citológica do tipo de morte celular foi avaliada através do método de coloração usando o brometo de etídio e a laranja de acridina. O método permite diferenciar as células viáveis (verde), células apoptóticas (laranja) e células necróticas (vermelho escuro), de acordo com as alterações morfológicas nucleares e citoplasmáticas. Após nove dias de

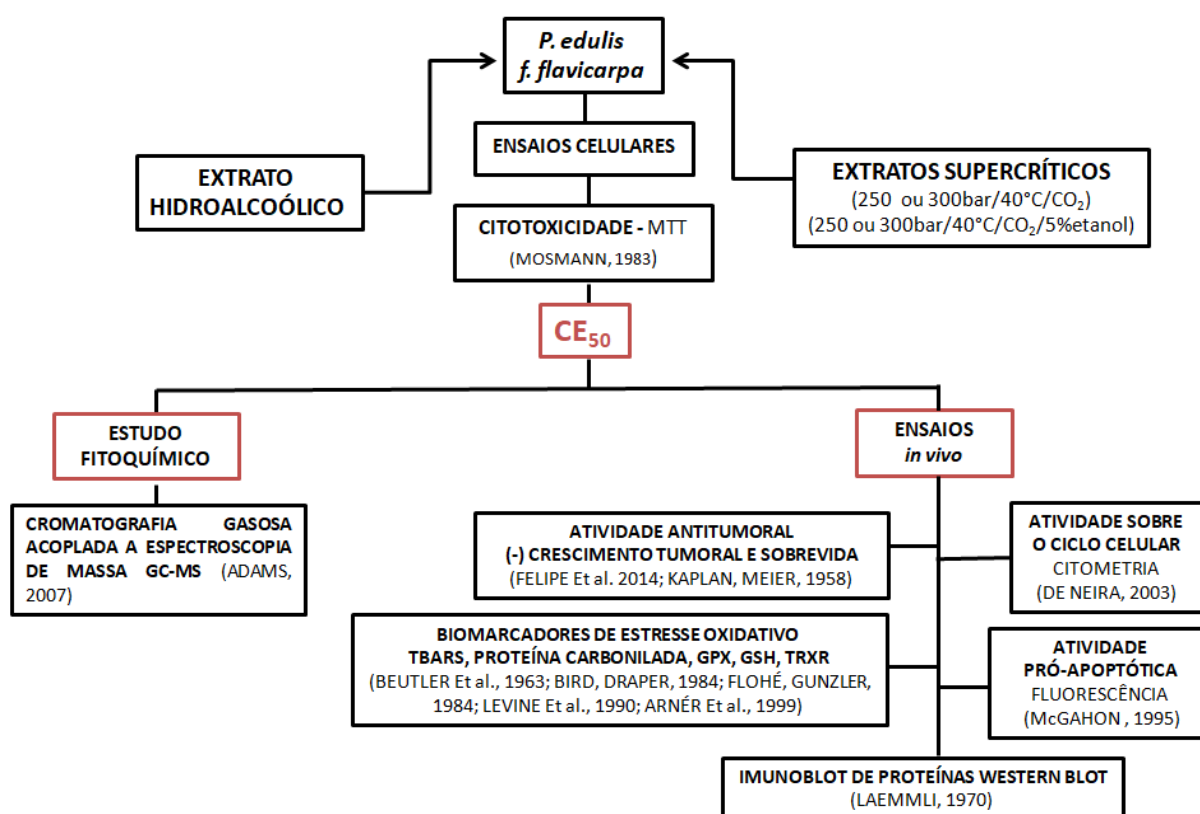
tratamento com os extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia), alíquotas do líquido ascítico dos animais foram coletadas, centrifugadas (10 min a 1000rpm) e ressuspensas em 500  $\mu$ L de PBS. Em seguida, as células de TAE (25  $\mu$ L, 5 a  $10^6$  células) foram coradas com uma solução (5  $\mu$ L) de brometo de etídio (250  $\mu$ M) e laranja de acridina (200  $\mu$ M) (1: 1 v/v). Posteriormente, as células foram visualizadas usando o microscópio Olympus, modelo BX41 (Japão). Para cada amostra, trezentas células foram contadas e fotografadas para registro visual. Foram feitas triplicatas das lamínas de cada amostra a ser analisada. Os resultados foram expressos como percentagem de células viáveis, apoptóticas e necróticas (MCGAHON et al., 1995).

### *3.1.1.10 Ensaio de Imunodeteção*

Avaliou-se a expressão de proteínas relacionadas com o dano ao DNA, controle do ciclo celular e indução de apoptose através de imunoeletroforese do lisado completo de células de TAE retiradas dos animais tratados com os extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia). As células foram lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 1% do surfactante NP40; 0,25% do detergente desoxicolato de sódio; 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil) suplementado com o coquetel de inibidores de protease (1%) e inibidores de fosfatase (3%). As proteínas foram desnaturadas em tampão laemmli (60mM Tris-HCl, pH = 6,8; 2% de dodecilsulfato de sódio (SDS); 10% glicerol; 5%  $\beta$ -merca mercaptoetanol; 0,01% de azul de bromofenol). Quantidades iguais de proteína (25  $\mu$ g) do homogenatos de células foram submetidas à eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (SDS - PAGE), seguida por eletrotransferência para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (LAEMMLI, 1970). Após o bloqueio e a lavagem, as membranas foram incubadas durante a noite com os anticorpos primários, sendo estes: os anticorpos policlonais de coelho contra  $\gamma$ H2AX (1:1000, v/v) e p53 (1:500, v/v); e anticorpos monoclonais de camundongo contra Bax (1:500, v/v) e Bcl-xL (1:500, v/v). Posteriormente, as membranas foram lavadas novamente e incubadas com anticorpos secundários (1h), sendo estes: o anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho (1:10000, v/v) e anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de camundongo (1:10000, v/v), ambos conjugados com peroxidase. A imunodeteção foi realizada usando um kit comercial de detecção de quimioluminescência para anticorpos acoplados à HRP. A actina (1:10000, v/v) foi usada como controle de carga de proteínas. As imagens das bandas foram obtidas com o sistema fotodocumentador ChemiDoc

MP (Bio Rad, EUA) e as medições foram realizadas empregando o programa ImageJ versão 1.49 (*National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA). Os valores obtidos para as amostras dos tratamentos foram normalizados com a actina.

**Figura 20.** Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico, antiproliferativo, pró-apoptótico e antitumoral dos extratos hidroalcoólico e supercrítico de *P. edulis f. flavicarpa* Degener.



### 3.1.1.11 Análise estatística

Os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata técnica, enquanto os experimentos *in vivo* foram realizados em replicata biológica ( $n = 12$ ;  $\alpha = 0,05$ ; Potência  $(1 - \beta) = 0,90$ ;  $t$  crítico = 1,81;  $df$  (grau de liberdade) = 10; Tamanho do efeito  $|\rho| = 0,67$ ). O cálculo do tamanho de amostra ( $n$  amostral) dos ensaios *in vivo* foi realizado empregando o software G\*Power 3.1.9.4. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou como porcentagem. Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância ANOVA one-way, complementado pelo teste de Bonferroni ou teste de Log-rank, quando apropriado. As



comparações foram realizadas usando o software Graph Pad Prism 6 (San Diego, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

### 3.1.2 Resultados e discussão

#### 3.1.2.1 Efeito citotóxico dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener

Os resultados obtidos demonstraram que apenas os extratos supercríticos preparados com etanol foram considerados citotóxicos para células MCF-7, apresentando uma  $CE_{50} < 500 \mu\text{g/mL}$  após 48h e 72h de tratamento (Tabela 3). O extrato supercrítico obtido nas condições de pressão a 300bar, temperatura a 40°C e com adição de 5% etanol (SFEtOH) foi considerado o extrato mais citotóxico, apresentando uma  $CE_{50}$  de 264,6  $\mu\text{g/mL}$  após 72h de tratamento, demonstrando assim um efeito citotóxico dependente de tempo e da dose.

**Tabela 3.** Citotoxicidade dos extratos da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener (10 a 500  $\mu\text{g/mL}$ ) contra as células MCF-7, após 24h, 48h e 72h de incubação, avaliada pelo ensaio de MTT.

Extrato	Extração	MCF-7 $CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )		
		24h	48h	72h
HCE	Água/Etanol (1/1, v/v)	> 500	> 500	> 500
SFE	250bar/40°C/CO <sub>2</sub>	> 500	> 500	> 500
	300bar/40°C/CO <sub>2</sub>	> 500	> 500	> 500
	250bar/40°C/CO <sub>2</sub> + 5% EtOH	> 500	461,0	286,8
	300bar/40°C/CO <sub>2</sub> + 5% EtOH	> 500	441,2	264,6

Os valores de  $CE_{50}$  foram obtidos usando o Software GraphPad Prism 6.0 (San Diego, EUA). Os dados representam as médias de três experimentos independentes.  $CE_{50}$ : Metade da concentração efetiva máxima; **HCE**: extrato hidroalcoólico; **SFE**: extrato supercrítico.

Os dados do ensaio de MTT indicaram que a adição de etanol (5%) como co-solvente na extração supercrítica proporcionou um aumento da citotoxicidade dos extratos.

Michelin e colaboradores (2011), obtiveram resultados similares ao estudarem a atividade antimicrobiana de extratos supercríticos de *Cordia verbenacea*, obtidos aplicando as mesmas condições de extração. Os autores relataram que a adição de 5 - 8% de etanol como

co-solvente aumentou a citotoxicidade dos extratos. O que sugere que o uso de modificadores de polaridade orgânicos (co-solvente) no processo de extração supercrítica pode aumentar o poder de extração de compostos citotóxicos encontrados no material vegetal (HERRERO et al., 2010). Além disso, a extração supercrítica por empregar o CO<sub>2</sub> como solvente de extração é considerado um procedimento não oxidante e, quando aplicado a baixas temperaturas, pode permitir a extração de compostos termolábeis e oxidáveis (HERRERO et al., 2010).

A partir dos dados do MTT, apenas o extrato SFEtOH (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH) foi escolhido para dar seguimento aos ensaios subsequentes, comparando o efeito deste com o extrato HCE (extrato hidroalcoólico) e doxorrubicina.

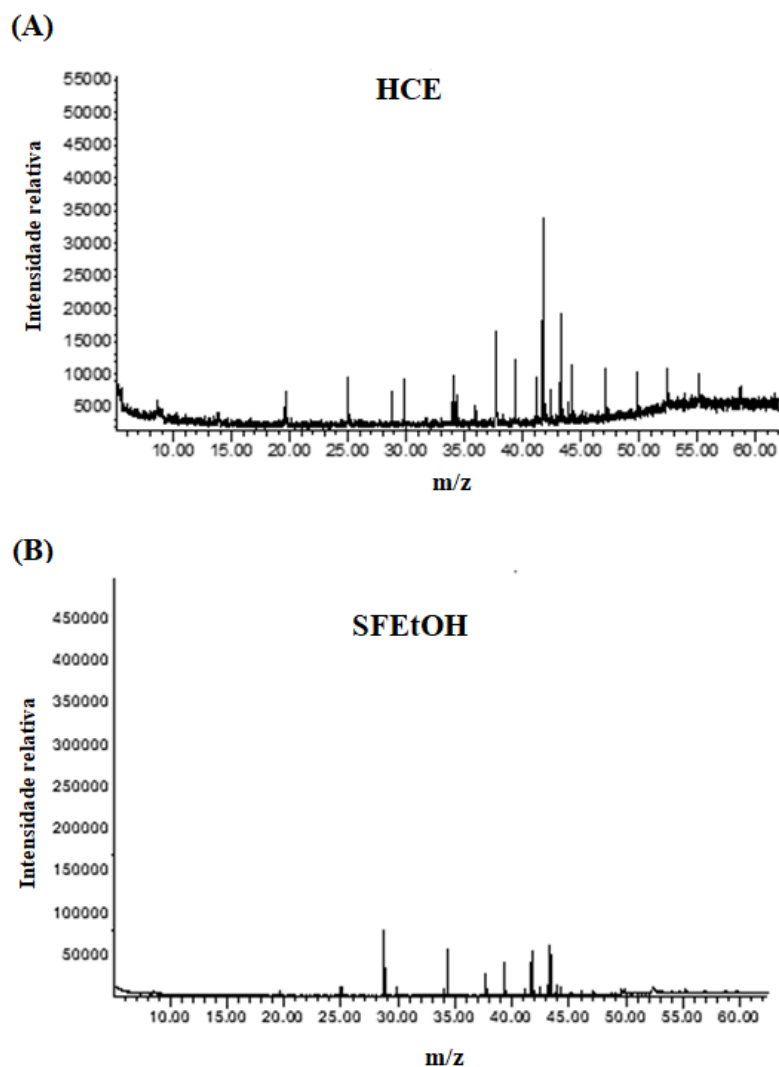
### *3.1.2.2 Correlação entre a constituição fitoquímica dos extratos da *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener e a citotoxicidade*

A fim de caracterizar fitoquimicamente os extratos da torta de sementes de *P. edulis* (HCE e SFEtOH) foi realizada a análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e os dados obtidos são apresentados na tabela 4 e figura 21.

A análise de GC-MS indicou a presença do ácido 9-octadecenóico (Z) -, éster metílico (ácido oleico, éster metílico); ácido hexadecanóico, éster metílico (ácido palmítico, éster metílico) e ácido hexadecanóico, éster etílico (ácido palmítico, éster etílico) no extrato HCE. Enquanto que, a análise de GC-MS no extrato SFEtOH indicou a presença predominantemente do ácido 7-octadecenóico, éster metílico; ácido 9,12-octadecadienóico (Z, Z) -, éster metílico (ácido linoleico, éster metílico); ácido dodecanóico, éster etílico (ácido láurico, éster etílico); ácido 9-octadecenóico (Z) -, éster etílico (ácido oleico, éster etílico); ácido hexadecanóico, éster etílico (ácido palmítico, éster etílico) e ácido tetradecanóico, éster etílico (ácido mirístico, éster etílico). E em menores proporções foi detectado no extrato SFEtOH a presença do ácido hexadecanóico, éster metílico (ácido palmítico, éster metílico); 9,12-octadecadien-1-ol, (Z, Z) (álcool linolílico); ácido heptadecanóico, 16-metil-, éster metílico (ácido margarínico, 16-metil-, éster metílico) e ácido octadecanóico, éster etílico (ácido esteárico, éster etílico).

Nota-se que, o ácido graxo predominante encontrado no extrato HCE foi o ácido oleico (17,99%), enquanto que, o principal ácido graxo identificado no extrato SFEtOH foi o ácido láurico (16,89%).

**Figura 21.** Cromatogramas representativos de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) dos extratos (A) HCE e (B) SFEtOH.



Nota: **HCE**: extrato hidroalcoólico; **SFEtOH**: extrato supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH).

**Tabela 4.** Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS) representada como tempos de retenção (TR) por minutos e área de pico (%) de compostos bioativos presentes em HCE e SFEtOH.

Nome químico (TR/min)	Área de pico (%)	
	HCE	SFEtOH
Ácido 7-octadecenóico, éster metílico (41,816)	-	10,45
9,12-Octadecadien-1-ol, (Z, Z) - (43,169)	-	2,89
Ácido 9,12-octadecadienóico (Z, Z) -, éster metílico (41,648)	-	8,13
Ácido 9-octadecenóico (Z) -, éster metílico (41,815)	17,99	-
Ácido dodecanóico, éster etílico (28,782)	-	16,89
Ácido 9-octadecenóico (Z) -, éster etílico (43,328)	-	12,55
Ácido heptadecanóico, 16-metil-, éster metílico (42,444)	-	2,09
Ácido hexadecanóico, éster etílico (39,339)	5,12	8,18
Ácido hexadecanóico, éster metílico (37,675)	8,01	4,86
Ácido hexadecanóico, éster metílico (43,949)	-	1,95
Ácido tetradecanóico, éster etílico (34,307)	-	11,12

Nota: Onde **HCE**: extrato hidroalcoólico; **SFEtOH**: extrato supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH).

Entre os compostos identificados, é importante destacar os ácidos graxos de cadeia média e longa com relatos de atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral, como ácido láurico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido oleico e ácido mirístico (ENGELBRECHT et al., 2008, TAKAYAMA et al., 2009, KADOCHI et al., 2017; CHEN et al., 2019).

Evidências têm demonstrado que, o ácido láurico apresenta atividade antiproliferativa e pró-apoptótica contra várias linhagens de células tumorais por induzir a geração de EROs e aumentar a expressão da proteína p21, além de causar parada do ciclo celular nas fases S e G2/M e induzir a morte celular por apoptose (FAUSER et al., 2013; LAPPANO et al., 2017).

Do mesmo modo, o ácido palmítico apresenta atividade antiproliferativa e pró-apoptótica por meio de mecanismos que envolvem a inibição da atividade da cinase PI3-K, aumento da geração de EROs, ativação da proteína p53, aumento da expressão de p21 e indução de apoptose (HARDY, LANGELIER, PRENTKI, 2000; YU, QIAN, 2014).

Adicionalmente, o ácido linoleico e os seus metabolitos, principalmente os ácidos  $\gamma$ -linolênico e dihomogamma-linolênico, também possuem atividade antitumoral por inibir a proliferação celular e induzir a morte celular por apoptose (YU, QIAN, 2014). Como exemplo tem-se o estudo realizado por Colquhoun e Schumacher (2001), no qual foi demonstrado que o ácido  $\gamma$ -linolênico induziu a peroxidação lipídica por aumentar os níveis de peróxidos lipídicos e EROs; e desencadeou a apoptose via mitocondrial através da liberação do citocromo *c* e ativação da caspase 3. Além disso, nos últimos anos foi identificada uma série de metabolitos intermediários reativos derivados do ácido dihomogamma-linolênico que são gerados no decorrer da peroxidação lipídica catalisada pelas cicloxigenases. Estes, por sua vez, também apresentam atividade antitumoral por induzir a parada do ciclo celular e desencadear a morte celular por apoptose (YU et al., 2009; GU et al., 2013).

De acordo com Jiang e colaboradores (2017), o ácido oleico apresenta atividade antitumoral tanto *in vitro* e como *in vivo* contra as células de carcinoma espinocelular de língua (TSCC). A atividade antiproliferativa e pró-apoptótica do ácido oleico advêm da sua capacidade de aumentar a expressão de p53 e diminuir a expressão de ciclina D1, induzindo a parada do ciclo celular na fase G1; além de causar a apoptose por via da diminuição da expressão de Bcl-2 e aumento da ativação da caspase-3. Além disso, o ácido oleico reduziu a fosforilação das proteínas Akt, mTOR, S6K, 4E-BP1 e ERK1/2.

É importante salientar-se que, por mais que o ácido margarínico ou ácido margárico esteja presente no extrato SFEtOH em menor proporção (2,09%), este também pode ter contribuído para o efeito citotóxico e antitumoral deste extrato. Dada que, segundo Saravanakumar e colaboradores (2015), o ácido margárico apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra células de carcinoma epidermóide de boca (KB) e carcinoma epidermóide de pele (A431) através de mecanismos que envolviam a regulação negativa da proteína de choque térmico de 90 kDa (*heat shock protein* 90 kDa - HSP90) e indução de apoptose em consequência de fragmentação do DNA mediada por EROs.

Por fim, dados apresentados por Chen e colaboradores (2019), demonstraram que o ácido mirístico apresentou atividade antibacteriana contra a *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), uma vez que este inibiu o crescimento bacteriano e induziu a morte celular por apoptose.

Nota-se que, os dados apresentados anteriormente por outros autores corroboram os resultados encontrados neste presente trabalho. Sendo assim, o efeito citotóxico, antiproliferativo, pró-apoptótico e antitumoral exibido pelos extratos HCE e SFEtOH muito

provavelmente estejam correlacionados com a presença dos ácidos graxos de cadeia média e longa. Todavia não se deve descartar o fato que, os ácidos graxos podem estar juntamente com outros fitocompostos presentes no extrato exercendo um efeito sinérgico, contribuindo simultaneamente para o efeito antitumoral *in vitro* e *in vivo* apresentado pelos extratos da torta de sementes de *P. edulis*.

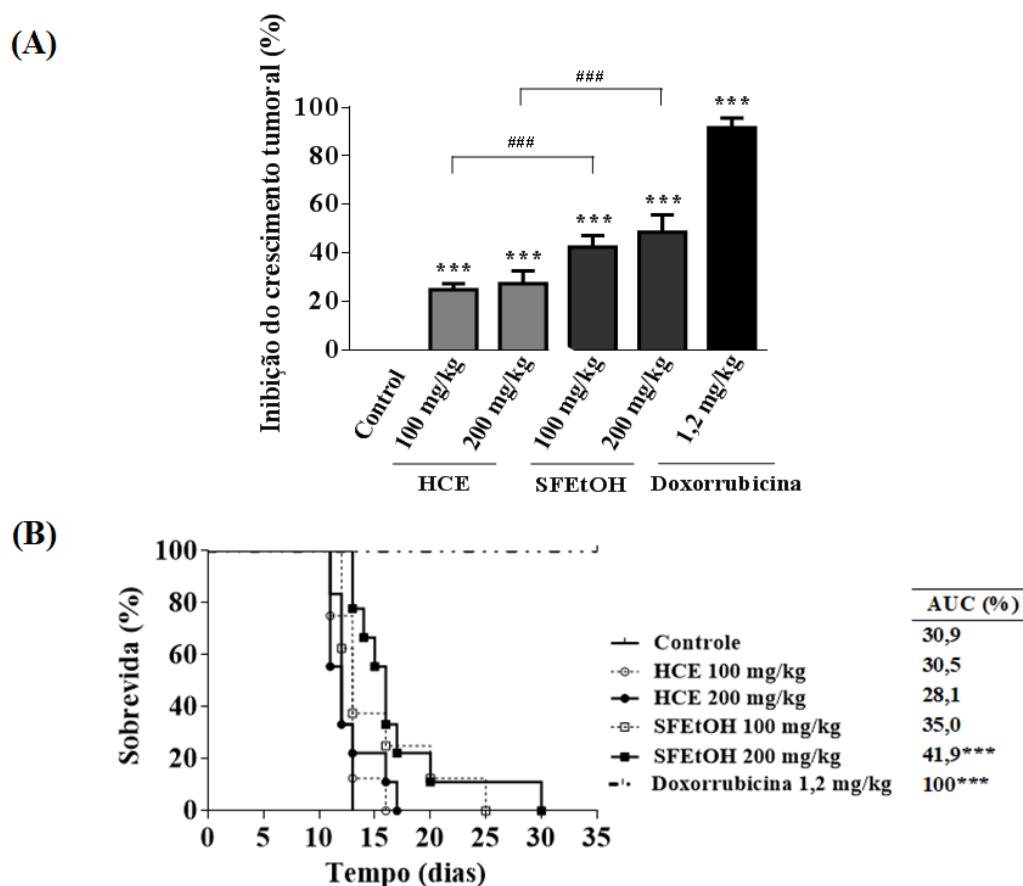
### 3.1.2.3 Atividade antitumoral *in vivo* dos extratos da *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener

Com o intuito de avaliar-se o efeito antitumoral *in vivo*, os camundongos foram tratados por nove dias consecutivos com os extratos HCE e SFEtOH nas doses de 100 e 200 mg/kg/dia. No qual, foi avaliado a inibição do crescimento tumoral e a sobrevida dos animais tratados, comparando os resultados deste com o controle negativo e doxorubicina (controle positivo).

De acordo com os resultados apresentados na figura 22, ambos os extratos foram capazes de inibir significativamente o crescimento tumoral, quando comparados com o controle negativo (Figura 22A). Nota-se que, o extrato SFEtOH usado na dose de 200 mg/kg/dia demonstrou uma atividade superior aos demais tratamentos, inibindo o crescimento tumoral em  $48,5 \pm 7,2\%$ , enquanto que, o extrato HCE utilizado na mesma dose causou uma inibição de apenas  $27,3 \pm 5,2\%$ . Os animais tratados com a doxorubicina (1,2 mg/kg/dia) praticamente não apresentaram crescimento tumoral.

Outro critério altamente relevante utilizado para julgar o potencial e a eficácia de qualquer fármaco antitumoral é o prolongamento do tempo de vida útil dos animais (CLARKSON, BURCHENAL, 1965). A probabilidade de sobrevivência dos animais tratados com os extratos HCE e SFEtOH foi estimada utilizando o método de Kaplan-Meier, complementado com o teste de Log-rank (Figura 22B). Observando os resultados obtidos é possível verificar que os animais que receberam o extrato HCE não apresentaram diferença em relação ao controle negativo. Por outro lado, apenas o extrato SFEtOH utilizado na dose de 200 mg/kg/dia foi capaz de aumentar significativamente a probabilidade de sobrevivência dos animais tratados, aumentando a sobrevida destes animais em 41,9%, quando comparado com o controle negativo. Não houve mortalidade em animais tratados com a doxorubicina.

**Figura 22.** Atividade antitumoral dos extratos HCE e SFEtOH (100 e 200 mg/kg/dia, 9 dias) em camundongos Balb/c inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).



Nota: Onde (A) Inibição do crescimento tumoral com base na variação da circunferência abdominal. (B) Taxa de sobrevivência de camundongos tratados com HCE e SFEtOH, de acordo com o método de Kaplan-Meier. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de replicata biológica,  $n = 12$ . Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA, complementado com o teste de Bonferroni ou teste de Log-rank, quando apropriado. **Controle:** controle negativo; **HCE:** extrato hidroalcoólico; **SFEtOH:** extrato supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH). **AUC:** área sob a curva. (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas comparadas aos dados do controle negativo quando  $p < 0,001$ . (###) denotam diferenças estatísticas comparando o extrato HCE com o extrato SFEtOH ( $p < 0,001$ ).

O extrato que demonstrou maior potencial de inibição sobre o crescimento tumoral foi o que mais aumentou a sobrevivência dos animais, especialmente quando usado na dose de 200 mg/kg/dia. Com isso, é possível sugerir que o extrato SFEtOH apresentou um efeito antitumoral mais significativo e eficaz que o extrato HCE.

Alguns estudos relataram que o aumento da geração intracelular de EROs, indução de danos ao DNA, bloqueio do ciclo celular e indução de morte celular por apoptose são os

principais mecanismos de ação responsáveis pelo efeito citotóxico dos ácidos láurico, palmítico, linoleico, oleico e mirístico (ENGELBRECHT et al., 2008, TAKAYAMA et al., 2009, FAUSER et al., 2013, KADOCHI et al., 2017). Assim, devido à presença destes ácidos graxos de cadeia média e longa nos extratos tornou-se imprescindível avaliar estes parâmetros. Para os subsequentes ensaios foram utilizados apenas a dose de 200 mg/kg/dia, visto que, esta foi a dose que demonstrou ter uma atividade antitumoral mais pronunciada.

#### *3.1.2.4 Biomarcadores de estresse oxidativo e danos oxidativos em células do TAE*

Os biomarcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidante foram avaliados em amostras do líquido ascítico de Ehrlich coletados de camundongos tratados com os extratos HCE e SFEtOH na dose de 200 mg/kg/dia por nove dias consecutivos.

Os resultados apresentados na figura 23 demonstram que ambos os extratos induziram o estresse oxidativo nas células do TAE. No qual, foi constatado que o extrato SFEtOH aumentou significativamente a peroxidação lipídica (Figura 23A) e a carbonilação de proteínas (Figura 23B), quando comparado com o controle negativo, enquanto que, o extrato HCE aumentou apenas o nível de peroxidação lipídica. Contudo, nota-se que, quando se compara os dois extratos em relação à peroxidação lipídica, estes não apresentaram diferença estatística entre si. No entanto, ambos os extratos foram estatisticamente diferentes em relação à carbonilação de proteínas.

Em relação à atividade das enzimas antioxidante (GPx e TrxR) e o conteúdo de GSH avaliados, observou-se que o extrato SFEtOH promoveu um aumento significativo na atividade GPx (Figura 23C) e no conteúdo de GSH (Figura 23D). Por outro lado, o extrato HCE apenas causou um ligeiro aumento na atividade da GPx.

Sabe-se que, o ciclo redox da glutathiona (GSH/GSSG) tem um papel intracelular crucial na defesa contra o estresse oxidativo. Considerando que, a GPx usa o GSH como cofator, levando à formação de sua forma oxidada glutathiona dissulfeto (GSSG) e o GSH, por sua vez, pode ser regenerado a partir de GSSG pela enzima glutathiona redutase (GR), uma reação dependente de NADPH (CHANCE et al., 1979). Logo, uma atividade exaustiva do ciclo redox da GSH, devido a um intenso insulto oxidativo, pode levar a uma depleção excessiva de NADPH (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007), comprometendo desta forma a atividade de enzimas dependentes de NADPH.

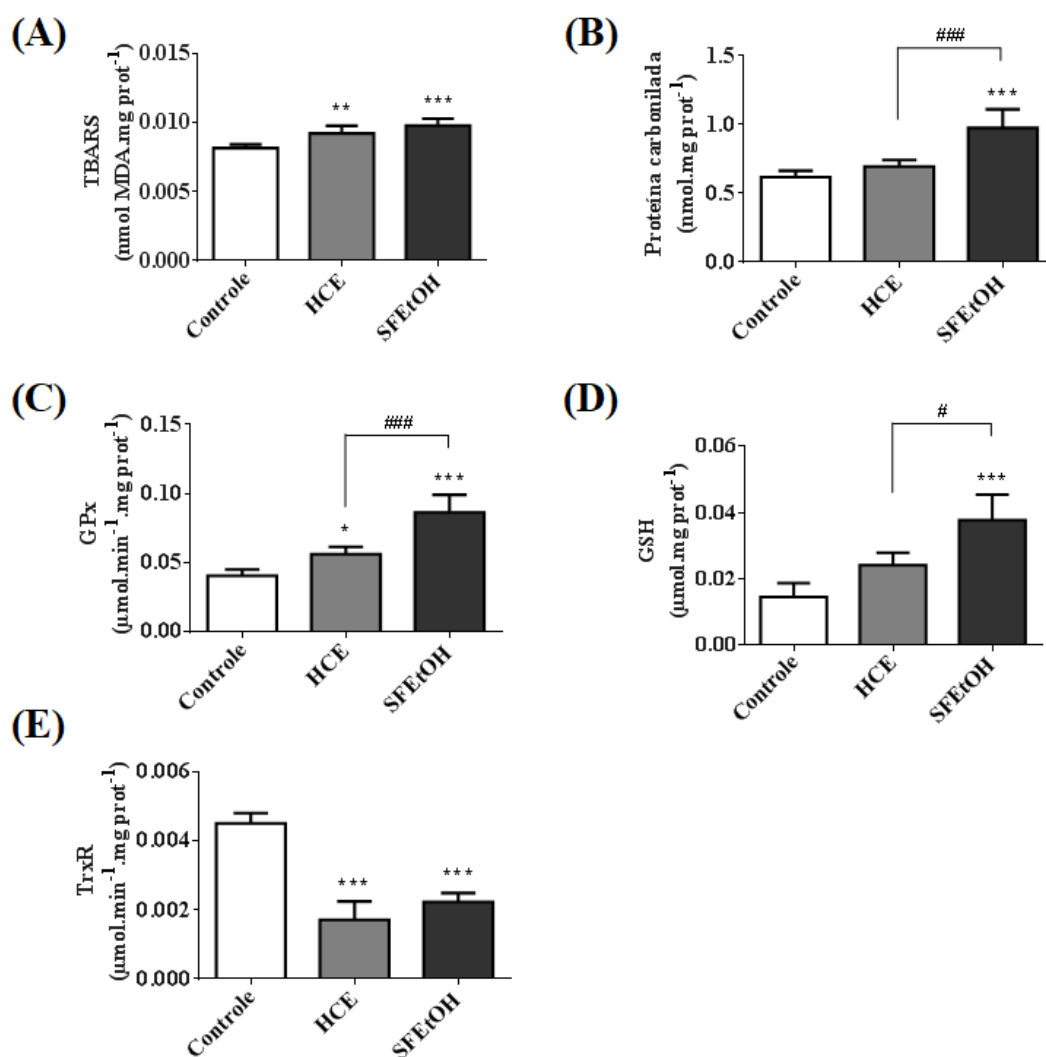


Tanto a GR como a TrxR pertencem à família das flavoproteínas com atividade piridina nucleotídeo-dissulfeto oxidoredutases. Estes têm como características, a presença de um centro redox composto por um par de cisteínas (dissulfeto), além de conter um domínio ligação de FAD (flavina-adenina-dinucleotídeo) (HOJO et al., 2002). Estas enzimas (GR e TrxR) quando ativas transferem os elétrons do NADPH para a molécula de FAD, deste para o centro redox que contém o grupo dissulfeto e por fim para os substratos correspondentes que conseqüentemente são reduzidos (HOJO et al., 2002). Assim sendo, o NADPH é um cofator altamente relevante para a atividade de GR e TrxR, bem como para a regeneração de GSH através da redução de GSSG (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

O sistema redox da tiorredoxina, um dos principais sistemas antioxidantes de defesa contra o estresse oxidativo, é frequentemente superexpresso em muitos tumores (BERGGREN et al., 1996). Recentemente, a TrxR se tornou um alvo promissor no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. Dado que, a inibição da atividade de TrxR provoca um desbalanço no equilíbrio redox que leva ao acúmulo intracelular de EROs nas células tumorais, causando assim um efeito citotóxico (AI et al., 2016).

Observando os resultados obtidos nota-se que, ambos os extratos exibiram uma potente atividade inibidora de TrxR, quando comparados com o controle negativo (Figura 23E). Contudo é importante salientar que, os resultados obtidos sugerem que os extratos HCE e SFEtOH demonstram ter diferentes mecanismos de atividade pró-oxidante. Visto que, o extrato SFEtOH diminuiu significativamente a atividade de TrxR, provavelmente devido a intensa atividade do ciclo redox da GSH que causou uma depleção de NADPH, e conseqüentemente levou a danos oxidativos a lipídios e proteínas. Enquanto que, a atividade pró-oxidante do extrato HCE se baseou quase que totalmente na inibição da atividade de TrxR, levando apenas a ocorrência de danos oxidativos a lipídios. Além disso, é possível constatar que o extrato SFEtOH apresenta uma atividade pró-oxidante mais eficiente que a do extrato HCE.

**Figura 23.** Biomarcadores de estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes medidas em células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) tratadas com os extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia, 9 dias).



