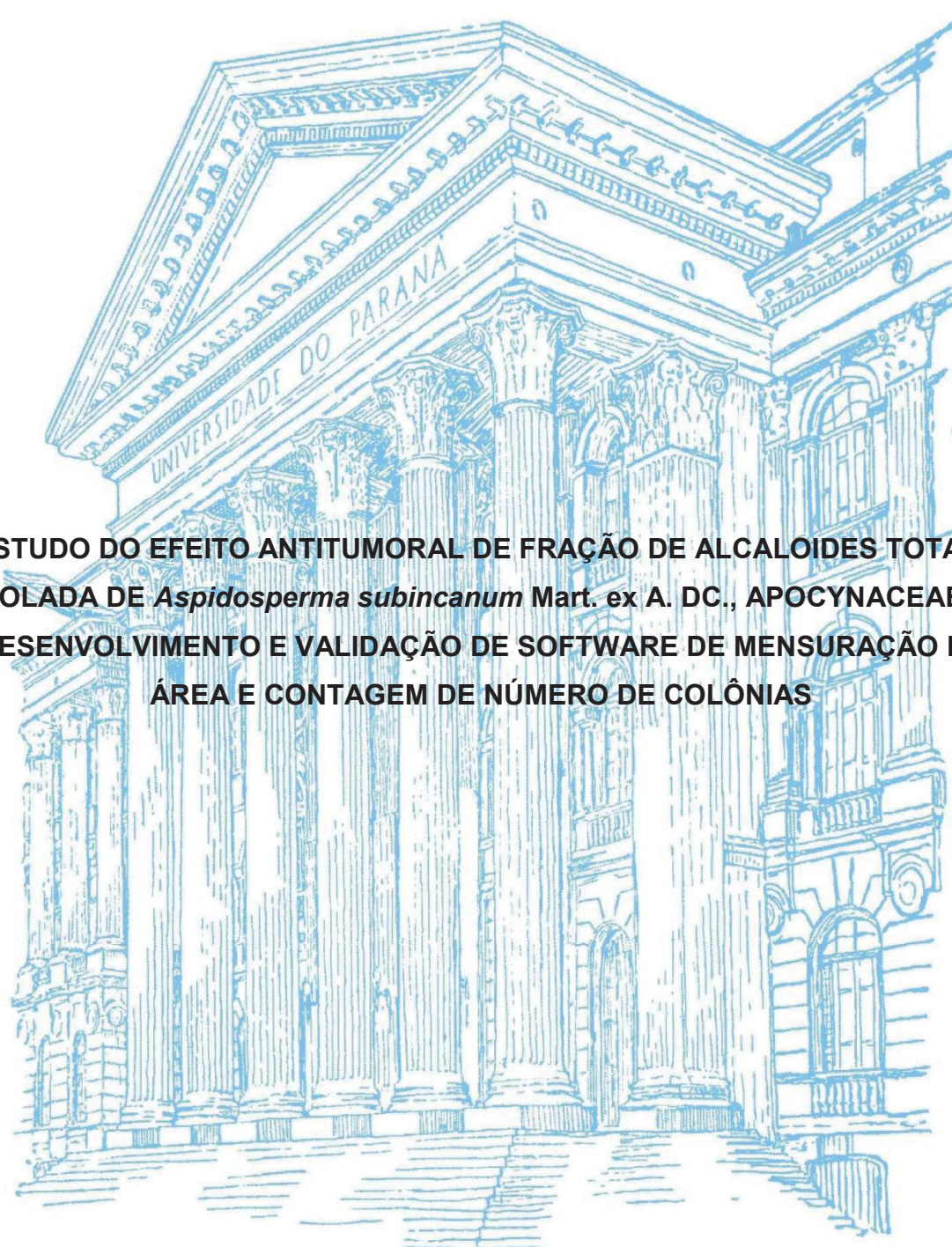


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRESSA FLORES SANTOS



**ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL DE FRAÇÃO DE ALCALOIDES TOTAIS
ISOLADA DE *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC., APOCYNACEAE E
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SOFTWARE DE MENSURAÇÃO DE
ÁREA E CONTAGEM DE NÚMERO DE COLÔNIAS**

CURITIBA

2018

ANDRESSA FLORES SANTOS

**ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL DE FRAÇÃO DE ALCALOIDES TOTAIS
ISOLADA DE *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC., APOCYNACEAE E
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SOFTWARE DE MENSURAÇÃO DE
ÁREA E CONTAGEM DE NÚMERO DE COLÔNIAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Área de Análises Clínicas, Setor de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof^o Dr. Wesley Maurício de Souza
Co-orientadora: Prof^a Dra. Karina Bettega Felipe

CURITIBA

2018

Santos, Andressa Flores

Estudo do efeito antitumoral de fração de alcaloides totais isolada de *Aspidospermasubincanum* Mart. ex A. DC., apocynaceae e desenvolvimento e validação de software de mensuração de área e contagem de número de colônias / Andressa Flores Santos – Curitiba, 2018.

114 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Wesley Mauricio de Souza

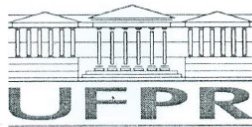
Coorientadora: Professora Dra. Karina Bettega Felipe

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Plantas medicinais. 2. Alcaloides. 3. Apocynaceae. 4. Neoplasias. 5. Validação de software.
I. Souza, Wesley Mauricio de. II. Felipe, Karina Bettega. III. Universidade Federal do Paraná.
IV. Título.

CDD 615.321



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **ANDRESSA FLORES SANTOS** intitulada: **ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL DE FRAÇÃO DE ALCALOIDES TOTAIS ISOLADA DE *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC., APOCYNACEAE E DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SOFTWARE DE MENSURAÇÃO DE ÁREA E CONTAGEM DE NÚMERO DE COLÔNIAS**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 02 de Fevereiro de 2018.

WESLEY MAURICIO DE SOUZA

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

KARINA BETTEGA FELIPE

Avaliador Externo (UFPR)

SHEILA MARIA BROCHADO WINNISCHOFER

Avaliador Externo (UFPR)

GUILHERME LANZI SASSAKI

Avaliador Externo (UFPR)

Aos meus pais, Cláudia e Oldemar, e ao Beto pelo apoio incondicional e amor inigualável.

AGRADECIMENTOS

Minha imensa gratidão

A minha co-orientadora Prof. Dra. Karina Bettega Felipe, não há palavras para descrever o quanto sou grata por tudo o que você me proporcionou e ensinou, superei barreiras, conheci lugares e pessoas maravilhosas, aprendi inúmeras coisas e principalmente que amizade e profissionalismo podem sim andar juntos, e que esta mistura proporciona, além de resultados, muitas risadas. Vou te levar no coração sempre.

Ao meu orientador Prof. Dr. Wesley Maurício de Souza, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelo jeito mineiro de ser e por sempre estar ali, presente, nos momentos que precisei de auxílio.

A Prof. Dra. Almeriane Maria Weffort-Santos, por ter me amadrinhado e ensinado muita coisa, principalmente que seus princípios devem se sobressair a tudo. MUITÍSSIMO obrigada por ceder o laboratório e sempre tirar minhas dúvidas.

As minhas colegas da pós, Ana, Cris, Monica e Mariana pelo apoio e risadas.

A Prof. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, e todos do LABIOEX, por nunca ter negado nada ao meu projeto mesmo sem me conhecer, foi uma experiência sem igual poder trabalhar na UFSC.

Ao quase Prof. Dr. Eduardo Beneditti Parisoto, que me deu moradia sem me conhecer, me apresentou comidas deliciosas e lugares legais, e além das risadas me ensinou também pra que lado se fecha o registro. Toda sorte desse mundo para você Bene, você merece.

A aluna de doutorado Regiane Stafim da Cunha, por ser um exemplo de pessoa, pessoa mais inteligente que você não há, obrigada por ser tão paciente e desculpe por ter te atormentado tanto. Você vai pro céu.

As laboratoristas Clari e Irene, que apesar de terem ido para casa, me ajudaram muito, muito obrigada pelo café de sempre e risadas.

A Prof. Dra. Andrea Emilia Marques Stingen por ter cedido o laboratório e materiais para realização de experimentos.

A Prof. Dra. Francinete Ramos Campos e seu aluno de doutorado Estevan Bruginski pela parceria e colaboração.

Ao Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moares Santos por ter disponibilizado o suplemento e a gnosia.

Aos meus pais, Cláudia e Oldemar, ela um exemplo de raça, força e amor, ele um exemplo de parceria e carinho, por serem a base de tudo, não terão vidas suficientes para poder recompensar tudo o que fizeram e fazem por mim, esse título é de vocês.

Ao meu namorado Elberth, por sempre sempre sempre estar ao meu lado, por fazer tudo por mim e ainda me aguentar reclamando. Desculpe pelas ausências, não era a intenção, mas as “filhinhas” precisavam de mim. Essa vitória é nossa, pois sem você e seu auxílio com números, tecnologia, inglês e apoio emocional eu não seria nada. A maior sorte do mundo eu ter você.

A minha família, que me apoia em tudo, sem vocês seria mais difícil.