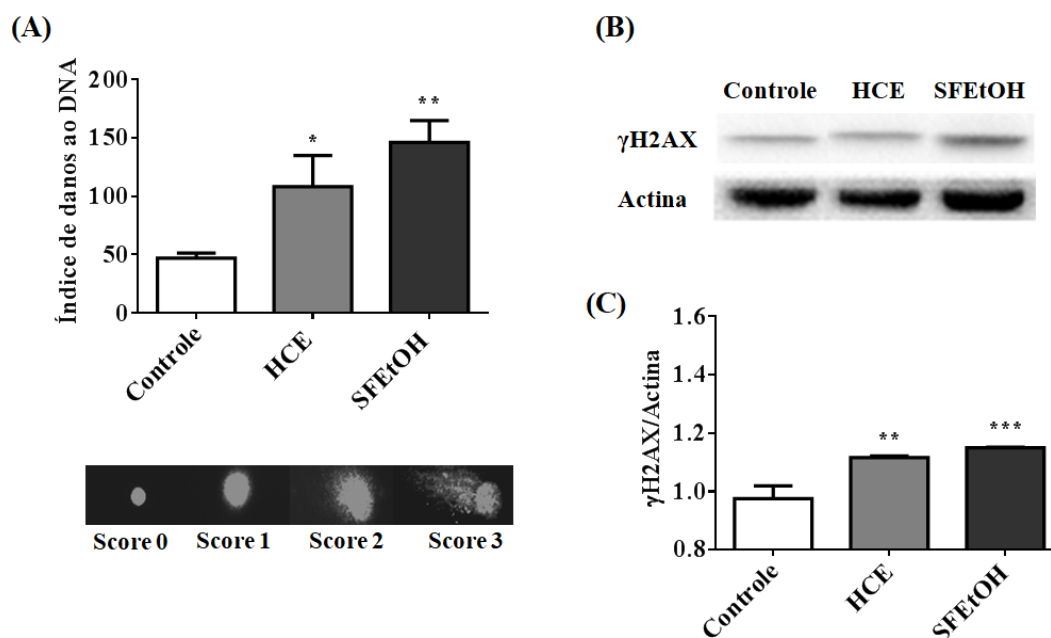
Nota: Onde (A) Níveis de peroxidação lipídica (TBARS: Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico) (B) Marcador de danos às proteínas (Proteína carbonilada). (C) Atividade da GPx (glutationa peroxidase). (D) Conteúdo de glutatona reduzida (GSH). (E) Atividade de TrxR (tioredoxina redutase). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, n = 12. **Controle:** controle negativo; **HCE:** extrato hidroalcoólico; **SFEtOH:** extrato supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH). (\*), (\*\*) e (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas comparadas aos dados do controle negativo quando p < 0,05, p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente. (#) e (###) denotam diferenças estatísticas comparando o extrato HCE com o extrato SFEtOH (p < 0,05 e p < 0,001).

### 3.1.2.5 Efeito dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener sobre o DNA de células do TAE

O efeito dos extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia) sobre o DNA das células de TAE foi avaliada pelo ensaio do cometa. Observando os resultados obtidos, é possível verificar-se que ambos os extratos tiveram a capacidade de causar danos no DNA das células do TAE, levando assim a fragmentação do mesmo. Os extratos HCE e SFEtOH causaram um índice de dano ao DNA de  $108,3 \pm 26,5$  e  $146,3 \pm 18,5$ , respectivamente. Enquanto que, o controle negativo somente apresentou um índice de dano ao DNA de  $47,0 \pm 4,2$  (Figura 24A).

A partir destes resultados, a fosforilação da histona  $\gamma$ H2AX na serina 139 foi então avaliada por imunoeletroforese uma vez que esta histona tem sido amplamente utilizada como um marcador sensível de danos no DNA (YUAN et al., 2010). Os dados apresentados nas figuras 24B e 24C indicam que o tratamento realizado com os extratos HCE e SFEtOH causou uma indução significativa da fosforilação de  $\gamma$ H2AX nas células de TAE. Estes resultados estão em concordância com o resultado obtido pelo ensaio do cometa (Figura 24A), confirmando assim a indução de danos ao DNA por ambos os extratos.

**Figura 24.** Avaliação do efeito dos extratos HCE e SFEtOH sobre o DNA das células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e avaliação da fosforilação da histona  $\gamma$ H2AX.



Nota: Onde (A) Índice de dano ao DNA analisado pelo ensaio do cometa e (B) Western blots da proteína-chave usada como biomarcadora do dano no DNA ( $\gamma$ H2AX) avaliado em células TAE tratadas com HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia, 9 dias) (C) Fosforilação da histona  $\gamma$ H2AX na serina 139 quantificada por densitometria. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão, n = 12. **Controle:** controle negativo; **HCE:** extrato hidroalcoólico; **SFEtOH:** extrato supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH). (\*), (\*\*) e (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas comparadas ao controle negativo quando p < 0,05, p < 0,01 e p < 0,001, respectivamente.

A fragmentação do DNA induzida pelos extratos HCE e SFEtOH muito provavelmente está relacionada ao aumento da geração de EROs. Sabe-se que, o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), uma espécie reativa não radicalar altamente difusível e estável, quando presente nas células em altas concentrações (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007), causa danos ao DNA levando a sua fragmentação (SUN-YEE et al., 2000). Contudo, o principal responsável pelo dano induzido ao DNA é o radical hidroxil ( $\cdot$ OH) gerado a partir da redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de metais de transição como o ferro na reação de Fenton. O radical hidroxil ( $\cdot$ OH) provoca quebras de fita simples e de fita dupla no DNA (COLLINS, 1999). Assim sendo, o resultado do ensaio do cometa (Figura 24A) sugere que a fragmentação do DNA está provavelmente associada ao estresse oxidativo causado pelos extratos HCE e SFEtOH, levando desta forma a indução de danos oxidativo ao DNA.

### 3.1.2.6 Efeito dos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener sobre o ciclo celular

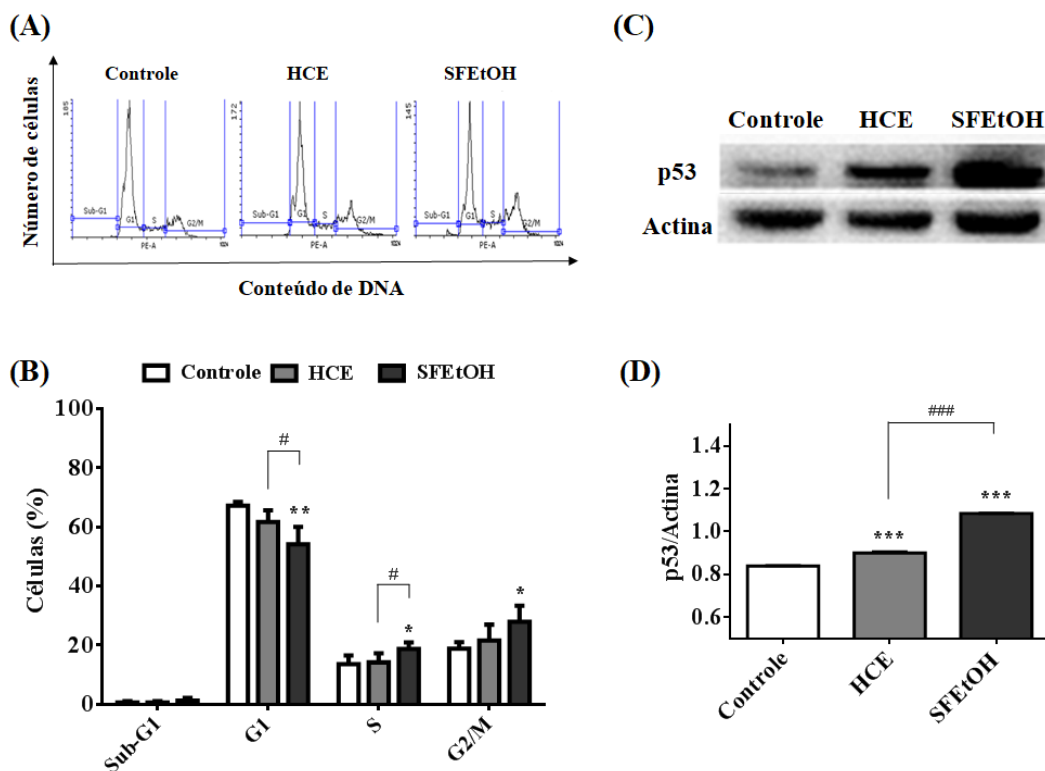
É de conhecimento geral que, muitas das estratégias terapêuticas que são capazes de bloquear o ciclo celular e inibir a proliferação da célula são utilizadas como tratamento complementar à quimioterapia citotóxica convencional (DICKSON, SCHWARTZ, 2009). Desta forma, o efeito dos extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia) sobre o ciclo celular das células de TAE foi avaliado a fim de classificar as células de acordo com a fase do ciclo celular.

Segundo Sagar e Green (2009), as células que estão na fase G1 não apresentam duplicação de DNA, enquanto que, as células que estão na fase G2/M possuem o DNA duplicado. As células em fase S exibem um conteúdo intermediário de DNA e na fase Sub-G1 estão os detritos e células mortas. Neste contexto, os dados apresentados nas figuras 25A e 25B indicam que o controle negativo apresentou  $67,1 \pm 1,2\%$  de células na fase G1,  $13,6 \pm 2,9\%$  de células na fase S e  $18,8 \pm 2,3\%$  de células na fase G2/M. Enquanto que, os extratos HCE e SFEtOH provocaram uma diminuição no número de células presentes na fase G1 para  $61,6 \pm 3,9$  e  $54,1 \pm 5,9\%$ , respectivamente; e, ao mesmo tempo, causaram um aumento no número de células presentes na fase G2/M para  $21,5 \pm 5,4$  e  $27,7 \pm 5,4\%$ , respectivamente. No entanto, apenas o extrato SFEtOH foi estatisticamente diferente do controle negativo, o que indica que o extrato SFEtOH foi capaz de causar um bloqueio do ciclo celular na fase G2/M. Visto que, ele diminuiu o número de células na fase G1 e aumentou na fase G2/M, o que sugere um provável efeito antiproliferativo do extrato SFEtOH.

A proteína supressora tumoral p53 é conhecida como sendo o “guardião do genoma” e atua bloqueando o ciclo celular quando o DNA celular é danificado. Além disso, a proteína p53 é capaz de mediar a morte celular por apoptose (HERCEG, WANG, 1999). Nesse sentido, a expressão de p53 foi avaliada por imunoelektroforese.

Ambos os extratos induziram o aumento da expressão de p53 nas células de TAE (Figura 25C/D). Assim, os resultados apresentados sugerem que a parada do ciclo celular em G2/M induzido pelo extrato SFEtOH (Figura 25A/B) ocorreu devido ao aumento da expressão da proteína p53 em resposta ao dano induzido ao DNA. Curiosamente, por mais que o extrato HCE tenha aumentado a expressão de p53, este não foi capaz de induzir a parada do ciclo celular nas células de TAE.

**Figura 25.** Avaliação do efeito dos extratos HCE e SFEtOH sobre o ciclo celular das células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE) e avaliação da expressão da proteína p53.



Nota: **(A)** Histograma e **(B)** Porcentagem de células TAE em cada fase do ciclo celular (Sub-G1, G1, S e G2/M) tratadas com os extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia, 9 dias) analisados por citometria de fluxo. **(C)** Western blots da proteína-chave usada como biomarcadora de bloqueio do ciclo celular (p53). **(D)** Expressão de p53 quantificada por densitometria. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 12$ . **Controle:** controle negativo; **HCE:** extrato hidroalcoólico; **SFEtOH:** extrato supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH). **Sub-G1:** células em quiescência; **G1:** células que não apresentam duplicação de DNA; **S:** células com conteúdo intermediário de DNA; **G2/M:** células com DNA duplicado. (\*) e (\*\*) denotam diferenças estatísticas comparadas ao controle negativo quando  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente. (#) denotam diferenças estatísticas comparando o extrato HCE com o extrato SFEtOH ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.2.7 Tipo de morte celular induzido pelos extratos da *P. edulis f. flavicarpa* Degener em células do TAE

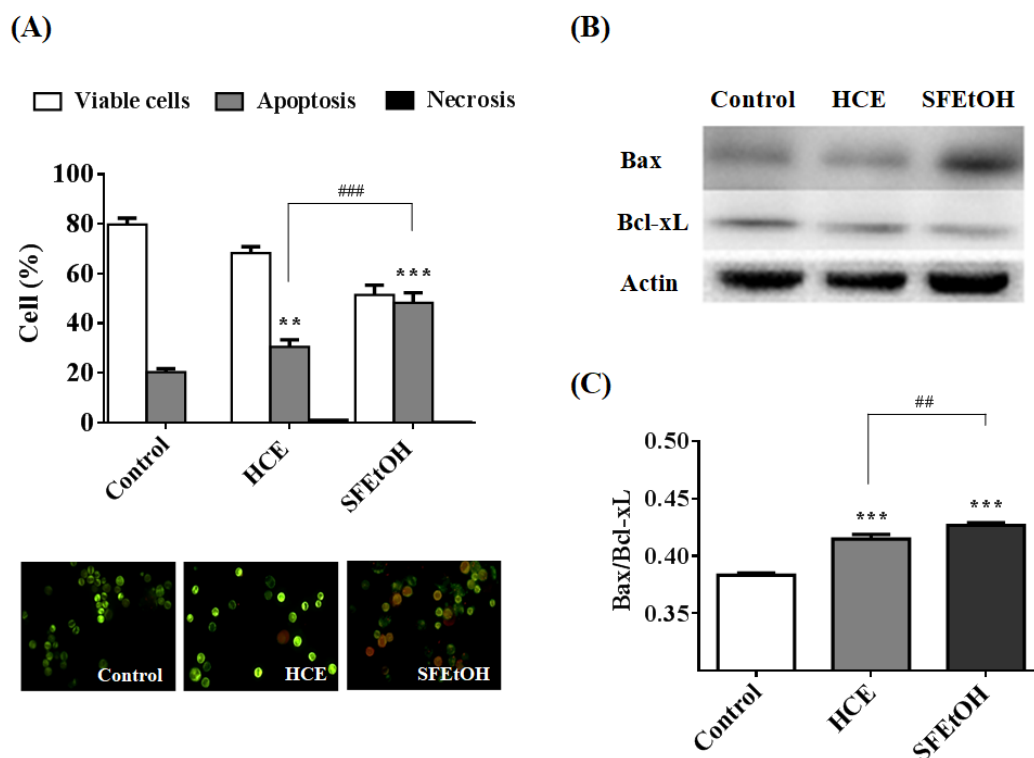
O tipo de morte celular induzido pelos extratos HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia) foi determinado através da coloração das células do TAE com brometo de etídio e laranja de acridina, ambos agentes intercaladores de DNA. Sabe-se que, a laranja de acridina tem a capacidade de permear todas as células, sendo células viáveis ou não viáveis, emitindo desta forma uma fluorescência de cor verde a partir do núcleo. Enquanto que, o brometo de etídio é

excluído das células vivas e só é absorvido pelas células quando a integridade da membrana citoplasmática é perdida. As células apoptóticas incorporam tanto a laranja de acridina quanto o brometo de etídio e, portanto, o núcleo é corado de laranja. O núcleo das células necróticas é corado apenas pelo brometo de etídio, emitindo assim uma fluorescência de coloração vermelha. Deste modo, este método permite diferenciar células viáveis daquelas em processo de morte celular por apoptose e necrose (MCGAHON et al., 1995).

Através da realização deste ensaio, observou-se que ambos os extratos foram capazes de aumentar o número de células apoptóticas em comparação com o controle negativo, enquanto que diminuía o número de células viáveis (Figura 26A). O controle negativo apresentou um número de células apoptóticas de  $20,3 \pm 2,8\%$ , enquanto que, os extratos HCE e SFEtOH apresentaram uma frequência de células apoptóticas de  $30,6 \pm 4,1$  e  $48,2 \pm 1,5\%$ , respectivamente. Além disso, ao comparar os dois extratos, o SFEtOH demonstrou uma eficiência pró-apoptótica maior que a do extrato HCE. Visto que, o SFEtOH aumentou o número de células apoptóticas em aproximadamente 18%, em comparação com o extrato HCE. Curiosamente, nenhum dos tratamentos, incluindo o controle negativo, observou-se a presença de células necróticas.

A apoptose que ocorre pela via mitocondrial é controlada por proteínas-chave da família Bcl-2. As proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL previnem a apoptose, enquanto que, as proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bak promovem a apoptose (BROWN, 1997). Assim, as proteínas Bax e Bcl-xL foram avaliadas por imunoelektroforese e observou-se que a razão Bax/Bcl-xL aumentou significativamente quando os animais foram tratados com os extratos HCE e SFEtOH na dose de 200 mg/kg/dia por nove dias consecutivos (Figura 26B/C). Deste modo, este resultado sugere que ambos os extratos induziram a morte celular por apoptose pela via mitocondrial nas células de TAE.

**Figura 26.** Tipo de morte induzido pelos extratos HCE e SFEtOH nas células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).



Nota: Onde **(A)** Morfologia das células TAE e o tipo de morte celular induzida por HCE e SFEtOH (200 mg/kg/dia, 9 dias) avaliados pelo método de coloração com brometo de etídio/laranja de acridina e visualizados por microscopia de fluorescência (Aumento de 400×); Mancha vermelha, laranja e verde denotam células necróticas, apoptóticas e viáveis, respectivamente. **(B)** Western blots das proteínas-chave utilizadas como biomarcadora de apoptose (Bax, Bcl-xL). **(C)** Razão de Bax/Bcl-xL quantificada por densitometria. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão,  $n = 12$ . **Controle:** controle negativo; **HCE:** extrato hidroalcoólico; **SFEtOH:** extrato supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH). (\*\*) e (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas comparadas ao controle negativo quando  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. (###) denotam diferenças estatísticas comparando o extrato HCE com o extrato SFEtOH ( $p < 0,001$ ).

Os dados obtidos mostraram que a apoptose induzida pelo extrato SFEtOH (Figura 26A) pode estar relacionada com a parada do ciclo celular em G2/M (Figura 25A/B). Estas evidências são sustentadas pelo fato que o tratamento com o extrato SFEtOH causou ativação da proteína p53 nas células do TAE (Figura 25C/D). Em contrapartida, o extrato HCE por mais que tenha modulado a expressão de p53 e induzido a apoptose, este não foi capaz de bloquear a progressão do ciclo celular nestas células. Portanto, estes dados reforçam o indicativo de que os extratos HCE e SFEtOH apresentam diferentes mecanismos de



citotoxicidade e efeito antitumoral. Isto, possivelmente, ocorre em virtude da composição de ácidos graxos presentes em ambos os extratos ser diferente (Tabela 4 e Figura 21), sendo o extrato HCE basicamente composto de ácidos graxos de cadeia longa, nomeadamente o ácido oleico e ácido palmítico. Enquanto que, o extrato SFEtOH demonstrou ser rico em ácidos graxos de cadeia média e longa, com destaque especial para os ácidos láurico, linoleico, oleico, palmítico e mirístico.

### 3.1.3 Conclusões parciais

Os extratos da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener apresentaram citotoxicidade *in vitro* e atividade antitumoral *in vivo*. O provável mecanismo responsável por estes efeitos seria o aumento da geração intracelular de espécies reativas de oxigênio devido a danos mitocondriais, levando a danos oxidativos de lipídios, proteínas e DNA, parada do ciclo celular na fase G2/M e apoptose via mitocondrial. Além disso, o extrato supercrítico (SFEtOH) apresentou uma maior eficiência antitumoral quando comparado ao extrato convencional (HCE), provavelmente devido à presença de ácidos graxos de cadeia média e longa.

Como mencionado anteriormente, estes resultados foram condensados em um artigo que foi publicado na revista *Food Chemistry and Toxicology* (ANEXO A):

Nádia S.R.S. Mota, Maicon R. Kwiecinski, Rodrigo C. Zeferino, Daniela A. de Oliveira, Lizandra C. Bretanha, Sandra R.S. Ferreira, Gustavo A. Micke, Danilo Wilhelm Filho, Rozangela C. Pedrosa, Fabiana Ourique. *In vivo* antitumor activity of by-products of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Rich in medium and long chain fatty acids evaluated through oxidative stress markers, cell cycle arrest and apoptosis induction. *Food and Chemical Toxicology*, 118, 557–565, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.010>.

## 3.2 ETAPA 2 – ATIVIDADE CITOTÓXICA E ANTITUMORAL DE ALCALOIDES $\beta$ -CARBOLÍNICOS E SUA CORRELAÇÃO COM A INDUÇÃO DE DANOS AO DNA, BLOQUEIO DO CICLO CELULAR E APOPTOSE.

Esta etapa do presente estudo foi realizada em três principais fases. Na primeira fase foi avaliada a atividade citotóxica *in vitro* dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina, através do ensaio de viabilidade celular, do qual foi selecionado o composto mais seletivo (harmina) para dar continuidade aos demais ensaios. Assim, foi avaliado o efeito citotóxico, antiproliferativo e pró-apoptótico deste alcaloide através da análise do tipo de morte celular, despolarização da membrana mitocondrial, parada do ciclo celular, ensaio do cometa e ensaios de imunodeteção. Na segunda fase avaliou-se a capacidade deste alcaloide em interagir com o DNA, através da execução de ensaios moleculares (espectroscopia UV-Visível, espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular) e de abordagens *in silico* (ancoragem molecular e dinâmica molecular). Por fim, na terceira fase buscou-se avaliar a atividade antitumoral *in vivo*, observando a inibição do crescimento tumoral e a sobrevivência dos animais tratados.

### 3.2.1 Materiais e métodos

#### 3.2.1.1 Reagentes e anticorpos

A agarose, iodeto de propídio (PI), laranja de acridina, DNA de timo de vitelo (CT-DNA), sal de tetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), albumina sérica bovina (BSA), éster etílico de tetrametil-rodamina (TMRE), ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) (DTNB) e o coquetel inibidor de proteases foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Os antibióticos, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), solução salina tamponada com fosfato (PBS) e o soro fetal bovino (FBS) foram adquiridos da Gibco (EUA). O kit de iodeto de propídio (PI)/ribonuclease A (RNase) foi adquirido da Immunostep (Salamanca, Espanha). O coquetel inibidor de fosfatases foi adquirido da Calbiochem (Merck Biosciences). Os anticorpos policlonais de coelho criados contra CDK2 (Cat. Sc-163), Ciclina A (Cat. Sc-596), Ciclina B1 (Cat. Sc-752), PARP1 (Cat. Sc-7150), Actina (Cat. Sc-7210 ) e os anticorpos monoclonais de camundongo criados contra Bax (Cat. sc-7480), Bcl-xL (Cat. sc-8392) e p53 (Cat. sc-126) vieram da Santa Cruz Biotechnology (EUA). O anticorpo policlonal de coelho

criado contra fosfo-Rb (Cat. 9308) foi adquirido da Cell Signaling Technology (Danvers, EUA). O anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho (Cat. AP132P) e o anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de camundongo (Cat. AP181P), bem como o kit de detecção de quimioluminescência para anticorpos acoplados à HRP foram provenientes da Merck Millipore (EUA). O harmano (1-metil-9H-pirido [3,4-b] indol) e a harmina (7-metoxi-1-metil-9H-pirido [3,4-b] indol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Todos os demais reagentes químicos foram usados com grau de pureza atendendo as normas da *American Chemical Society* (ACS).

### 3.2.1.2 Cultura de células

As células de carcinoma de mama humano (MCF-7), adenocarcinoma de colo do útero (HeLa), carcinoma hepatocelular hepático (HepG2) e fibroblastos normais (McCoy) foram adquiridos no banco de células do Rio de Janeiro, Brasil. As células foram mantidas a temperatura constante (37 °C) sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> com 95% de umidade do ar. O meio de cultura utilizado foi o meio DMEM, suplementado com 10% de FBS, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL).

### 3.2.1.3 Ensaio de viabilidade celular

A citotoxicidade dos alcaloides β-carbolínicos harmano e harmina foram avaliadas através do ensaio de MTT (sal de tetrazólio) (MOSMANN, 1983). As células descritas acima foram plaqueadas a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços. Após atingirem 80% de confluência, as células foram tratadas com diferentes concentrações de harmano e harmina (0,1 a 1000 µM) por 48h e 72h. O controle negativo foi tratado apenas com o meio de cultura padrão contendo dimetilsulfóxido a 0,1% (DMSO) e a doxorubicina foi utilizada como controle positivo. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas por 2h com uma solução de MTT (100 µl/poço; 0,5 mg/mL). Os cristais de formazan foram solubilizados por meio da adição de DMSO (100 µL/poço); e em seguida, efetuou-se a leitura das absorbâncias no leitor de microplacas (TECAN Infinity M200), empregando um comprimento de onda de 550nm. Foram realizados três experimentos independentes e os resultados foram apresentados como a metade da concentração efetiva máxima (CE<sub>50</sub>), calculada usando o software Graph Pad Prism 6 (San Diego, EUA).

O índice de seletividade (IS) dos compostos em estudo foi calculado usando a equação reportada por Koch e colaboradores (2005):

IS (índice de seletividade) =  $CE_{50}$  do composto em linhagem de célula normal /  $CE_{50}$  do mesmo composto em linhagem de célula tumoral.

Onde se considera um composto como seletivo quando seu IS é maior ou igual a 2.

#### *3.2.1.4 Avaliação do tipo de morte celular induzida nas células MCF-7*

O tipo de morte celular induzida por harmina foi avaliado através do método de coloração com iodeto de propídio e laranja de acridina (MCGAHON et al., 1995). Este método permite diferenciar as células viáveis (verde) daqueles em processo de morte por apoptose (laranja) ou necrose (vermelho intenso).

As células MCF-7 foram plaqueadas ( $2 \times 10^5$ /poço) em placas de seis poços. Após atingirem a confluência, as mesmas foram tratadas com a harmina nas concentrações que correspondiam ao  $CE_{30}$  (27,88  $\mu$ M) e  $CE_{50}$  (46,47  $\mu$ M) por 72h. O controle negativo foi tratado apenas com o meio de cultura contendo 0,1% de DMSO. Após o tratamento, as células foram coradas com iodeto de propídio (100 mg/mL) e laranja de acridina (100 mg/mL) (5  $\mu$ l; 1:1 v/v). Em seguida, as células foram visualizadas usando o microscópio Olympus, modelo BX41 (Japão). Os resultados foram expressos como as porcentagens de células viáveis, apoptóticas ou necróticas.

#### *3.2.1.5 Ensaio de potencial de membrana mitocondrial*

A despolarização da membrana mitocondrial foi determinada usando um corante fluorescente, éster etílico de tetrametil-rodamina (TMRE), que se acumula na matriz mitocondrial de acordo com o potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) (O'REILLY et al., 2003). As células MCF7 foram plaqueadas a uma densidade de  $1 \times 10^6$  células/poço em placas de seis poços. Após o atingirem a confluência, as células foram tratadas com a harmina nas concentrações de 27,88  $\mu$ M e 46,47  $\mu$ M por 48h. A seguir, as células foram incubadas no escuro com TMRE (25 nM) por 20 minutos a 37°C. A fluorescência celular foi determinada usando o citômetro de fluxo BD FACS Canto II (BD Biosciences, EUA) e os resultados foram apresentados como porcentagem de células com alta fluorescência de TMRE.

### *3.2.1.6 Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo*

O efeito do alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina sobre o ciclo celular de MCF-7 foi analisado por citometria de fluxo usando um kit de solução de iodeto de propídio (IP, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e ribonuclease A (RNase, 0,2  $\text{mg}/\text{mL}$ ). As células foram plaqueadas ( $2 \times 10^5/\text{poço}$ ) em placas de seis poços. Após atingirem a confluência, as células foram sincronizadas com nocodazol (30  $\text{ng}/\text{mL}$ ) por 14h e, em seguida, tratadas com harmina (27,88  $\mu\text{M}$ ) por 72h. Posteriormente, as células foram fixadas durante a noite com etanol (70%) a  $-20^\circ \text{C}$ , lavadas com PBS contendo 2% de albumina e incubadas com a solução de iodeto de propídio/RNase por 15 min em temperatura ambiente. A seguir, as células foram avaliadas usando o citômetro de fluxo BD FACS Canto II (BD Biosciences, EUA) e classificadas em cada fase do ciclo celular, de acordo com o conteúdo do DNA. Os dados foram processados usando o Flowing Software 2.5.0 (Finlândia).

### *3.2.1.7 Avaliação da interação do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina com o DNA de timo de vitelo (CT-DNA)*

O monitoramento da interação de harmina com o CT-DNA foi avaliada por meio da titulação espectrofotométrica de varredura UV-Visível (NAVARRO et al. 2003). No qual, concentrações crescentes de harmina (0 - 250  $\mu\text{M}$ ) foram tituladas sobre uma concentração fixa de CT-DNA (150  $\mu\text{M}$ ). As soluções foram previamente preparadas em tampão HEPES (10 mM, pH = 7,0). Os espectros das amostras foram obtidos no espectrofotômetro Hitachi U-2910®; e a varredura UV- Visible foi realizada de 200 a 800 nm. Foram determinadas as alterações na absorvância de CT-DNA, após a incubação com harmina, bem como o deslocamento do comprimento de onda de absorção máxima.

A fim de determinar a potencial intercalação de harmine entre as bases de DNA, foi realizado o ensaio de intercalação empregando o agente intercalante iodeto de propídio (IP), de acordo com Silveira e colaboradores (2011). Ensaios preliminares foram realizados a fim de obter-se uma curva de saturação, no qual o CT-DNA (150  $\mu\text{M}$ ) foi saturado com iodeto de propídio (300  $\mu\text{M}$ ). Em seguida, concentrações crescentes de harmina (0 - 250  $\mu\text{M}$ ) foram incubadas com concentrações fixas de CT-DNA (150  $\mu\text{M}$ ) e iodeto de propídio (300  $\mu\text{M}$ ) por 10 minutos em temperatura ambiente. A doxorubicina, um antitumoral padrão intercalante de DNA, foi utilizada como controle positivo. As soluções foram preparadas em tampão fosfato

50 mM contendo 0,1M de NaCl (pH = 7,4). O SpectraMax Paradigma® Multileader foi usado para medir a variação da fluorescência das amostras. Foram utilizados comprimentos de onda de excitação e emissão de 492 nm e 620 nm, respectivamente.

O ensaio de dicroísmo circular (DC) foi realizado como descrito por Bertoldo e colaboradores (2011). Os espectros de dicroísmo circular foram mensurados no espectropolarímetro JASCO-810 (JASCO, Easton, MD). Uma concentração fixa de CT-DNA (150  $\mu$ M), preparada no tampão fosfato (50 mM) contendo 0,1M de NaCl (pH = 7,4), foi titulada com concentrações crescentes de harmina, alcançando uma razão molar de DNA/harmina de 0,04, 0,05 e 0,07. Todos os espectros de dicroísmo circular foram adquiridos nos intervalos de 220 a 350 nm e os dados finais foram expressos em *millidegrees* (mdegs).

### 3.2.1.8 Estudo *in silico*: Simulação de ancoragem molecular e dinâmica molecular

A sequência da estrutura modelo de B-DNA d (CGTGAATTCACG) (PDB ID1G3X) foi obtida a partir da base de dados de acesso livre Protein Data Bank (PDB) (MALININA et al., 2002). O ligante-harmina (INE), salvo como arquivo (.mol2), veio do banco de dados ZINC (<http://zinc.docking.org/substance/18847046>). Após a remoção do ligante coprecipitado original e de moléculas de águas, a ligante harmina (INE) foi minimizado com o software UCSF Chimera 1.13 (PETTERSEN et al., 2004), usando o campo de força AMBER99bsc1 (HORNAK et al., 2006). A ferramenta ACPYPE, baseada em Python (SOUSA DA SILVA, VRANKEN, 2012), foi utilizada como Antechamber para gerar a topologia da ligante harmina (INE) que seria utilizada posteriormente nas simulações de ancoragem e dinâmica molecular (WANG et al., 2006). As simulações de ancoragem molecular foram realizadas utilizando o software AutoDock MGLTools 1.5.6rc3, do qual foi gerado o complexo DNA-INE, salvo como arquivo (.pdbqt) (FORLI et al., 2016). As geometrias e as energias de afinidade de ligação foram calculadas através do algoritmo AutoDock Vina 1.2.2, usando os parâmetros padrão (TROTT, OLSON, 2010). As ligações de hidrogênio e/ou as interações hidrofóbicas previstas entre os nucleotídeos de DNA e o ligante harmina (INE) foram visualizadas com o software livre PyMOL 1.8.7.0 para o Python 3.6 (SCHRÖDINGER, 2015) e com o software LigPlot+ 2.1 (LASKOWSKI, SWINDELLS, 2011). No entanto, para as simulações de dinâmica molecular foi usada apenas a pose do ligante (.Pdbqt) que possuía a menor energia de afinidade de ligação e RMSD (*root-mean-*

*square deviation*). O Avogadro (HANWELL et al., 2012), um editor e visualizador de moléculas, foi utilizado para converter esse arquivo no formato .pdb, antes das simulações de dinâmica molecular com o GROMACS versão 2018.4 (VAN DER SPOEL et al., 2005; ABRAHAM et al., 2018) usando o campo de força AMBER99bsc1 (HORNAK et al., 2006). As simulações de dinâmica molecular foram realizadas dentro de caixas de simulação com formato octaedro; e o modelo de água TIP3P (Potencial Intermolecular Transferível com 3 pontos) foi aplicado para solvatar e neutralizar o sistema com dois íons sódio ( $\text{Na}^+$ ) (JORGENSEN et al., 1983). Previamente, o sistema de simulação de dinâmica molecular foi estabilizado efetuando corridas para minimização de energia e equilíbrio de solvente, mantendo desta forma o espaço da grade (caixa) sob as condições dos conjuntos canônicos NVP e conjuntos isotérmicos isobáricos NPT ( $T = 37\text{ }^\circ\text{C}$ ;  $P = 1\text{ bar}$ ). Todas as simulações usaram o mesmo intervalo de tempo de 10 picossegundo (ps). Nota-se que, as posições restritas dos átomos pesados de DNA ficaram acessíveis ao solvente, sem que isto perturbasse a estrutura complexa desta macromolécula.

### 3.2.1.9 Cálculos de energia MM-PBSA

Os cálculos da área de superfície de Poisson – Boltzmann de mecânica molecular (MM-PBSA) realizados após as simulações de dinâmica molecular mostraram algumas flutuações conformacionais e contribuições de energia residual para a energia de ligação livre (KUMARI, KUMAR, 2014). O método de MM-PBSA calculou as energias e trajetórias relacionadas à formação do complexo de DNA com a ligante harmina (INE). Este método usando os parâmetros padrão e solvente explícito, também permite o cálculo de potenciais não ligados tais como interações de Van Der Waals e interações eletrostáticas. Os resultados foram visualizados com *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HSIN et al., 2008) para LINUXAMD64, versão 1.9.4a12 (2017). Os cálculos das trajetórias usaram Verlet através da pesquisa de vizinhos de dinâmica molecular e do esquema de corte vdW (VERLET, 1967). Nota-se que, o programa "readHBmap.py" (Python 2) mostrou *frames* com ligações de hidrogênio. Além disso, os gráficos de ocupação de ligações de hidrogênio mostraram *frames* (1 *frames* = 2 ps) em que esta interação contribuiu para a estabilidade do complexo macromolécula-ligante (LEMKUL; ALLEN; BEVAN, 2010). Por fim, os *frames* selecionados foram visualizados utilizando os softwares Quimera e LigPlot+ 2.1; e as

principais interações intermoleculares entre o DNA e o ligante-harmina (INE) foram avaliadas.