“Você ganha força, coragem e confiança através de cada experiência em que você realmente para e encara o medo de frente.” (Eleanor Roosevelt)

RESUMO

Quimioterápicos disponíveis para o tratamento do câncer apresentam pouca eficácia e baixa especificidade. Alcaloides indólicos isolados de plantas tratam-se de importantes fontes de medicamentos antitumorais. Dessa forma, esse trabalho teve por finalidade avaliar o potencial antitumoral da fração de alcaloides totais (FAT) obtida de suplemento elaborado a partir da casca da *A. subincanum*, em modelo experimental *in vitro*, tentando-se identificar possíveis alcaloides presentes na fração. A análise de por CLAE e espectrometria de massas evidenciou a presença da uleína e outros 7 alcalóides não identificados em FAT. Em relação as atividades biológicas, FAT teve efeito citotóxico e antiproliferativo em diversas linhagens tumorais (Hela, U937, HRT-18 e MCF7), sendo mais eficaz em células MCF7. Tal atividade foi seletiva, quando comparado o efeito exercido por FAT em células MCF7 e sobre a linhagem McCoy (fibroblastos murinos). FAT promoveu o aumento do número de células na fase G1 do ciclo celular, levando ao desencadeamento de apoptose. A fração também causou redução intracelular de EROs devido a uma ativação forte e persistente da CAT. Por fim, o tratamento com FAT culminou na supressão dos níveis de COX-2. Conclui-se que FAT apresenta importante efeito antitumoral devido a interferências no equilíbrio redox e na expressão de COX-2. No que se refere à investigação do efeito antitumoral de compostos e produtos naturais, é comum a realização de ensaios que avaliam o efeito citotóxico e antiproliferativo dos mesmos em linhagens celulares tumorais, destacando-se, o ensaio clonogênico. Há diversos problemas envolvidos nas análises dos resultados obtidos por meio deste ensaio. Assim, o segundo objetivo desse trabalho foi desenvolver e validar um software para determinação da área (total e individual) e do número de colônias. O software apresentou performance superior quando comparado ao método manual (padrão ouro de análise) e plugin, uma vez que foi capaz de analisar uma maior quantidade de parâmetros, além de ter otimizado o tempo de análise. Conclui-se que o software em desenvolvimento trata-se de uma ferramenta eficaz para determinação da área e do número de colônias.

Palavras-chave: Antitumoral. Citotoxicidade. Uleína. *Aspidosperma subincanum*.

ABSTRACT

Chemotherapy drugs available for cancer treatment have low efficacy and low specificity. Indole alkaloids isolated from plants are important sources of antitumor drugs. Thus, the objective of this work was to evaluate the antitumor potential of the total alkaloid fraction (FAT) obtained from a supplement prepared from the *A. subincanum* bark, in an experimental model *in vitro*, in an attempt to identify possible alkaloids present in the fraction. Analysis by HPLC and mass spectrometry evidenced the presence of ulein and other 7 unidentified alkaloids in FAT. In relation to the biological activities, FAT had a cytotoxic and antiproliferative effect in several tumoral lines (Hela, U937, HRT-18 and MCF7), being more effective in MCF7 cells. Such activity was selective when compared to the effect exerted by FAT on MCF7 cells and on the McCoy line (murine fibroblasts). FAT promoted the increase in the number of cells in the G1 phase of the cell cycle, leading to the onset of apoptosis. The fraction also caused intracellular reduction of ROS because of a strong and persistent activation of CAT. Finally, treatment with FAT culminated in the suppression of COX-2 levels. It is concluded that FAT has an important antitumor effect due to interferences in redox balance and expression of COX-2. As regards the investigation of the antitumor effect of natural compounds and products, it is common to perform tests that evaluate the cytotoxic and antiproliferative effect of the same in tumor cell lines, especially the clonogenic test. There are several problems involved in the analysis of the results obtained by this assay. Thus, the second objective of this work was to develop and validate a software for determining the area (total and individual) and the number of colonies. The software presented superior performance when compared to the manual method (gold standard of analysis) and plugin, since it was able to analyze a greater amount of parameters, besides having optimized the analysis time. It is concluded that the software in development is an effective tool for determining the area and number of colonies.

Key-words: Antitumor. Citotoxicity. Uleine. *Aspidosperma subincanum*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. As duas principais vias apoptóticas, as quais são ativadas por estímulos apoptóticos internos (via intrínseca) e externos (via extrínseca)..... | 20 |
| Figura 2. Representação esquemática dos diferentes estágios de necrose (esquerda) e apoptose (direita) | 22 |
| Figura 3. Progressão do ciclo celular. | 23 |
| Figura 4. Sequência da Reação de Fenton..... | 25 |
| Figura 5. Principais antioxidantes naturais enzimáticos e não enzimáticos.O sistema antioxidante humano é dividido em dois grandes grupos, o enzimático e não enzimático. | 26 |
| Figura 6. Vias de ativação de NF-kB. Há duas vias principais de transdução de sinal NF-kB: a via canônica e a não canônica. | 29 |
| Figura 7. Esquema provável da interface entre a inflamação e a carcinogênese.. ... | 32 |
| Figura 8. Relação entre estresse oxidativo, inflamação e câncer. | 33 |
| Figura 9. <i>Aspidosperma subincanum</i> Mart. ex A. DC. A – Árvore, B – Superfície do ritidoma e cor da casca interna. | 35 |
| Figura 10. Fórmula estrutural da uleina..... | 36 |
| Figura 11. Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico e antiproliferativo <i>in vitro</i> da fração de alcaloides totais obtido de suplemento elaborado a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE..... | 37 |
| Figura 12. Esquema de contagem das células MCF7 e McCoy após 72 horas de tratamento com FAT e VC..... | 41 |
| Figura 13. Perfil cromatográfico da fração de alcaloides totais (FAT)..... | 49 |
| Figura 14. Possível fragmentação da uleina no ESI..... | 50 |
| Figura 15. Possível fragmentação da uleina no ESI..... | 51 |
| Figura 16. Espectro de massas de FAT por infusão direta (DIMS)..... | 52 |
| Figura 17. Efeito citotóxico e/ou antiproliferativo da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e da vincristina (VC) sobre células MCF7 e McCoy após 72 h de tratamento. | 54 |

| | |
|---|----|
| Figura 18. Efeito da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e da vincristina (VC) sobre o número de células das linhagens MCF7 e McCoy.. | 56 |
| Figura 19. Efeito anticlonogênico da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e do quimioterápico vincristina (VC). | 57 |
| Figura 20. Efeito anticlonogênico da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e do quimioterápico vincristina (VC). | 58 |
| Figura 21. Efeito da fração de alcalóides totais (FAT- Cl ₃₀ - 19,2µg/mL) obtida a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e da vincristina (VC - Cl ₃₀ – 9,6 nM) sobre a progressão do ciclo celular de células MCF7 após 72 horas de tratamento. | 59 |
| Figura 22. Tipo de morte celular induzido pela fração de alcalóides totais (FAT) (32 µg/mL) obtida a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e pela vincristina (VC) (16 nM) em linhagem MCF7 após 72 horas de tratamento | 61 |
| Figura 23. Efeito da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE sobre os níveis intracelulares de H ₂ O ₂ na linhagem MCF7. | 63 |
| Figura 24. Atividade da CAT em células MCF7 após tratamento com fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE, doxorrubicina (DOXO) e associação DOXO+FAT por 24, 48 e 72 horas. | 65 |
| Figura 25. Efeito da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE, e da dexametasona (DEXA- 100 nM) sobre a expressão de COX-2 após 24, 48 e 72 horas de tratamento. | 68 |
| Figura 26. Hipótese do mecanismo de ação citotóxica e antiproliferativa da fração de alcalóides totais (FAT) obtido de suplemento elaborado a partir da casca de <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE. | 69 |
| Figura 27. Esquema de compilação de linguagem computacional. | 76 |
| Figura 28. Desenho representativo do suporte para obtenção das imagens das colônias nos respectivos poços. | 78 |

| | |
|--|----|
| Figura 29. Divisão do poço em quadrantes para facilitar a contagem manual do número de colônias. | 78 |
| Figura 30. Passos a serem seguidos para análise das colônias pelo plugin..... | 79 |
| Figura 31. Etapas de análise da imagem pelo ImageJ utilizando o plugin desenvolvido por Guzmán et al, 2014. | 80 |
| Figura 32. Imagem final fornecida pelo plugin com os resultados obtidos | 80 |
| Figura 33. Etapas de análise da imagem pelo software e desenvolvimento. | 81 |
| Figura 34. Documento de texto gerado pelo software em desenvolvimento. | 81 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1. Alcaloides que apresentam atividade antitumoral e antiinflamatória..... | 34 |
| TABELA 2. Principais alcaloides isolados da espécie <i>Aspidosperma subincanum</i> Mart. ex A. DC..... | 35 |
| TABELA 3. Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinados para FAT em linhagens tumorais tratadas por 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações da fração teste (10 – 350 $\mu\text{g/mL}$)..... | 52 |
| TABELA 4. Principais ensaios diretos e indiretos para análise de viabilidade e proliferação celular..... | 72 |
| TABELA 5. Número de colônias da linhagem MCF7 contadas pelo método manual e pelo software em desenvolvimento. | 83 |
| TABELA 6. Número de colônias da linhagem McCoy contadas por meio manual e pelo software em desenvolvimento. | 83 |
| TABELA 7. Área das colônias da linhagem MCF7 determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento..... | 84 |
| TABELA 8. Área das colônias da linhagem McCoy determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento..... | 85 |
| TABELA 9. Média \pm desvio padrão do número de colônias da linhagem MCF7 determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento. | 86 |
| TABELA 10. Média \pm desvio padrão do número de colônias da linhagem McCoy determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento. | 87 |
| TABELA 11. Média \pm desvio padrão dos valores das áreas das colônias da linhagem MCF7 determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento..... | 87 |
| TABELA 12. Média \pm desvio padrão dos valores das áreas das colônias da linhagem McCoy determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento. | 88 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| ATP | - Adenosina trifosfato |
| BSA | - Albumina do soro bovino |
| CAT | - Catalase |
| CDK | - Cinase dependente de ciclinas |
| CDKi | - Inibidor de quinases dependentes de ciclinas |
| cDNA | - DNA complementar |
| CLAE | - Cromatografia Líquida de alta eficiência |
| CI ₃₀ | - Concentração inibitória 30% |
| CI ₅₀ | - Concentração inibitória 50% |
| COX-2 | - Ciclooxygenase 2 |
| DCFH-DA | - Diclorofluoresceína diacetato |
| DEPC | - Água ultrapura livre de endonucleases |
| DEXA | - Dexametasona |
| DISC | - <i>Complexo</i> indutor de sinalização de morte |
| DMSO | - Dimetilsulfóxido |
| DNA | - Ácido desoxirribonucleico |
| DOXO | - Doxorubicina |
| EGFR | - Receptor do fator de crescimento epidérmico |
| ERNS | - Espécies reativas de nitrogênio |
| EROS | - Espécies reativas de oxigênio |
| ESI | - Eletrospray ionization |
| FAD | - Dinucleótido de flavina e adenina |
| FAT | - Fração de alcaloides totais |
| GR | - Glutathione redutase |
| GSH | - Glutathione reduzida |
| GSSG | - Glutathione oxidada |
| HBSS | - Hank's Balanced Salt Solution |
| HPLC | - High performance liquid chromatography |
| IκB | - Proteína inibitória de NF-κB |
| IKK | - Cinases de IκB |
| INCA | - Instituto Nacional do Câncer |

| | |
|---------|--|
| IUPAC | - União Internacional de Química Pura e Aplicada |
| LDH | - Lactato desidrogenase |
| LPS | - Lipopolissacarídeo |
| MDR | - Multiple drug resistance |
| MEC | - Matriz extracelular |
| MMPs | - Metaloproteinases |
| MTT | - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina |
| NAC | - N-acetilcisteína |
| NADPH | - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato |
| NFkB | - Fator nuclear kappa B |
| NIK | - Cinase inductora de NF-κB |
| NK | - Natural Killer |
| NTD | - Domínio N-terminal |
| OMS | - Organização Mundial da Saúde |
| PMAPs | -Padrões moleculares associados a patógenos |
| PBS | - Tampão fosfato-salino |
| RIPK1 | - Proteína-cinase 1 |
| RIPK3 | - Proteína-cinase 3 |
| RL | - Radical livre |
| RT-qPCR | - PCR quantitativo em tempo real |
| SI | - Sistema internacional de unidades |
| SOD | - Superóxido dismutase |
| TNFα | - Factor de necrose tumoral <i>alfa</i> |
| TRAF2 | - Receptor associado ao fator-2 |
| UFPR | - Universidade Federal do Paraná |
| VC | - Vincristina |
| VN | - Vermelho neutro |
| .txt | - Documento de texto |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| | CAPÍTULO 1 - ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL DE FRAÇÃO DE ALCALOIDES TOTAIS OBTIDO DE SUPLEMENTO ELABORADO A PARTIR DA CASCA DE <i>Aspidosperma subincanum</i> MART. ex A. DC., APOCYNACEAE | |
| 2 | OBJETIVOS | 16 |
| 2.1.1 | Objetivo Geral..... | 16 |
| 2.1.2 | Objetivos Específicos | 16 |
| 3 | REVISÃO DE LITERATURA | 17 |
| 3.1 | CÂNCER | 17 |
| 3.2 | MECANISMO DE MORTE CELULAR | 19 |
| 3.2.1 | Apoptose | 19 |
| 3.2.2 | Necrose | 21 |
| 3.3 | CICLO CELULAR | 22 |
| 3.4 | ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E CÂNCER | 24 |
| 3.5 | ALCALOIDES COMO AGENTES ANTITUMORAIS E ANTIINFLAMATÓRIOS | 33 |
| 3.5.1 | Constituição química, atividades farmacológicas e uso popular da espécie <i>Aspidosperma subincanum</i> | 34 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS | 37 |
| 4.1 | MATERIAL BOTÂNICO | 37 |
| 4.2 | MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS E CROMATOGRÁFICOS..... | 38 |
| 4.3 | ENSAIOS BIOLÓGICOS | 39 |
| 4.3.1 | Cultivo de células..... | 39 |
| 4.3.2 | Ensaio de viabilidade celular pelo sal de tetrazolium (MTT)..... | 39 |
| 4.3.3 | Ensaio de viabilidade celular pelo vermelho neutro (VN) | 40 |
| 4.3.4 | Ensaio de contagem celular | 41 |
| 4.3.5 | Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)..... | 42 |
| 4.3.6 | Análise do ciclo celular | 42 |
| 4.3.7 | Coloração diferencial com Iodeto de Propídeo e Laranja de Acridina (IP/LA) | 43 |
| 4.3.8 | Determinação da concentração intracelular de espécies reativas do oxigênio (EROs) | 44 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 4.3.9 | Determinação da atividade de enzima antioxidante (CAT)..... | 44 |
| 4.3.10 | Avaliação do efeito de FAT sobre a transcrição de COX-2 | 45 |
| 5 | ANÁLISE ESTATÍSTICA | 47 |
| 6 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 48 |
| 6.1 | MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS E CROMATOGRÁFICOS..... | 48 |
| 6.2 | ENSAIOS BIOLÓGICOS | 52 |
| 6.2.1 | Ensaio de viabilidade celular pelo sal de tetrazolium (MTT) e pelo vermelho neutro (VN)..... | 52 |
| 6.2.2 | Ensaio de contagem celular | 55 |
| 6.2.3 | Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)..... | 57 |
| 6.2.4 | Análise do ciclo celular | 59 |
| 6.2.5 | Coloração diferencial com Iodeto de Propídeo e Laranja de Acridina (IP/LA) | 60 |
| 6.2.6 | Determinação da concentração intracelular de espécies reativas do oxigênio (EROs) | 62 |
| 6.2.7 | Determinação da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) | 65 |
| 6.2.8 | Avaliação do efeito de FAT sobre a expressão de COX-2 | 67 |
| 7 | CONCLUSÕES | 70 |
| CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SOFTWARE DE MENSURAÇÃO DE ÁREA E CONTAGEM DE NÚMERO DE COLÔNIAS | | |
| 8 | OBJETIVOS | 71 |
| 8.1.1 | Objetivo Geral..... | 71 |
| 8.1.2 | Objetivos Específicos | 71 |
| 9 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 72 |
| 9.1 | ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA <i>IN VITRO</i> | 72 |
| 9.1.1 | Ensaio clonogênico..... | 74 |
| 9.2 | A LINGUAGEM PYTHON™ | 75 |
| 10 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 77 |
| 10.1 | ENSAIO CLONOGÊNICO | 77 |
| 10.2 | DESENVOLVIMENTO DO SOFTWARE | 77 |
| 10.3 | MÉTODO DE OBTENÇÃO DAS IMAGENS | 77 |
| 10.4 | ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS | 78 |
| 10.4.1 | Análise manual | 78 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 10.4.2 | Análise por plugin (ImageJ) | 79 |
| 10.4.3 | Análise automatizada pelo software em desenvolvimento | 80 |
| 10.5 | VALIDAÇÃO DO SOFTWARE PARA AS LINHAGENS ESTUDADAS..... | 82 |
| 11 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 83 |
| 12 | CONCLUSÕES | 90 |
| | REFERÊNCIAS..... | 91 |

1 INTRODUÇÃO

Depois das doenças cardíacas, o câncer constitui a principal causa de morte nos Estados Unidos, sendo responsável por mais de 500.000 casos fatais anualmente. No Brasil, conforme o Instituto Nacional do Câncer, ocorreram no biênio 2016 - 2017, cerca de 600.000 casos novos de câncer, sendo os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele não melanoma, os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e de mama e colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo. Portanto, esta patologia se configura como um problema de saúde pública tanto de dimensões internacionais como nacionais (INCA, 2017).

Embora já existam fármacos consagrados no tratamento do câncer, nenhum destes foram capazes de regredir completamente as diferentes manifestações desta patologia, ou mesmo reduzir significativamente sua toxicidade e efeitos adversos, além de induzir a multiresistência a quimioterapia em tumores (MDR) (LONGLLEY; JOHNSTON, 2005; HOLOHAN et al., 2013).

Sabe-se que o processo de apoptose é essencial para eliminação de células cancerosas e, desta forma, este mecanismo tornou-se alvo de estudos na procura de novos fármacos para serem utilizados na quimioterapia do câncer. A maior parte das células tumorais apresenta mutações que levam à superexpressão de proteínas antiapoptóticas e à inativação de genes supressores tumorais, como o p53, que regula positivamente a apoptose em função da ocorrência de danos irreparáveis no DNA (VERMEULEN, VAN BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003). Outra mutação que recebe destaque, trata-se da superexpressão da enzima ciclooxigenase 2 (COX-2), relacionada ao desencadeamento do processo inflamatório e também à carcinogênese, uma vez que a ativação desta enzima é capaz de promover a indução de resistência à apoptose e de favorecer a ocorrência de angiogênese e metástase (SUBHASHINI, MAHIPAL, REDDANNA, 2005).

É importante destacar que diversos alcaloides indólicos são capazes de exercer efeito antitumoral e antiinflamatório significativos. Como exemplo de alcaloides indólicos com efeito antitumoral, pode-se citar os alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) e o paclitaxel. Em relação a alcaloides indólicos com efeito antiinflamatório, recebe destaque a uleina, presente principalmente em plantas do

gênero *Aspidosperma* e *Himatanthus* (Apocynaceae)(BRANDÃO et al, 2010; SOUZA 2004; HOLANDA et al. 2008).

Dentro deste contexto, este trabalho foi uma tentativa de validar, por meio de ferramentas bioquímicas e de biologia molecular, o efeito antitumoral induzido pela fração de alcaloides totais (FAT) isolado do fitoterápico Para Pau Aspido 80®(Parabolic Biologicals Ltd), e verificar se o efeito está relacionado a ação antiinflamatória apresentada pela uleína, composto presente na fração em questão.