#### *3.2.1.10 Ensaio do cometa - Fragmentação do DNA das células MCF-7*

O efeito do alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina sobre o DNA das células MCF-7 foi avaliada pelo ensaio de cometa, de acordo com Singh e colaboradores (1988). As células MCF-7 foram plaqueadas ( $2,5 \times 10^4$ /poço) em placas de 24 poços. Após atingirem a confluência, as células foram tratadas com a harmina nas concentrações de 27,88  $\mu\text{M}$  e 46,47  $\mu\text{M}$  por 72h. Posteriormente, as células foram ressuspensas em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%), depositadas em lâminas histológicas pré-cobertas com agarose (1,5%) e incubadas por 10 min a  $-8^\circ\text{C}$ . As células foram lisadas por sete dias usando a solução de lise (2,5 M NaCl; 10 mM Tris; 100 mM EDTA; 1% Triton X-100 e 10% de DMSO; pH = 10,0) e depois submetidas à eletroforese horizontal (25V e 300mA) em tampão alcalino (300 mM NaOH; 1 mM EDTA; pH = 13,0) por 20 min a  $8^\circ\text{C}$ . Em seguida, as lâminas foram neutralizados e fixados com as respectivas soluções; solução neutralizante (0,4M Tris HCl; pH = 7,5) e solução de fixação (15% TCA; 5% ZnSO<sub>4</sub>; 5% glicerol). Esses procedimentos foram intercalados com lavagem com água. Após secagem em temperatura ambiente, as lâminas foram coradas (0,1% NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 0,1% AgNO<sub>3</sub>, 0,25% de ácido tungstossílico, 0,15% de formaldeído, 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, v/v), lavadas com ácido acético (0,01%) e visualizadas no microscópio Olympus, modelo BX41 (Japão). Os cometas foram classificados de acordo com Ross e colaboradores (1995), em que a pontuação zero (0) representa os núcleos não danificados e uma pontuação de quatro (4) representa núcleos danificados ao máximo.

#### *3.2.1.11 Ensaio de Imunodeteção*

As células MCF7 foram tratadas com a harmina (27,88  $\mu\text{M}$ ) por 48h e depois lavadas com PBS e lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 1% do surfactante NP40; 0,25% do detergente desoxicolato de sódio; 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil) suplementado com o coquetel de inibidores de protease (1%) e inibidores de fosfatase (3%). As proteínas foram desnaturadas em tampão Laemmli (60mM Tris-HCl, pH = 6,8; 2% de dodecilsulfato de sódio (SDS); 10% glicerol; 5%  $\beta$ -merca mercaptoetanol; 0,01% de azul de bromofenol). Posteriormente, 25  $\mu\text{g}$  de proteína desnaturada foram



submetidos à eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (SDS - PAGE), seguida por eletrotransferência para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (LAEMMLI, 1970). Após o bloqueio e a lavagem, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários durante a noite a  $-8^{\circ}\text{C}$  (anticorpos policlonais de coelho criados contra fosfo-Rb (1:1000, v/v), CDK2 (1:1000, v/v), Ciclina A (1:1000, v/v), Ciclina B1 (1:1000, v/v) e PARP1 (1:1000, v/v); e anticorpos monoclonais de camundongo criados contra Bax (1:200, v/v), Bcl-xL (1:200, v/v) e p53 (1:200, v/v)). Por fim, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários por pelo menos 1h. O anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho (1:5000, v/v) e o anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de camundongo (1:3000, v/v) são ambos conjugados com peroxidase. Um kit de detecção de quimioluminescência para anticorpos acoplados à HRP foi utilizado para imunodeteção. A actina (1:1000, v/v) foi usada como controle de carga. As imagens adquiridas (ChemiDoc MP System; Bio Rad, EUA), foram analisadas no programa ImageJ versão 1.49 (*National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA) e os valores obtidos para as amostras tratados com harmina foram normalizados com a actina.

### 3.2.1.12 Atividade antitumoral *in vivo* do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina

A atividade antitumoral *in vivo* da harmina foi avaliada usando camundongos Balb/com machos ( $20 \pm 2$  g) mantidos em condições controladas (12h ciclo claro-escuro,  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , 60% de umidade do ar), recebendo água e comida *ad libitum*. Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os princípios internacionalmente aceitos para uso e cuidados com animais de laboratório (publicação do NIH # 85–23, revisada em 1985). O protocolo experimental recebeu aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (CEUA-PP00784).

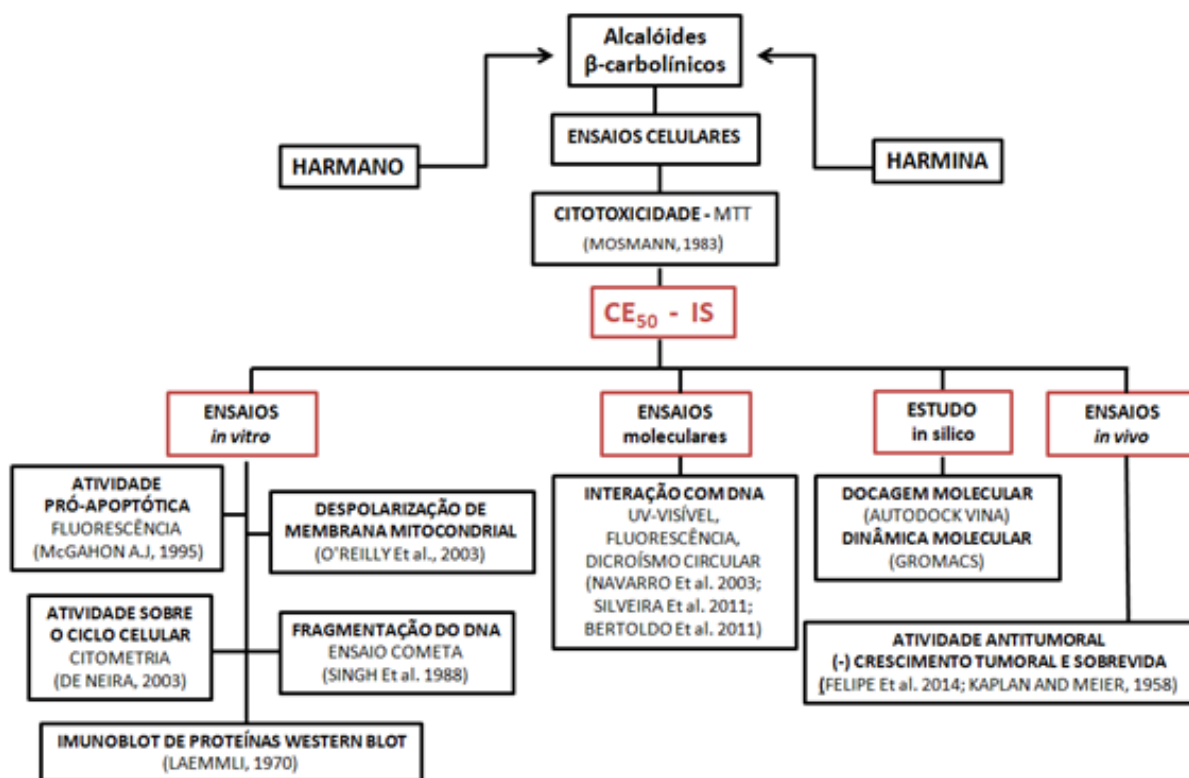
Previamente, testes foram realizados com o intuito de selecionar a dose máxima segura de harmina com a diluição ideal e as doses de 10 e 20 mg/kg/dia foram escolhidas para dar seguimento aos experimentos. Antes da indução do tumor (dia zero), todos os camundongos foram pesados (g) e suas circunferências abdominais foram medidas (cm). Os camundongos foram inoculados intraperitonealmente com células do TAE ( $5 \times 10^6$  células, 200  $\mu\text{L}$ ). Após 24h, os camundongos foram divididos em quatro grupos (n = 12). O grupo controle negativo foi tratado apenas com solução salina contendo 1% de DMSO. O grupo controle positivo recebeu doxorubicina (0,6 mg/kg/dia) (HOSSAIN et al., 2012). O grupo teste

receberam harmina nas doses de 10 e 20 mg/kg/dia, respectivamente. Os tratamentos foram administrados por via intraperitoneal (50 µl) durante nove dias consecutivos. Vinte e quatro horas depois, todos os camundongos foram pesados e suas circunferências abdominais medidas novamente. Utilizando a fórmula relatada por Felipe e colaboradores (2014), a inibição (%) do crescimento tumoral foi calculada da seguinte forma:

Inibição do crescimento do tumor (%) = [ (variação na circunferência abdominal do grupo tratado x 100) / variação na circunferência abdominal do grupo controle] - 100.

Por fim, os camundongos (n = 12) foram mantidos vivos e monitorados diariamente para avaliar a sobrevida (expectativa de vida), segundo Kaplan e Meier (1958). Adicionalmente, usou-se o teste de Log-rank para avaliar comparativamente a distribuição da sobrevida dos animais tratados com harmine, em comparação com o grupo controle negativo (PETO, PETO, 1972).

**Figura 27.** Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico, antiproliferativo, pró-apoptótico e antitumoral dos alcalóides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina.



### 3.2.1.13 Análise estatística

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata técnica, enquanto os experimentos *in vivo* foram realizados em replicata biológica ( $n = 12$ ;  $\alpha = 0,05$ ; Potência  $(1 - \beta) = 0,90$ ;  $t$  crítico = 1,81;  $df$  (grau de liberdade) = 10; tamanho do efeito  $|\rho| = 0,67$ ). O software G\*Power 3.1.9.4 foi usado para calcular o  $n$  amostral dos ensaios *in vivo*. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou como porcentagem. Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância ANOVA one-way, complementado pelo teste de Bonferroni ou teste de Log-rank, quando apropriado. As comparações foram realizadas usando o software GraphPad Prism 6 (San Diego, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

### 3.2.2 Resultados e discussão

#### 3.2.2.1 Avaliação do efeito citotóxico e a seletividade dos alcaloides $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina

Inicialmente, o efeito citotóxico e o potencial seletivo de dois alcaloides  $\beta$ -carbolínicos, harmano e harmina, foram avaliados contra três linhagens de células tumorais nomeadamente as células MCF-7, HeLa e HepG2; e contra uma linhagem de células normais (McCoy). Os valores obtidos para a  $CE_{50}$  (metade da concentração efetiva máxima) e IS (índice de seletividade) dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos em estudo e da doxorrubicina estão apresentados na tabela 5.

**Tabela 5.** Citotoxicidade e seletividade dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina contra as células MCF-7, HeLa, HepG2 e McCoy após 48h e 72h de tratamento (0,1 a 1000  $\mu$ M), avaliada pelo ensaio de MTT e realizada em triplicata.

	MCF-7			HeLa			HepG2			McCoy
	$CE_{50}$		IS	$CE_{50}$		IS	$CE_{50}$		IS	$CE_{50}$
	48h	72h	72h	48h	72h	72h	48h	72h	72h	72h
<b>Harmano</b>	203,6	78,19	<b>3,23</b>	138,7	51,04	<b>4,95</b>	---	158,70	<b>1,59</b>	252,60
<b>Harmina</b>	117,8	46,47	<b>4,44</b>	130,3	75,10	<b>2,75</b>	---	82,03	<b>2,51</b>	206,17
<b>Doxorrubicina</b>	---	0,025	<b>7,2</b>	---	0,18	<b>1,0</b>	---	---	---	0,18

Os dados representam as médias de três experimentos independentes. Os valores de  $CE_{50}$  foram obtidos usando o Software GraphPad Prism 6.0 (San Diego, EUA).  $CE_{50}$ : Metade da concentração efetiva máxima; IS: índice de seletividade.

Observando os resultados, é possível verificar-se que ambos os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos apresentaram um efeito citotóxico dependente de tempo e da dose. Entretanto, o tempo de exposição de 72h foi onde se obteve os melhores valores de  $CE_{50}$ . No qual, o harmano apresentou valores de  $CE_{50}$  de 78,19  $\mu$ M, 51,04  $\mu$ M e 158,70  $\mu$ M para células MCF-7, HeLa e HepG2, respectivamente. Enquanto que, a  $CE_{50}$  para a harmina foi de 46,47  $\mu$ M, 75,10  $\mu$ M e 82,03  $\mu$ M, respectivamente. O quimioterápico doxorrubicina, utilizado como controle positivo, mostrou alta citotoxicidade contra as células MCF-7 (0,025  $\mu$ M), HeLa (0,18  $\mu$ M) e HepG2 (0,59  $\mu$ M).

Alguns estudos relataram resultados semelhantes, nos quais ambos os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos, harmano e harmina, induziram citotoxicidade e inibiram o crescimento de diferentes linhagens de células tumorais de maneira dependente de tempo e da dose (Liu et al., 2016; Zhang et al., 2016). Nota-se que no presente estudo, os efeitos citotóxicos apresentados por harmano e harmina sobre as células MCF-7 e HepG2 foram muito semelhantes. No qual, a harmina demonstrou ter um efeito citotóxico (2x) mais eficaz que o do harmano. Contudo, um efeito oposto foi observado nas células HeLa.

Este perfil de citotoxicidade apresentado por ambos os alcaloides pode ser explicado pela presença de genes importantes, com ou sem mutações, presentes nestas células. De acordo com o banco de dados COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), as células tumorais MCF-7 e HepG2 conservaram alguns genes relacionados ao reparo do DNA e a progressão do ciclo celular sem mutações, tais como o gene ERCC2 (codifica o fator de reparo do DNA IHH - TFIHH), o gene ERG (codifica o regulador transcricional ERG) e o gene FANCC (codifica Proteína do grupo C da anemia de Fanconi - Proteína FACC). No entanto, estas células apresentam mutações nos genes PIK3CA (codifica a subunidade alfa da cinase PI3K), TP53 (codifica o supressor de tumor p53), CDKN2A (codifica o inibidor da cinase dependente de ciclina 2A ou p16-INK4) e ATM (codifica a ataxia telangiectasia mutada - ATM). Assim sendo, com exceção das células HeLa, as células tumorais MCF-7 e HepG2 exibem similaridade genética. Isto sugere que, a resposta das células MCF-7 e HepG2, quando expostas a harmano e harmina, poderia ser muito semelhante, explicando desta forma o perfil de citotoxicidade apresentado por estes dois alcaloides  $\beta$ -carbolínicos.

De acordo com Badisa e colaboradores (2009), o índice de seletividade (IS) demonstra o potencial de um composto preferencialmente atingir linhagens de células tumorais, em vez de linhagens de células normais. Portanto, quanto maior o valor de IS, mais seletivo é o composto. Além disso, um valor de IS superior a dois indica baixa toxicidade para células normais e alta toxicidade para as linhagens de células tumorais.

Em relação ao potencial seletivo dos compostos em estudo, a harmina demonstrou ser mais seletivo que o harmano (Tabela 5). Visto que, a harmine demonstrou seletividade para todas as linhagens de células tumorais testadas no presente estudo, enquanto que, o harmano foi seletivo apenas para as células tumorais MCF-7 e HeLa. A doxorrubicina foi seletiva apenas para as células MCF-7.

É importante salientar que, a harmina apresentou a maior seletividade para as células MCF-7, no qual apresentou um índice de seletividade (IS) de 4,44. Assim, o valor de IS foi

utilizado como o principal critério de escolha para dar seguimento ao nosso estudo apenas com o alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina e a linhagem de células tumorais MCF-7.

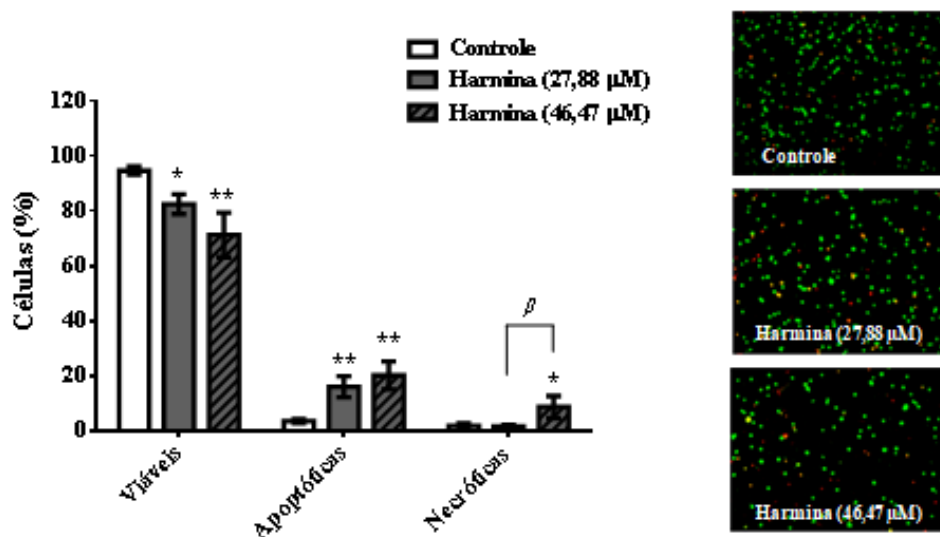
As análises realizadas posteriormente tiveram como objetivo elucidar melhor os efeitos citotóxicos da harmine contra as células MCF-7, buscando possíveis mecanismos de ação responsáveis por estes efeitos.

### *3.2.2.2 Avaliação da atividade pró-apoptótica do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina nas células MCF-7 e análise dos mecanismos de ação responsáveis por esta atividade*

As células MCF-7 foram tratadas com a harmina nas concentrações de 27,88  $\mu$ M ( $CE_{30}$ ) e 46,47  $\mu$ M ( $CE_{50}$ ) por 72h. Em seguida, o tipo de morte celular foi avaliado através do método de coloração com o iodeto de propídio e laranja de acridina, ambos agentes intercaladores de DNA. Os resultados apresentados na figura 28 demonstram que, a harmina foi capaz de induzir significativamente a morte celular nas células MCF-7 de maneira dependente da dose.

Ambas as concentrações utilizadas de harmina (27,88  $\mu$ M e 46,47  $\mu$ M) aumentaram significativamente o número de células apoptóticas. No entanto, apenas a concentração de 46,47  $\mu$ M de harmina causou aumento do número de células necróticas ( $8,67 \pm 3,47\%$ ), quando comparado com o controle negativo ( $1,81 \pm 0,70\%$ ). Além disso, a harmina na concentração de 46,47  $\mu$ M diminuiu o número de células viáveis em aproximadamente 32,88%, enquanto, aumentava o número de células apoptóticas (82,28%) e necróticas (79,14%), em comparação com o controle negativo. Portanto, levando em consideração os dados apresentados, nota-se que, a harmina induziu preferencialmente à morte celular por apoptose em células MCF-7.

**Figura 28.** Morfologia das células MCF-7 e o tipo de morte celular induzida pela harmina (27,88  $\mu\text{M}$  e 46,47  $\mu\text{M}$ , 72h), avaliado pelo método de coloração com iodeto de propídio e acridina laranja e visualizado por microscopia de fluorescência (Aumento de 400x).

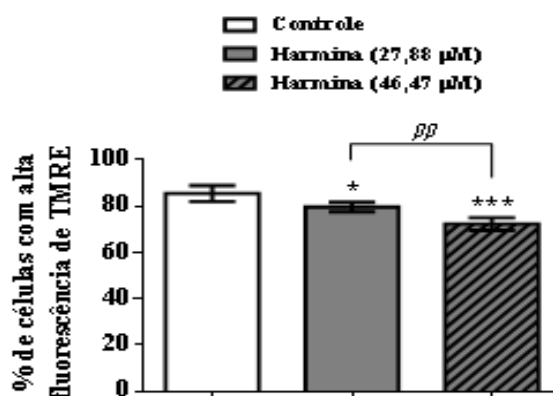


As manchas vermelhas, laranja e verdes denotam células necróticas, apoptóticas e viáveis, respectivamente. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA e teste de Bonferroni. (\*) e (\*\*) denotam diferenças estatísticas em comparação com dados de controle negativos, quando  $p < 0,05$  e  $p < 0,01$ , respectivamente. (<sup>B</sup>) denota diferença estatística comparando a concentração de 27,88  $\mu\text{M}$  a 46,47  $\mu\text{M}$  de harmina, quando  $p < 0,05$ .

O potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ), que é estabelecido pelas bombas de prótons da cadeia de transporte de elétrons, é crucial para a função mitocondrial. A perda do  $\Delta\Psi\text{m}$  pode diminuir a geração de ATP e a captação de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ). Além disso, a perda do  $\Delta\Psi\text{m}$  pode desencadear a morte celular por apoptose por estar relacionado com a ativação transitória do poro de transição da permeabilidade mitocondrial, pelo qual diversas proteínas pró-apoptóticas são liberadas do mitocôndria para o citoplasma incluindo o citocromo c e a Bax (DUCHEN, 1999; TAN et al., 2009; NAKAGAWA et al., 2010). Neste contexto, a despolarização da membrana mitocondrial de células MCF-7 tratadas com harmina (27,88  $\mu\text{M}$  e 46,47  $\mu\text{M}$ , 48h) foi avaliada utilizando um corante catiônico lipofílico fluorescente (TMRE).

A harmina foi capaz de diminuir o potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) nas células MCF-7 de maneira dependente da dose (Figura 29).

**Figura 29.** Efeitos da harmina (27,88  $\mu\text{M}$  e 46,47  $\mu\text{M}$ , 48h) no potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi\text{m}$ ) das células MCF-7.



Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA e teste de Bonferroni. (\*) e (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas em comparação com dados de controle negativos, quando  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. ( $\beta\beta$ ) denota diferença estatística comparando a concentração de 27,88  $\mu\text{M}$  a 46,47  $\mu\text{M}$  de harmina, quando  $p < 0,01$ .

As células MCF-7, quando expostas as concentrações de 27,88  $\mu\text{M}$  e 46,47  $\mu\text{M}$  de harmina, obtiveram um  $\Delta\Psi\text{m}$  de  $79,65 \pm 1,85$  e  $72,26 \pm 2,41\%$ , respectivamente. Enquanto que, o controle negativo, tratado apenas com o meio de cultura contendo 1% de DMSO, obteve um  $\Delta\Psi\text{m}$  de  $85,45 \pm 3,08\%$ . Assim, harmina na concentração de 46,47  $\mu\text{M}$  foi capaz de diminuir o  $\Delta\Psi\text{m}$  das células MCF-7 em 15,43%, quando comparado com o controle negativo.

Assim sendo, os resultados de despolarização da membrana mitocondrial estão em concordância com os resultados obtidos pelo ensaio do tipo de morte celular (Figura 28). Isto sugere que, a harmina causou uma disfunção mitocondrial, acompanhada pela perda do potencial da membrana mitocondrial e induziu a apoptose em células MCF-7.

As proteínas da família Bcl-2 são proteínas-chave reguladores de apoptose via mitocondrial. No qual, as proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 e Bcl-xL previnem a apoptose e as proteínas pró-apoptóticas como Bax e Bak promovem a apoptose (BROWN, 1997). Neste sentido, o efeito modulador da harmina (27,88  $\mu\text{M}$ , 48h) sobre as proteínas pró e antiapoptóticas em células MCF-7 foi avaliado por imunoeletoforese.

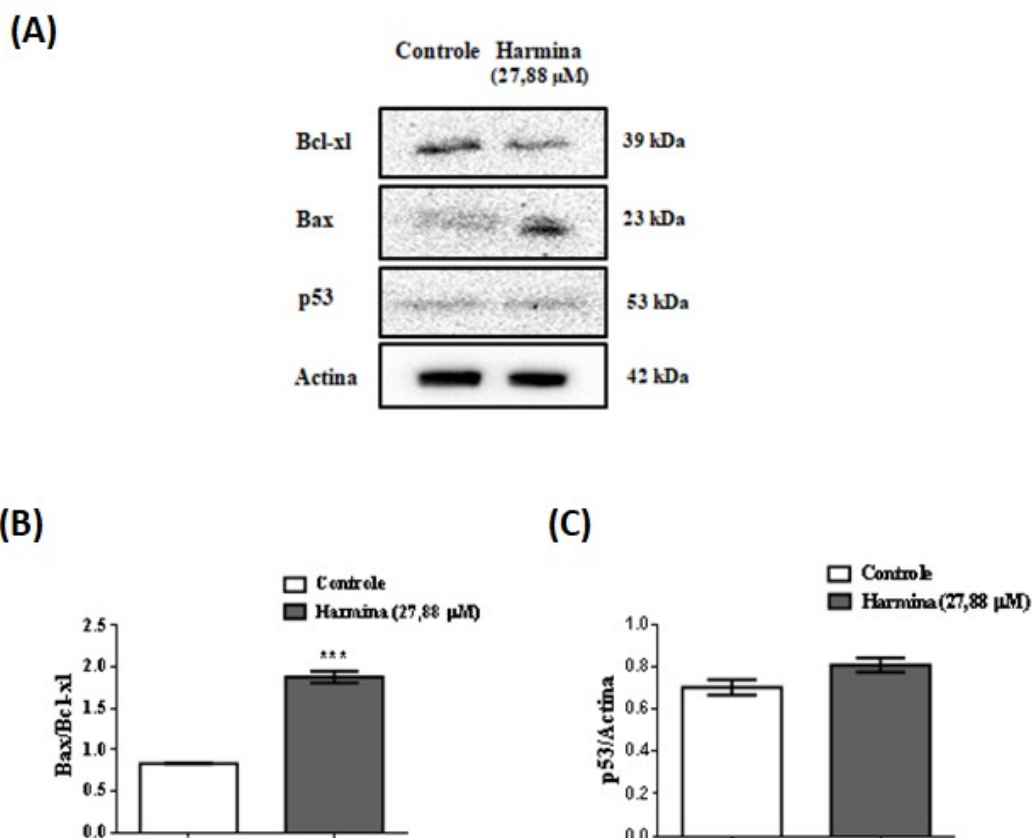
Os resultados obtidos (Figura 30A/B) demonstram que a harmina aumentou a expressão da proteína pró-apoptótica Bax, enquanto que, diminuía a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-xL. Consequentemente, a harmina aumentou significativamente a razão Bax/Bcl-xL, o que sugere que a harmina induziu a morte celular por apoptose pela via



mitocondrial nas células MCF-7. Estes dados confirmam os resultados anteriores sobre o tipo de morte celular (Figura 28) e a despolarização mitocondrial (Figura 29).

No entanto, a harmina induziu a apoptose independentemente da proteína p53 (Figura 30A/C). Luo e colaboradores (2008) obtiveram resultados semelhantes em uma linhagem de células de câncer de cólon (HCT116) tratadas com o composto antitumoral metoxi-1-estiril-9H-pirido-[3,4-b]-índole (JKA97), um análogo da harmina. Neste caso, o composto em estudo também induziu a morte celular por apoptose de maneira dependente de Bax e independente de p53.

**Figura 30.** Efeito modulador da harmina (27,88  $\mu$ M, 48h) sobre as proteínas pró e antiapoptóticas nas células MCF-7.



Nota: **(A, B e C)** Imagem da eletroforese e dados quantitativos de proteínas que modulam a apoptose (Bcl-xL, Bax e p53) em células MCF-7 tratadas com harmina (27,88  $\mu$ M, 48h). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA e teste de Bonferroni. (\*\*\*) denota diferença estatística em comparação com dados de controle negativos, quando  $p < 0,001$ .

### 3.2.2.3 Efeito do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina sobre o ciclo celular das células MCF-7

O efeito de harmina (27,88  $\mu$ M, 72h) sobre o ciclo celular de MCF-7 foi analisado por citometria de fluxo com o objetivo de classificar as células de acordo com a fase do ciclo celular, com base no seu conteúdo de DNA.

Segundo Bai, Li e Zhang, (2017), estímulos mitogênicos desencadeiam uma cascata de eventos que levam à progressão do ciclo celular e conseqüentemente à divisão celular. Sendo que, a fase G1 é a primeira etapa da progressão do ciclo celular. Nesta fase as células não possuem o DNA duplicado. No entanto, as células na fase S sintetizam o DNA e as células na fase G2 apresentam o seu DNA duplicado e estão sendo preparadas para entrar na fase M (mitose), na qual as células sofrem a divisão celular. Normalmente, os detritos e células mortas aparecem na fase Sub-G1.

Os dados apresentados nas figuras 31A e 31B demonstram que, a harmina foi capaz de induzir alterações no ciclo celular das células MCF-7. As células tratadas com harmina (27,88  $\mu$ M) por 72h apresentaram  $67,70 \pm 0,85\%$  de células na fase G1,  $3,53 \pm 0,58\%$  de células na fase S e  $26,12 \pm 0,38\%$  de células na fase G2/M. Enquanto que, as células do controle negativo apresentaram  $65,5 \pm 0,96\%$  de células na fase G1,  $13,41 \pm 1,03\%$  de células na fase S e  $21,01 \pm 1,59\%$  de células na fase G2/M.

Nota-se que, a harmina teve a capacidade de promover uma diminuição significativa (73,68%) no número de células na fase S, enquanto que, aumentava significativamente (19,56%) o número de células na fase G2/M, quando comparado com o controle negativo. Contudo, as células presentes na fase G1 não apresentaram diferença estatística em relação às células não tratadas. Desta forma, estes resultados sugerem que a harmina induziu um bloqueio do ciclo celular na fase G2/M nas células MCF-7, o que indica o seu efeito antiproliferativo.

Além disso, após o tratamento com harmina observou-se um aumento de células na fase sub-G1 ( $2,67 \pm 0,11\%$ ), quando comparado com o controle negativo ( $0,08 \pm 0,08\%$ ). Isto é um indicativo de morte celular por apoptose, o que confirma o resultado anterior sobre o tipo de morte celular induzido pela harmina (Figura 28).

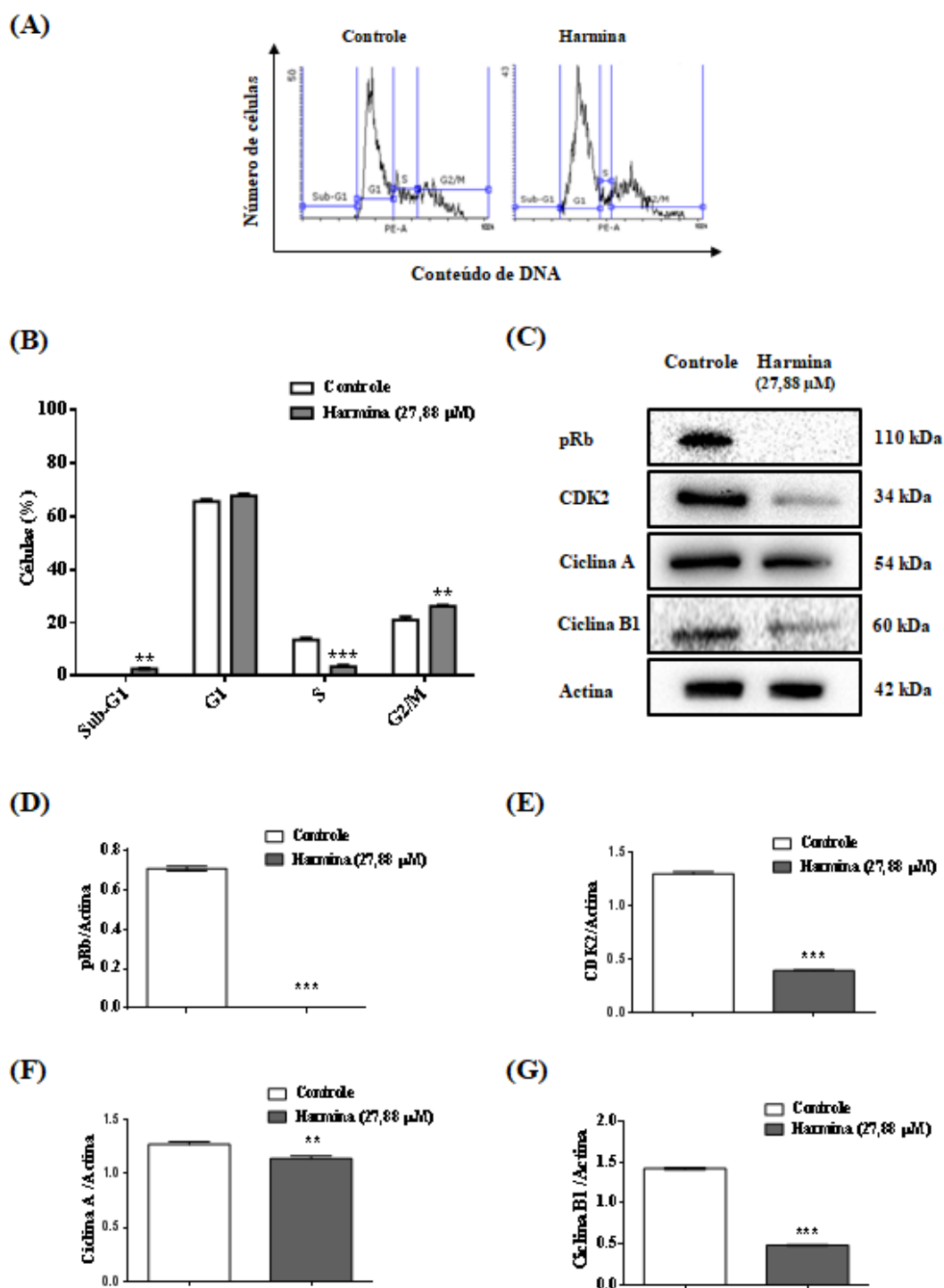
A capacidade da harmina em causar a parada do ciclo celular na fase G2/M pode ser um indicativo de seu efeito inibitório sobre as proteínas que regulam o ciclo celular. Sabe-se que, cada fase do ciclo celular é fortemente regulada pelas cinases dependentes de ciclina

(CDKs) e seus parceiros reguladores, as ciclinas, que são expressas de maneira periódica. As CDKs, quando ativadas pelas ciclinas, fosforilam vários substratos-chave que promovem a progressão do ciclo celular (BAI, LI, ZHANG, 2017).

Neste sentido, o efeito modulador da harmina (27,88  $\mu$ M, 48h) sobre as proteínas Rb, CDK2, ciclina A e ciclina B1 foram avaliadas por imunoeletroforese.

Observando os resultados apresentados nas figuras 31C e 31D, é possível verificar-se que a harmina inibiu totalmente a fosforilação da proteína Rb. Além disso, o tratamento com harmina causou uma diminuição significativa nas proteínas do ciclo celular, CDK2, ciclina A e ciclina B1 (Figura 31C/E/F e 31G). Estes dados confirmam os resultados referentes à redução significativa de células presentes na fase S e a parada do ciclo celular na fase G2/M (Figura 31A/B).

**Figura 31.** Avaliação do efeito de harmina sobre o ciclo celular de MCF-7 e modulação da expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular (pRb, CDK2, ciclina A e ciclina B1).



Nota: Onde (A) Histograma e (B) Porcentagens de células MCF-7 em cada fase do ciclo celular (Sub-G1, G1, S e G2/M). As células foram tratadas com harmina (27,88 μM, 72h) e analisadas por citometria de fluxo. (C, D, E e F) Imagem da eletroforese e dados quantitativos de proteínas reguladoras do ciclo celular (pRb, CDK2, ciclina A e ciclina B1) em células MCF-7 tratadas com harmina (27,88 μM, 48h). **Sub-G1:** Detritos e células mortas; **G1:** células que não apresentam duplicação de DNA; **S:** células com conteúdo intermediário de DNA; **G2/M:**

células com DNA duplicado. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA e teste de Bonferroni. (\*\*) e (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas em relação ao controle negativo, quando  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

Nota-se que, a capacidade de harmina de inibir totalmente a fosforilação da proteína Rb, sugere que esta proteína estaria totalmente ativa; e que, por sua vez, estaria inibindo a ação dos fatores de transcrição da família E2F, culminando dessa forma na diminuição da expressão de várias proteínas reguladoras do ciclo celular, o que demonstra a função antiproliferativa da proteína Rb. Este resultado está em concordância com o resultado referente à diminuição da expressão das proteínas CDK2, ciclina A e ciclina B1 (Figura 31C/E/F e 31G).

Além disso, é importante ressaltar que a harmina foi capaz de provocar uma intensa inibição da fase S (73,68%) nas células MCF-7. Este efeito inibitório da fase S provavelmente vem do efeito sinérgico da função antiproliferativa da proteína Rb, que diminuiu a expressão de CDK2; juntamente com o fato de que a harmina seja um inibidor ATP-competitivo de CDKs. Visto que, segundo Song e colaboradores (2004), a harmina é um inibidor ATP-competitivo específico das proteínas CDK1, CDK2 e CDK5.

Estudo realizado por Hilgendorf e colaboradores (2013) relataram outras funções para a proteína Rb, além da sua função canônica de proteína supressora tumoral com atividade antiproliferativa. Segundo estes autores, a proteína Rb pode promover a apoptose em resposta a danos induzidos ao DNA de células tumorais altamente proliferativas por meio da coativação transcricional de genes que codificam proteínas pró-apoptóticas, como a caspase 7 e p73. Adicionalmente, a proteína Rb também pode se ligar diretamente na proteína pró-apoptótica Bax, ativando-a. Estes dados indicam que tanto as funções pró-apoptóticas mitocondriais quanto à função transcricional da proteína Rb ocorrem independentemente da proteína p53. Sendo assim, estes dados estão em concordância com os resultados do tipo de morte celular induzido pela harmina (Figura 28 e Figura 30).

#### *3.2.2.4 Interação do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina com o DNA*

Os danos induzidos ao DNA, dependendo da sua gravidade, podem fazer com que os mecanismos moleculares básicos de resposta contra o dano alternem entre a parada do ciclo celular (dando tempo para a célula tentar reparar a lesão do DNA) e a indução de programas

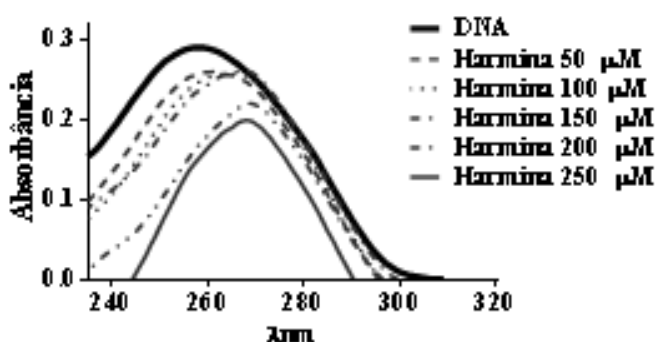
de morte, tais como a apoptose e necrose (SUROVA, ZHIVOTOVSKY, 2013). Por conseguinte, o DNA é um importante alvo molecular de muitos agentes antitumorais (HURLEY, 2002).

Com o intuito de alcançar uma maior compreensão da ligação de harmina ao DNA, a interação DNA-harmina foi investigada por espectroscopia UV-Visível, espectroscopia de fluorescência e dicroísmo circular, seguida pelas simulações de ancoragem e dinâmica molecular e o ensaio de cometa.

Primeiramente, a interação entre a harmina e o CT-DNA foi analisada por meio da titulação espectrofotométrica de varredura UV-Visível. No qual, a harmina causou um efeito hipocrômico e batocrômico (Figura 32), o que sugere que este alcaloide se ligou ao CT-DNA por intercalação.

Segundo Villanueva e colaboradores (2018), os efeitos hipocrômicos e batocrômicos observados nos máximos da absorvância UV-Visível são evidências de interações de empilhamento entre sistemas aromáticos conjugados que se intercalam entre os pares de bases do DNA. A estrutura química da harmina é constituída por um anel de piridina fundido a um anel indólico (PAGANO et al., 2017). Sendo assim, a geometria molecular da harmina (pequena, planar e tricíclica) pode ter facilitado a sua ligação ao DNA por intercalação.

**Figura 32.** Efeito de harmina sobre o DNA de timo de vitelo (CT-DNA, 150  $\mu\text{M}$ ) avaliado por espectroscopia UV-Visível.



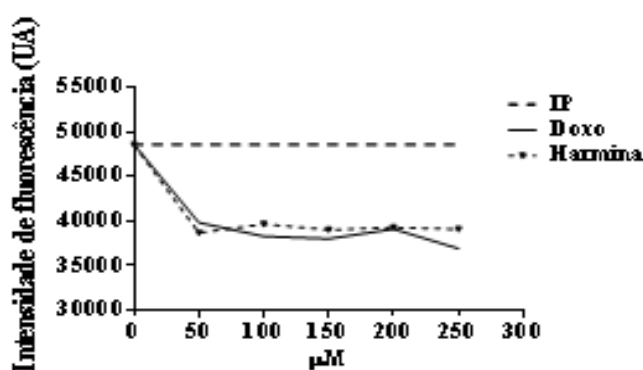
Nota: Onde **DNA**: CT-DNA (DNA de timo de vitelo); **Harmina**: CT-DNA + Harmina.

Com o propósito de confirmar que a harmina interagiu e intercalou-se entre os pares de bases do DNA, foram realizadas titulações espectrofotométricas usando o agente intercalante de DNA, iodeto de propídio (IP). Quando intercalado ao DNA o iodeto de propídio emite fluorescência. Substâncias capazes de intercalarem no DNA podem competir

com o iodeto de propídio intercalado, deslocando o mesmo e, como consequência há uma redução na quantidade de iodeto de propídio ligado ao DNA, resultando na diminuição da intensidade de fluorescência deste agente intercalante (SREEDHARA, COWAN, 2001).

A figura 33 demonstra que concentrações crescentes de harmina levaram a uma diminuição da fluorescência do iodeto de propídio, o que sugere que a harmina intercalou-se entre os pares de bases do DNA, deslocando o iodeto de propídio ligado a macromolécula.

**Figura 33.** Efeito de harmina sobre o DNA de timo de vitelo (CT-DNA, 150  $\mu$ M) avaliado por espectroscopia de fluorescência.

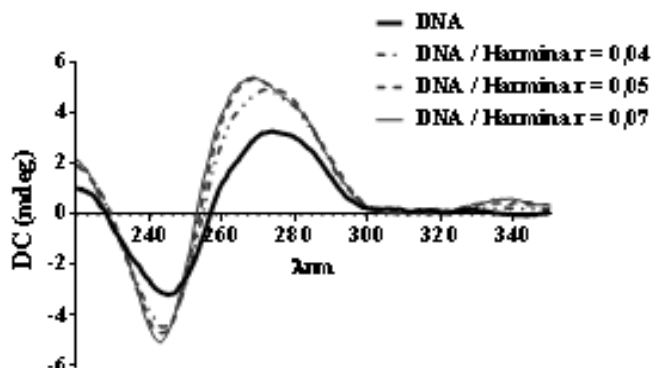


Nota: Onde UA: unidades arbitrárias; IP: CT-DNA + Iodeto de propídio; Doxo: CT-DNA + Doxorubicina, Harmina: CT-DNA + Harmina.

A fim de obter mais informações sobre as alterações conformacionais que ocorrem no DNA após a ligação da harmina, foi realizado o ensaio de dicroísmo circular (DC). O espectro típico de dicroísmo circular de DNA em sua forma B (B-DNA) apresenta uma banda positiva com um máximo em 275 nm, devido ao empilhamento de bases, e uma banda negativa com um mínimo em 248 nm, devido à conformação helicoidal do DNA (FOX, 1977). Portanto, alterações na estrutura secundária do B-DNA acarretam em alterações no espectro de dicroísmo circular (VILLANUEVA et al., 2018).

A harmina foi capaz de induzir alterações no espectro de dicroísmo circular (Figura 34). Visto que, aumentou a intensidade tanto das bandas negativas como das bandas positivas do CT-DNA. Assim, os resultados do espectro de dicroísmo circular do complexo DNA-harmina são consistentes com os dados de intercalação. Logo, estes resultados corroboram os resultados anteriores de espectroscopia UV-Visível (Figura 32) e espectroscopia de fluorescência (Figura 33), sugerindo que o efeito citotóxico e antiproliferativo da harmina esteja relacionado à sua intercalação no DNA.

**Figura 34.** Efeito de harmina sobre o DNA de timo de vitelo (CT-DNA, 150  $\mu$ M) avaliado por espectroscopia de dicroísmo circular.



Nota: Onde **DC**: dicroísmo circular; **DNA**: CT-DNA (DNA de timo de vitelo).

### 3.2.2.5 Resultados do estudo *in silico*

Para melhor elucidar as possíveis interações de harmina com sequência específicas do DNA e reunir mais detalhes estruturais do complexo DNA-harmina foram realizados simulações de ancoragem e dinâmica molecular.

A simulação de ancoragem molecular foi realizada utilizando a versão automatizada do programa AutoDock denominada como AutoDock Vina disponibilizada por Trott e Olson (2010). Enquanto que, as simulações de dinâmica molecular foram realizadas utilizando o GROMACS versão 2018.4 (VAN DER SPOEL et al., 2005; ABRAHAM et al., 2018).

A pose que apresentou a menor energia de afinidade de ligação (kcal/mol) predita pelo AutoDock Vina (-7,6 kcal/mol; RMSD 0,00000) foi em seguida submetida as simulações de dinâmica molecular (1 ns). No qual, foi demonstrado que a harmina pode intercalar entre as porções hidrofóbicas dos resíduos de nucleotídeos dt620 e dt619 da fita B do DNA (Figura 35A).

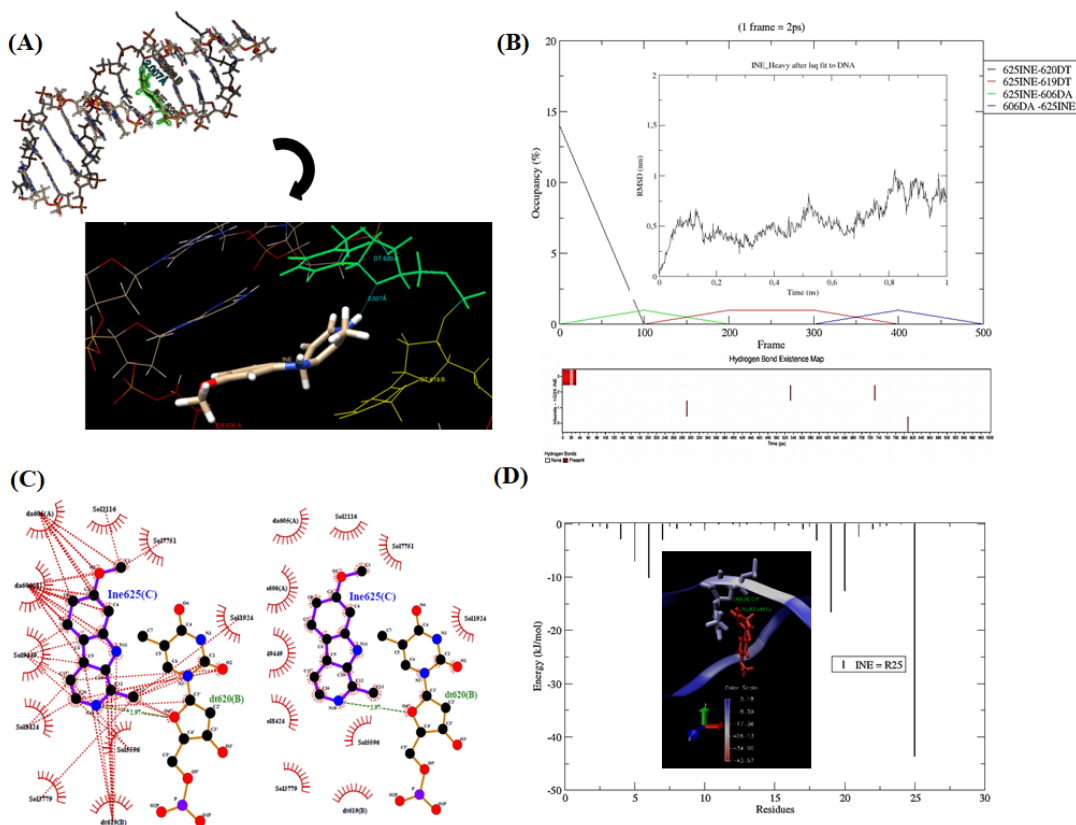
O *frame* correspondente ao intervalo de tempo de 10 ps demonstrou a presença de uma ligação de hidrogênio entre o átomo doador nitrogênio 14 (N14) de harmina que compartilha o átomo hidrogênio 15 (H15) com o átomo aceptor oxigênio 4 (O4') do resíduo dt620 do DNA (2,007 Å) (Figura 35A). Contudo, a taxa de ocupação desta ligação é de apenas 2,8%. A figura 35B (em baixo) demonstra a presença de outras ligações de hidrogênio entre a harmina e os nucleotídeos dt619 e da606, possuindo taxas de ocupação de 0,4% e 0,2%, respectivamente.



Apesar do valor baixo da taxa de ocupação de ligação de hidrogênio, ainda assim é possível verificar que as variações no RMSD da harmina (Figura 35B, inserção) indicaram uma estabilidade inicial do complexo DNA-harmina que foi brevemente mantida por ligação de hidrogênio.

A continuidade da estabilidade do complexo DNA-harmina, com variações no RMSD em torno de 5Å, provavelmente tenha vindo das interações hidrofóbicas estabelecidas entre a harmina e os resíduos de nucleotídeos da605, da606, dt619 e dt620 do DNA (Pose 1), inicialmente previstas pelo AutoDock Vina (Figura 36A), onde se obteve o maior valor de contribuição de interações hidrofóbicas (11.78219). Estas mesmas interações hidrofóbicas aparecem após as simulações de dinâmica molecular (Figura 35C).

**Figura 35.** Simulações de dinâmica molecular entre harmina e os nucleotídeos de DNA (PDB 1G3X).



Nota: Onde (A) Harmina intercalada (destacada em verde) entre as bases de DNA. Formou-se uma ligação de hidrogênio entre harmina e a molécula de DNA (PDB 1G3X) através do nucleotídeo (dt620). (B) A taxa de ocupação das ligações de hidrogênio (cada *frame* = 2 ps) para cada nucleotídeo reflete as variações de RMSD da harmina. (C) As linhas vermelhas tracejadas representam as interações hidrofóbicas e as linhas verdes tracejadas representam uma ligação de hidrogênio formada entre harmina e o nucleotídeo timina (dt620) do DNA. (D) Cada nucleotídeo de DNA (1-24) e o ligante (harmina) (25) tiveram contribuições específicas para a energia total. A

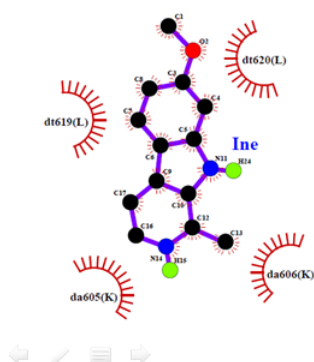
imagem complexa inserida mostra a pontuação de cores relacionada às energias de contribuição de cada resíduo, no qual a menor contribuição vem da harmina (vermelho) ligada pelo átomo de hidrogênio ao nucleotídeo timina (dt620) do DNA (azul). **da**: adenina; **dt**: timina; **INE**: Harmina.

**Figura 36.** Predições de interações entre harmina e os nucleotídeos de DNA (PDB 1G3X), usando o AutoDock Vina e o GROMACS.

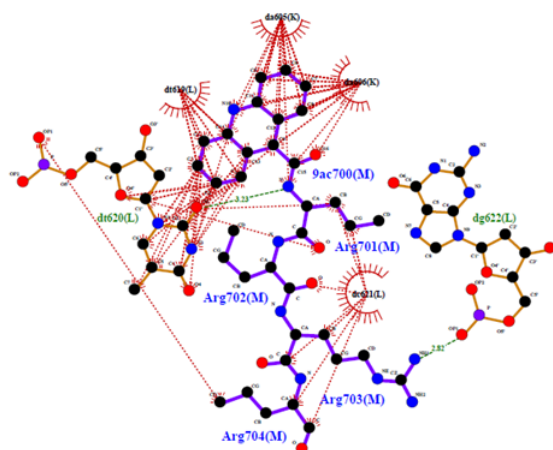
(A)

Coordenadas centrais da caixa de pesquisa		Pose do ligante Harmine (ZINC 18847046)	AutoDock Vina				Resíduos de DNA			
Centro da caixa	Tamanho da caixa		Energia de afinidade de ligação (kcal/mol)	Ligações de Hidrogênio	Interações hidrofóbicas	RMSD (Å)	AutoDock Vina		GROMACS (10ps)	
							Ligações de Hidrogênio	Interações hidrofóbicas	Ligações de Hidrogênio	Interações hidrofóbicas
x = 58,447	x = 20	1	-7,6	0,00000	11,78219	0,000	---	da605, da606, dt619, dt620	da606, dt619, dt620	da605, da606, dt619, dt620
y = 49,029	y = 20	2	-7,3	0,39324	3,62713	1,871	---	da605, da606, dt619, dt620	---	---
z = 60,636	z = 20	3	-7,2	0,71863	5,06671	3,027	---	da605, da606, dt619, dt620	---	---
		4	-7,1	0,92490	5,78882	1,728	---	da605, da606, dt619, dt620	---	---

(B)



(C)

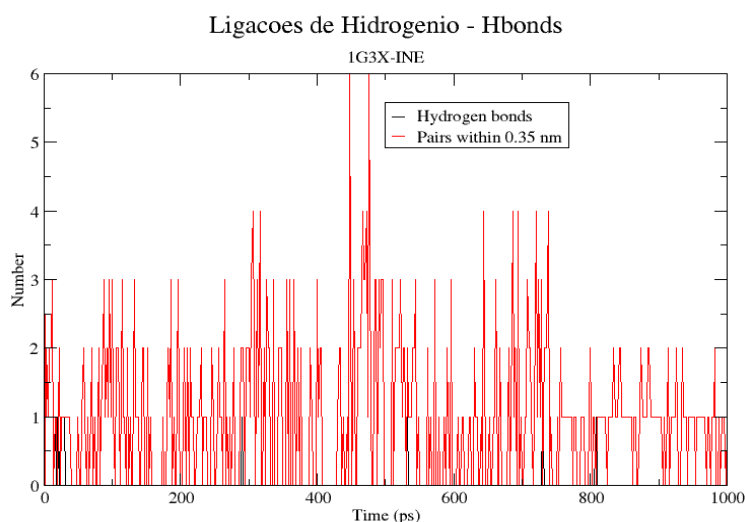


Nota: Onde (A) AutoDock Vina e GROMACS (10 ps) previram as interações entre harmina e a molécula de DNA (PDB 1G3X). (B) AutoDock Vina previu a Pose 1 (pose com a menor energia de ligação) do ligante harmina que foi ancorado dentro da molécula de DNA. Não há formação de ligações de hidrogênio entre a harmina e os nucleotídeos DNA, apenas interações hidrofóbicas. (C) Interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio formadas entre o ligante original 9-acridina-peptídeo (acridina-tetra arginina; 9ac) e os nucleotídeos de DNA. **RMSD**: Distância da raiz quadrada média entre a posição de docagem e a configuração de ligação no modelo cristalográfico; **da**: adenina; **dt**: timina; **INE**: Harmina.

As simulações de dinâmica molecular com o GROMACS consideram apenas as ligações com distâncias de até 3,5Å como sendo ligações de hidrogênio. Portanto, ligações com distâncias maiores que 3,5Å correspondem a outros tipos de interações. Observando o resultado da figura 37, nota-se uma predominância de ligações com distâncias superiores a

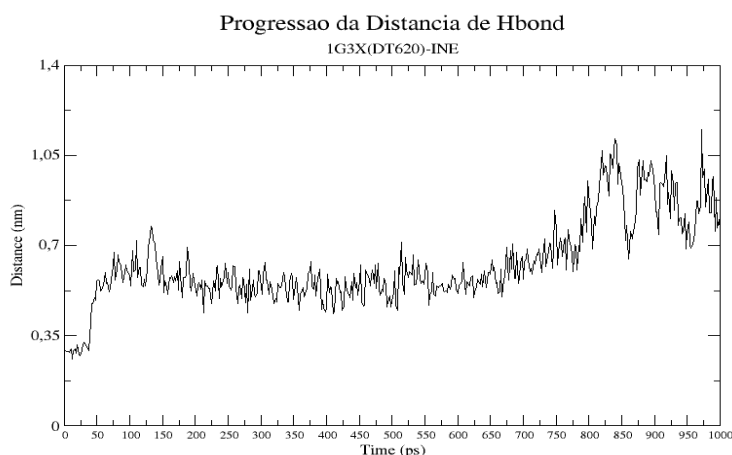
3,5Å, o que confirma o resultado da progressão de distância da ligação de hidrôgeno. Visto que, a média da progressão de distância das ligações estabelecidas entre harmina e os nucleotídeos de DNA é superior a 3,5Å (Figura 38).

**Figura 37.** Número de ligações de hidrogênio formadas entre harmina e os nucleotídeos de DNA (PDB 1G3X).



Nota: Onde **INE**: Harmina; **1G3X-INE**: complexo DNA-harmina; **ps**: picosegundos.

**Figura 38.** Progressão distâncias de ligação de hidrogênio formada entre harmina e o nucleotídeo timina (dt620) do DNA (PDB 1G3X).

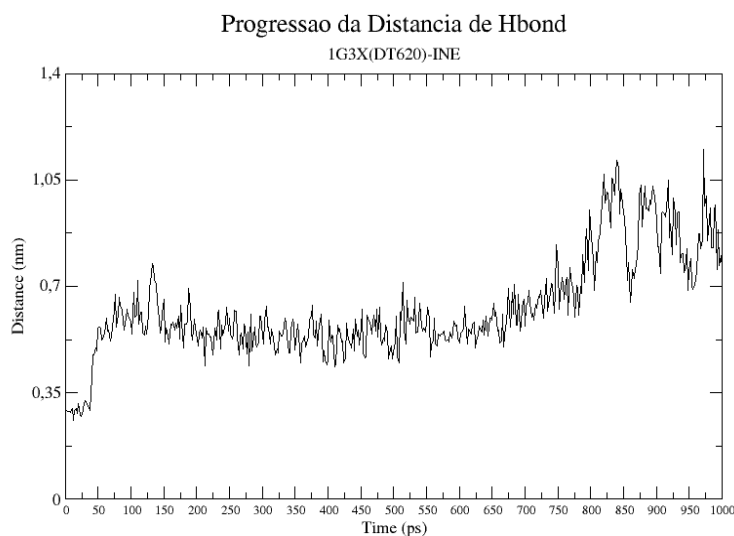


Nota: Onde **INE**: Harmina; **1G3X(dt620)-INE**: complexo DNA-harmina; **ps**: picosegundos.

Para ligações de hidrôgeno, o valor de 150° para a distribuição do ângulo de ligação é considerada o ideal. Contudo, a média da distribuição do ângulo das ligações entre harmina e os nucleotídeos do DNA foi de 49,4175° (Figura 39). Portanto, os resultados das figuras 37,

38 e 39 além de estarem em concordância, confirmam o fato de que as ligações de hidrogênio não são as principais ligações responsáveis por manter a harmina no interior da cavidade hidrofóbica do DNA.

**Figura 39.** Progressão do ângulo da ligação de hidrogênio formada entre harmina e o nucleotídeo timina (dt620) do DNA (PDB 1G3X) (ângulo médio = 49,4175°).

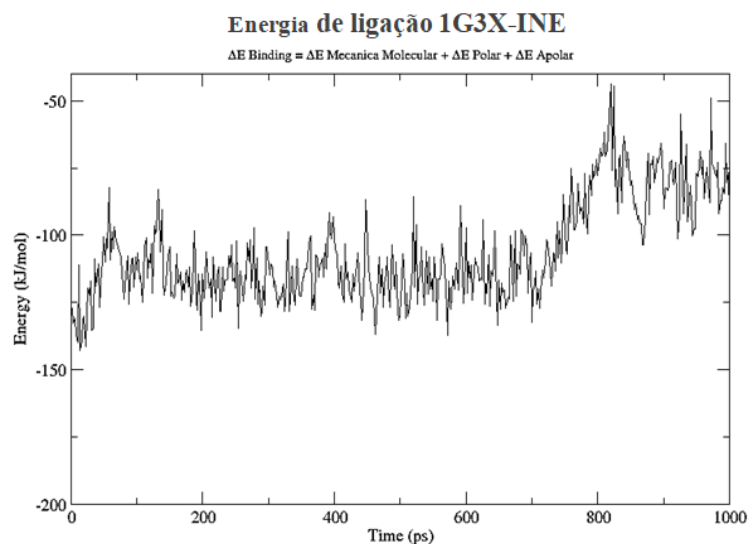


Nota: Onde **INE**: Harmina; **1G3X(dt620)-INE**: complexo DNA-harmina; **ps**: picosegundos.

O método de MM-PBSA permite calcular algumas das energias de ligação do complexo DNA-harmina. O potencial não ligado correspondente à energia de van der Waals foi de  $-121,927 \pm 0,809$  kJ/mol, enquanto que, a energia eletrostática foi de  $14,545 \pm 0,276$  kJ/mol.

O valor da energia de ligação do complexo ( $-106,423 \pm 0,824$  kJ/mol) corresponde à energia de solvatação polar ( $14,545 \pm 0,276$  kJ/mol) e energia de solvatação não polar relacionada à área de superfície acessível por solvente (SASA) ( $-10,555 \pm 0,059$  kJ/mol) mais a energia de mecânica molecular (Figura 40).

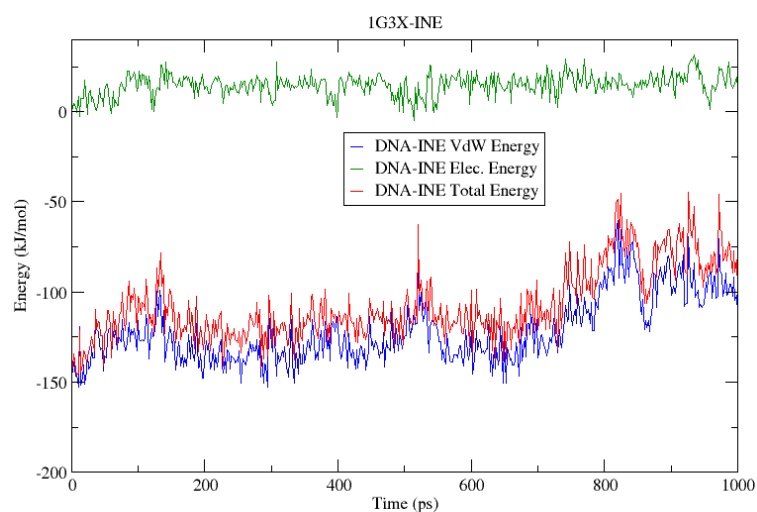
**Figura 40.** Energia de ligação ( $\Delta E$ ) do complexo DNA-harmina, calculada pelo método MM-PBSA.



Nota: Onde **Energia de ligação do complexo** = energia de mecânica molecular + energia de solvatação polar + energia de solvatação não polar. **INE**: Harmina; **1G3X-INE**: complexo DNA-harmina; **ps**: picosegundos.

Além disso, o método de MM-PBSA calculou os potenciais não ligados que contribuíram para a energia mecânica molecular total calculada no vácuo. No qual, a energia de van der Waals representou a principal contribuição para a energia molecular do complexo no vácuo (Figura 41). No interior do complexo DNA-harmina, o ligante-harmina apresentou o menor valor de energia, o que contribuiu também para a energia total (Figura 35D).

**Figura 41.** Cálculos de potenciais não ligados (interações de Van der Waals e interações eletrostáticas) que contribuem para a Energia Mecânica Molecular total calculada no vácuo.



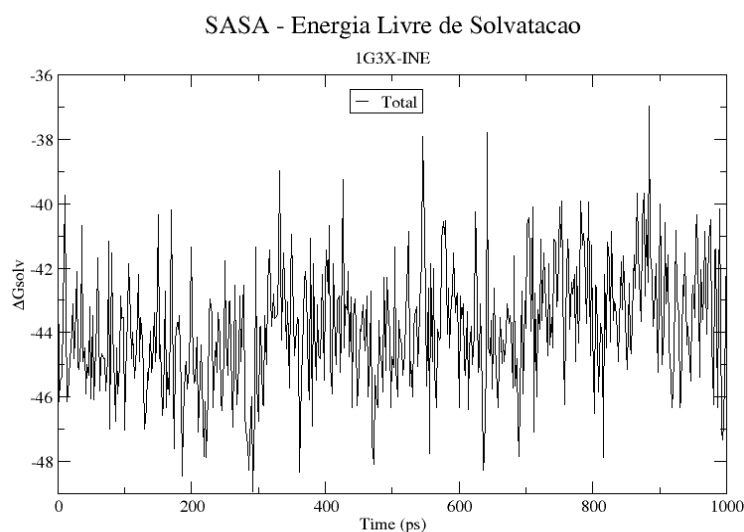
Nota: Onde **Linha azul:** energia das interações de Van der Waals; **Linha verde:** energia das interações eletrostáticas; **Linha vermelha:** energia mecânica molecular total calculada em vácuo.

Segundo König, Bruckner e Boresch (2013), a fim de conferir maior precisão a uma simulação de um processo biológico, como por exemplo a ocorrência de interações entre pequenas moléculas ligantes e as biomoléculas, é importante considerar o papel funcional do solvente. A água de solvatação tem um papel importante tanto na formação de ligações entre a molécula-ligante e a macromolécula-alvo (JANIN, 1999), bem como na seletividade destas interações (PALOMER et al., 2000). O resultado apresentado na figura 35C demonstrou que harmina também interagiu com moléculas de água de solvatação presentes no interior da cavidade hidrofóbica do DNA.

Além disso, o modelo de solvente TIP3P aplicado nas simulações com o GROMACS, permitiu que o método de MM-PBSA calculasse a energia livre de solvatação relacionada a SASA ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) do complexo DNA-harmina.

Ao longo de todo o ensaio de simulação de dinâmica molecular, o  $\Delta G_{\text{solv}}$  foi mantido em torno de -44 kJ/mol (Figura 42), o que confirma que a energia necessária para mover o ligante harmina do solvente aquoso para o ambiente não polar (DNA) foi muito baixa e isto favoreceu a ocorrência de interações entre a harmina e o DNA.

**Figura 42.** Energia livre de solvatação ( $\Delta G_{\text{solv}}$ ) do complexo DNA-harmina relacionada ao SASA, calculada com a MM-PBSA.



Nota: Onde **INE**: Harmina; **1G3X(dt620)-INE**: complexo DNA-harmina;  $\Delta G_{\text{solv}}$ : energia livre de solvatação; **ps**: picosegundos.

Os resultados da ancoragem molecular seguida de dinâmica molecular indicaram que, as interações hidrofóbicas, interações de Van der Waals e interações da harmina com a água de solvatação contribuíram para a intercalação do ligante-harmina entre os pares de bases do DNA, especificamente nas regiões ricas em adenina e timina.

Desta forma, as simulações moleculares confirmaram os resultados referentes aos efeitos hipocrômicos e batocrômicos da harmina no espectro UV-Visível (Figura 32), diminuição da fluorescência do agente intercalante iodeto de propídio (Figura 33) e as alterações no espectro de dicroísmo circular (Figura 34), demonstrando assim a natureza complementar das técnicas espectroscópicas com as simulações moleculares utilizadas neste presente estudo.

### *3.2.2.6 Efeito do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina sobre o DNA das células MCF-7 e análise dos mecanismos de reparo do DNA*

A capacidade da harmina (27,88  $\mu\text{M}$  e 46,47  $\mu\text{M}$ , 72 h) de induzir danos ao DNA em células MCF-7 foi avaliada através do ensaio do cometa. Observando os resultados obtidos, é possível verificar-se que a harmina teve a capacidade de causar danos significativos ao DNA das células MCF-7 (Figura 43A), levando assim a fragmentação do mesmo.

A harmina nas concentrações de 27,88  $\mu\text{M}$  e 46,47  $\mu\text{M}$  causou um índice de dano ao DNA de  $140,62 \pm 28,66$  e  $184,35 \pm 23,66$ , respectivamente. Enquanto que, o controle negativo apenas apresentou um índice de dano ao DNA de  $72,26 \pm 27,72$ .