No que se refere à investigação do efeito antitumoral de compostos e produtos naturais, é comum a realização de ensaios que visam avaliar o efeito citotóxico e antiproliferativo dos mesmos em diversas linhagens celulares tumorais. Estes ensaios normalmente avaliam a capacidade destes produtos e/ou compostos em induzirem danos a membrana plasmática e de reduzirem a atividade metabólica ou a proliferação de células malignas. Um exemplo de teste utilizado para este fim, trata-se do ensaio clonogênico, o qual avalia o potencial de uma única célula gerar clones frente a um tratamento, permitindo verificar não apenas a atividade citotóxica e/ou antiproliferativa de substâncias, mas também a duração da promoção destes efeitos (temporários ou permanentes), fornecendo informações preliminares sobre a existência de resistência ao tratamento (JONES et al., 1985; PARCHMENT et al., 1992). Classicamente, a análise deste ensaio é realizada mediante a contagem do número de colônias formadas após a exposição de células aos tratamentos teste, sendo considerada uma colônia, um grupo constituído por 50 células (FRANKEN et al, 2006).

Um dos problemas envolvidos nas análises dos resultados obtidos por meio do ensaio de formação de colônias se deve ao fato destas serem realizadas manualmente, o que torna a análise demorada e subjetiva (CHOUDHRY, 2016) evidenciando assim, a necessidade de automação para a obtenção de resultados mais fidedignos, além da otimização de tempo. Por fim, salienta-se que muitas vezes a determinação do número de colônias não é o melhor parâmetro para avaliar-se o efeito induzido por um tratamento. Pode-se citar, por exemplo, tratamentos que induzem senescência celular, onde eventualmente não observa-se diferença no número de colônias e sim, no número de células por colônia.

Assim, este trabalho também apresenta esforços no intuito de automatizar e otimizar a análise de dados obtidos por meio do ensaio clonogênico, por meio do

desenvolvimento e da validação de um software que determina a área (total e individual) e o número de colônias.

Para melhor compreensão do leitor, optou-se em dividir o mesmo em dois capítulos. O capítulo 1 abordou a parte do trabalho relacionada a investigação do efeito antitumoral da fração de alcaloides totais obtido de suplemento elaborado a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE. Já o capítulo 2 discorreu sobre a parte do trabalho relacionada ao desenvolvimento de um software de mensuração de área e de número de colônias.

CAPÍTULO 1 - ESTUDO DO EFEITO ANTITUMORAL DE FRAÇÃO DE ALCALOIDES TOTAIS OBTIDO DE SUPLEMENTO ELABORADO A PARTIR DA CASCA DE *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE

2 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito antitumoral *in vitro* da fração de alcaloides totais (FAT) obtida por meio do suplemento Para Pau Aspido 80[®] (Parabolic Biologicals Ltd), investigando possíveis mecanismos de ação do mesmo.

2.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a fração de alcaloides totais (FAT) do suplemento Para Pau Aspido 80[®] (Parabolic Biologicals Ltd);
- Avaliar a citotoxicidade e o efeito antiproliferativo da FAT em linhagens tumorais, selecionando a linhagem mais susceptível ao tratamento, além de verificar se o efeito da FAT é seletivo para células tumorais;
- Verificar o efeito de FAT sobre a distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular e sobre a atividade pró-apoptótica em células da linhagem tumoral mais sensível a fração;
- Avaliar o envolvimento de espécies reativas do oxigênio (EROs) e de enzima antioxidante (CAT) nos efeitos citotóxico e antiproliferativo de FAT sobre a linhagem tumoral escolhida;
- Determinar os níveis de COX-2 em células da linhagem tumoral mais sensível a fração, correlacionando o efeito anti-inflamatório de FAT as atividades pró-apoptótica e antiproliferativa da mesma.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 CÂNCER

O câncer é considerado um problema de saúde pública, o qual está presente principalmente em países em desenvolvimento. Para os próximos anos, estima-se a ocorrência de 20 milhões de novos casos no mundo (INCA, 2017). No Brasil, para o biênio 2016-2017, foram estimados 600 mil novos casos da doença sendo os tipos mais frequentes (com exceção do câncer de pele não melanoma) nos homens, o câncer de próstata, pulmão e intestino; e nas mulheres, o câncer de mama, intestino e colo de útero (OMS, 2016; INCA, 2017).

Clinicamente, o câncer é considerado um conjunto de mais de 100 doenças as quais apresentam desordem na proliferação celular podendo levar a metástase, processo que culmina na formação de tumores em locais distantes do sítio de origem (INCA, 2017).

Esta doença, do ponto de vista bioquímico, é uma doença celular caracterizada por um descontrole sobre o ciclo e processos de morte celular, levando a uma proliferação exarcebada, desenvolvimento de tumores e a resistência a apoptose (MOFFAT et al., 2000).

Tais alterações bioquímicas e celulares se devem à ocorrência de mutações em genes que controlam esses processos e são divididos em dois grupos principais: oncogenes e genes supressores tumorais (WOLF e RAMIREZ, 2001; AUDIC, HARTLEY, 2004). Oncogenes são genes que codificam proteínas envolvidas na proliferação celular excessiva. Já os genes supressores tumorais inibem o crescimento de células malignas (MEEK, 2009; RAJAGOPALAN et al., 2010).

Estes genes, ao sofrerem mutações podem levar a ativação de proto-oncogenes em oncogenes, o que leva à superexpressão de proteínas e receptores responsáveis pelo crescimento, diferenciação e proliferação celular. Ainda, as mutações envolvidas na carcinogênese podem acarretar na inativação dos genes supressores tumorais. Dentre os genes frequentemente mutados em células neoplásicas pode-se citar aqueles que codificam as proteínas c-Myc, p53, p16, Ras, família Bcl-2 (Bax, Bid), cinases dependentes de ciclinas (CDKs), ciclinas, entre outras. Destas, mutações nos genes p53 e bcl-2 são as mais frequentes, sendo que

50% dos tumores em média apresentam as mesmas (REED, 1998; KUMARI; KOHLI; DAS, 2014).

As causas do câncer podem ser externas ou internas ao organismo, e se correlacionam. As causas externas estão associadas a fatores como o meio ambiente, hábitos sociais e culturais envolvendo a exposição do organismo a carcinógenos, tendo como exemplos: dieta inadequada, exposição exacerbada a radiação solar, alcoolismo, tabagismo, exposição à fumaça, ingestão incorreta ou abusiva de medicamentos, dentre outros (INCA, 2017). Já as causas internas são geneticamente pré-determinadas (fatores hereditários, familiares e étnicos) e relacionadas à capacidade de defesa do organismo frente a agressões externas (INCA, 2016).

O tratamento do câncer envolve a utilização de três abordagens: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, sendo esta última considerada o tratamento de maior eficácia (MILLER et al., 1981), pois diversos tumores levam a metástases precocemente, indicando a importância da terapia sistêmica que é o objetivo deste tratamento (ENGERS e GABBERT, 2000).

Embora haja diversos fármacos convencionalmente utilizados na clínica, nenhum dos esquemas terapêuticos aplicados é capaz de regredir completamente as diferentes manifestações desta doença. Além disso, o uso de agentes antitumorais acarreta em uma alta incidência de efeitos adversos associados à sua elevada toxicidade e inespecificidade. Outra questão importante sobre o tratamento do câncer trata-se da resistência à quimioterapia (MDR), resultando na escolha de terapia associada para melhor resposta do paciente (LONGLEY e JOHNSTON, 2005; HOLOHAN et al., 2013).

Essas informações ressaltam a necessidade de identificar-se novos fármacos e/ou abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer. Nesse sentido, grande parte das pesquisas realizadas para este fim, baseiam-se em estudar os efeitos de agentes análogos aos existentes, preconizando maior especificidade e menor incidência de efeitos colaterais (BONASSA, 2005).

3.2 MECANISMO DE MORTE CELULAR

3.2.1 Apoptose

A apoptose é um fenômeno de morte celular programada, a qual foi descrita por Kerr, Wyllie e Curie em 1972. Tal processo é caracterizado pela ocorrência de diversas alterações morfológicas que incluem a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA e a formação dos corpos apoptóticos (Figura 2) (EDINGER e THOMPSON, 2004; SU; MEI; SINHA, 2013).

A apoptose é um evento controlado por meio da ativação de fatores pró-apoptóticos mediados por proteínas sinalizadoras e efetoras, ocorrendo tanto em situações fisiológicas, como por exemplo, renovação celular, tecidual e defesa do organismo perante a ação de patógenos; quanto em condições patológicas, como em doenças cardiovasculares, em resposta a danos genotóxicos e na carcinogênese. Nas situações patológicas os genes de regulação encontram-se mutados, superexpressos, suprimidos ou subexpressos (ALBERTS et al., 2008; SU, MEI, SINHA, 2013).

Este mecanismo de morte celular é desencadeado pela ativação de duas vias principais denominadas via extrínseca ou citoplasmática e via intrínseca ou mitocondrial (Figura 1), que respondem a diversos sinais celulares, tais como: agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, privação de fatores de crescimento, estresse oxidativo, entre outros (VELU et al., 2007).

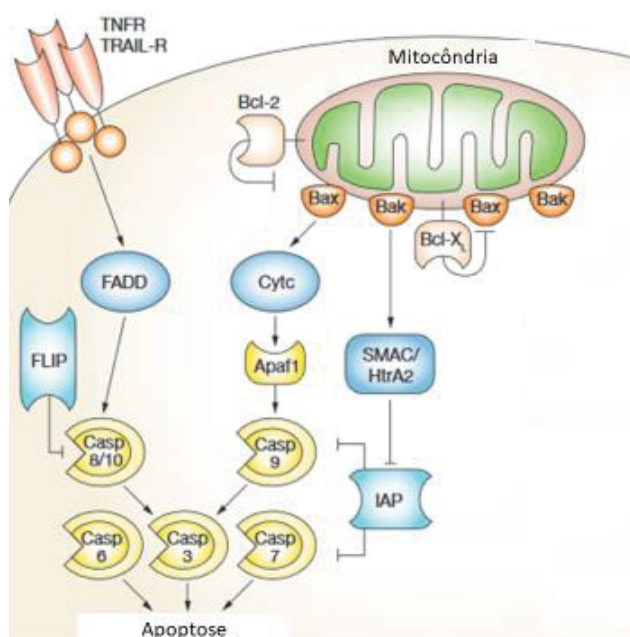


Figura 1. As duas principais vias apoptóticas, as quais são ativadas por estímulos apoptóticos internos (via intrínseca) e externos (via extrínseca). A via intrínseca, ao ser desencadeada, libera o citocromo c e SMAC para o citoplasma. O citocromo c ao ser liberado se liga e ativa APAF-1, promovendo a ativação das caspases 9 e 3. SMAC se associa a IAPs o que impede a inibição das caspases 9 e 3. A ativação destas caspases culmina na morte celular por apoptose. Proteínas Bcl-2 e Bcl-xl inibem a liberação do citocromo c, já as proteínas BAD, BID e BAX induzem a liberação do mesmo. Na via extrínseca os receptores de morte são ativados (FAS/FASL), estes por sua vez, se associam a proteínas adaptadoras (FAAD), levando a formação do complexo indutor de morte (DISC), ativando as caspases 8 e 3 e culminado na morte celular por apoptose. Fonte: Adaptado de Reed, 2006.