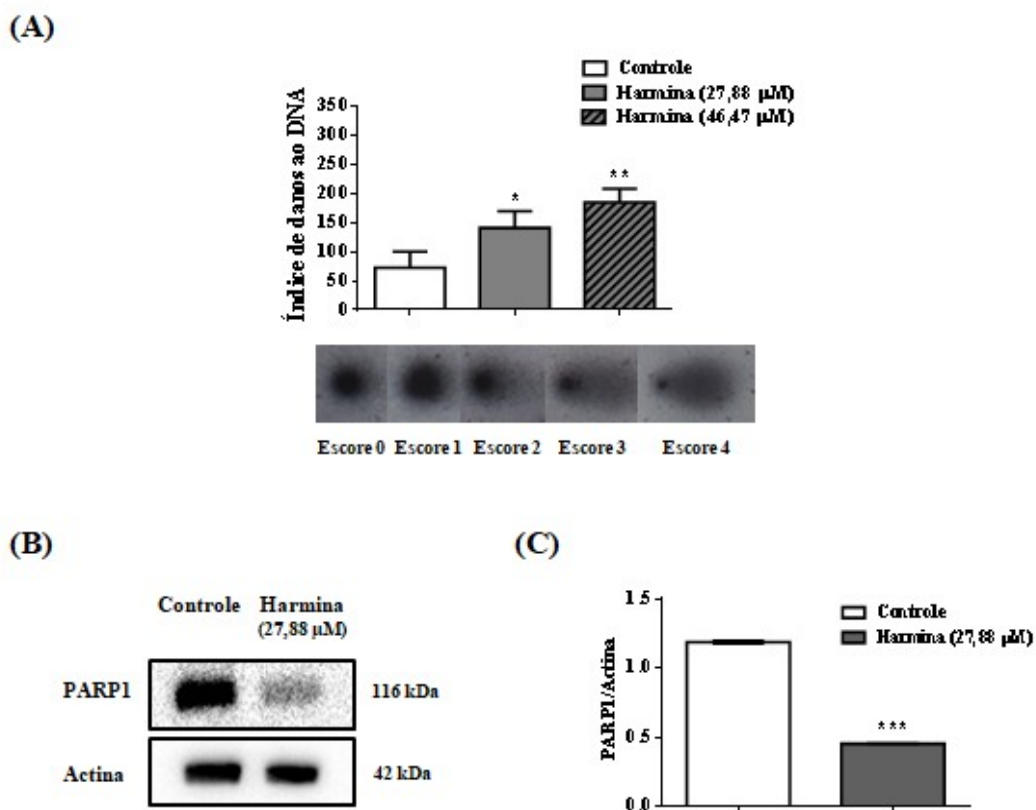
Além disso, as concentrações de 27,88  $\mu\text{M}$  e 46,47  $\mu\text{M}$  da harmina aumentaram os danos no DNA das células MCF-7 em 94,60 e 155,12%, respectivamente, quando comparado com o controle negativo. Estes resultados sugerem que a harmina foi capaz de intercalar-se entre os pares de bases do DNA causando danos e conseqüentemente levando a fragmentação do DNA danificado. Sendo assim, estes resultados confirmam aqueles obtidos pelas técnicas espectrofotométricas e simulações de ancoragem e dinâmica molecular.

Sabe-se que, danos induzidos a estrutural do DNA desencadeia uma série de mecanismos de reparo do DNA (CSEH et al., 2017). A proteína poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP1), um dos membros mais bem estudados da família das polimerases poli (ADP-ribose), é superexpressa em uma variedade de células tumorais e a sua expressão tem sido associada ao mau prognóstico de pacientes com câncer, principalmente em pacientes com câncer de mama (ROJO et al. 2012). Neste sentido, a expressão da proteína PARP1 nas células MCF-7 tratadas com harmina (27,88  $\mu\text{M}$ , 48 h) foi avaliada por imunoelctroforese.

A harmina diminuiu significativamente a expressão da proteína PARP1 (Figura 43B/C), quando comparado com o controle negativo. Isto sugere que além da harmina induzir danos ao DNA, ela tem a capacidade de diminuir os mecanismos de reparo de DNA dependente de PARP1.



**Figura 43.** Avaliação do efeito da harmina sobre o DNA das células MCF-7 e análise dos mecanismos de ação responsáveis por este efeito.



Nota: Onde (A) índice de dano ao DNA analisado pelo ensaio do cometa. (B e C) Imagem da eletroforese e dados quantitativos da proteína PARP1, envolvida no reparo do DNA, avaliado em células MCF-7 tratadas com harmina (27,88 µM, 48h). Os resultados são expressos como a média ± desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA e teste de Bonferroni. (\*), (\*\*), e (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas em comparação com os dados do controle negativo, quando  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente.

Segundo Cseh e colaboradores (2017), a proteína PARP1 tem outras funções além da sua função canônica de proteína envolvida no reparo do DNA. A proteína PARP1 controla a integridade e a função das mitocôndrias, uma fonte crítica do cofator  $\text{NAD}^+$ . A PARP1 é uma enzima que utiliza o cofator  $\text{NAD}^+$  para produzir as modificações pós-traducionais (cadeia PAR) ligadas à própria PARP1 ou a outras proteínas-alvo envolvidas no reparo do DNA (SATO, LINDAHL, 1992; ALTMAYER et al., 2009).

No estudo realizado por Cseh e colaboradores (2017), os autores relatam que a proteína PARP1 contribui para a transativação de genes que codificam componentes críticos da cadeia transportadora de elétrons, tais como o citocromo *c* e a proteína NADH

desidrogenase 2 (ND2) (subunidade do complexo I). Desta forma, é possível que a perda do potencial da membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) observada nas células MCF7 tratadas com harmina (Figura 29) esteja, pelo menos em parte, correlacionada com a diminuição da expressão da proteína PARP1, o que contribuiu também para a morte celular por apoptose (Figura 28). Contudo, é necessário mais estudos para melhor elucidar esta hipótese.

### 3.2.2.7 Atividade antitumoral *in vivo* do alcaloide $\beta$ -carbólico harmina

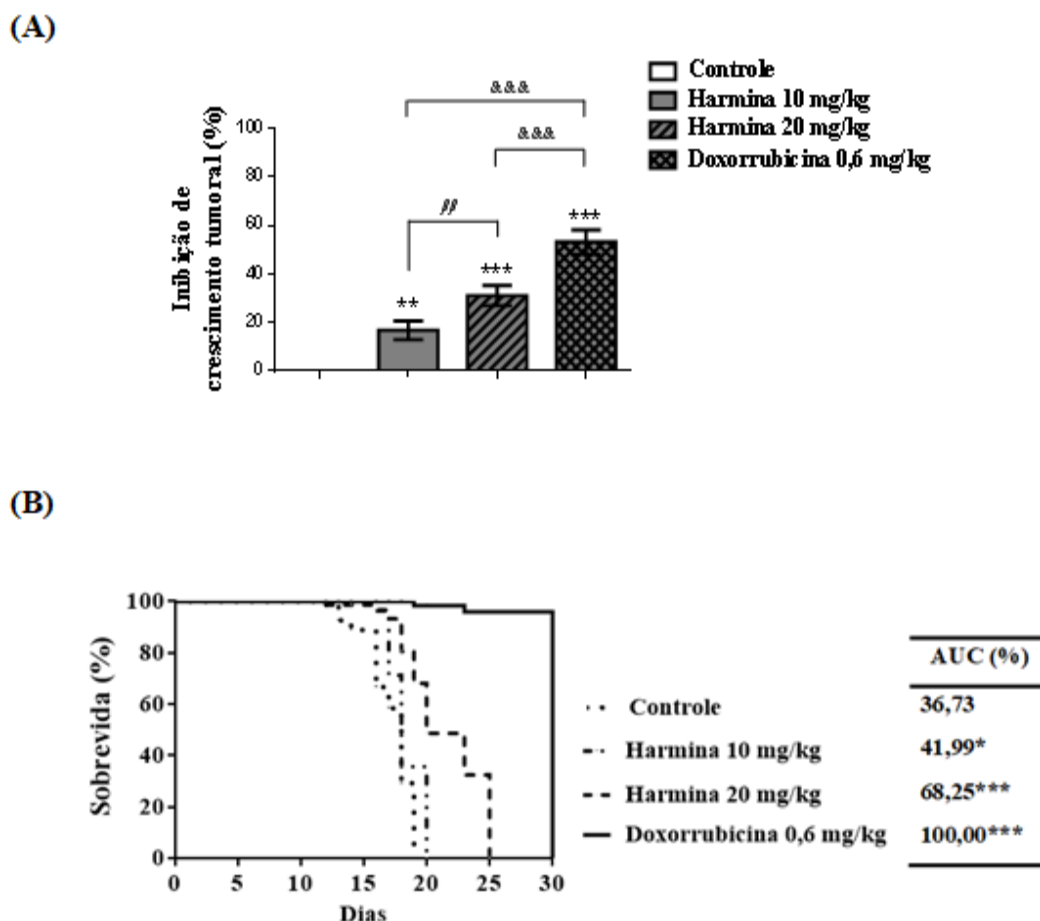
Após a avaliação da atividade citotóxica *in vitro* e *in silico* da harmina, foi investigado a sua atividade antitumoral *in vivo*, utilizando camundongos Balb/c inoculados com células do TAE. Os camundongos foram tratados (via intraperitoneal, 50  $\mu$ l) com a harmina nas doses de 10 e 20 mg/kg/dia por nove dias consecutivos.

Foi avaliada a inibição do crescimento tumoral e a sobrevivência dos animais tratados com harmina, comparando os resultados deste com o controle negativo e doxorrubicina. É importante salientar-se que, tanto o crescimento tumoral como o prolongamento do tempo de vida útil dos animais tratados são critérios altamente relevantes na avaliação do efeito antitumoral de qualquer composto candidato a agente anticancerígeno (CLARKSON, BURCHENAL, 1965; GÜNTHER et al., 2011).

De acordo com os resultados apresentados na figura 44, harmina foi capaz de inibir significativamente o crescimento tumoral quando comparado com o controle negativo (Figura 44A). A dose de 10 mg/kg/dia de harmina inibiu o crescimento tumoral em  $16,77 \pm 3,88\%$ , enquanto que, a dose de 20 mg/kg/dia apresentou um efeito inibitório significativamente maior, inibindo o crescimento tumoral em  $31,10 \pm 4,19\%$ . A doxorrubicina (0,6 mg/kg/dia), usada como controle positivo, foi capaz de inibir o crescimento tumoral em  $53,20 \pm 5,02\%$ .

A harmina utilizada na dose de 10 mg/kg/dia aumentou em 41,99% a probabilidade de sobrevivência dos animais tratados, quando comparado com o controle negativo. Nota-se que, os animais que receberam 20 mg/kg/dia de harmina apresentaram um prolongamento do tempo de vida útil significativamente maior (68,25%), quando comparado com o controle negativo (36,73%). Não houve mortalidade em animais tratados com a doxorrubicina.

**Figura 44.** Atividade antitumoral da harmina (10 e 20 mg/kg/dia, 9 dias) em camundongos Balb/c inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich.



Nota: Onde (A) Inibição do crescimento tumoral, com base na variação da circunferência abdominal. (B) Taxa de sobrevivência de camundongos tratados com harmina, de acordo com o método de Kaplan-Meier. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de replicata biológica,  $n = 12$ . Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA, complementado com o teste de Bonferroni ou teste de Log-rank, quando apropriado. AUC: área sob a curva. (\*), (\*\*) e (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas em comparação com os dados do controle negativo, quando  $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. ( $\beta\beta$ ) denotam diferenças estatísticas comparando a dose de 10 mg/kg/dia com a dose de 20 mg/kg/dia de harmina ( $p < 0,01$ ). (&&&) denotam diferenças estatísticas em comparação com o controle positivo ( $p < 0,001$ ).

Os resultados obtidos na avaliação da inibição do crescimento tumoral e sobrevivência dos animais tratados com a harmina estão em concordância entre si. Dado que, a harmina foi capaz de inibir significativamente o crescimento tumoral de maneira dependente da dose, o que conseqüentemente aumentou a probabilidade de sobrevivência dos animais tratados. Estes resultados sugerem que a harmina pôde induzir uma diminuição na viabilidade das células de TAE, o que conferiu a ela um efeito antitumoral *in vivo*.

Deve-se notar que, com base em nossa pesquisa na literatura, este é o primeiro relato do efeito antitumoral *in vivo* do alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina, utilizando o modelo do tumor ascítico de Ehrlich.

### 3.2.3 Conclusões parciais

Os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina apresentaram citotoxicidade contra as linhagens de células tumorais testadas neste estudo. Contudo, a harmina demonstrou ser mais seletivo que o harmano. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que a harmina intercalou entre os pares de bases do DNA nas regiões ricas em adenina e timina, causando danos ao DNA com conseqüente fragmentação do mesmo. Além disso, a harmina diminuiu os mecanismos de reparo do DNA dependentes da PARP1, induziu à parada do ciclo celular na fase G2/M devido à inibição da fosforilação da proteína Rb e redução da expressão de CDK2, ciclina A e ciclina B1, o que culminou na indução de apoptose via mitocondrial por meio da diminuição do potencial da membrana mitocondrial e modulação da expressão das proteínas da família Bcl-2. Confirmando estes dados, a harmina apresentou atividade antitumoral *in vivo* em camundongos Balb/c inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich. Posto isto, concluímos que o alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina possivelmente pode vir-a-ser utilizado futuramente como um promissor coadjuvante a terapia antitumoral convencional.

Como citado anteriormente, estes resultados foram condensados em um artigo que foi enviado e aceito para publicação na revista *International journal of functional nutrition* (Anexo B).

Nádia S.R.S. Mota<sup>1</sup>, Maicon R. Kwiecinski<sup>2</sup>, Karina B. Felipe<sup>3</sup>, Valdelúcia M.A.S. Grinevicius<sup>1</sup>, Tâmila Siminski<sup>1</sup>, Gabriela M. Almeida<sup>1</sup>, Rodrigo C. Zeferino<sup>1</sup>, Claus T. Pich<sup>4</sup>, Danilo W. Filho<sup>5</sup> and Rozangela C. Pedrosa<sup>1</sup>.  $\beta$ -carboline alkaloid harmine induces DNA damage and triggers apoptosis by a mitochondrial pathway: study *in silico*, *in vitro* and *in vivo*. INTERNATIONAL JOURNAL OF FUNCTIONAL NUTRITION 1:1, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijfn.2020.1>.

### 3.3 ETAPA 3 - ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTIPROLIFERATIVA E ANTIANGIOGÊNICA DE ALCALOIDES $\beta$ -CARBOLÍNICOS E SUA CORRELAÇÃO COM A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/Akt

Esta etapa do presente estudo foi dividida em duas principais fases. A primeira fase incluiu a avaliação da atividade antiproliferativa dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos (harmano e harmina) sobre a linhagem de células de câncer de mama MCF-7, analisada por meio do ensaio clonogênico. Do qual, foi selecionando o alcaloide que apresentou maior efeito antiproliferativo (harmina) para dar seguimento aos ensaios subsequentes, em que foram investigados os efeitos deste alcaloide na via de sinalização PI3K/Akt, geração de EROs e captação de glicose em células MCF-7. Na segunda fase foi avaliada a atividade antiangiogênica *in vivo* da harmina. Para tal, foram utilizados camundongos Balb/c, inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).

#### 3.3.1 Materiais e métodos

##### 3.3.1.1 Reagentes e anticorpos

A  $^{14}\text{C}$ -desoxi-D-glicose, solução salina de Hank, 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA), dimetilsulfóxido (DMSO) e o coquetel inibidor de proteases foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Os antibióticos, meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), solução salina tamponada com fosfato (PBS) e o soro fetal bovino (FBS) foram adquiridos da Gibco (EUA). O coquetel inibidor de fosfatases foi adquirido da Calbiochem (Merck Biosciences). O anticorpo policlonal de coelho criado contra fosfo-mTOR (Cat. 2971), o anticorpo policlonal de camundongo criados contra pAkt (Cat. Sc-514032); e os anticorpos monoclonais de coelho criados contra Akt (Cat. C67E7) e mTOR (Cat. 2983) foram provenientes da Cell Signaling Technology (Danvers, EUA). O anticorpo policlonal de coelho criado contra HIF1 $\alpha$  (Cat. Sc-10790) veio da Santa Cruz Biotechnology (EUA). O anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho (Cat. AP132P) e anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de camundongo (Cat. AP181P), para além do kit de detecção de quimioluminescência para anticorpos acoplados à HRP vieram da Merck Millipore (EUA). O harmano (1-metil-9H-pirido [3,4-b] indol) e a harmina (7-metoxi-1-metil-9H-pirido [3,4-b]

indol) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Todos os demais reagentes químicos foram usados com grau de pureza atendendo as normas da *American Chemical Society* (ACS).

### 3.3.1.2 Cultura de células

As células de carcinoma de mama humano (MCF-7) foram obtidas a partir do banco de células de Rio de Janeiro, Brasil. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL); e mantidas a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade do ar.

### 3.3.1.3 Ensaio de proliferação celular

O efeito dos alcaloides β-carbolínicos (harmano e harmina) sobre a proliferação celular de células MCF-7 foi analisado pelo ensaio de formação de colônias (FRANKEN et al., 2006). As células MCF-7 foram plaqueadas a uma densidade de 500 células/poço em placas de 6 poços. Neste ensaio foram utilizadas concentrações que correspondiam ao CE<sub>30</sub>. Assim, as células foram tratadas por 72h com os alcaloides harmano e harmina nas concentrações de 46,90 µM e 27,88 µM, respectivamente. O controle negativo foi tratado apenas com o meio DMEM contendo 0,1% de DMSO. Após os 72h de tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS aquecida a 37°C. Em seguida, foi adicionado meio DMEM completo e as células foram incubadas por 15 dias, com renovação do meio a cada 3 dias. Ao término deste período o meio foi removido, as células foram lavadas com PBS e fixadas com metanol por 10 min a temperatura ambiente. A seguir, as células foram coradas com cristal violeta (0,2 %; m/v em água destilada) por 10 min e lavadas novamente com PBS. Após secagem em temperatura ambiente, as placas foram fotografadas e as colônias com mais de 50 células foram contadas para determinar o número de unidades formadoras de colônias. Posteriormente, foi adicionado ácido acético glacial a 10% por 15 min a temperatura ambiente e as placas foram mantidas sob agitação. Aliquotas de 200 µl foram transferidas para placas de 96 poços em triplicata e foi efetuada a leitura das absorbâncias no leitor de microplacas (TECAN Infinity M200), empregando um comprimento de onda de 590nm. Os dados foram processados usando o software Graph Pad Prism 6 (San Diego, EUA). Os dados finais foram expressos como porcentagem de formação de colônias e número de colônias formadas. Foram realizados três ensaios independentes com cada concentração testada em duplicata.

### 3.3.1.4 Ensaio de Imunodeteção

Avaliou-se a expressão de proteínas relacionadas com a via de sinalização PI3K/Akt por meio de imunoeletroforese do lisado completo de células MCF7 tratadas com a harmina na concentração de 27,88  $\mu\text{M}$  por 48h. As células MCF7 foram lisadas em tampão RIPA (50 mM Tris-HCl, pH = 7,4; 150 mM NaCl; 1% do surfactante NP40; 0,25% do detergente desoxicolato de sódio; 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil) suplementado com o coquetel de inibidores de protease (1%) e inibidores de fosfatase (3%). As proteínas foram desnaturadas em tampão laemmli (60mM Tris-HCl, pH = 6,8; 2% de dodecilsulfato de sódio (SDS); 10% glicerol; 5%  $\beta$ -merca mercaptoetanol; 0,01% de azul de bromofenol). A seguir, 25  $\mu\text{g}$  de proteína desnaturada foram submetidos à eletroforese em gel de dodecilsulfato de sódio (*sodium dodecyl sulphate* - SDS) de poliacrilamida (SDS - PAGE), seguida por eletrotransferência para membranas de fluoreto de polivinilideno (PVDF) (LAEMMLI, 1970). Após o bloqueio e a lavagem, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários durante a noite a - 8 ° C (anticorpos policlonais de coelho criados contra fosfo-mTOR (1:1000, v/v), HIF1 $\alpha$  (1:1000, v/v); anticorpos policlonais de camundongo criados contra pAkt (1:1000, v/v); anticorpos monoclonais de coelho criados contra Akt (1:1000, v/v) e mTOR (1:1000, v/v)). Por fim, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpos secundários (1h); sendo estes: o anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de coelho (1:5000, v/v) e anticorpo policlonal de cabra anti-IgG de camundongo (1:3000, v/v), ambos conjugados com peroxidase (Merck Milipore, EUA). A imunodeteção foi realizada usando um kit de detecção de quimioluminescência para anticorpos acoplados à HRP (Merck Millipore, EUA). A actina (1:1000, v/v) foi usada como controle de carga. As imagens adquiridas (ChemiDoc MP System; Bio Rad, EUA) foram analisadas no programa ImageJ versão 1.49 (*National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA). Os valores obtidos para as amostras dos tratamentos foram normalizados com a actina.

### 3.3.1.5 Níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células MCF7

O conteúdo intracelular de EROs foi mensurado por citometria de fluxo, utilizando o reagente 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (GLORIEUX et al., 2011). A oxidação do DCFH-DA é quantitativamente proporcional à concentração de peróxido de

hidrogênio ( $H_2O_2$ ) gerado (HIRABAYASHI, TANIUCHI, KOBAYASHI, 1985). As células MCF-7 foram plaqueadas ( $1,5 \times 10^4$ /poço) em placas de 12 poços. Após atingirem a confluência, as células foram tratadas com a harmina nas concentrações de 27,88  $\mu M$  e 46,47  $\mu M$  por 48h. Em seguida, o meio contendo o tratamento foi removido e as células foram incubadas com uma solução de DCFH-DA (2  $\mu M$ ; 500  $\mu l$ ) preparada em solução salina de Hank (Hank's Balanced Salt Solution – HBSS) por 30 min a 37°C. Após este período, os poços foram lavados com o tampão HBSS para remover o excesso de DCFH-DA. A seguir, as células foram tripsinizadas, centrifugadas (5 min a 2000 rpm), lavadas e resuspensas em 300  $\mu l$  de tampão HBSS. A intensidade da fluorescência do DCFH-DA foi medida no citômetro de fluxo BD FACS Canto II (BD Biosciences, EUA). Os dados foram analisados utilizando o Flowing Software 2.5.0 (Finlândia). Os resultados foram apresentados como intensidade média de fluorescência de DCFH-DA.

#### 3.3.1.6 Ensaio de captação de glicose em células MCF7

O efeito do alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina sobre a captação de glicose em células MCF7 foi analisado por cintilação líquida, utilizando o  $^{14}C$ -desoxi-D-glicose (CAZAROLLI et al., 2009). As células MCF-7 foram plaqueadas ( $8 \times 10^5$ /poço) em placas de 6 poços. Após atingirem a confluência, as células foram tratadas com a harmina nas concentrações de 27,88  $\mu M$  e 46,47  $\mu M$  por 48h. Posteriormente, as células foram incubadas por 1h com o  $^{14}C$ -desoxi-D-glicose (0,1  $\mu Ci/mL$ ). Em seguida, as células foram centrifugadas (8 min 1000 rpm), lavadas (2x) com PBS e foi adicionado 200  $\mu l$  de hidróxido de sódio (NaOH) a 0,5 M. A seguir, a radioatividade foi mensurada por cintilação líquida usando um espectrômetro de cintilação líquida LKB rack beta (modelo LS 6500, Beckman Coulter®). Por fim, os valores obtidos para as amostras dos tratamentos foram normalizados com a quantidade total de proteína, determinadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Os resultados foram expressos como nmol de unidades de glicose por mg de proteína.

#### 3.3.1.7 Avaliação da atividade antiangiogênica *in vivo*

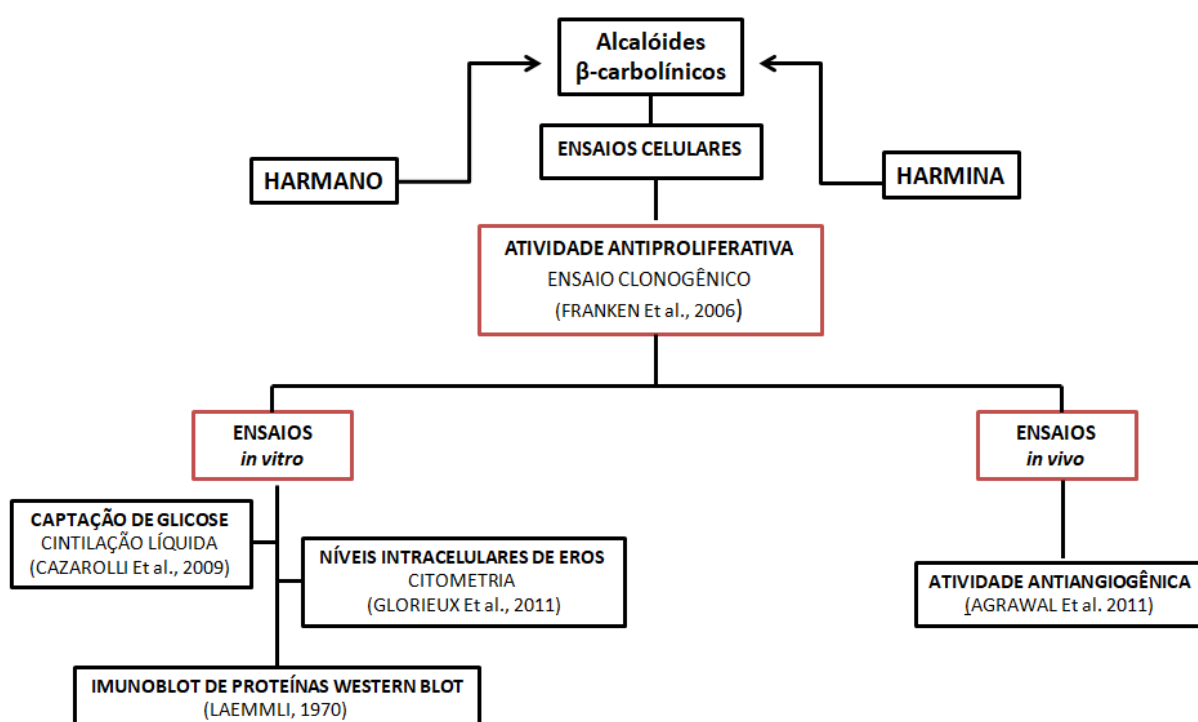
A atividade antiangiogênica *in vivo* da harmina foi realizada utilizando camundongos Balb/c machos ( $20 \pm 2$  g) mantidos em condições controladas (ciclo claro-escuro de 12h,  $22 \pm 2^\circ C$ , 60% de umidade do ar), recebendo ração comercial padrão e água *ad libitum*.



Todos os procedimentos com animais foram realizados de acordo com os princípios internacionalmente aceitos para uso e cuidados com animais de laboratório (publicação do NIH # 85–23, revisada em 1985). O protocolo experimental recebeu aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil (CEUA-PP00784).

Os camundongos foram inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE;  $5 \times 10^6$  células; 200  $\mu$ L) via intraperitoneal (dia zero). Após 24h, os camundongos foram divididos em três grupos (n = 12). O grupo controle negativo foi tratado apenas com solução salina contendo 1% de DMSO. Os grupos de teste receberam harmina nas doses de 10 e 20 mg/kg/dia, respectivamente. Os tratamentos foram realizados intraperitonealmente (50  $\mu$ l) por nove dias consecutivos. No décimo dia, os camundongos foram anestesiados com uma solução de xilazina (15 mg/kg) e cetamina (90 mg/kg) administrado via intraperitoneal e sacrificados para o estudo da atividade antiangiogênica da harmina. Os microvasos do tumor na região subcutânea do peritônio dos camundongos foram fotografados. Posteriormente, a área, densidade e o número dos microvasos foram quantificados usando o programa Image J versão 1.49 (*National Institute of Health*, Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram expressos como número total de microvasos formados (AGRAWAL et al. 2011).

**Figura 45.** Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico, antiproliferativo e antiangiogênico do alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina.



### 3.3.1.8 Análise estatística

Os ensaios *in vitro* foram realizados em triplicata técnica, enquanto os experimentos *in vivo* foram realizados em replicata biológica ( $n = 12$ ;  $\alpha = 0,05$ ; Potência  $(1 - \beta) = 0,90$ ;  $t$  crítico = 1,81;  $df$  (grau de liberdade) = 10; Tamanho do efeito  $|\rho| = 0,67$ ). O  $n$  amostral dos ensaios *in vivo* foi calculado pelo software G\*Power 3.1.9.4. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão ou como porcentagem. Os dados foram analisados pelo teste de análise de variância ANOVA one-way, complementado pelo teste de Bonferroni. As comparações foram realizadas usando o software Graph Pad Prism 6 (San Diego, EUA). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados como estatisticamente significativos.

## 3.3.2 Resultados e discussão

### 3.3.2.1 Avaliação do efeito antiproliferativo dos alcaloides $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina em células MCF-7

Inicialmente, os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina foram submetidos a uma triagem de efeito antiproliferativo em células MCF-7, avaliado pelo ensaio de formação de colônias.

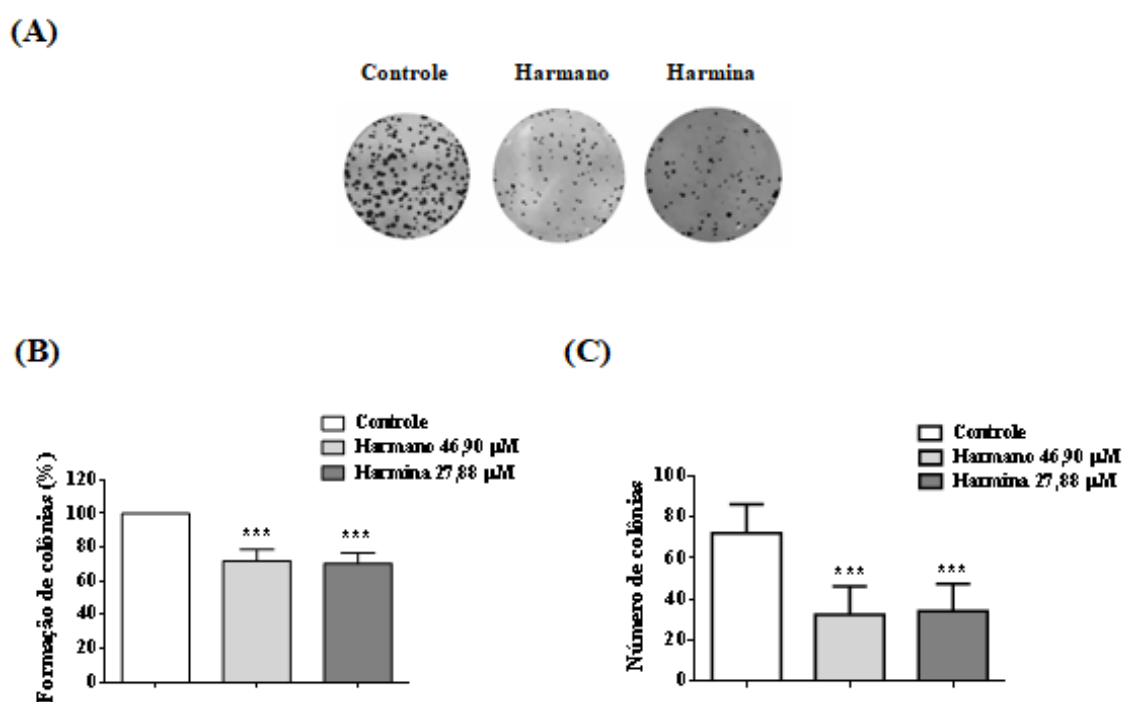
Com base nos resultados apresentados nas figuras 46A/B e 46C, é possível observar-se que ambos os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos exibiram um efeito antiproliferativo. Após o tratamento das células por 72h com o harmano e a harmina nas concentrações de 46,90  $\mu\text{M}$  e 27,88  $\mu\text{M}$ , obteve-se um percentual de formação de colônias de  $72,05 \pm 9,45\%$  e  $70,51 \pm 8,75\%$ , respectivamente. O controle negativo foi considerado como sendo 100% de formação de colônias (Figura 46A/B). Além disso, tanto o harmano (46,90  $\mu\text{M}$ ) quanto à harmina (27,88  $\mu\text{M}$ ) diminuíram o número de colônias formadas para  $32,50 \pm 13,92$  e  $34,25 \pm 13,22$ , enquanto que, o controle negativo apresentou o número de colônias formadas de  $72,28 \pm 14,13$  (Figura 46A/C). Estes resultados demonstram que, os dois alcaloides  $\beta$ -carbolínicos utilizados neste estudos tiveram a capacidade de diminuir significativamente a proliferação celular de células MCF-7, quando comparados com o controle negativo.

No entanto, quando se comparam os dois alcaloides em relação ao efeito antiproliferativo, estes não apresentam diferença estatística entre si. Contudo, é importante

salientar-se que, a harmina demonstrou ter um potencial antiproliferativo mais eficaz que o do harmano. Dado que, a harmina em uma concentração aproximadamente 1,7x menor que a do harmano, exibiu o mesmo efeito antiproliferativo do harmano.

Assim sendo, a harmina foi escolhida para dar seguimento aos demais ensaios, comparando o efeito deste com o controle negativo tratado apenas com o meio DMEM contendo 0,1% de DMSO.

**Figura 46.** Atividade antiproliferativa de harmano e harmina sobre as células MCF-7.



Nota: Onde (A) Imagem da formação de colônias de células MCF-7 tratadas com o harmano (46,90  $\mu\text{M}$ ) e harmina (27,88  $\mu\text{M}$ ) por 72h, em comparação com o controle negativo. (B e C) Dados quantitativos da atividade antiproliferativa de harmano e harmina em células MCF-7. Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA e teste de Bonferroni. (\*\*\*) denota diferença estatística em comparação com dados de controle negativos, quando  $p < 0,001$ .

### 3.3.2.2 Avaliação do efeito modulatório do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina sobre a via PI3K/Akt em células MCF-7

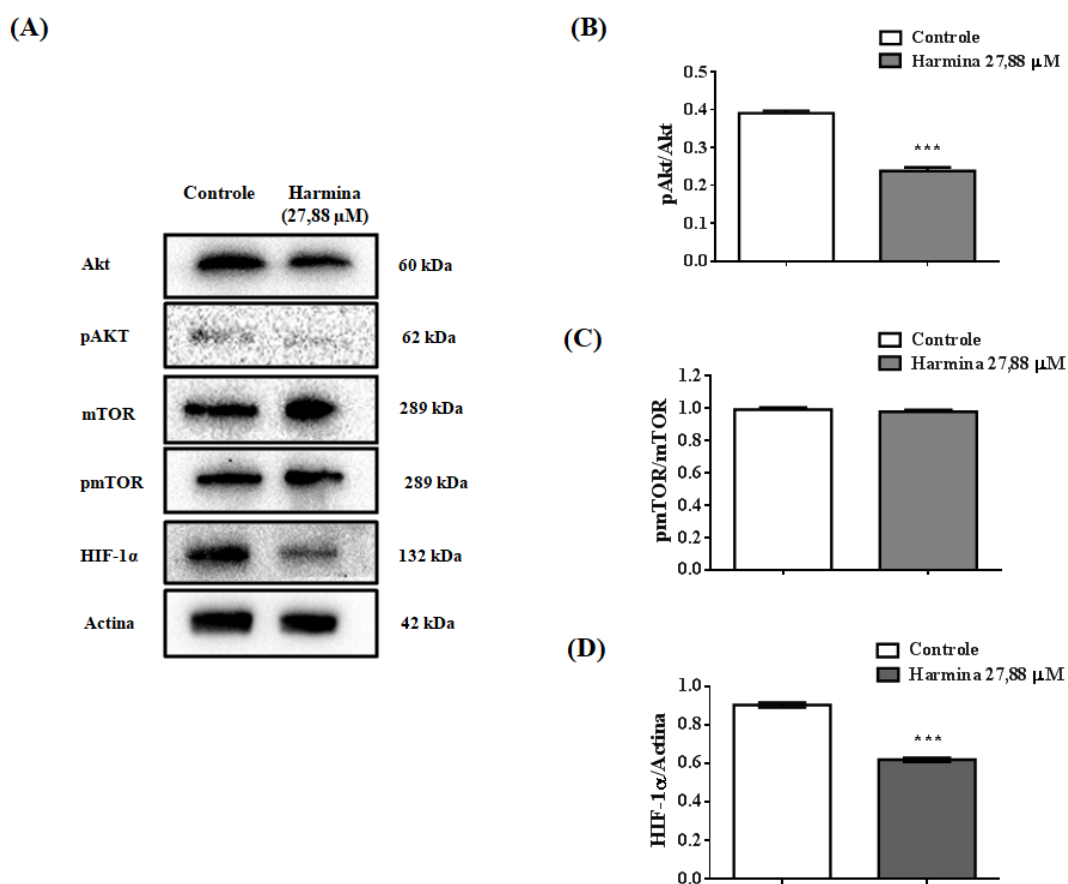
Uma vez que harmina exibiu efeito antiproliferativo, foi avaliado se a mesma afetaria a via de sinalização da PI3K/Akt. Visto que, esta via regula vários processos biológicos cruciais para o desenvolvimento do câncer, nomeadamente a sobrevivência, proliferação e

diferenciação celular. Além disso, a ativação contínua da via PI3K/Akt tem sido associada ao surgimento de uma variedade de tumores humanos (PORTA, PAGLINO, MOSCA, 2014). Neste sentido, o efeito modulatório da harmina (27,88  $\mu$ M, 48 h) sobre a via PI3K/Akt em células MCF-7 foi avaliada por imunoeletoforese.

Como demonstrado na figura 47A, a harmina diminuiu tanto a expressão da Akt quanto a fosforilação da mesma. No entanto, nota-se que, a harmina também diminuiu significativamente a razão pAkt/Akt (Figura 47B), o que sugere que este alcaloide  $\beta$ -carbolínico foi capaz de inibir de forma significativa a atividade desta proteína. Em contrapartida, a harmina inibiu a via de sinalização PI3K/Akt independentemente do envolvimento da proteína mTOR (Figura 47A/C).

Apesar da harmina não ter apresentado efeito sobre a expressão e atividade da proteína mTOR, ainda assim houve uma redução significativa no conteúdo do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  (fator-1 $\alpha$  induzido por hipóxia) em células MCF-7 (Figura 47A/D). Estes resultados sugerem que a harmina possivelmente estaria diretamente ou indiretamente regulando outras proteínas envolvidas na via de sinalização da PI3K/Akt, como por exemplo, a glicogênio sintase cinase-3 beta (GSK-3 $\beta$ ).

**Figura 47.** Efeito de harmina sobre a via PI3K/Akt/mTOR em células MCF-7.



Nota: Onde **(A)** Imagem da eletroforese e **(B, C e D)** dados quantitativos de proteínas associadas à via PI3K/Akt/mTOR (Akt, pAkt, mTOR, pmTOR, HIF-1 $\alpha$ ) em células MCF-7 tratadas com a harmina (27,88  $\mu\text{M}$ , 48h). Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA e teste de Bonferroni. (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas em relação ao controle negativo, quando  $p < 0,001$ .

Já é de conhecimento que, a proteína GSK-3 $\beta$  fosforila o fator HIF-1 $\alpha$ , marcando-o para a ubiquitinação e degradação proteossomal de maneira independente da proteína supressora de tumores Von Hippel-Lindau (pVHL) (YEE, SPIVAK-KROIZMAN, POWIS, 2008). Todavia, a proteína GSK-3 $\beta$  ao ser fosforilada diretamente pela Akt é inativada (PORTA, PAGLINO, MOSCA, 2014).

Contudo, os dados apresentados neste presente estudo sugerem que, o fato da harmina diminuir a expressão e atividade da Akt, isto provavelmente influenciou a atividade da proteína GSK-3 $\beta$ . Uma vez a GSK-3 $\beta$  ativa, esta por sua vez, aumentou a degradação do fator HIF-1 $\alpha$  independentemente da proteína pVHL, diminuindo desta forma os níveis intracelulares de HIF-1 $\alpha$  nas células MCF-7, o que consequentemente diminuiu a proliferação

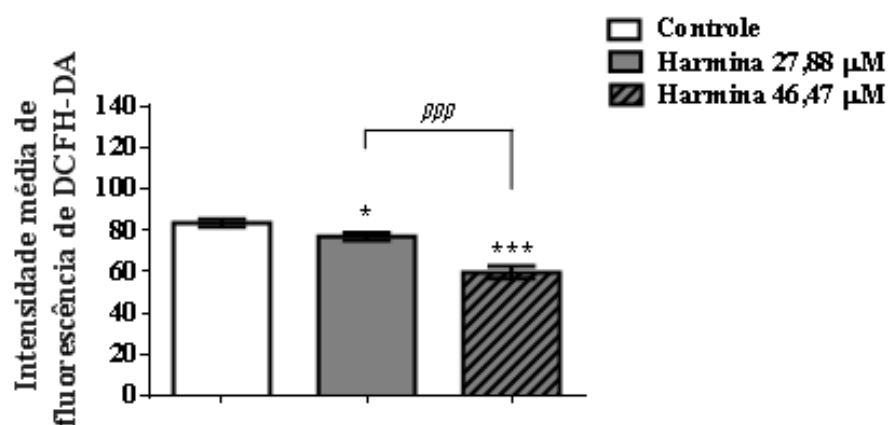
destas células tumorais. Entretanto, é necessário mais estudos para melhor elucidar esta hipótese.

### 3.3.2.3 Indução intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células MCF7 tratadas com o alcaloide $\beta$ -carbólico harmina

Para elucidar a relação entre a atividade antiproliferativa da harmina, seu efeito modulatório sobre a via de sinalização PI3K/Akt e a geração de EROs, células MCF-7 foram tratadas com a harmina (27,88  $\mu$ M e 46,47  $\mu$ M) por 48h e foi realizado o ensaio do DCFH.

A harmina diminuiu significativamente a geração intracelular de EROs em células MCF-7 de maneira dependente da dose (Figura 48). No qual, harmina nas concentrações de 27,88  $\mu$ M e 46,47  $\mu$ M apresentou uma geração intracelular de EROs de  $77,07 \pm 1,55$  e  $59,63 \pm 2,62$ , respectivamente. O controle negativo, por sua vez, apresentou uma geração intracelular de EROs de  $83,61 \pm 1,65$ . Assim, harmina na concentração de 27,88  $\mu$ M e 46,47  $\mu$ M foi capaz de diminuir a geração intracelular de EROs em 7,83% e 28,68%, quando comparado com o controle negativo.

**Figura 48.** Indução da geração de EROs em células MCF-7 após 48h de tratamento com a harmina (27,88  $\mu$ M a 46,47  $\mu$ M).



Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA e o teste de Bonferroni. (\*) e (\*\*\*) denotam diferenças estatísticas em comparação com os dados do controle negativo, quando  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$ , respectivamente. (ppp) denota diferença estatística comparando a concentração de 27,88  $\mu$ M a 46,47  $\mu$ M de harmina, quando  $p < 0,001$ .

Sabe-se que, a via de sinalização PI3K/Akt regula positivamente a geração de EROs através da modulação direta do metabolismo energético mitocondrial (KOUNDOUROS, POULOGIANNIS, 2018). Visto que, a proteína GSK-3 $\beta$  mitocondrial, quando inibida por fosforilação pela Akt, perde a sua capacidade de regular negativamente o complexo I mitocondrial e as proteínas piruvato desidrogenase e  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, aumentando assim a atividade mitocondrial, como resultado ocorre um aumento na produção de superóxido (O $_2^{\bullet}$ ) e peróxido de hidrogênio (H $_2$ O $_2$ ) (STARKOV et al. 2004). Além disso, altos níveis de EROs intracelular aumentam a translocação do fator HIF-1 $\alpha$  para o núcleo, o que resulta no aumento da expressão gênica de proteínas importantes envolvidas nos processos de sobrevivência e proliferação celular (KOUNDOUROS, POULOGIANNIS, 2018). Por outro lado, as próprias EROs podem aumentar a atividade da via PI3K/Akt por mediar a hiperfosforilação de PI3K com subsequente fosforilação e ativação de Akt pela PDK1 (piruvato desidrogenase cinase 1), aumentando assim a expressão gênica de proteínas essenciais à progressão do ciclo celular, culminando no aumento da proliferação celular (OKOH et al. 2013).

Portanto, os dados apresentados sugerem que, a harmina ao inibir a via PI3K/Akt diminuiu a geração de EROs em células MCF-7. À vista disso, ocorreu uma diminuição da translocação do fator HIF-1 $\alpha$  para o núcleo e como resultado houve uma redução na proliferação destas células. Entretanto, não se deve descartar o fato de que, a diminuição da geração de EROs nas células MCF-7 também pode ter contribuído para a inibição da atividade da proteína Akt, colaborando assim para a inibição da via PI3K/Akt.

Deste modo, os dados referentes à atividade antiproliferativa da harmina (Figura 46), o seu efeito modulatório sobre a via de sinalização PI3K/Akt (Figura 47) e a geração de EROs (Figura 48) corroboram entre si.

#### *3.3.2.4 Avaliação do efeito do alcaloide $\beta$ -carbolínico harmina sobre a captação de glicose em células MCF-7*

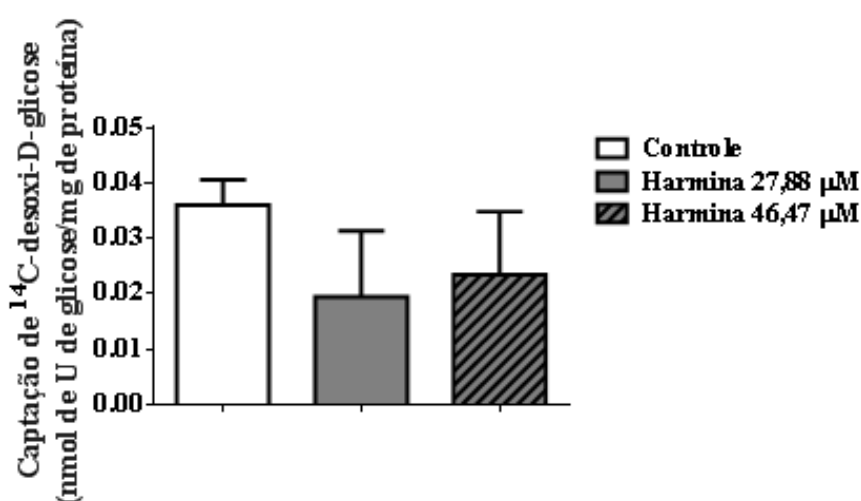
Consta-se que, modificações no metabolismo glicolítico é provavelmente a alteração metabólica mais comum que distingue as células tumorais das demais células (células normais), no qual ocorre um aumento da taxa de captação de glicose e sua conversão em lactato, mesmo em condições ricas em oxigênio, efeito este conhecida como “glicólise aeróbica” ou “Efeito Warburg” (KATO et al., 2018, HOXHAI, MANNING, 2020). Além

disso, o aumento no metabolismo glicolítico fornece intermediários metabólicos que contribuem para a síntese de proteínas, lipídios e nucleotídeos, favorecendo assim o crescimento e proliferação celular (HOXHAI, MANNING, 2020). Ademais, o aumento da captação de glicose é refletido pelo aumento da expressão e atividade de transportadores de glicose (GLUT) e enzimas glicolíticas, sendo estes regulados positivamente pelo fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  (BRAHIMI-HORN et al., 2011).

Desta forma, levando em consideração os resultados obtidos anteriormente, foi avaliado se a diminuição do conteúdo do fator HIF-1 $\alpha$  em células MCF-7 foi capaz de interferir também na captação de glicose. Neste contexto, o efeito da harmina (27,88  $\mu$ M a 46,47  $\mu$ M, 48h) sobre a captação de glicose em células MCF-7 foi avaliada e os resultados deste experimento estão apresentados na figura 49.

Após o tratamento das células MCF-7 com a harmina nas concentrações citadas acima, não foi observado diferença estatística em relação às células do controle negativo. Isto sugere que, apesar da harmina reduzir os níveis intracelulares de HIF-1 $\alpha$  em células MCF-7, ainda assim este alcaloide  $\beta$ -carbolínico não afetou a captação de glicose nestas células, indicando deste modo que provavelmente a atividade citotóxica e antiproliferativa da harmina advém da regulação de outras vias de sinalização à exceção da via glicolítica.

**Figura 49.** Captação de glicose em células MCF-7 após 48h de tratamento com a harmina (27,88  $\mu$ M a 46,47  $\mu$ M).



Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA e teste de Bonferroni.



### 3.3.2.5 Atividade antiangiogênica *in vivo* do alcaloide $\beta$ -carbólico harmina

Sabe-se que, a supressão da disponibilidade de oxigênio e nutrientes para as células tumorais através da redução ou inibição da angiogênese afeta o crescimento e proliferação celular, além de contribuir para a ocorrência de morte celular e diminuição da probabilidade de invasão e metástases (HANAHAN, WEINBERG, 2000- 2011). Por outro lado, têm-se o conhecimento que, a via de sinalização PI3K/Akt por intermédio do fator de transcrição HIF-1 $\alpha$  promove a neoangiogênese por regular positivamente a expressão de fatores pró-angiogênicos, tais como o VEGF (CERADINI et al., 2004).

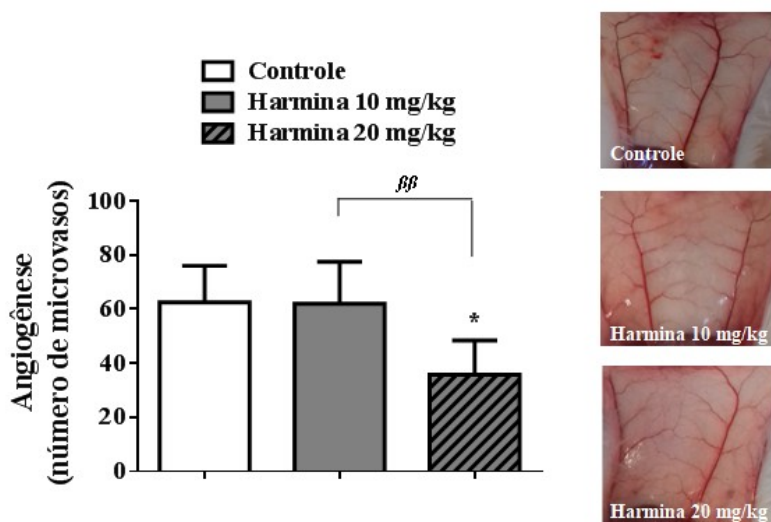
Assim sendo, após a avaliação da atividade citotóxica e antiproliferativa *in vitro* da harmina, foi investigado a sua atividade antiangiogênica *in vivo*, utilizando camundongos Balb/c inoculados com células do TAE. Os camundongos foram tratados com a harmina (10 e 20 mg/kg/dia, 50  $\mu$ l) por nove dias consecutivos.

De acordo com os resultados apresentados na figura 50, nota-se que, apenas harmina utilizada na dose de 20 mg/kg/dia foi capaz de inibir significativamente a angiogênese, onde este diminuiu o número total de microvasos formados para  $35,80 \pm 12,02$ , ao passo que, o controle negativo apresentou um número total de microvasos formados de  $62,50 \pm 11,72$ . Desse modo, a harmina (20 mg/kg/dia) inibiu a angiogênese em 42,72%, quando comparado com o controle negativo. Entretanto, a dose de 10 mg/kg/dia de harmina apresentou um número total de microvasos formados de  $62,0 \pm 14,18$ , por conseguinte não apresentou diferença estatística em relação ao controle negativo.

No entanto, quando se comparam as duas doses de harmina (10 e 20 mg/kg/dia) em relação ao efeito angiointibitório, observa-se uma diferença estatística significativa entre eles. Isto sugere que a harmina apresentou uma atividade antiangiogênica dependente da dose.

Além do mais, os dados obtidos indicam que, provavelmente, a atividade antiangiogênica *in vivo* da harmina advém da sua capacidade de inibir a via de sinalização PI3K/Akt com consequente diminuição dos níveis intracelulares de HIF-1 $\alpha$ .

**Figura 50.** Atividade antiangiogênica de harmina (10 e 20 mg/kg/dia, 9 dias), em camundongos Balb/c inoculados com células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE).



Os resultados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de replicata biológica,  $n = 12$ . Os dados foram analisados pela análise de variância one-way ANOVA e o teste de Bonferroni. (\*) denotam diferenças estatísticas em comparação com os dados do controle negativo, quando  $p < 0,05$ . ( $\beta\beta$ ) denotam diferenças estatísticas comparando a dose de 10 mg/kg/dia com a dose de 20 mg/kg/dia de harmina ( $p < 0,01$ ).

### 3.3.3 Conclusões parciais

Os alcaloides  $\beta$ -carbólicos harmano e harmina apresentaram atividade antiproliferativa contra a linhagem de células tumorais MCF-7. Entretanto, a harmina exibiu um efeito antiproliferativo mais eficaz que o harmano. Os resultados obtidos neste presente estudo indicam que a harmina diminuiu a expressão e atividade da proteína Akt, como consequência reduziu os níveis intracelulares do fator HIF-1 $\alpha$  independentemente do envolvimento de mTOR e diminuiu também a geração de EROs, culminando assim na inibição da via de sinalização PI3K/Akt. Além disso, a harmina apresentou atividade antiangiogênica *in vivo*. Portanto, concluímos que, o alcaloide  $\beta$ -carbólico harmina possivelmente pode vir-a-ser utilizado futuramente como um agente antitumoral promissor para o tratamento do câncer de mama.

#### 4. CONCLUSÃO DA TESE

Com base nos objetivos propostos e nos resultados obtidos com o presente trabalho, pode-se concluir que:

- O estudo do efeito citotóxico dos extratos da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener contra as células MCF-7, demonstrou claramente que a adição de 5% etanol como co-solvente aumentou a citotoxicidade dos extratos supercríticos de maneira dependente de tempo e da dose. Com destaque para o extrato supercrítico obtido nas condições de 300bar de pressão, 40°C de temperatura e 5% etanol (co-solvente) que apresentou uma atividade citotóxica *in vitro* superior às demais.
- Tanto o extrato hidroalcoólico quanto o extrato supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH) da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener exibiram atividade antitumoral *in vivo*. No qual, ambos os extratos aumentaram o estresse oxidativo em células do tumor ascítico de Ehrlich (TAE), o que levou a danos oxidativos nos lipídios, proteínas e DNA, culminando na morte celular por apoptose via mitocondrial. Contudo, os mecanismos responsáveis pelos efeitos pró-oxidantes de ambos os extratos são diferentes.
- Apenas o extrato supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH) induziu parada do ciclo celular na fase G2/M em células de TAE.
- O extrato supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH) apresentou uma atividade citotóxica, antiproliferativa, pró-apoptótica e antitumoral mais eficiente que a do extrato hidroalcoólico, provavelmente devido à presença dos ácidos graxos de cadeia média e longa, especialmente o ácido láurico, ácido palmítico, ácido linoleico, ácido oleico e ácido mirístico, que apresentam atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antitumoral.
- Os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina apresentaram efeito citotóxico e seletividade sobre as células tumorais testadas no presente estudo. No entanto, a harmina demonstrou ser mais seletivo que o harmano.

- O alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina tem a capacidade de interagir com o DNA e intercalar-se entre os pares de bases do DNA nas regiões ricas em adenina e timina.
- Por ser um composto intercalante de DNA, a harmina foi capaz de induzir danos ao DNA com conseqüente fragmentação do mesmo. Além disso, a harmina diminuiu os mecanismos de reparo do DNA dependentes da PARP1, o que levou a parada do ciclo celular na fase G2/M e morte celular por apoptose via mitocondrial.
- Ambos os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos (harmano e harmina) apresentaram atividade antiproliferativa sobre as células MCF-7. Contudo, a harmina exibiu um efeito antiproliferativo mais eficaz que o harmano.
- O alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina diminuiu a expressão e atividade de Akt, como resultado houve uma redução no conteúdo intracelular de HIF-1 $\alpha$  e de EROs, culminando assim na inibição da via de sinalização PI3K/Akt. Destacando-se que, a inibição da via de sinalização PI3K/Akt ocorreu independentemente do envolvimento de mTOR.
- O alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina também apresentou atividade antitumoral *in vivo* com conseqüente aumento da sobrevivência dos animais tratados.
- O alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina apresentou atividade antiangiogênica *in vivo*, o que contribuiu também para a sua atividade antitumoral *in vivo*.

Desta forma, os resultados deste estudo demonstram que, os compostos isolados a partir da torta de sementes de *P. edulis* f. *flavicarpa* Degener e o próprio o alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina podem vir-a-ser utilizados futuramente como moléculas protótipos para a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, podendo possivelmente virem a ser utilizados como promissores coadjuvantes a terapia antitumoral convencional já utilizado na clínica.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

### 5.1 PERSPECTIVAS

O desenvolvimento desse estudo abre novas perspectivas de trabalho que possam servir de complemento aos resultados já obtidos ou, até mesmo, abrir novas possibilidades ou rumos para estudos futuros mais aprofundados, tais como:

- O efeito citotóxico deve ser avaliado sobre outras linhagens de células tumorais para melhor caracterização do efeito citotóxico e a seletividade dos compostos presentes nos extratos da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener;
- O extrato hidroalcoólico e supercrítico (300bar/40°C/CO<sub>2</sub>/5% de EtOH) da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener devem ser melhores avaliados fitoquimicamente (LC-MS, CLAE), para assim, permitir fazer correlações mais aproximadas sobre a estrutura dos constituintes químicos dos extratos e suas atividades bioquímicas. Salientando que, o estudo fitoquímico deve-se embasar principalmente na busca de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos;
- Avaliar os biomarcadores de defesas antioxidantes e de estresse oxidativo em linhagens de células tumorais e células normais cultivadas *in vitro* tratadas com os extratos da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener;
- Avaliar a toxicidade sistemática nos animais tratados com os extratos da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener, avaliando os marcadores bioquímicos de citotoxicidade hepática (enzimas aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase e lactato desidrogenase), cardíaca (creatina cinase total e isoenzimas – CK) e renal (ureia e creatinina);
- Avaliar o potencial efeito sinérgico dos extratos da torta de sementes de *P. edulis f. flavicarpa* Degener com quimioterápicos convencionais já usados na clínica;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* e o efeito antitumoral *in vivo* dos ácidos graxos de cadeia média e longa isoladamente, empregando os modelos experimentais usados neste presente estudo;

- O efeito citotóxico dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos harmano e harmina devem ser avaliados sobre outras linhagens de células tumorais a fim de melhor caracterizar o potencial efeito seletivo destes alcaloides;
- Avaliar o efeito do alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina na cadeia respiratória mitocondrial isolada (complexo I, II e III) de células MCF-7;
- Investigar o mecanismo de morte celular induzido pelo alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina em células MCF-7, através da análise da expressão do marcador de apoptose citocromo *c*, comparando o conteúdo de citocromo *c* mitocondrial e citosólico;
- Investigar o mecanismo de morte celular induzido pelo alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina em células MCF-7, através da avaliação da atividade de caspase-3 e caspase-8;
- Avaliar o efeito do alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina sobre a expressão e atividade de glicogênio sintase cinase-3 beta (GSK-3 $\beta$ ) e proteína Von Hippel-Lindau (pVHL) em células MCF-7;
- Analisar o efeito do alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina sobre os biomarcadores de estresse oxidativo e atividade de enzimas antioxidantes em células MCF-7;
- Avaliar o potencial efeito inibitório do alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina sobre a migração e invasão de células MCF-7, buscando investigar os possíveis mecanismos responsáveis por tal efeito;
- Investigar os mecanismos de interação entre o alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina e a proteína Akt1 através de simulações de ancoragem (AutoDock Vina) e dinâmica molecular (GROMACS);
- O potencial efeito sinérgico do alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina com quimioterápicos convencionais já usados na clínica, deve ser investigado empregando modelos *in vitro* e *in vivo*;
- Os marcadores bioquímicos de citotoxicidade hepática, cardíaca e renal (aspartato aminotransferase, alanina aminotransferase, lactato desidrogenase, creatina cinase total e isoenzimas – CK, ureia e creatinina), devem ser avaliados em animais tratados com o alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina;
- Avaliar a captação de glicose e expressão do transportador GLUT1 em animais tratados com o alcaloide  $\beta$ -carbolínico harmina;

- Analisar a expressão do fator pró-angiogênico VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) em animais tratados com o alcaloide  $\beta$ -carbólico harmina.

## 6. REFERÊNCIAS

AALTONEN K, et al. High cyclin B1 expression is associated with poor survival in breast cancer. *Br J Cancer*. 100, 1055-60, 2009.

ABAGYAN R, TOTROV M, KUZNETSOV D. ICM—A new method for protein modeling and design: Applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *J. Comput. Chem.* 15, 488–506, 1994. <https://doi.org/10.1002/jcc.540150503>

ABAGYAN RA, TOTROV, MM, KUZNETZOV DA. ICM—a new method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. *Journal of Computational Chemistry*, 15, 488–506, 1994.

ABE F, et al. Trypanocidal constituents in plants 1. Evaluation of some Mexican plants for their trypanocidal activity and active constituents in Guaco, roots of *Aristolochia taliscana*. *Biol Pharm Bull*. 25(9), 1188-1191, 2002.

ABRAHAM M, et al. The GROMACS development team. 2018. *GROMACS User Manual version 2018.4.*, [www.gromacs.org](http://www.gromacs.org).

ABRAHAM RT. mTOR as a positive regulator of tumor cell responses to hypoxia. *Curr Top Microbiol Immunol*. 279, 299–319, 2004. doi:10.1007/978-3-642-18930-2\_18

ADAMS JM, CORY S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26, 1324–1337, 2007.

ADAMS RP. In: *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Quadrupole Mass Spectroscopy*, 4th ed., Allured Publishing Corporation: Carol Stream, 804, 2007.

AGARWAL S, et al. MYCN acts as a direct co-regulator of p53 in MYCN amplified neuroblastoma. *Oncotarget*. 9(29), 20323–38, 2018.

AGGARWAL BB. Nuclear factor- $\kappa$ B: the enemy within. *Cancer Cell*, 6, 203–208, 2004. doi:10.1016/j.ccr.2004.09.003

AGRAWAL SS, et al. Antitumor properties of Boswellic acid against Ehrlich ascites cells bearing mouse. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1924–1934, 2011. doi: 10.1016/j.fct.2011.04.007.

AI Y, et al. Discovery of New Monocarbonyl Ligustrazine – Curcumin Hybrids for intervention of Drug-Sensitive and Drug-Resistant Lung Cancer. *J Med Chem*. 59, 1747-1760, 2016. Doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b01203



AIRAKSINEN MM, KARI, I.  $\beta$ -Carbolines, psychoactive compounds in the mammalian body. Part I: occurrence, origin and metabolism, *Med. Biol.* 59, 21–34, 1981.

AKOH CC, MIN DB. “Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology” 3th ed. 2008.

AKTAS BY, et al. Exploiting DNA repair defects in breast cancer: from chemotherapy to immunotherapy, *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2019. DOI: 10.1080/14737140.2019.1631162.

ALI R, et al. *Review: New Anticancer Agents: Recent Developments in Tumor Therapy.* *Anticancer Research*, 32, 2999-3006, 2012.

ALTMAYER M, Et al. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res.* 37, 3723–3738, 2009.

AMARO RE, et al. Ensemble Docking in Drug Discovery. *Biophysical Journal* 114, 2271–2278, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2018.02.038>

AMIT I, et al. A module of negative feedback regulators defines growth factor signaling. *Nat. Genet.* 39, 503–512, 2007.

ANIGHORO A, BAJORATH J, RASTELLI G. Polypharmacology: Challenges and opportunities in drug discovery. *J. Med. Chem.* 57, 7874–7887, 2014. doi:10.1021/jm5006463

ANWAR M, ASLAM HM, ANWAR S. PARP inhibitors. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 13 (4), 1-4, 2015. doi: 10.1186/s13053-014-0024-8.

ARNÉR ESJ., ZHONG LW, HOLMGREN A. Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol.* 300, 226–39, 1999.

ASAMI S, et al. Cigarette smoking induces an increase in oxidative DNA damage, 8-hydroxydeoxyguanosine, in a central site of the human lung. *Carcinogenesis.* 18, 1763–1766, 1997.

AUDIC Y, HARTLEY RS. Post-transcriptional regulation in Cancer – Review. *Biology of the Cell*, 96, 479–498, 2004.

BADER AG, et al. oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. *Nat Rev Cancer.* 2005 Dec;5(12):921-9. doi:10.1038/nrc1753

BADISA RB, et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells, *Anticancer Res.* 29, 2993-2996, 2009.

BAERISWYL V, CHRISTOFORI, G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 19, 329–337, 2009.

BAI J, LI Y, ZHANG G. Review: Cell cycle regulation and anticancer drug Discovery. *Cancer Biol Med.* 14, 348-362, 2017. doi: 10.20892/j.issn.20953941.2017.0033.

BAKER SJ, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244, 217–221, 1989.

BARAK Y, et al. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity. *EMBO J.* 12, 461–468, 1993.

BARRALES FM, REZENDE CA, MARTÍNEZ J. Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) seed oil assisted by ultrasound. *J. Supercrit. Fluids* 104, 183–192, 2015. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2015.06.006>.

BAYLISS R, et al. On the molecular mechanisms of mitotic kinase activation. *Open Biol.* 2, 120136, 1-19, 2012. <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.120136>

BEDRICH L, Et al. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nature Reviews / Drug Discovery*, 11, 2012.

BEGIN ME, Et al. Differential killing of human carcinoma cells supplemented with n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *J Natl Cancer Inst.* 77, 1053–62, 1986.

BERDASCO M, ESTELLER M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: How cellular identity goes awry. *Dev. Cell.* 19, 698–711, 2010.

BERGERS G, BENJAMIN LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410, 2003.

BERGGREN M, et al. Thioredoxin and thioredoxin reductase gene expression in human tumors and cells lines, and the effects of serum stimulation and hypoxia. *Anticancer Res.* 16, 3459-4366, 1996.

BERMAN H, et al. The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data. *Nucleic Acids Research*, 35, Database issue D301-D303, 2007. doi:10.1093/nar/gkl971

BERMAN HM, BURLEY SK, KLEYWEGT GJ. The archiving and dissemination of biological structure data. *Current Opinion on Structural Biology*, 40, 17-22, 2016. doi: 10.1016/j.sbi.2016.06.018

BERMAN HM, et al. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res*, 28(1), 235–242, 2000.

BERSTEN, DC, et al. bHLH-PAS proteins in cancer. *Nat. Ver. Cancer*, 13 (12), 827–841, 2013. doi:10.1038/nrc3621

BERTOLDO JB, et al. Structural stability of *Staphylococcus xylosus* lipase is modulated by Zn<sup>2+</sup> ions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1814, 1120–1126, 2011. doi:10.1016/j.bbapap.2011.04.020.

BESSON A, DOWDY SF, ROBERTS JM. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell*. 14: 159-69, 2008.

BEUTLER E, DURON O, KELLY BM. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*. 61, 882–90, 1963.

BHATIA A, KUMAR Y. Cellular and molecular mechanisms in cancer immune escape: a comprehensive review. *Expert Rev Clin Immunol*.10(1), 41–62, 2014.

BHOWMICK NA, NEILSON EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337, 2004.

BIRBEN E, et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 5, 9–19, 2012.

BIRD RP, DRAPER AH. Comparative studies on different methods of malondyaldehyde determination. *Methods Enzymol*. 90, 105–10, 1984.

BOEIRA JM, et al. Genotoxic and recombinogenic activities of the two beta-carboline alkaloids harman and harmine in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*. 500, 39-48, 2002.

BONDI J, et al. Expression and gene amplification of primary (A, B1, D1, D3, and E) and secondary (C and H) cyclins in colon adenocarcinomas and correlation with patient outcome. *J Clin Pathol*. 58, 509-14, 2005.

BOUAYAD N, et al. Dietary effects of harmine, a β-carboline alkaloid, on development, energy reserves and a amylase activity of *Plodia interpunctella* Hübner [Lepidoptera: Pyralidae]. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 19(1), 73-80, 2011.

BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*. 72, 248–254, 1976.

BRAHIMI-HORN MC, BELLOT G, POUYSSÉGUR J. Hypoxia and energetic tumour metabolism. *Current Opinion in Genetics & Development*, 21, 67-72, 2011. doi: 10.1016/j.gde.2010.10.006

BRAZILIAN INSTITUTE OF GEOGRAPHY AND STATISTICS (IBGE), produção agrícola municipal, Rio de Janeiro, 43, 1-62, 2016.

BROOKS BR, et al. CHARMM: the biomolecular simulation program. *J Comput Chem.* 30(10), 1545–1614, 2009.

BROWN R. The Bcl-2-family of proteins. *Br. Med. Bull.* 53, 466–477, 1997. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011624>.

BROWNAWELL, AM, et al. Inhibition of nuclear import by protein kinase B (Akt) regulates the subcellular distribution and activity of the forkhead transcription factor AFX. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3534–3546, 2001. doi:10.1128/MCB.21.10.3534-3546.2001

BRUNET A, et al. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96 (6), 857–868, 1999. doi:10.1016/s0092-8674(00)80595-4

CAI L, et al. Acetyl-CoA induces cell growth and proliferation by promoting the acetylation of histones at growth genes. *Mol Cell.* 42, 426–437, 2011.

CÁNEPA ET, et al. INK4 proteins, a family of mammalian CDK inhibitors with novel biological functions. *IUBMB Life.* 59, 419-26, 2007.

CANTLEY LC. The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*, 296, 1655–1657, 2002. doi:10.1126/science.296.5573.1655

CAO X, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 27(4), 635–46, 2007.

CARMONA-FONTAINE C, et al. Emergence of spatial structure in the tumor microenvironment due to the Warburg effect. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110, 19402–19407, 2013.

CAROCHO M, FERREIRA, ICFR. "A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives". *Food and Chemical Toxicology*, 51, 15, 2013.

CASE DA, et al. AMBER 12. San Francisco, CA: University of California; 2012.