A via extrínseca tem início com a ativação dos receptores de morte, os quais, nesta condição, associam-se a proteínas adaptadoras e a pró-caspases levando a formação do complexo indutor de morte (DISC) e culminando na ativação das caspases iniciadoras (8 ou 10). Estas por sua vez, levam a ativação das caspases efetoras (3 ou 7) induzindo a morte apoptótica (IGNEY e KRAMMER, 2002; FAVALORO et al., 2012).

Já a via intrínseca responde a injúrias que levam a permeabilização mitocondrial (exemplo dano ao DNA e ação de agentes oxidantes), promovendo a liberação de moléculas pró-apoptóticas no citoplasma. Esta permeabilização se deve ao colapso do potencial de membrana interna ($\Delta\Psi$) e ao extravasamento da água presente do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, o que leva a ruptura da mitocôndria e liberação das proteínas. Este processo também contribui para a perda da homeostase celular, cessando a síntese de ATP e elevando os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROS), promovendo a oxidação de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos e aumentando, por consequência, o colapso do

potencial de membrana interna (IGNEY e KRAMMER, 2002; FAVALORO et al., 2012).

Dentre as proteínas pró-apoptóticas que são liberadas para o citosol, destaca-se o citocromo c, o qual associa-se a APAF-1 e a pró-caspase-9, levando a formação do apoptossomo, que culmina por sua vez na ativação da caspase-9 e em sequência, da caspase-3, ocasionando a apoptose (GRIVICICH et al., 2007).

3.2.2 Necrose

A necrose é um processo de morte celular caracterizado pela perda da integridade da membrana celular, inchaço citoplasmático, aparecimento de vacúolos, inchaço do retículo endoplasmático, distensão mitocondrial, lise de lisossomos e liberação do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular, gerando uma resposta inflamatória e podendo acarretar na morte e injúria de células vizinhas e danos teciduais irreversíveis (Figura 2) (TRUMP et al., 1997; KUROSACA et al., 2003; HENRIQUEZ et al., 2008).

Este processo pode ser desencadeado por diversas condições como infecções, processos inflamatórios, isquemias, agentes térmicos e químicos. Neoplasias, diabetes, distrofia, cirrose hepática, são exemplos de doenças em que observa-se a ocorrência de necrose, sendo que o trauma gerado por este mecanismo pode levar a falhas extensivas na fisiologia normal, o que contribui para a diminuição da homeostasia celular e o agravamento destas condições (OKADA e MAK, 2004).

A necrose é um processo que pode ocorrer ou não de forma regulada. Estudos evidenciam a ação de alguns reguladores essenciais no controle da mesma, como o receptor do fator de necrose tumoral (TNFR), receptores de interação proteína-quinase 1 e 3 (RIPK1 e RIPK3) e o receptor associado ao fator-2 (TRAF2) (AMARAVADI e THOMPSON, 2007; GALLUZZI, KEPP, KROEMER, 2011; NAUDÉ et al., 2011). Nesse sentido, tem sido observado que a ligação do fator de necrose tumoral (TNF α) ao seu receptor ativa o complexo RIPK1/RIPK3 desencadeando a necrose (GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2011; HAN; ZHONG; ZHANG, 2011). Por fim, cabe ressaltar que este processo de necrose regulada é denominado “necroptose” (FULDA, 2013; GALLUZZI, KEPP, KROEMER, 2011).

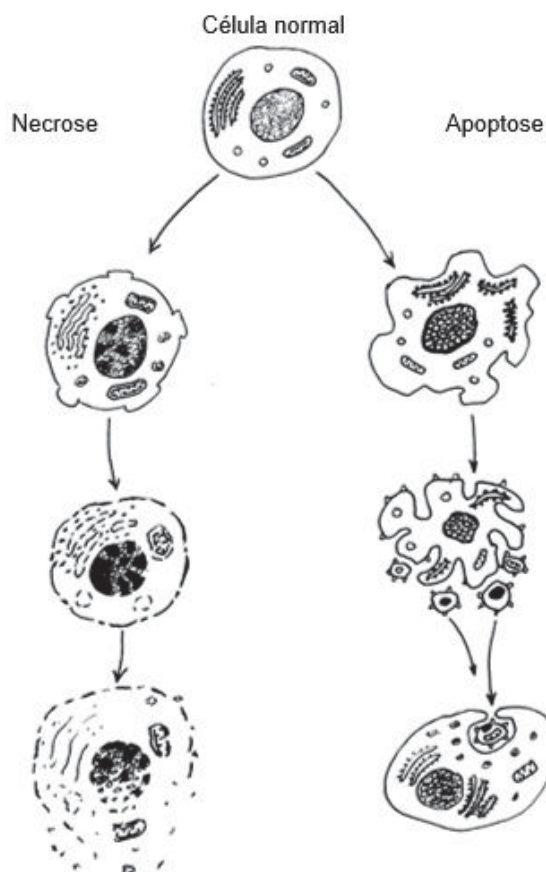


Figura 2. Representação esquemática dos diferentes estágios de necrose (esquerda) e apoptose (direita). No processo de morte celular por necrose, a membrana plasmática é rompida, o que leva ao extravazamento do conteúdo intracelular para o meio extracelular. Na morte celular por apoptose, ocorre a formação dos corpos apoptóticos, os quais contém restos celulares, e estes são, em seguida, fagocitados por macrófagos ou células vizinhas.

FONTE: Adaptado de MEER et al., 2009.

3.3 CICLO CELULAR

O ciclo celular, também chamado de ciclo de divisão celular, descreve uma série de eventos que ocorrem em uma célula e que levam a sua divisão e duplicação, ou seja, que acarretam em uma replicação idêntica (BEHL e ZIEGLER, 2014). A progressão entre as diferentes fases é controlada por uma maquinaria bioquímica conservada, a fim de garantir a correta duplicação e segregação do genoma, que está atrelada a sinais extracelulares de controle de crescimento e proliferação (DIAZ-MORALLI et al., 2013). Este processo apresenta quatro fases: Gap1 (G1), síntese (S), Gap 2 (G2), mitose (M) e G0 (ALMEIDA et al, 2005). Na fase G1, ocorre a preparação das células para a divisão celular e a síntese de macromoléculas essenciais para a célula nova. Já a fase S é caracterizada pela

duplicação do DNA. Por fim, na fase G2, são sintetizados componentes para a mitose, finalizando o ciclo celular (Figura 3) (ALMEIDA et al., 2005).

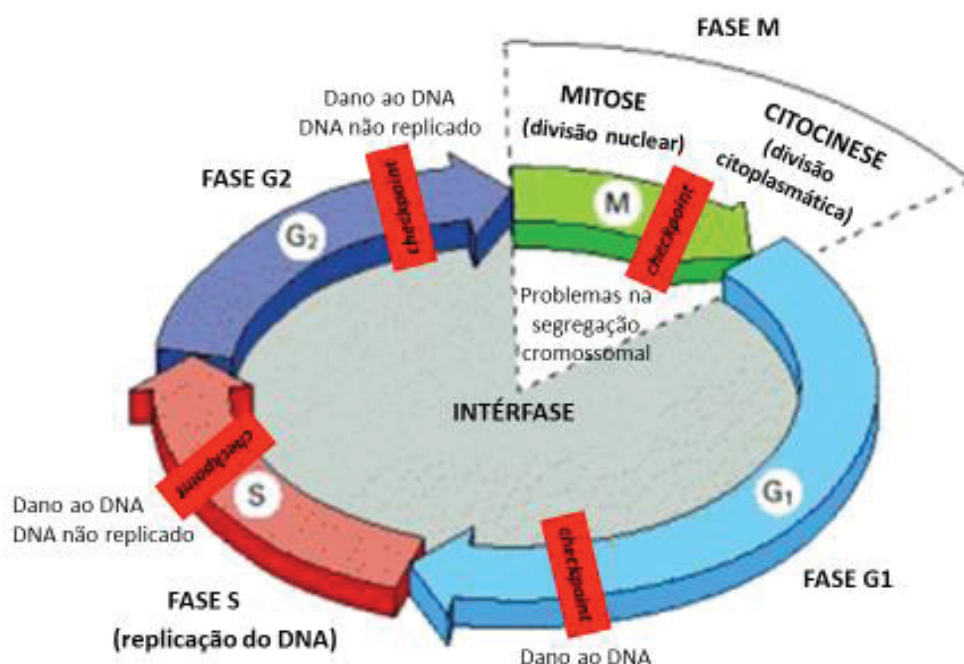


Figura 3. Progressão do ciclo celular. O ciclo celular ocorre em fases e estas apresentam *checkpoints* a fim de evitar possíveis erros na duplicação celular. Na fase G1 ocorre o primeiro *checkpoint*, o qual avalia a integridade do DNA, assim como o tamanho e ambiente celular. Na fase S e G2, o *checkpoint* é responsável por verificar falhas na replicação e integridade do DNA. O último *checkpoint*, o qual ocorre na fase M, avalia novamente a integridade do DNA e assegura a segregação correta dos cromossomos, assim como a estabilidade genética.