CASSEL, E, et al. Supercritical fluid extraction of alkaloids from *Ilex paraguariensis* St. Hil. *Journal of Food Engineering*, 100, 656-661, 2010.

CATALOGUE OF SOMATIC MUTATIONS IN CANCER – COSMIC. Available in: < <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>>. Accessed March 2019.

CAVALLI LR, VARELLA-GARCIA M, LIANG BC. Diminished tumorigenic phenotype after depletion of mitochondrial DNA. *Cell Growth Differ.* 8, 1189–1198, 1997.

CAZAROLLI LH, et al. Mechanism of action of the stimulatory effect of apigenin-6-C-(2'-O-alpha-L-rhamnopyranosyl)-beta-L-fucopyranoside on <sup>14</sup>C-glucose uptake. *Chem. Biol. Interact.* 179, 407-412, 2009. doi: 10.1016/j.cbi.2008.11.012.

CERADINI DJ, et al. Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med.* 10 (8), 858–864, 2004. doi:10.1038/nm1075

CHAABANE W, et al. Autophagy, Apoptosis, Mitoptosis and Necrosis: Interdependence Between Those Pathways and Effects on Cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 61, 43–58, 2013.

CHAMBERS AM, LUPO KB, MATOSEVIC S. Tumor microenvironment-induced Immunometabolic reprogramming of natural killer cells. *Front Immunol.* 9, 2517, 2018.

CHAMRAS H, et al. Fatty acid modulation of MCF-7 human breast cancer cell proliferation, apoptosis and differentiation. *The Journal of nutritional biochemistry*, 13(12), 711-716, 2002. doi: 10.1016/S0955-2863(02)00230-9.

CHANCE B, SIES H, BOVERIS A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 59 (3), 527–605, 1979.

CHANG F, et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. *Molecular Targets for Therapy (MTT) Leukemia*, 17, 590–603, 2003. doi:10.1038/sj.leu.2402824

CHATTERJEE, S. Telomeres in health and disease. *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, 21(1), 87, 2017. doi: 10.4103/jomfp.JOMFP\_39\_16.

CHEN X, et al. Antimicrobial potential of myristic acid against *Listeria monocytogenes* in Milk. *The Journal of Antibiotics*, 1-8, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41429-019-0152-5>

CHENG, N, et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res.* 6, 1521–1533, 2008.

CHIM CS, et al. Methylation of INK4 and CIP/KIP families of cyclin-dependent kinase inhibitor in chronic lymphocytic leukaemia in Chinese patients. *J Clin Pathol.* 59, 921-6, 2006.

CLARKSON BD, BURCHENAL JH. Preliminary screening of antineoplastic drugs. *Program Clinical Cancer Research*, 1, 625- 629, 1965.

COLLINS A. Oxidative DNA damage, antioxidants, and cancer. *Bioessays*, 21, 238-46, 1999.

COLQUHOUN A, SCHUMACHER RI.  $\gamma$ -Linolenic acid and eicosapentaenoic acid induce modifications in mitochondrial metabolism, reactive oxygen species generation, lipid peroxidation and apoptosis in Walker 256 rat carcinosarcoma cells. *Biochim Biophysica Acta*. 1533, 207–19, 2001. doi:10.1016/s1388-1981(01)00136-6

COMERFORD, KM, et al. Hypoxia-inducible factor-1-dependent regulation of the multidrug resistance (MDR1) gene. *Cancer Res*. 62, 3387–3394, 2002.

CONSTANT JS, et al.. Lactate elicits vascular endothelial growth factor from macrophages: a possible alternative to hypoxia. *Wound Repair Regen*. 8, 353–360, 2000.

COPELAND RA, POMPLIANO DL, MEEK TD. Opinion – drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat Rev Drug Discov*. 5, 730–739, 2006.

CORVERA S, CZECH, MP. Direct targets of phosphoinositide 3-kinase products in membrane traffic and signal transduction. *Trends Cell Biol*. 8, 442–446, 1998.

COZZI P. The discovery of a new potential anticancer drug: a case history. *Il Farmaco*. 58(3), 213-220, 2003.

CSEH AM, et al. Review: Poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase as therapeutic target: lessons learned from its inhibitors. *Oncotarget*, 8, (30), 50221-50239, 2017. doi:10.18632/oncotarget.16859.

CURELLO S, et al. Changes in the cardiac glutathione status after ischemia and reperfusion. *Experientia*, 41, 42–43, 1985.

CURTIN NJ. DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer*. 12(12), 801-17, 2012. doi: 10.1038/nrc3399.

DA SILVA VC, BENEZRA H, LUZ JS, GEORG RC, OLIVEIRA CC, FERREIRA AMDC. Binding of oxindole-Schiff base copper (II) complexes to DNA and its modulation by the ligand. *J. Inorg. Biochem.*, 105, 1692–1703, 2011. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.09.016.

DAI C, et al. Metabolomics of oncogene-specific metabolic reprogramming during breast cancer. *Cancer Metab*. 6(5), 2018.

DANESH FR, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors prevent high glucose-induced proliferation of mesangial cells via modulation of Rho GTPase/ p21 signaling pathway: Implications for diabetic nephropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 99, 8301-5, 2002.

DAR S, et al. Bioenergetic adaptations in Chemoresistant ovarian Cancer cells. *Sci Rep*. 7(1), 8760, 2017.

DAS UN, MADHAVI N. Effect of polyunsaturated fatty acids on drug-sensitive and resistant tumor cells *in vitro*. *Lipids Health Dis.* 10, 159, 2011. doi:10.1186/1476-511X-10-159

DATTA SR, BRUNET A, GREENBERG ME. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13, 2905–27, 1999. doi:10.1101/gad.13.22.2905

DATTA SR, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell intrinsic death machinery. *Cell*, 91, 231–241, 1997. doi:10.1016/s0092-8674(00)80405-5

DATTO, M.B, et al.. The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor b-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B *Mol. Cell Biol.* 17, 2030–2037, 1997.

DAVID SS, O'SHEA VL, KUNDU S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature*, 447(7147), 941-50, 2007. doi: 10.1038/nature05978.

DE NEIRA C.M. The effects of yellow passion fruit, *Passiflora edulis flavicarpa*, phytochemicals on cell cycle arrest and apoptosis of Leukemia Lymphoma MOLT-4 cell line. Thesis, University of Florida, Degree of Master of Science, 2003.

DE SANTANA F.C., et al. Chemical composition and antioxidant capacity of Brazilian passiflora seed oils, *J. Food Sci.* 80, 2647-2654, 2015. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13102>.

DE VIVO M, CAVALLI A. Recent advances in dynamic docking for drug Discovery. *WIREs Comput Mol Sci*, 7, e1320, 2017. doi: 10.1002/wcms.1320

DE VIVO M, et al. Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery. *J Med Chem.* 59, 4035–4061, 2016. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b01684

DEAN RT, ROBERTS CR, JESSUP W. Fragmentation of extracellular and intracellular polypeptides by free radicals. *Prog Clin Biol Res.* 180, 341–350, 1985.

DECHERCHI S, et al. Implicit solvent methods for free energy estimation. *Eur. J. Med. Chem.* 91, 27–42, 2015. doi:10.1016/j.ejmech.2014.08.064

DECKER P, ISENBERG D, MULLER S. Inhibition of Caspase-3- mediated Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Apoptotic Cleavage by Human PARP Autoantibodies and Effect on Cells Undergoing Apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 9043–9046, 2000.

DESMARAIS Y, et al. Enzymological properties of poly (ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity. *Biochimica et biophysica acta*, 1078, 179–186, 1991.

DEVAKI K, et al. Hypoglycemic activity of *Passiflora edulis* Sims leaf extract in wister albino rats. *International Research Journal of Pharmacy*, 2 (9), 170-172, 2011.

DEVI PU. Basics of Carcinogenesis. *Health Administrator*, v. XVII, 1, 16-24, 2001.

DEWSON G, KLUCK RM. Mechanisms by Bak and Bax permeabilise mitochondria durant apoptosis. *Journal of Cell Science*, 122, 2801-2808, 2009.

DHALLA NS, TEMSAH RM, NETTICADAN T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. *J Hypertens*. 18, 655–673, 2000.

DHAWAN K, DHAWAN S, SHARMA A. *Passiflora*: a review update. *J Ethnopharmacol*, 94, 1–23, 2004. doi: 10.1016/j.jep.2004.02.023

DICK FA, RUBIN SM. Molecular mechanisms underlying RB protein function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14, 297–306, 2013.

DICKINSON DA, FORMAN HJ. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann N Y Acad Sci*. 973, 488–504, 2002.

DICKSON MA, SCHWARTZ GK. Development of cell-cycle inhibitors for cancer therapy. *Curr Oncol*. 16 (2), 36-43, 2009.

DIERGE E, FERON O. Dealing with saturated and unsaturated fatty acid metabolism for anticancer therapy. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 22, 427–433, 2019. doi:10.1097/MCO.0000000000000601

DIWAN SY. Effect of *Peganum Harmala* Methanol Extract on Liver and Kidney of Mice Administered MTX Drug. *Journal of Al-Nahrain University, Science*, 16 (4), , 161-166, 2013.

DOMMELS YE, et al. The role of cyclooxygenase in n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acid mediated effects on cell proliferation, PGE2 synthesis and cytotoxicity in human colorectal carcinoma cell lines. *Carcinogenesis*, 24, 385–92, 2003.

DOS SANTOS LC, et al. Solubility of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) seed oil in supercritical CO<sub>2</sub>. *Fluid Phase Equilibria* 493, 174-180, 2019.

DUCHEN, MR. Contributions of mitochondria to animal physiology: from homeostatic sensor to calcium signalling and cell death. *J. Physiol*. 516, 1–17, 1999. doi: 10.1111/j.1469-7793.1999.001aa.x

ECKHARDT BL, et al. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. *Nature Reviews / Drug Discovery*, 11, 479-497, 2012. doi:10.1038/nrd2372.



ELMORE S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495–516, 2007.

ENGELBRECHT AM, et al. Differential induction of apoptosis and inhibition of the PI3-kinase pathway by saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in a colon cancer cell model. *Apoptosis*, 13, 1368–1377, 2008. Doi: 10.1007/s10495-008-0260-3

EWING TJA, KUNTZ ID. Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. *J Comput Chem*, 18(9), 1175–1189, 1997.

FARZIN D, et al. Effects of harmaline and other  $\beta$ -carbolines on apomorphine induced licking behavior in rat. *Pharmacol Biochem Behav*, 98(2), 215-219, 2011.

FAUSER JK, et al. Induction of Apoptosis by the Medium-Chain Length Fatty Acid Lauric Acid in Colon Cancer Cells due to Induction of Oxidative Stress. *Chemotherapy*, 59, 214–224, 2013. Doi: 10.1159/000356067

FAUSER JK, et al. Induction of Apoptosis by the Medium-Chain Length Fatty Acid Lauric Acid in Colon Cancer Cells due to Induction of Oxidative Stress. *Chemotherapy*, 59, 214–224, 2013. doi: 10.1159/000356067

FEDI P, TRONICK SR, AARONSON AS. Growth factors. In: *Cancer Medicine*, Holland JF Bast RC Morton DL Frei E Kufe DW Weichselbaum RR (eds) pp 41–64, 1997. Williams and Wilkins: Baltimore, MD

FELIPE KB, et al. Inhibition of tumor proliferation associated with cell cycle arrest caused by extract and fraction from *Casearia sylvestris* (Salicaceae). *J. Ethnopharmacol*, 155 (3), 1492–1499, 2014. doi:org/10.1016/j.jep.2014.07.040.

FERNANDES PA, SILVA DA, LIMA MA. Cytotoxic effects of alkaloids on cervical carcinoma cell lines: a review. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.*, 36(3), 359-366, 2015. ISSN 1808-4532.

FILALI I, et al.. Synthesis of new isoxazoline derivatives from harmine and evaluation of their anti-Alzheimer, anti-cancer and anti-inflammatory activities. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 28, 1–6, 2014.

FLOHÉ L, GUNZLER WA. Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 105, 114–21, 1984.

FLORES ER, et al. p63 and p73 are required for p53-dependent apoptosis in response to DNA damage. *Nature*, 416, 560–564, 2002.

FORLI S, et al. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nat Protoc*. 11(5): 905–919, 2016. doi: 10.1038/nprot.2016.051.

FORSYTHE JA, et al. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 16, 4604–4613, 1996.

FOX K. *Drug-DNA interaction protocols*. 2nd ed. Southampton, UK: Humana Press, 1977.

FRANKEN NAP, et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. *Nature Protocols*, 1, 2315–2319, 2006. doi:10.1038/nprot.2006.339

FRENKEL D, SMIT B. *Understanding Molecular Simulation*; San Diego, CA: Academic Press, Inc. 638, 2001.

FRESNO-VARA JA, et al. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev.* 30, 193–204, 2004. doi:10.1016/j.ctrv.2003.07.007

FREUDENTHAL BD, et al. Uncovering the polymerase-induced cytotoxicity of an oxidized nucleotide. *Nature*, 517, 635–39, 2015.

FROST D, et al.  $\beta$ -carboline compounds, including harmine, inhibit DYRK1A and tau phosphorylation at multiple Alzheimer's disease-related sites. *PLoS One*, 6(5), e19264, 2011.

FRUMAN DA, MEYERS RE, CANTLEY LC. Phosphoinositide kinases. *Annu Rev Biochem.* 67, 481–507, 1998. doi:10.1146/annurev.biochem.67.1.481

FURUKAWA T, et al. Thymidine phosphorylase in cancer aggressiveness and chemoresistance. *Pharmacol Res.* 132, 15–20, 2018.

GERRIETS VA, et al. Foxp3 and toll-like receptor signaling balance Treg cell anabolic metabolism for suppression. *Nat Immunol.* 17(12), 1459–66, 2016.

GIACINTI C, GIORDANO A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*, 25, 5220–5227, 2006.

GIBBS-SEYMOUR I, et al.. HPF1/ C4orf27 Is a PARP-1-Interacting Protein that Regulates PARP-1 ADP-Ribosylation Activity. *Molecular cell.* 62, 432–442, 2016.

GILSON MK, et al. The statistical-thermodynamic basis for computation of binding affinities: a critical review. *Biophys J*, 72, 1047–1069, 1997.

GINGRAS AC, et al. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* 12, 502–513, 1998.

GIOIA D, et al. Dynamic Docking: A Paradigm Shift in Computational Drug Discovery. *Molecules*, 22, 2029, 2017. doi:10.3390/molecules22112029

GIROTTI AW. Mechanisms of lipid peroxidation. *J Free Radic Biol Med.* 1, 87–95, 1985.

GLENNON RA, et al.. Binding of  $\beta$ -carbolines and related agents at serotonin (5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>1A</sub>) dopamine D<sub>2</sub> and benzodiazepine receptors. *Drug and Alcohol Dependence* 60(2), 121–132, 2000. DOI 10.1016/S0376-8716(99)00148-9.

GLORIEUX C, et al. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 82, 1384-1390, 2011.

GOLDSTEIN M, KASTAN MB. The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annual review of medicine*, 66, 129-43, 2015. doi: 10.1146/annurev-med-081313-121208.

GOODSELL, DS, OLSON AJ. Automated docking of substrates to proteins by simulated annealing. *Proteins*, 8 (3), 195–202, 1990.

GRINEVICIUS VMAS, et al. Antitumor activity of conventional and supercritical extracts from *Piper nigrum* L. cultivar Bragantina through cell cycle arrest and apoptosis induction. *J Supercrit Fluids*, 128, 94–101, 2017. doi: 10.1016/j.supflu.2017.05.009

GU Y, et al. The first characterization of free radicals formed from cellular COX-catalyzed peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 57, 49–60, 2013. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.12.004

GÜNTHER T.M.F. Atividade antitumoral das associações de Vitamina C com Vitamina K<sub>3</sub> microencapsuladas ou com Ortovanadato de sódio. Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

GUO Z, et al. Probing the alpha-helical Structural Stability of Stapled p53 Peptides: Molecular Dynamics Simulations and Analysis. *Chem. Biol. Drug Des.* 75, 348–359, 2010. doi:10.1111/j.1747-0285.2010.00951.x

GUPTA P, et al. Food Processing Residue Analysis and its Functional Components as Related to Human Health: Recent Developments. *Austin J Nutri Food Sci.* 3(3), 1068, 2015.

HAFNER A, et al. The multiple mechanisms that regulate p53 activity and cell fate. *Nature Reviews / Molecular Cell Biology*, 20, 199-210, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0110-x>.

HAGER KM, GU W. Understanding the noncanonical pathways involved in p53-mediated tumor suppression. *Carcinogenesis* 35, 740–746, 2014.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE J. Free Radicals in Biology and Medicine, fourth ed. Oxford University Press, New York, 2007.

HAMSA TP, KUTTAN G. Harmine activates intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis in B16F-10 melanoma. *Chin Med.*, 6 (11), 1-8, 2011. doi: 10.1186/1749-85466-11.

HAMSA TP, KUTTAN G. Harmine inhibits tumour specific neo-vessel formation by regulating VEGF, MMP, TIMP and pro-inflammatory mediators both in vivo and in vitro. *Eur J Pharmacol*, 649, 64–73, 2010. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.09.010

HANAHAHAN D, FOLKMAN J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86, 353–364, 1996.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674, 2011. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*, 100, 57–70, 2000.

HANNON GJ, BEACH D. P15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest *Nature*, 371, 257–261, 1994.

HANWELL MD, et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, 4 (17), 1-17, 2012. doi: 10.1186/17582946-4-17.

HARDY S, LANGELIER Y, PRENTKI M. Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects. *Cancer Res.* 60, 6353–6358, 2000.

HARVEY MJ, GIUPPONI G, FABRITIIS G. De ACEMD: Accelerating Biomolecular Dynamics in the Microsecond Time Scale. *J. Chem. Theory Comput.* 5, 1632–1639, 2009. <https://doi.org/10.1021/ct9000685>

HAUPT, Y, et al. Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387, 296–299, 1997.

HAY N, SONENBERG N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18, 1926–45, 2004. doi:10.1101/gad.1212704

HAYFLICK L. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry*, 62, 1180–1190, 1997.

HENDLICH M. Databases for protein-ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 54, 1178–1182, 1998.

HERCEG Z, WANG Z. Failure of poly (ADP-ribose) polymerase cleavage by caspases. *Mol Cell Biol.* 19, 5124-5133, 1999.

HERRAIZ T, et al. beta-Carboline alkaloids in *Peganum harmala* and inhibition of human [MAO]. *Food Chem Toxicol.* 48(3), 839-845, 2010.

HERRERO et al. Plants, seaweeds, microalgae and food by-products as natural sources of functional ingredients obtained using pressurized liquid extraction and supercritical fluid extraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 26-38, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.01.018>

HERRERO M, et al. Review: Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *Journal of Chromatography A*, p.01–17, 2009.

HERRERO M, et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. *J Chromatogr A*. 1217 (16), 2495-2511, 2010. doi: 10.1016/j.chroma.2009.12.019

HESS B, et al. GROMACS 4: algorithms for highly efficient, load-balanced, and scalable molecular simulation. *J Chem Theory Comput.* 4(3), 435–447, 2008.

HICKMAN ES, MORONI MC, HELIN K. The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer . *Current Opinion in Genetics & Development*, 12, 60–66, 2002.

HILGENDORF KI, et al. The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria. *Genes & Development*, 27, 1003–1015, 2013. <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.211326.112>.

HIRABAYASHI Y, TANIUCHI S, KOBAYASHI Y. A quantitative assay of oxidative metabolism by neutrophils in whole blood using flow cytometry. *J. Immunol. Meth.* 82, 253-259, 1985.

HOCK AK, VOUSDEN KH. Tumor suppression by p53: fall of the triumvirate? *Cell*, 149, 1183–1185, 2012.

HOEIJMAKERS JH. DNA damage, aging, and cancer. *The New England journal of medicine*, 361(15), 1475-85, 2009. doi: 10.1056/NEJMra0804615.

HOJO Y, et al. Fluid Shear Stress Attenuates Hydrogen Peroxide–Induced c-Jun NH2-Terminal Kinase Activation via a Glutathione Reductase–Mediated Mechanism. *Circ Res.* 91, 712-718, 2002.

HOLLIDAY GL, et al. Key challenges for the creation and maintenance of specialist protein resources. *Proteins*, 83, 1005-1013, 2015. doi: 10.1002/prot.24803

HOLLSTEIN, M, et al. p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49–53, 1991.

HORNAK V, et al. Comparison of multiple AMBER force fields and development of improved protein backbone parameters. *Proteins.*, 15, 65 (3), 712–725, 2006. doi: 10.1002/prot.21123.

HOSSAIN MA, et al. Aspirin enhances doxorubicin-induced apoptosis and reduces tumor growth in human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* 40, 1636–1642, 2012. doi:org/10.3892/ijo.2012.1359.

HOXHAIJ G, MANNING BD. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nature Reviews Cancer*, 20, 74–88, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>

HSIN J, et al.. Using VMD - An Introductory Tutorial. *Curr Protoc Bioinformatics*. CHAPTER: Unit–5.7, 2008. doi:10.1002/0471250953.bi0507s24.

HUANG H, et al. Skp2 inhibits FOXO1 in tumor suppression through ubiquitin-mediated degradation. *Proc. Natl Acad. Sci.* 102, 1649–1654, 2005. doi: 10.1073/pnas.0406789102

HUBER A, et al. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair*. 3(8), 1103–8, 2004.

HURLEY LH. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy, *Nat. Rev. Canc.* 2, 188-200, 2002. doi.org/10.1038/nrc749.

HUSSON, HP. The simple indole alkaloids. In: Brossi, A. *The alkaloid: Chemistry and Pharmacology*. Academic Press Inc, Orlando, 26, 35-50, 1985.

INDOVINA P, et al. Emerging roles of RB family: new defense mechanisms against tumor progression. *J Cell Physiol.* 228, 525–535, 2012.

INDOVINA P, et al. RB1 dual role in proliferation and apoptosis: Cell fate control and implications for cancer therapy. *Oncotarget*, 6 (20), 17873 – 17890, 2015.

INGALE A.G.; HIVRALE A.U. Pharmacological studies of *Passiflora* sp. and their bioactive compounds. *African Journal of Plant Science*, 4 (10), 417-426, 2010.

INOKI, K, et al. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev.* 17, 1829–1834, 2003. doi:10.1101/gad.1110003

INOKI, K, et al. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature Cell Biol.* 4, 648–657, 2002. doi:10.1038/ncb839

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância, 2020.

IRWIN JJ, et al. ZINC: a Free Tool to Discover Chemistry for Biology. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52 (7), 1757-1768, 2012. doi:10.1021/ci3001277

IYER NV, et al. Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.* 12, 149–162, 1998.

JAAKKOLA P, et al. Targeting of HIF-alpha to the von Hippel–Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292, 468–472, 2001. doi:10.1126/science.1059796

JACKSON, SP, BARTEK J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, 461, 1071–1078, 2009.

JANIN J. Wet and dry interfaces: the role of solvent in protein-protein and protein DNA recognition. *Structure*, 7, 277–279, 1999.

JENDIROBA DB, et al. J. Effective cytotoxicity against human leukemias and chemotherapeutic-resistant leukemia cell lines by N-N-dymethylsphingosine. *Leukemia Research*, 26, 301-310, 2002.

JENNER P. Oxidative stress in Parkinson's disease. *Ann Neurol.* 53, S26–S36, 2003.

JIANG BH, LIU LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv. Cancer Res.* 102, 19–65, 2009.

JIANG L, et al. Oleic acid induces apoptosis and autophagy in the treatment of Tongue Squamous cell carcinomas. *Scientific Reports*, 7, 11277, 2017. doi:10.1038/s41598-017-11842-5

JIANG P, et al. p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol.*; 13:310–316, 2011.

JOHNSON J, et al. Targeting the RB-E2F pathway in breast cancer. *Oncogene.*, 35(37), 4829– 4835, 2016. doi:10.1038/onc.2016.32.

JONES G, et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol.* 267, 727–748, 1997. doi:10.1006/jmbi.1996.0897

JONES G, WILLETT P, GLEN RC. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. *J Mol Biol*, 245(1), 43–53, 1995.

JONES, G, et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol.* 267(3), 727–748, 1997.

JORGENSEN WL, Et al. "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water". *J. Chem. Phys.* 79 (2), 926–935, 1983.

KADOCHI Y, et al. Remodeling of energy metabolism by a ketone body and medium-chain fatty acid suppressed the proliferation of CT26 mouse colon cancer cells. *Oncol Lett.* 14, 673-680, 2017. doi: 10.3892/ol.2017.6195

KAMESHITA I, et al. Poly (ADP-Ribose) synthetase. Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain. *The Journal of biological chemistry*, 259, 4770–4776, 1984.

KANDOTH C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature*, 502, 333–339, 2013.

KANG HC, et al. Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)- dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108, 14103–14108, 2011.

KANG KH, LEMKE G, KIM JW. The PI3K-PTEN tug-of-war, oxidative stress and retinal degeneration. *Trends Mol Med*. 15(5),191–198, 2009. doi:10.1016/j.molmed.2009.03.005

KAPLAN EL, MEIER P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Statist Assoc*. 53, 457-481, 1958.

KATO Y, et al. Cancer metabolism: new insights into classic characteristics. *Jpn Dent Sci Rev*. 54(1), 8–21, 2018.

KAZEROUNIAN S, YEE KO, LAWLER J. Thrombospondins in cancer. *Cell. Mol. Life Sci*. 65, 700–712, 2008.

KELLY, BD, et al. Cell type-specific regulation of angiogenic growth factor gene expression and induction of angiogenesis in nonischemic tissue by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor 1. *Circ Res*. 93, 1074–1081, 2003. doi:10.1161/01.RES.0000102937.50486.1B

KIM JW, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 3, 177–185, 2006.

KIM JW, et al. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab*. 3, 177–185, 2006. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002

KINNINGS SL, et al. Drug discovery using chemical systems biology: Repositioning the safe medicine Comtan to treat multi-drug and extensively drug resistant tuberculosis. *PLoS Comput. Biol.*, 5, e1000423, 2009. doi:10.1371/journal.pcbi.1000423

KIRKWOOD, J.G. Statistical Mechanics of Fluid Mixtures. *J. Chem. Phys*. 3, 300–313, 1935.

KOCH A, et al. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Massai of Kenya. *J Ethnopharmacol*, 101, 95-99, 2005. doi.org/10.1016/j.jep.2005.03.011.



KONDO K, et al. Ibrutinib modulates the immunosuppressive CLL microenvironment through STAT3-mediated suppression of regulatory B-cell function and inhibition of the PD-1/PD-L1 pathway. *Leukemia*, 32(4), 960–70, 2018.

KÖNIG G, BRUCKNER S, BORESCH. Absolute Hydration Free Energies of Blocked Amino Acids: Implications for Protein Solvation and Stability. *Biophys. J.* 104, 453–462, 2013. doi: 10.1016/j.bpj.2012.12.008.

KOUNDOUROS N, POULOGIANNI G. Phosphoinositide 3-Kinase/Akt Signaling and Redox Metabolism in Cancer. *Frontiers in Oncology*, 8 (160), 1-9, 2018. doi: 10.3389/fonc.2018.00160

KROEMER G, MARTIN, SJ. Caspase-independent cell death. *Nat. Med.* 11, 725–730, 2005.

KROKAN HE, BJORAS M. Base excision repair. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5(4), a012583, 2013. doi: 10.1101/cshperspect.a012583.

KUBBUTAT MH, JONES SN, VOUSDEN KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* 387, 299–303, 1997.

KUMARI R, KUMAR R. Open Source Drug Discovery Consortium, and Andrew Lynn g\_mmpbsa--a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. *J. Chem. Inf. Model.* 54, 1951–1962, 2014. doi: 10.1021/ci500020m.

KUMMAR S, et al. Advances in using PARP inhibitors to treat cancer. *BMC Med.* 10 (25), 1–5, 2012. doi: 10.1186/1741-7015-10-25.

KUNTZ ID, et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. *J Mol Biol*, 161(2), 269–288, 1982.

KVIECINSKI MR, et al. SFE from *Bidens pilosa* Linné to obtain extracts rich in cytotoxic polyacetilenes with antitumor activity. *J. Supercrit. Fluids*, 56, 243–248, 2011. doi.org/10.1016/j.supflu.2010.12.011.

LAEMMLI UK. Cleavage of structural protein during assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680–685, 1970.

LAI GY, et al. Freedman, Association of serum a-tocopherol, b-carotene, and retinol with liver cancer incidence and chronic liver disease mortality, *Br. J. Canc.* 111, 2163–2171, 2014. <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.365>.

LAM SK, NG TB. Passiflin, a novel dimeric antifungal protein from seeds of the passion fruit. *Phytomedicine*, 16, 172–180, 2009.

LANE DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, 358, 15–16, 1992.

LANE TJ, et al. To milliseconds and beyond: Challenges in the simulation of protein folding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 23, 58–65, 2013. doi:10.1016/j.sbi.2012.11.002

LANGELIER MF, et al. Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *The Journal of biological chemistry*, 286, 10690–10701, 2011.

LANGELIER MF, RICCIO AA, PASCAL JM. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Research*, 42, 7762–7775, 2014.

LAPENNA S, GIORDANO A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews | Drug Discovery*. 8, 547-566, 2009. doi:10.1038/nrd2907.

LAPPANO R, et al. The lauric acid-activated signaling prompts apoptosis in cancer cells. *Cell Death Discov.* 3, 17063, 2017. doi: 10.1038/cddiscovery.2017.63

LASKOWSKI RA, SWINDELLS MB. LigPlot<sup>+</sup>: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J. Chem. Inf. Model.* 51 (10), 2778-2786, 2011. doi: 10.1021/ci200227u.

LAWRENCE MS, et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature*, 505, 495–501, 2014.

LEE A, LEE K, KIM D. Using reverse docking for target identification and its applications for drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* 11, 707–715, 2016. doi:10.1080/17460441.2016.1190706

LEE JM, et al. The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J. Cell Biol.* 172, 973–981, 2006.

LEMKUL JA, ALLEN WJ, BEVAN DR. Practical Considerations for Building GROMOS-Compatible Small-Molecule Topologies. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 50 (2), 2221-2235, 2010. doi: 10.1021/ci100335w.

LEVINE RL, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 186, 464–478, 1990.

LI S, et al. Pharmacokinetic study of harmaline and its 10 metabolites in rat after intravenous and oral administration by UPLC-ESI-MS/MS. *Pharmaceutical Biology*, 54 (9), 1768–1781, 2016. doi:org/10.3109/13880209.2015.1127978.

LIANG P, et al. Role of host GPR120 in mediating dietary omega-3 fatty acid inhibition of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 111, 52–59, 2019. doi:10.1093/jnci/djy125

LIEBER MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annual review of biochemistry*, 79, 181-211, 2010. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.

LIN J, et al. The roles of glucose metabolic reprogramming in chemo- and radioresistance. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 38, 218, 2019, <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1214-z>.

LIU J, et al. Harmine induces cell cycle arrest and mitochondrial pathway-mediated cellular apoptosis in SW620 cells via inhibition of the Akt and ERK signaling pathways. *Oncology Reports*, 35, 3363-3370, 2016. doi: 10.3892/or.2016.4695.

LIU P, KAO TP, HUANG H. CDK1 promotes cell proliferation and survival via phosphorylation and inhibition of FOXO1 transcription factor. *Oncogene*. 27, 4733-44, 2008.

LORD CJ, ASHWORTH A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature*, 481(7381), 287-94, 2012. doi: 10.1038/nature10760.

LOUREIRO APM, et al. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. *Química Nova*, 25(5), 777-93, 2002.

LOWRY OH, et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275, 1951.

LU H, TONGE PJ. Drug-target residence time: critical information for lead optimization. *Curr Opin Chem Biol*, 14, 467-474, 2010. doi:10.1016/j.cbpa.2010.06.176

LU JJ, et al. Alkaloids isolated from natural herbs as the anticancer agents. Evidence-based complementary and alternative medicine. New York: Hindawi 2012. Available from:<http://www.hindawi.com/journals/ecam/2012/485042/cta/>

LU Y, et al. The PTEN/MMAC1/TEP tumor suppressor gene decreases cell growth and induces apoptosis and anoikis in breast cancer cells. *Oncogene*, 18, 7034-45, 1999. doi:10.1038/sj.onc.1203183

LUO W, et al. Anti-cancer effects of JKA97 are associated with its induction of cell apoptosis via a Bax-dependent and p53independent pathway. *J Biol Chem.* 283, 8624-8633, 2008. doi:10.1074/jbc.M707860200.

LUSHCHAK VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* 224, 164-75, 2014.

MACALUSO M, MONTANARI M, GIORDANO A. Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes. *Oncogene*, 25, 5263-5267, 2006.

MAIDA, Y, et al. An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature*, 461, 230–235, 2009.

MAJIDINIA M, YOUSEFI B. DNA repair and damage pathways in breast cancer development and therapy. *DNA repair*, 54, 22-29, 2017. doi:10.1016/j.dnarep.2017.03.009.

MALININA L, et al. Intercalation of an Acridine-Peptide Drug in an AA/TT Base Step in the Crystal Structure of [d(CGCGAATTCGCG)]<sub>2</sub> with Six Duplexes and Seven Mg<sup>2+</sup> Ions in the Asymmetric Unit. *Biochemistry*, 41, 9341-9348, 2002. doi:10.1021/bi020135c.

MALUMBRES M. Physiological relevance of cell cycle kinases. *Physiol Rev*. 91, 973-1007, 2011.

MARTINEZ JD, et al. *Molecular Biology of Cancer*. Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, Ed. 6, 5, ISBN 0-471-37031-2, 2003.

MARTINEZ-ZAGUILAN R, et al. Acidic pH enhances the invasive behavior of human melanoma cells. *Clin Exp Metastasis*. 14, 176–186, 1996.

MASELLA R, et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 16, 577–586, 2005.

MASUTOMI K, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 102, 8222–8227, 2005.

MATSUI Y, et al. Extract of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seed Containing High Amounts of Piceatannol Inhibits Melanogenesis and Promotes Collagen Synthesis. *J. Agric. Food Chem*. 58, 11112–11118, 2010.

MAYO LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc. Natl Acad. Sci*. 98, 11598–11603, 2001.

MCARTHUR K, CHAPPAZ S, KILE BT. Apoptosis in megakaryocytes and platelets: the life and death of a lineage. *Blood*. 131(6), 605-610, 2018.

MCCAMMON JA, GELIN BR, KARPLUS M. Dynamics of folded proteins. *Nature*, 267(5612), 585–590, 1977.

MCGAHON AJ, et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. *Methods Cell Biol*. 46, 153-185, 1995.