Fonte: Adaptado de Alberts et al., 2002.

Os mecanismos sensores que realizam o monitoramento e regulação do ciclo são denominados *checkpoints* (pontos de controle) (BARTEK et al., 1999), (WILLIAMS e STOEBER, 2012; DIAZ-MORALLI et al., 2013). Atualmente a literatura cita a existência de três *checkpoints*: a) *checkpoint* de dano ao DNA, o qual ocorre nas 4 fases do ciclo celular; b) *checkpoint* de replicação, que monitora a progressão pela fase S, garantindo a duplicação correta do DNA e c) *checkpoint* do fuso mitótico, que ocorre na fase M e vigia a ligação dos cromossomos aos microtúbulos (Figura 3). Ao ser detectado um evento errôneo ao longo do ciclo, estes mecanismos sensores emitem sinais para proteínas efetoras, as quais podem levar ao bloqueio ou parada do ciclo até a resolução do mesmo. Se este erro não for reparado, as células podem ser induzidas à senescência ou apoptose (BARNUM e O'CONNELL, 2016).

Como exemplo de proteínas efetoras pode-se citar as ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDK), as quais, uma vez complexadas, levam a progressão do ciclo e mantêm as células em divisão. Por sua vez, a atividade das CDKs é controlada pela ação dos inibidores de CDK (CDKIs), os quais incluem proteínas como p21 (Cdkn1a), p27 (Cdkn1b) e p57 (Cdkn1c). Tais inibidores atuam mediando o bloqueio ou parada do ciclo por meio da sua união a CDKs complexadas com ciclinas (BARBACID, 2005). Outros inibidores de CDKs tratam-se das proteínas p15 (Cdkn2b), p16 (Cdkn2a), p18 (Cdkn2c) e p19 (Cdkn2d), as quais associam-se especificadamente à CDK4 conjugada a quinase dependente de ciclinas D (SCHWARTZ e SHAH, 2005).

Por fim, outra proteína de alta importância para o controle do ciclo celular é a proteína supressora tumoral p53, que atua principalmente no *checkpoint* G1/S para checagem e reparo de danos ao DNA. Esta proteína atua ao induzir a transcrição de p21, levando a inibição da atividade de CDK e ao bloqueio/parada do ciclo celular, impedindo a transmissão da informação genética incorreta a células filhas. Se a injúria for irreparável, a proteína leva a transcrição de genes envolvidos na indução da apoptose (NIIDA e NAKANISHI, 2006; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

3.4 ESTRESSE OXIDATIVO, INFLAMAÇÃO E CÂNCER

A espécies reativas de oxigênio (EROs) são moléculas altamente reativas derivadas do metabolismo aeróbico, podendo reagir com diversos compostos que estejam próximos e atuarem como agentes oxidantes ou redutores (ANDRADE et al., 2010; BARBOSA et al., 2010; SCHIEBER e CHANDEL, 2014). Existem EROs radiculares, como por exemplo o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}), bem como EROs não radiculares, tais como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete (1O_2). O principal local de origem de EROs trata-se da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, mas a produção também pode ocorrer por outras vias, tais como “*burst oxidativo*” (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; ALFADDA e SALLAM, 2012).

Dentre os radicais livres (RL), o radical $^{\bullet}OH$ possui maior reatividade e nenhum organismo apresenta defesa antioxidante capaz de metabolizá-lo, há somente a defesa por *scavengers* específicos, como por exemplo a glutatona

reduzida (GSH) (CHANCE et al., 1979; SÁNCHEZ, 2012). Este radical pode agir em diversas estruturas celulares, como proteínas (enzimas e membranas), lipídios e ácidos graxos, a lipoperoxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Mesmo que o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 não apresentem alta reatividade, podem originar outras espécies extremamente reativas, tais como o radical hidroxil ($\bullet OH$), através da chamada Reação de Fenton (Reação A e B) (Figura 4) podendo mediar, indiretamente, efeitos biológicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; LIPINSKI, 2011).

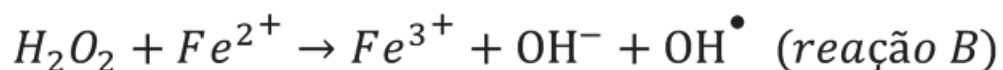
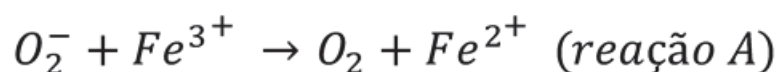


Figura 4. Sequência da Reação de Fenton.

A importância biológica das EROs vem sendo descrita desde 1954, assim como a relação destas com patologias, como por exemplo, câncer, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, entre outras (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015). Frequentemente os efeitos deletérios de EROs no organismo humano devem-se à situação de estresse oxidativo, caracterizada pelo ataque a biomoléculas tais como DNA, lipídeos, proteínas e carboidratos, devido ao desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, a favor dos pró oxidantes (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

As EROs também atuam em processos fisiológicos normais, como na transdução de sinal e no tônus vascular, tendo papel importante na homeostase celular, e mostrando a necessidade de equilíbrio entre geração de EROs e defesa antioxidante (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; ALFADDA e SALLAM, 2012). Desta forma, EROs e defesas antioxidantes devem ser produzidos de forma contínua e estarem fisiologicamente em proporções adequadas (BARBOSA et al., 2010).

Em relação a defesa antioxidante, sabe-se que a mesma é realizada por substâncias antioxidantes, as quais, mesmo em baixas concentrações em relação ao agente oxidante, revertem o processo de oxidação através de três maneiras: a) inibindo a formação de RL e EROs (prevenindo o dano); b) impedindo a ação de RL e EROs, tais como aqueles que atuam como seqüestradores (*scavengers*); c)

reparando e reconstituindo estruturas que foram lesadas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

A defesa antioxidante é dividida em enzimática e não-enzimática (Figura 5). Dentre os agentes não enzimáticos pode-se citar a GSH, um tripeptídeo produzido endogenamente, cuja ação *scavenger* é de grande importância (HUBER et al., 2008). Outros antioxidantes não enzimáticos podem ser obtidos da dieta, como por exemplo, o α -tocoferol (presente na vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenoides licopeno e β -caroteno) e compostos fenólicos (BARREIROS e DAVID, 2006). Ainda neste grupo, existem substâncias sintéticas como, por exemplo, a N-acetilcisteína (NAC) a qual é precursora da GSH, e apresenta atividade farmacológica atuando como agente mucolítico (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015; BARBOSA et al., 2010).

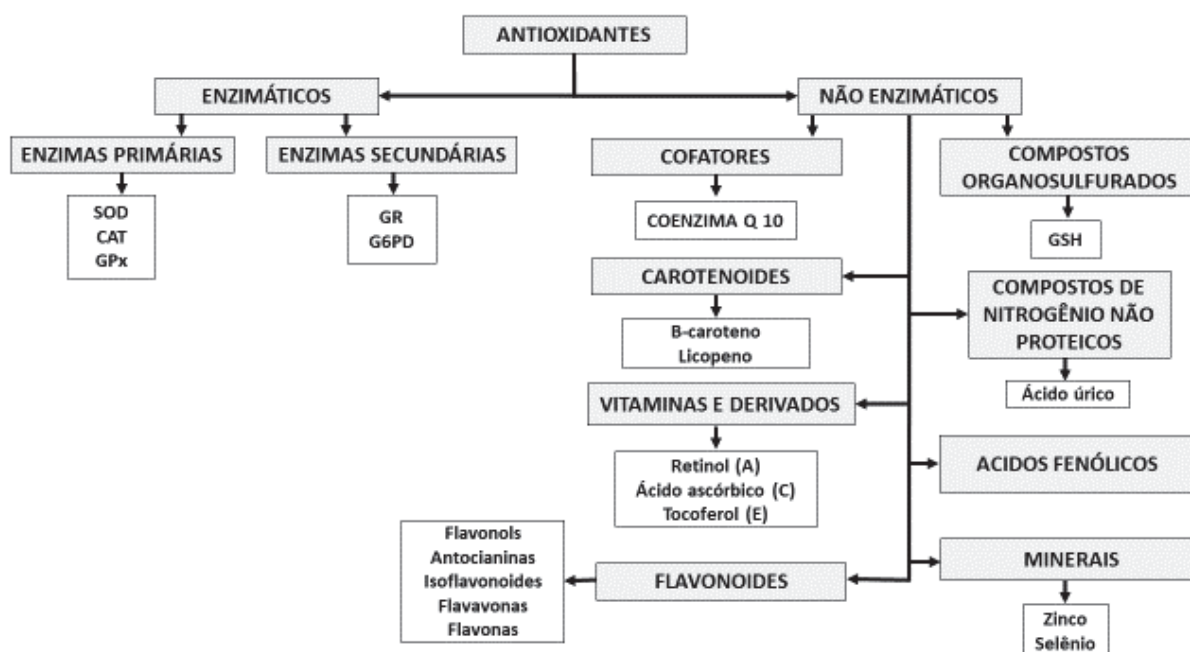


Figura 5. Principais antioxidantes naturais enzimáticos e não enzimáticos. O sistema antioxidante humano é dividido em dois grandes grupos, o enzimático e não enzimático. O sistema enzimático é subdividido em defesas enzimáticas primárias e secundárias. As defesas primárias são compostas pela ação de três enzimas principais: glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Já as defesas secundárias são formadas pela glutatona redutase (GR) e pela glicose-6-fosfato (G6PD). As defesas não enzimáticas são formadas por cofatores, como por exemplo, a coenzima Q 10, carotenoides, vitaminas e seus derivados, flavonoides, ácidos fenólicos, minerais, compostos organosulfurados e compostos de nitrogênio não proteicos.

Fonte: Adaptado de Carochó e Ferreira, 2013.