MEDEMA RH, et al. AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature*, 404, 782–787, 2000. doi:10.1038/35008115

MEMMOTT RM, DENNIS PA. Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cell Signal* 21, 656–64, 2009. doi:10.1016/j.cellsig.2009.01.004

MICHIELIN EMZ, et al. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. *J Supercrit Fluids*, 56 (1), 89–96, 2011. Doi: 10.1016/j.supflu.2010.11.006

MICIE V, et al. Supercritical fluid extraction with carbon dioxide at different pressures. *Contemporary Materials II*, 1, 84-87, 2011.

MONTANHER AB, et al. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 281–288, 2007.

MORRIS GM, et al. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comput Chem*. 19, 1639–1662, 1998.

MORRIS GM, LIM-WILBY M. Chapter 19: Molecular Docking. *Methods in Molecular Biology*, vol. 443, *Molecular Modeling of Proteins*. Edited by Andreas Kukol \_c Humana Press, Totowa, NJ.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 16, 55-63, 1983.

MOYNAHAN ME, JASIN M. Mitotic homologous recombination maintains genomic stability and suppresses tumorigenesis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 11(3), 196-207, 2010. doi: 10.1038/nrm2851.

NAFISI S, et al. Beta-carboline alkaloids bind DNA. *J Photochem Photobiol B*, 100, 84–91, 2010. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2010.05.005

NAKAGAWA Y, et al. Mitochondrial dysfunction and biotransformation of  $\beta$ -carboline alkaloids, harmine and harmaline, on isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*, 188, 393–403, 2010. doi: 10.1016/j.cbi.2010.09.004.

NAKANISHI C, TOI M. Nuclear factor- $\kappa$ B inhibitors as sensitizers to anticancer drugs. *Nature Rev. Cancer*, 5 (4), 297–309, 2005. DOI:10.1038/nrc1588

NAR A, et al. Cyclin A and cyclin B1 overexpression in differentiated thyroid carcinoma. *Med Oncol*. 29, 294-300, 2012.

NAVARRO M, et al. Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)<sub>2</sub>]BF<sub>4</sub>, J. Inorg. Biochem. 97, 364369, 2003. doi:org/10.1016/S0162-0134(03)00290-3.

NELSON MT, et al. NAMD: a parallel, object oriented molecular dynamics program. Int J Supercomput Appl High Perform Comput. 10(4), 251–268, 1996.

NIKAM TD, NITNAWARE KM, AHIRE ML. Alkaloids Derived from Tryptophan: Harmine and Related Alkaloids. Natural Products, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2013. DOI 10.1007/978-3-642-22144-6\_20

NIKI E. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. Biochim. Biophys. Acta 1840, 809–17, 2014.

NOBLE RL, BEER CT, CUTTS JH. Role of chance observations in chemotherapy: *Vinca rosea*. Ann NY Acad Sci. 76, 882-894, 1958.

NORBURY C, NURSE P. Animal cell cycles and their control. Ann Ver Biochem. 61, 441-68, 1992.

O'REILLY CM, et al. Quantitative analysis of spontaneous mitochondrial depolarizations. Biophys J. 85, 3350–3357, 2003. doi: 10.1016/S0006-3495(03)74754-7.

OKKENHAUG K, VANHAESEBROECK B. New responsibilities for the PI3K regulatory subunit p85 $\alpha$ . Sci. STKE 65, PE1, 2001. doi: 10.1126/stke.2001.65.pe1

OKOH VO, et al. Reactive oxygen species via redox signaling to PI3K/AKT pathway contribute to the malignant growth of 4-hydroxy estradiol-transformed mammary epithelial cells. PLoS One, 8(2), e54206, 2013. doi:10.1371/journal.pone.0054206.

OLIVEIRA DA, et al.. Valorization of passion fruit (*Passiflora edulis* sp.) by-products: Sustainable recovery and biological activities. J Supercrit Fluids, 111, 55–62, 2016. Doi: 10.1016/j.supflu.2016.01.010

ORSAVOVA J, et al. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids, Int. J. Mol. Sci. 16, 12871-12890, 2015, <https://doi.org/10.3390/ijms160612871>.

OSPOVAT I, et al.. Mitomycin C and vinblastine: na active regimen in previously treated breast cancer patients. Tumori. 95(6), 683-6, 2009.

OUYANG L, et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. Cell Prolif. 45, 487–498, 2012.

PAGANO B, et al. Binding of Harmine Derivatives to DNA: A Spectroscopic Investigation. Molecules, 22, 1831, 1-8, 2017. doi:10.3390/molecules22111831.

PALOMER A, PÉREZ JJ, MAULEÓN D. Modeling cyclooxygenase inhibition. Implication of active site hydration on the selectivity of ketoprofen analogues. *J. Med. Chem.*, 43, 2280-2284, 2000.

PAN AC, et al. Molecular determinants of drug-receptor binding kinetics. *Drug Discov Today*, 18, 667–673, 2013. doi:10.1016/j.drudis.2013.02.007

PAPANDREOU I, et al. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 3, 187–197, 2006.

PARK JI, et al. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*, 460, 66–72, 2009.

PASTOREKOVA S, GILLIES RJ. The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*, 38, 65–77, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10555-019-09799-0>.

PATE KT, et al. Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer. *EMBO J.* 33, 1454–1473, 2014.

PATEL K, et al. A review on medicinal importance, pharmacological activity and bioanalytical aspects of betacarboline alkaloid “Harmine”. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 660-664, 2012.

PAVLOVA NN, THOMPSON CB. The emerging hallmarks of cancer metabolism. *Cell Metab.* 23(1), 27–47, 2016. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006

PELLICANO F, MUKHERJEE L, HOLYOAKE TL. Concise Review: Cancer Cells Escape from Oncogene Addiction: Understanding the Mechanisms Behind Treatment Failure for More Effective Targeting. *Stem Cells*, 32, 1373–1379, 2014.

PETO R, PETO J. "Asymptotically Efficient Rank Invariant Test Procedures". *Journal of the Royal Statistical Society, Series A*. Blackwell Publishing. 135 (2), 185–207, 1972. doi:10.2307/2344317. hdl:10338.dmlcz/103602. JSTOR 2344317.

PETTERSEN EF, et al. UCSF Chimera—A Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J Comput Chem.* 25, 1605–1612, 2004. doi:10.1002/jcc.20084.

PIECHOWSKA P, ZAWIRSKA-WOJTASIAK R, MILDNER-SZKUDLARZ S. Bioactive  $\beta$ -Carbolines in Food: A Review. *Nutrients*, 11, 814, 2019. doi:10.3390/nu11040814.

PIERSON JT, et al. Major Australian tropical fruits biodiversity: Bioactive compounds and their bioactivities. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 357–387, 2012. doi:10.1002/mnfr.201100441.

PINZI L, RASTELLI G. Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 4331, 2019. doi:10.3390/ijms20184331

PIOMBO G, et al. Characterization of the seed oils from kiwi (*Actinia chinensis*), passion fruit (*Passiflora edulis*) and guava (*Psidium guajava*), *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*, 13, 195-199, 2006, <https://doi.org/10.1684/ocl.2006.0026>.

PLIMPTON, S. Fast Parallel Algorithms for Short-Range Molecular Dynamics. *J. Comput. Phys.* 117, 1–19, 1995.

POMMIER Y, et al. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chemistry & biology.* 17(5), 421-33, 2010. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.04.012.

PORTA C, PAGLINO C, MOSCA A. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Frontiers in Oncology.* 64, 2014. doi: 10.3389/fonc.2014.00064.

PRADELLI AL, BÉNÉTEAU M. Mitochondrial control of caspases-dependent and independent cell death. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67, 1589-1597, 2010.

RADHAKRISHNAN SK, JETTE N, LEES-MILLER SP. Non-homologous end joining: emerging themes and unanswered questions. *DNA repair.* 17, 2-8, 2014. doi: 10.1016/j.dnarep.2014.01.009.

RAICA M, CIMPEAN AM, RIBATTI D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *Eur. J. Cancer* 45, 1924–1934, 2009.

RANJHA L, HOWARD SM, CEJKA P. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma.* 2018. doi: 10.1007/s00412-017-0658-1.

RAREY, M, et al. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol*, 261(3), 470–489, 1996.

RECZEK CR, CHANDEL NS. Cancer. Revisiting vitamin C and cancer. *Science*, 350, 1317–18, 2015

RECZEK CR, CHANDEL NS. ROS-dependent signal transduction. *Curr. Opin. Cell Biol.* 33, 8–13, 2015.

REMSSEN JF, CERUTTI PA. Inhibition of DNA-repair and DNA synthesis by harman in human alveolar tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 86, 124–129, 1979.

RÉUS GZ, et al. Administration of harmine and imipramine alters creatine kinase and mitochondrial respiratory chain activities in the rat brain. *Depress Res Treat.* 2012, 987-397, 2012.



RÉUS GZ, et al. Harmine and imipramine promote antioxidant activities in prefrontal cortex and hippocampus. *Oxid Med Cell Longev.* 3(5), 325-331, 2010.

REVERCHON E, DE MARCO I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter, *J. Supercrit. Fluids* 38, 146-166, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2006.03.020>.

RICCI MS, ZONG WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. *Oncologist.* 11, 342-57, 2006.

RIVOIRE WA, et al.. *Biologia molecular do câncer cervical.* *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* 6 (4), 447-451, 2006.

ROBERTS MF, WINK M. *Alkaloids: biochemistry ecological functions and medical applications.* New York: Plenum Press, 1998.

ROJO F, et al. Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer. *Ann Oncol.* 23 (5), 1156–64, 2012. doi:10.1093/annonc/mdr361.

ROSENKRANZ V, WINK M. Alkaloids induce programmed cell death in bloodstream forms of trypanosomes [*Trypanosoma b. brucei*]. [Special Issue: Spiro compounds]. *Molecules*, 13(10), 2462-2473, 2008.

ROSS GM, et al. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications. Report on the 5th LH Gray Trust Workshop, Institute of Cancer Research, *Mutat Res.* 337, 57–60, 1995.

ROTHBERG JM, et al. Acid-mediated tumor proteolysis: contribution of cysteine cathepsins. *Neoplasia.* 15, 1125–1137, 2013.

ROULEAU M, et al. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer.* 10(4), 293–301, 2010.

ROWE CA, et al. Inhibition of Neoplastic Transformation of Benzo[ $\alpha$ ]pyrene-Treated Balb/c 3T3 Murine Cells by a Phytochemical Extract of Passionfruit Juice. *Journal of medicinal food.* *J Med Food*, 7 (4), 402–407, 2004.

SAGAR S, GREEN IR. Pro-apoptotic activities of novel synthetic quinones in human cancer cell lines. *Cancer Lett*, 285, 23-27, 2009. Doi: 10.1016/j.canlet.2009.04.036

SAJJAD H. Study of nephrotoxic effects of vincristinetreatment in mice. *Annals of Biological Research*, 3(5), 2304-6, 2012.

SAKANO T, et al. Molecular dynamics analysis to evaluate docking pose prediction. *Biophys. Physicobiol.* 13, 181–194, 2016. doi: 10.2142/biophysico.13.0\_181

SALMASO V, MORO S. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. *Front. Pharmacol.* 9, 923, 2018. doi:10.3389/fphar.2018.00923

SÁNCHEZ-CAMARGO AP, et al. Supercritical Fluid Extraction, in: J. Reedjik (Ed.) Elsevier Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering. Elsevier, Waltham, MA, 2014.

SANJAYA RE, et al. Investigation on supercritical CO<sub>2</sub> extraction of phenolic-phytochemicals from an epiphytic plant tuber (*Myrmecodia pendans*), *J. CO<sub>2</sub> Utilization*, 6, 26-33, 2014.

SANT'ANNA CMR. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da IUPAC para 1997). *Química Nova*, 25 (3), 505-512, 2002.

SARAVANAKUMAR K, et al. Anticancer potential of bioactive 16-methylheptadecanoic acid methyl ester derived from marine *Trichoderma*. *Journal of Applied Biomedicine* Volume 13, Issue 3, July 2015, Pages 199-212. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2015.04.001>

SATO AC, et al. Effects of Compounds from *Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Juice on Blood Coagulation and on Proteolytic Enzymes. *Protein & Peptide Letters*, 19, 501-508, 2012.

SATOH K, et al. Global metabolic reprogramming of colorectal cancer occurs at adenoma stage and is induced by MYC. *Proc Natl Acad Sci U S A U S A* . 114(37), 7697–7706, 2017.

SATOH MS, LINDAHL T. Role of poly (ADP-ribose) formation in DNA repair. *Nature*, 356, 356–358, 1992.

SATOH MS, POIRIER GG, LINDAHL T. Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry*, 33, 7099–7106, 1994.

SCHOFIELD, CJ, RATCLIFFE, PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5, 343–354, 2004. doi:10.1038/nrm1366

SCHRÖDINGER LCC. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8, Schrödinger, L.C.C., 2015.

SELYE H.. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, 138(32), 1936.

SELYE H.. Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can. Med. Assoc. J.* 115, 53–56, 1976.

SEMENZA GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 3 (10), 721–732, 2003. doi:10.1038/nrc1187

SHAMS KA, et al. Isolation and characterization of antineoplastic alkaloids from *Catharanthus roseus* L. Don. cultivated in Egypt. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 6(2), 118-22, 2009.

SHANKLAND SJ, WOLF G. Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 278, 515-529, 2000.

SHARMA S, DING F, DOKHOLYAN NV. Multiscale modeling of nucleosome dynamics. *Biophys J*. 92(5), 1457–1470, 2007.

SHAY JW, WRIGHT WE. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 1, 72–76, 2000.

SHERR CJ. Cancer cell cycles. *Science*, 274,1672–1677, 1996.

SHI WK, et al. PFKFB3 blockade inhibits hepatocellular carcinoma growth by impairing DNA repair through AKT. *Cell Death Dis*. 9(4), 428, 2018.

SHILOH Y. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Rev. Cancer* 3, 155–168, 2003.

SHUCHENG L, et al. Physical and chemical analysis of *Passiflora* seeds and seed oil from China. *Int J Food Sci Nutr*. 59 (7-8), 706-715, 2008. Doi: 10.1080/09637480801931128.

SIES H, BERNDT C, JONES DP. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem*. 86, 715–48, 2017. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.

SIES H.. Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, London: Academic, Ed.1–8, 1985.

SIGAL A, ROTTER V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*. 60, 6788–6793, 2000.

SINGH AM, DALTON S. What can 'Brown-ing' do for you? *Trends Endocrinol Metab*. 29(5), 349-59, 2018.

SINGH NP, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*. 75, 184–91, 1988.

SOBHANI AM, EBRAHIMI S, MAHMOUDIAN M. An In Vitro Evaluation of Human DNA Topoisomerase I Inhibition by *Peganum harmala* L. Seeds Extract and Its  $\beta$ -Carboline Alkaloids. *J Pharm Pharmaceut Sci*. 5(1), 19-23, 2002.

SONG Y, et al. Specific inhibition of cyclin-dependent kinases and cell proliferation by harmine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 317, 128–132, 2004. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.03.019.

SONVEAUX P, et al. Targeting the lactate transporter MCT1 in endothelial cells inhibits lactate-induced HIF-1 activation and tumor angiogenesis. *PLoS One*. 7, e33418, 2012.

SOTO AM, SONNENSCHNEIN C. The somatic mutation theory of Cancer: growing problems with the paradigm? *Bioassays*, 26, 1097-1107, 2004.

SOUSA DA SILVA AW, VRANKEN WF. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. *BMC Research Notes*, 5 (367), 1-8, 2012. doi: 10.1186/1756-0500-5-367.

SOUZA LNS, et al. Linfoma de Hodgkin na infância e adolescência: 15 anos de experiência com o protocolo DH-II-90. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 32(4), 295-302, 2010.

SPIVAK G. Nucleotide excision repair in humans. *DNA repair*. 36:13-8, 2015. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.09.003.

SREEDHARA A, COWAN JA. Catalytic hydrolysis of DNA by metal ions and complexes. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 4, 337-347, 2001. <https://doi.org/10.1007/s007750100209>

STARKOV AA, et al. Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *J Neurosci*. 24(36), 7779–7788, 2004. doi:10.1523/JNEUROSCI.1899-04.2004

STERLING T, IRWIN J. ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2015 doi:10.1021/acs.jcim.5b00559

STERN R, et al.. Lactate stimulates fibroblast expression of hyaluronan and CD44: the Warburg effect revisited. *Exp Cell Res*. 276, 24–31, 2002.

SU B, et al. Diallyl disulfide inhibits TGFbeta1-induced upregulation of Rac1 and beta-catenin in epithelial-mesenchymal transition and tumor growth of gastric cancer. *Oncol Rep*. 39(6), 2797-806, 2018.

SUN-YEE K, et al.  $\alpha$ -Phenyl-Nt-butyl nitronone protects oxidative damage to HepG2 cells. *J Biochem Mol Biol*. 34, 43-6, 2000.

SUROVA O, ZHIVOTOVSKY B. REVIEW: Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*, 32, 3789–3797, 2013. doi:10.1038/onc.2012.556.

SVASTOVA E, et al. Hypoxia activates the capacity of tumor-associated carbonic anhydrase IX to acidify extracellular pH. *FEBS Lett*. 577, 439–445, 2004.

SWIETACH P, VAUGHAN-JONES RD, HARRIS AL. Regulation of tumor pH and the role of carbonic anhydrase 9. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 299–310, 2007.

TAKAYAMA C, et al. Amino acids suppress apoptosis induced by sodium laurate, an absorption enhancer. *J Pharm Sci.*, 98, 4629–4638, 2009. Doi: 10.1002/jps.21757

TAN ML, et al. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. *Pharm Res.* 26, 1547-1560, 2009. doi:10.1007/s11095-009-9895-1.

TAO Z, et al. Domain C of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 is important for enzyme activity and contains a novel zinc-ribbon motif. *Biochemistry*, 47, 5804–5813, 2008.

THE UNIPROTKB CONSORTIUM. UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Research*, 45, D158 - D169, 2017. doi: 10.1093/nar/gkw1099

TILMAN D, CLARK M. Global diets link environmental sustainability and human health. *Nature*, 515, 518-522, 2014. Doi: 10.1038/nature13959

TINOCO I JR, WEN JD. Simulation and analysis of single-ribosome translation. *Phys Biol.* 6(2), 025006, 2009.

TODOROV IT, SMITH W, TRACHENKO K. Dove, M.T. DL\_POLY\_3: New dimensions in molecular dynamics simulations via massive parallelism. *J. Mater. Chem.* 16, 1911, 2006.

TOFFALORI C, et al. Immune signature drives leukemia escape and relapse after hematopoietic cell transplantation. *Nat Med.* 25(4), 603–11, 2019.

TROTT O, OLSON AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 31, 455-461, 2010. doi: 10.1002/jcc.21334.

TSUCHIYA H, SHIMIZU H, IINUMA M. Beta-Carboline Alkaloids in Crude Drugs. *Chem. Pharm. Bull.* 47, 440–443, 1999.

ULLAH Z, LEE CY, DEPAMPHILIS ML. Cip/Kip cyclin-dependent protein kinase inhibitors and the road to polyploidy. *Cell Div.* 4-10, 2009

VALLEE A, et al. Demyelination in multiple sclerosis: reprogramming energy metabolism and potential PPARgamma agonist treatment approaches. *Int J Mol Sci.* 19(4), 2018.

VAN DER SPOEL D, et al. GROMACS: Fast, Flexible, and Free. *Journal of Computational Chemistry*, 26, 1701–1718, 2005. doi:org/10.1002/jcc.20291.

VANHAESEBROECK B, WATERFIELD MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* 253 (1), 239–254, 1999. doi:10.1006/excr.1999.4701

VEGRAN F, et al. Lactate influx through the endothelial cell monocarboxylate transporter MCT1 supports an NF-kappaB/IL-8 pathway that drives tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 71, 2550–2560, 2011.

VEIKKOLA T, ALITALO K. VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 9, 211–220, 1999.

VERLET L. Computer "Experiments" on Classical Fluids. I. Thermodynamical Properties of Lennard-Jones Molecules. *Physical Review*, 159 (1), 98-103, 1967.

VERMEULEN K, VAN BOCKSTAELE DR, BERNEMAN ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif.* 36, 131–149, 2003.

VIGAN J, et al. Exploring the selectivity of supercritical CO<sub>2</sub> to obtain nonpolar fractions of passion fruit bagasse extracts, *J. Supercrit. Fluids*, 110, 1-10, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2015.12.001>.

VILLANUEVA PJ, et al. Pyronaridine exerts potent cytotoxicity on human breast and hematological cancer cells through induction of apoptosis. *PLoS ONE*, 13(11), 1-18, 2018. doi:org/10.1371/journal.pone.0206467.

VOGT PK, JIANG H, AOKI M. Triple layer control: phosphorylation, acetylation and ubiquitination of FOXO proteins. *Cell Cycle*, 4, 908–913, 2005. doi:10.4161/cc.4.7.1796

VOLPERT OV, DAMERON KM, BOUCK N. Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene*, 14, 1495–1502, 1997.

VON ZGLINICKI T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem. Sci.* 27, 339–44, 2002.

WAHLSTROM T, HENRIKSSON MA. Impact of MYC in regulation of tumor cell metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 1849, 563–569, 2015.

WANG C, et al. Identification of transaldolase as a novel serum biomarker for hepatocellular carcinoma metastasis using xenografted mouse model and clinic samples. *Cancer Lett.* 313, 154-166, 2011.

WANG G, et al. New strategies for targeting glucose metabolism-mediated acidosis for colorectal cancer therapy. *J Cell Physiol.* 234(1), 348-68, 2018.

WANG J, et al. Automatic atom type and Bond type perception in molecular mechanical calculations. *J. Mol. Graph. Model.* 25(2), 247-260, 2006. doi:10.1016/j.jmglm.2005.12.005.

WANG S, et al. Targeting the MDM2-p53 Protein- Protein Interaction for New Cancer Therapy: Progress and Challenges. *Cold Spring Harb Prespective Med.* 7, a026245, 2017. Doi: 10.1101/cshperspect.a a026245

WANG ZB, LIU YQ, CUI YF. Pathways to caspase activation. *Cell Biology International*, 29, 489-496, 2005.

WANG, GL, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92, 5510-5514, 1995.

WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*, 123, 309-314, 1956.

WASZKOWYCZ B, CLARK DE, GANCIA E. Outstanding challenges in protein-ligand docking and structure-based virtual screening. *WIREs Comput. Mol. Sci.* 1, 229-259, 2011.

WEI, W, et al. The v-Jun point mutation allows c-Jun to escape GSK3-dependent recognition and destruction by the Fbw7 ubiquitin ligase. *Cancer Cell*, 8, 25-33, 2005. doi:10.1016/j.ccr.2005.06.005

WERTZ IE, DIXIT VM. Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell Death Differ.* 17, 14-24, 2010.

WIGERUP C, PÅHLMAN S, BEXELL D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 164, 152-169, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.04.009>

WILLIS SN, ADAMS JM. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17, 617-625, 2005.

WINK M. Molecular modes of action of cytotoxic alkaloids: from DNA intercalation spindle poisoning topoisomerase inhibition to apoptosis and multiple drug resistance. *The Alkaloids: Chemistry and Biology*, 64, 1-47, 2007. DOI 10.1016/S1099-4831(07)64001-2.

WINTERBOURN CC. The biological chemistry of hydrogen peroxide. *Methods Enzymol.* 528, 3-25, 2013.

WISHART DS, et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic Acids Research.** 2017 Nov 8. doi: 10.1093/nar/gkx1037.

WISHART MJ, DIXON JE. PTEN and myotubularin phosphatases: from 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. *Trends Cell Biol.* 12, 579–585, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02412-1](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02412-1)

WONDRAK GT. Redox-directed cancer therapeutics: molecular mechanisms and opportunities. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 3013–69, 2009.

World Health Organization – WHO. Cancer. Available in: <https://www.who.int/cancer/en/>. Accessed May 2019.

XIAO J, et al. Supercritical fluid extraction and identification of isoquinoline alkaloids from leaves of *Nelumbo nucifera* Gaertn, *Eur. Food Res. Technol.* 231, 407-414, 2010.

XU X, et al. Transketolase-like protein 1 (TKTL1) is required for rapid cell growth and full viability of human tumor cells. *Int J Cancer.* 124, 1330–1337, 2009.

XU Y, et al. Free radical derivatives formed from COX-catalyzed DGLA peroxidation can attenuate colon cancer cell growth and enhance 5-FU's cytotoxicity. *Redox Biol.* 2, 610–8, 2014. doi: 10.1016/j.redox.2014.01.022

XU Y, QIAN SY. Anti-cancer Activities of  $\omega$ -6 Polyunsaturated Fatty Acids *Biomed J.* 37(3), 112–119, 2014. doi:10.4103/2319-4170.131378.

YAMAZAKI Y, KAWANO Y. Inhibitory effects of herbal alkaloids on the tumor necrosis factor- $\alpha$  and nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated RAW264 macrophages. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 59(3), 388-391, 2011.

YANG MH, et al. Direct regulation of TWIST by HIF-1 $\alpha$  promotes metastasis. *Nat Cell Biol.* 10, 295–305, 2008. doi:10.1038/ncb1691

YEE KM, SPIVAK-KROIZMAN TR, POWIS G. HIF-1 regulation: not so easy come, easy go. *Trends Biochem Sci.* 33, 526-534, 2008.

YOSHIDA GJ. Metabolic reprogramming: the emerging concept and associated therapeutic strategies. *J Exp Clin Cancer Res.* 34, 111, 2015.

YU Q, et al. Characterization of novel radicals from COX catalyzed arachidonic acid peroxidation. *Free Radic Biol Med.* 47, 568–76, 2009. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.023

YUAN J, ADAMSKI R, CHEN J. Focus on histone variant H2AX: to be or not to be. *FEBS Letters,* 584, 3717–3724, 2010. Doi: 10.1016/j.febslet.2010.05.021

YUAN TL, CANTLEY LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene,* 27, 5497–5510, 2008.



YURIEV E, RAMSLAND PA. Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *J. Mol. Recognit.* 26, 215–239, 2013. DOI: 10.1002/jmr.2266

ZAKER F, OODY A, ARJMAND A. A study on the antitumoral and differentiation effects of *Peganum harmala* derivatives in combination with ATRA on leukaemic cells. *Arch Pharm Res.* 30(7), 844-849, 2007.

ZHANG L, et al. Harmine suppresses homologous recombination repair and inhibits proliferation of hepatoma cells, *Cancer Biology & Therapy*, 16(11), 1585-1592, 2015. DOI: 10.1080/15384047.2015.1078021.

ZHANG P, et al. Harmine Hydrochloride Triggers G2 Phase Arrest and Apoptosis in MGC-803 Cells and SMMC-7721 Cells by Upregulating p21, Activating Caspase-8/Bid, and Downregulating ERK/Bad Pathway. *Phytother. Res.* 30, 31–40, 2016. doi: 10.1002/ptr.5497.

ZHAO L, WINK M. The  $\beta$ -carboline alkaloid harmine inhibits telomerase activity of MCF-7 cells by down-regulating hTERT mRNA expression accompanied by an accelerated senescent phenotype. *PeerJ* 1, e174, 2013. DOI 10.7717/peerj.174

ZHENG W, et al. Determination of Harmane and Harmine in Human Blood Using Reversed-Phased High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *Anal. Biochem.* 279, 125–129, 2000.

ZWANZIG RW. High-Temperature Equation of State by a Perturbation Method. I. Nonpolar Gases. *J. Chem. Phys.* 22, 1420–1426, 1954.

## 7. ANEXOS

### 7.1 ANEXO A

Primeira pagina do artigo publicado no periódico *Food and Chemical Toxicology*, volume 118, páginas 557–565, 2018, sob o título: In vivo antitumor activity of by-products of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Rich in medium and long chain fatty acids evaluated through oxidative stress markers, cell cycle arrest and apoptosis induction. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.06.010>.

Food and Chemical Toxicology 118 (2018) 557–565

---



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

## Food and Chemical Toxicology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodchemtox](http://www.elsevier.com/locate/foodchemtox)



---

**In vivo antitumor activity of by-products of *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg. Rich in medium and long chain fatty acids evaluated through oxidative stress markers, cell cycle arrest and apoptosis induction**

Nádia S.R.S. Mota<sup>a</sup>, Maicon R. Kwiecinski<sup>b</sup>, Rodrigo C. Zeferino<sup>a</sup>, Daniela A. de Oliveira<sup>c</sup>, Lizandra C. Bretanha<sup>d</sup>, Sandra R.S. Ferreira<sup>c</sup>, Gustavo A. Micke<sup>d</sup>, Danilo Wilhelm Filho<sup>e</sup>, Rozangela C. Pedrosa<sup>a</sup>, Fabiana Ourique<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Experimental Biochemistry (LABIOEX), Department of Biochemistry, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil  
<sup>b</sup>Postgraduate Program of Health Sciences (PPGCS), Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, Brazil  
<sup>c</sup>Laboratory of Thermodynamics and Supercritical Technology (LATSC), Department of Chemical Engineering and Food Engineering, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil  
<sup>d</sup>Laboratory of Capillary Electrophoresis, Department of Chemistry, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil  
<sup>e</sup>Department of Ecology and Zoology, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, Brazil

---

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Keywords:</b>  <i>Passiflora edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg            Oxidative stress            DNA fragmentation            Cell cycle arrest            Apoptosis</p>	<p>Antiinflammatory and antitumor activity has been reported in <i>Passiflora edulis</i> (yellow passion fruit) nevertheless the intrinsic mechanisms of action are not fully elucidated. The present study aimed to perform a comparison between the antitumor activity involving the crude extract (HCE) and the supercritical fluid extract with ethanol as co-solvent (SFEtOH) from <i>P. edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> Deg. The <i>in vitro</i> cytotoxicity was evaluated in MCF-7 cells, while the <i>in vivo</i> antitumor activity was assessed in male Balb/c mice inoculated with Ehrlich carcinoma cells. SFEtOH exhibited higher antitumor activity compared to HCE. Wherein, SFEtOH showed an EC<sub>50</sub> of 264.6 µg/mL against MCF-7 cells as well as an increased inhibition of tumor growth of 48.5% (p &lt; 0.001) in male Balb/c mice, thereby promoting an increased mice lifespan to approximately 42%. Moreover, SFEtOH caused lipid (p &lt; 0.001) and protein (p &lt; 0.001) oxidation by increasing glutathione redox cycle activity while decreased the thioredoxin reductase activity (p &lt; 0.001). SFEtOH also induced oxidative DNA damage in Ehrlich ascites carcinoma (EAC) cells leading to G2/M cycle arrest and has increased apoptotic cells up to 48.2%. These data suggest that the probable mechanisms of antitumor effect are associated to the lipid, protein and DNA damage, leading to cell cycle arrest and triggering apoptosis via mitochondrial pathway, should be probable due to the presence of medium and long chain fatty acids such as lauric acid.</p>

## 7.2 ANEXO B

Primeira pagina do artigo aceito para publicação no periódico *International journal of functional nutrition*, volume 1:1, páginas 1–12, 2021, sob o título:  $\beta$ -carboline alkaloid harmine induces DNA damage and triggers apoptosis by a mitochondrial pathway: study *in silico*, *in vitro* and *in vivo*. <https://doi.org/10.3892/ijfn.2020.1>.

INTERNATIONAL JOURNAL OF FUNCTIONAL NUTRITION 1: 1, 2021

## $\beta$ -carboline alkaloid harmine induces DNA damage and triggers apoptosis by a mitochondrial pathway: study *in silico*, *in vitro* and *in vivo*

NÁDIA S.R.S. MOTA<sup>1</sup>, MAICON R. KVIECINSKI<sup>2</sup>, KARINA B. FELIPE<sup>3</sup>, VALDELÚCIA M.A.S. GRINEVICIUS<sup>1</sup>, TÂMILA SIMINSKI<sup>1</sup>, GABRIELA M. ALMEIDA<sup>1</sup>, RODRIGO C. ZEFERINO<sup>1</sup>, CLAUS T. PICH<sup>4</sup>, DANILLO W. FILHO<sup>5</sup> and ROZANGELA C. PEDROSA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 88040-900;

<sup>2</sup>Postgraduate Program of Health Sciences (PPGCS), University of Southern Santa Catarina (UNISUL), Palhoça, SC 88137-270; <sup>3</sup>Department of Clinical Analysis, Federal University of Paraná (UFPR), Curitiba, PR 80060-000; <sup>4</sup>Center for Sciences, Technologies and Health of the Araranguá Campus, Federal University of Santa Catarina (UFSC), Araranguá, SC 88905-120; <sup>5</sup>Department of Ecology and Zoology,

Federal University of Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC 88040-900, Brazil

Received April 18, 2020; Accepted May 5, 2020

DOI: 10.3892/ijfn.2020.1

**Abstract.** Harmine, a tricyclic  $\beta$ -carboline alkaloid is an important metabolite present in *Passiflora incarnata* L. and *Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Degener. Fruits of these plants are highly consumed in tropical countries and are popularly known as passion fruit, a natural product with potential anti-tumour activity. The cytotoxicity and selectivity effects were evaluated *in vitro* using tumour cell lines (MCF-7, HeLa) and normal mouse fibroblasts (McCoy cells). Molecular assays were performed using CT-DNA analysed by UV-Visible spectroscopy, fluorescence spectroscopy and circular dichroism, followed by *in silico* simulation (AutoDock Vina and GROMACS) and Comet assay. *In vivo* antitumour activity was assessed in Balb/c mice bearing Ehrlich ascitic tumour. Harmine presented cytotoxicity and selectivity to tumour cells. Spectrometry, molecular simulations and Comet assay suggested that harmine binds onto DNA nucleoside base pairs by intercalation, consequently inducing DNA fragmentation. Furthermore, harmine decreased the PARP1-dependent DNA repair mechanism, causing cell cycle arrest in the G<sub>2</sub>/M phase through inhibition of pRb phosphorylation and reduced expression of CDK2, cyclin A and cyclin B1. Moreover, harmine decreased mitochondrial membrane potential and

caused mitochondrial-related cellular Bax-dependent and p53-independent apoptosis in MCF-7 cells. This  $\beta$ -carboline alkaloid also decreased tumour growth, body weight, volume of ascitic fluid and volume of packed tumour cells, while increased the non-viable/viable tumour cells ratio, which consequently increased the lifespan of animals bearing tumours. Mechanistically, our findings indicate a putative antitumor effect of harmine, which associates DNA damage, DNA repair repression, cell cycle arrest and triggering apoptosis through mitochondrial pathway. The results suggest that harmine, present in the pulp and seed of the passion fruit, could be used in future as a promising coadjuvant anticancer agent and we suggest to address this fruit as a functional food.

### Introduction

Despite advances in technology and medicine in terms of diagnosis and therapy, cancer is now the leading cause of death worldwide and thus remains a serious health issue and an economic burden (1). With the exception of non-melanoma skin cancer, prostate tumour is the most frequent cancer in men, while breast tumour is the most frequent cancer in women.