A vitamina E, inicialmente denominada inibitol, é um grupo constituído de 8 antioxidantes produzidos por vegetais, sendo eles α , β , γ , δ - tocoferol e α , β , γ , e δ - trienóis, dentre estes, o α -tocoferol se destaca por aparecer em abundância em

plantas, e por consequência, no plasma e tecidos humanos por meio da dieta. A função antioxidante da vitamina E refere-se à inibição da peroxidação lipídica, por meio da doação de hidrogênio para o radical peróxil. Neste processo, ocorre a desativação do tocoferol, o qual é regenerado por reação com o ascorbato nas membranas das células e/ou com a ubiquinona na membrana mitocondrial (TRABER e STEVENS, 2011; BARREIROS e DAVI, 2006).

Dentre as enzimas antioxidantes responsáveis em proteger as células de eucariotos do estresse oxidativo, pode-se citar como por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathiona peroxidase (GPx) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

A SOD é uma metaloenzima essencial para tecidos e células, ela realiza a remoção do $O_2^{\bullet-}$ a partir da dismutação para O_2 e H_2O_2 (McCORD; FRIDOVICH, 1969). A CAT é uma hemoproteína que realiza a redução específica do H_2O_2 para H_2O e O_2 , uma vez que o peróxido de hidrogênio é estável e extremamente difusível, este permeia eritrócitos e tecidos, tornando-se uma molécula sinalizadora (HARVEY, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Outra enzima antioxidante é a glutathiona redutase (GR), a qual é responsável pela redução de glutathiona oxidada (GSSG) a GSH, regenerando o tripeptídeo e mantendo os níveis intracelulares ideais. Para realizar esta função, esta enzima necessita de co-fatores, a Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), obtido da via das pentoses, e flavina adenina dinucleotídeo (FAD), a qual deriva da riboflavina (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2015).

Como mencionado anteriormente, o estresse oxidativo está relacionado a processos patológicos, bem como está envolvido na homeostase celular. No que se refere ao câncer, tem sido descrito que estas espécies estão envolvidas na tumorigênese, estando presentes em taxas elevadas em quase todos os tipos de câncer (LIOU e STORZ, 2010), favorecendo a sobrevivência, crescimento e proliferação celular, além de induzirem a ocorrência de processo inflamatório no microambiente tumoral, o que propicia ainda mais o desenvolvimento de tumores (STORZ, 2005).

Nesse sentido, outro processo relacionado ao estresse oxidativo é a inflamação, esta atua em resposta a um agente agressor na tentativa de reparar a homeostase tecidual. Durante o processo inflamatório há o recrutamento de células do sistema imune, tais como os neutrófilos, os quais possuem a enzima

mieloperoxidase (MPO) que apresenta papel fundamental no processo de fagocitose (RUBIN et al., 2006; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2008; PAPAYANNOPOULOS e ZYCHLINSKY, 2009; SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010). Na inflamação, a enzima NADPH oxidase é ativada e, juntamente com o influxo de íons, leva a ativação da MPO, acarretando na geração de ácido hipocloroso (HOCl) a partir de H₂O₂, o qual pode causar dano oxidativo ao patógeno (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

A expressão de fatores inflamatórios é conduzida pelo fator de transcrição nuclear NF-κB (COURTOIS e GILMORE, 2006). O complexo NF-κB é formado por uma família de cinco fatores de transcrição conservados evolutivamente: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 (NF-κB1) e p52 (NF-κB2) (GUPTA et al., 2010). Estes fatores possuem uma região altamente conservada no domínio N-terminal (NTD) denominado domínio de homologia REL (RHD), o qual realiza a formação de heterodímeros, a ligação ao DNA e a interação com a proteína inibitória de NF-κB (IκB)(ZHENG et al., 2011).

Em células de mamíferos foram descritos três tipos principais de IκBs: IκBa, IκBb e IκBε, as quais agem mascarando a sequência de localização nuclear que se encontra no RHD das subunidades de NF-κB. Além destes IκBs clássicos, proteínas atípicas que incluem *B cell CLL/ lymphoma 3*(BCL3), IκBζ e IκBNS também são membros da família de inibidores (VALLABHAPURAPU e KARIN, 2009).

A degradação de IκBs se dá de forma regulada e é dependente de cinases de IκB (IKK), um complexo composto por duas subunidades catalíticas IKKα e IKKβ e uma subunidade regulatória IKKγ. Este complexo é necessário para ativação da via clássica ou canônica de sinalização do NF-κB (Figura 6) (SHIH et al., 2010^A). Nesta via, as proteínas p65 e p50 do complexo NF-κB estão geralmente inativas e localizadas no citoplasma, enquanto se encontram ligadas ao IκB. Para que estas subunidades se desliguem de seu inibidor, é necessária uma fosforilação da IκB nos resíduos de serina 32 e 36, que é realizada pelo complexo IKK. Tal fosforilação conduz o inibidor à ubiquitinação e degradação via proteassomo 26S. O heterodímero p65/p50 é então translocado para o núcleo e ativa a transcrição gênica através da ligação a sequências específicas de DNA, conhecidas como sítios κB (KARIN e BEM-NERIAH, 2000; VANDENABEELE et al. 2010; GUPTA et al., 2010; ZHENG et al., 2011).

Na via não canônica (Figura 6), o homodímero de IKKα é ativado pela fosforilação mediada pela quinase NIK (cinase indutora de NF-κB). Então, o

complexo IKK α ativo fosforila o precursor p100 que é processado proteoliticamente em p52. Dessa forma, p52 forma um heterodímero com RelB, que é translocado para o núcleo e desempenha seu papel como ativador da transcrição gênica (GUPTA et al., 2010; VANDENABEELE et al. 2010; SUN, 2010).

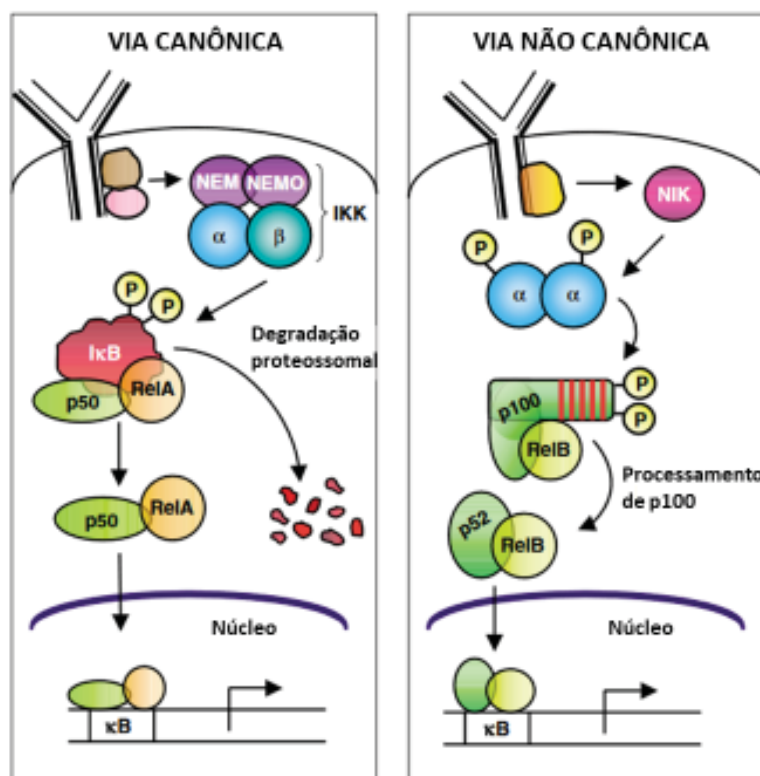


Figura 6. Vias de ativação de NF- κ B. Há duas vias principais de transdução de sinal NF- κ B: a via canônica e a não canônica. Na via canônica, o dímero p50/RelA é mantido no citoplasma por interação com I κ B. Ao se ter um estímulo, o complexo IKK se torna ativo e fosforila I κ B, o qual será degradado e leva ao deslocamento do dímero p50/RelA para o núcleo, ativando assim, a transcrição de genes alvo. Na via não canônica ocorre a ativação do complexo IKK (nesta via este complexo apresenta duas subunidades alfa), por meio da cinase indutora de NF- κ B (NIK) o qual, por sua vez, ativa o complexo p100/RelB que é processado a p52/RelB e este é deslocado para o núcleo a fim de exercer sua função.

Fonte: Adaptado de Gilmore (2006).

A ativação do NF- κ B pode ser iniciada por um grande número de estímulos extracelulares tais como: respostas inflamatórias (sinalização das citocinas interleucina (IL-1 β), TNF- α , CD40, RANK e BAFF-R); pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PMAPs) procariotos (LPS via TLR4 ou a patógenos virais, como dsRNA (double-stranded RNA) e ssRNA (single stranded RNA) via TLR3 e TLR7, respectivamente); pelos receptores de células B (BCR) e T (TCR); e também pelos receptores de fatores de crescimento como os membros da família EGFR (UMEZAWA, 2006; GUPTA et al., 2010).

Tem sido relatado que EROs apresentam papel dúbio relacionado à ativação do NF- κ B. De acordo com Morgan e Liu (2010) EROs podem ativar este fator de transcrição ao interferir na fosforilação de RelA. Tem sido descrito que espécies reativas do oxigênio podem atuar inibindo NF- κ B ao impedirem a capacidade de ligação deste fator de transcrição ao DNA (TOLEDANO e LEONARD,1991; MORGAN e LIU, 2010), bem como ao evitarem a fosforilação de subunidades inibidoras (KIL; KIM; PARK; 2008; WU et al., 2009). Ainda, de acordo com Zhou; Johnson; Rando (2001) NF- κ B pode sofrer inativação em resposta ao estresse oxidativo, a fim de elevar a atividade de enzimas antioxidantes e de promover a manutenção do equilíbrio redox.

Dessa forma, é evidente que a via de sinalização de NF- κ B apresenta papel crucial em diversos processos biológicos, incluindo a inflamação, imunidade, proliferação celular, a diferenciação e a sobrevivência (MORGAN e LIU, 2010). Nesse sentido, tem-se observado que a ativação de NF- κ B também está envolvida com a progressão e desenvolvimento tumoral, estabelecendo uma correlação entre câncer e inflamação.

Os primeiros relatos da possível conexão entre câncer e inflamação ocorreram no século XIX, onde Rudolf Virchow evidenciou a presença de leucócitos em torno de tumores (BALKWILL e MANTOVANI, 2001; VAN KEMPEN et al, 2006; GRIVENNIKOV et al, 2010; REUTER et al.,2010). Nas últimas décadas, esta associação vem sendo amplamente evidenciada. Tem sido observado que a inflamação crônica está envolvida na promoção de mutações, instabilidade genética e anormalidades cromossômicas, devido ao fato de que o processo inflamatório está vinculado a produção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), potentes indutores de dano ao DNA (COLOTTA et al. 2009; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Em relação ao envolvimento da via do NF- κ B e a tumorigênese, tem sido relatado que a ativação do mesmo culmina na transcrição de genes antiapoptóticos (como exemplo, Bcl-2 e Bcl-xl), indução da expressão de proteínas mitogênicas (Ciclina D1 e Ciclina D2), transcrição da expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8) e de metaloproteinases (MMPs), favorecendo a resistência a apoptose, a degradação da matriz extracelular (MEC) e a ocorrência de proliferação celular exarcebada e de metástase (LOBERG et al., 2007; GUPTA et

al., 2010). Desta forma, a ativação deste complexo é associada a um pior prognóstico em vários tipos de câncer (WU e KRAL, 2005; LI e SETHI, 2010).

Além disso, tem sido descrita a existência de retroalimentação positiva entre a ativação de NF- κ B e a sinalização inflamatória. Este *feedback* se dá por meio de citocinas pró-inflamatórias que induzem o complexo NF- κ B levando, por exemplo, a maior expressão de TNF- α , o qual recruta células do sistema imune potencializando a inflamação no microambiente tumoral. A ativação de NF- κ B pode ocorrer também pela ação de EROs, cuja produção é alta durante a ocorrência de processos inflamatórios. Por fim, diversos patógenos indutores de neoplasias também estão associados à ativação deste complexo (CHRECK; RIEBER; BEAUERLE, 1991).

Ainda, tem sido observado que o crescimento dos tumores pode ser regulado por células inflamatórias, tais como macrófagos, neutrófilos, *natural killers* (NK) e células de imunidade adaptativa (linfócito T e B) através da liberação de fatores de crescimento, enzimas, espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, quimiocinas, citocinas, prostaglandinas, entre outras moléculas bioativas no microambiente tumoral (VAN KEMPEN et al, 2006). Como exemplo de citocinas e quimiocinas envolvidas no crescimento e desenvolvimento tumoral pode-se citar a interleucina 6 (IL-6), a qual tem sido associada a iniciação e progressão tumoral, bem como a interleucina 8 (IL-8), envolvida na produção de espécies reativas de oxigênio, mecanismos de privação de nutrientes, indução de hipóxia e secreção de fatores pró-inflamatórios (TNF α , IL-1 β) (HOLMES et al, 1991; MURPHY e TIFFANY, 1991; WAUGH e WILSON, 2008).

Por fim, estudos tem evidenciado que outra enzima envolvida no desencadeamento do processo inflamatório e que está diretamente associada ao desenvolvimento de tumores trata-se da ciclooxigenase 2 (COX-2) (KOKI et al., 2002; NARKO et al., 2005; TELLIEZ et al., 2006; CHENG et al., 2012). Tem sido demonstrado que um grande número de células tumorais superexpressam esta enzima com o intuito de promover alterações no processo de adesão da matriz extracelular e na regulação do fator de crescimento endotelial vascular, além de conferir resistência à apoptose (SUBHASHINI; MAHIPAL; REDDANNA, 2005). Tais alterações se devem ao fato de que a COX-2 é responsável pela produção de diversos mediadores biológicos denominados prostanóides, como por exemplo as prostaglandinas (PGE2), que estão relacionadas a modulação da proliferação, morte celular e invasão tumoral em diversos tipos de câncer, indicando a relação entre

COX-2 e desenvolvimento tumoral (INOUE e TANABE, 1998; MARNETT et al., 1999; DENG; ZHU; WU, 2003; AGGARWAL et al., 2004).

O mecanismo molecular que correlaciona a carcinogênese ao processo inflamatório, bem como o envolvimento da COX-2 na interface destes processos está demonstrado na Figura 7. Durante o processo inflamatório, fosfolipídeos de membrana, pela ação da enzima fosfolipase, são convertidos em ácido araquidônico. Este, por sua vez, é substrato da COX-2, a qual atua convertendo o mesmo em prostaglandinas e tromboxanos. Tais mediadores podem atuar estimulando a carcinogênese através de duas ações principais: 1- elevação da expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2, conferindo resistência a apoptose e 2- elevação da expressão de metaloproteinases e VEGF, favorecendo a angiogênese tumoral e metástase (DEMPKE et al., 2001; WARIS e SIDDIQUI, 2005).

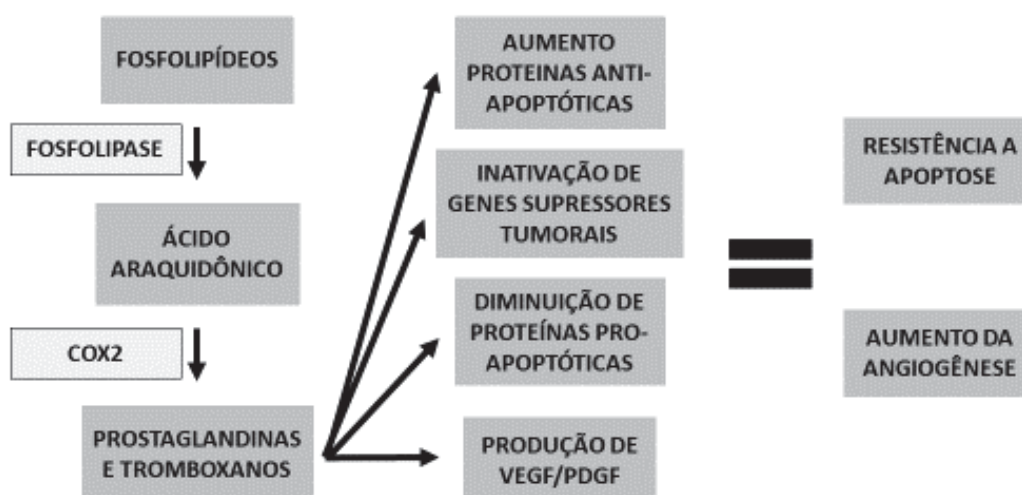


Figura 7. Esquema provável da interface entre a inflamação e a carcinogênese. O primeiro passo na síntese de prostaglandinas e tromboxanos é a hidrólise de fosfolípidos a ácido araquidônico, em uma reação catalisada pela fosfolipase. A segunda etapa desta via é catalisada pela COX-2, e leva a formação de prostaglandinas e tromboxanos, culminando no processo inflamatório. Por consequência, ocorre o aumento de proteínas anti-apoptóticas, diminuição de proteínas pró-apoptóticas, inativação de genes supressores tumorais e produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), que em conjunto, favorecem a carcinogênese. Fonte: Adaptado de Dempke et al, (2001).

Resumindo as informações descritas, a correlação entre estresse oxidativo, câncer e inflamação, está descrita na Figura 8.

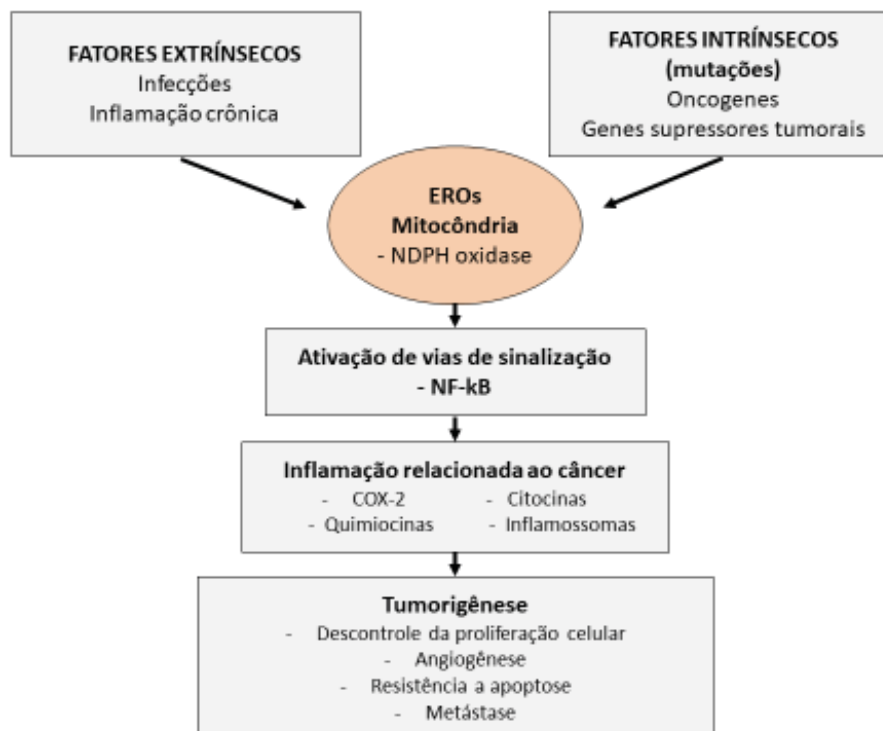


Figura 8. Relação entre estresse oxidativo, inflamação e câncer. Fatores intrínsecos e extrínsecos ao organismo podem desencadear alterações no equilíbrio redox, levando a ativação de vias de sinalização envolvidas no processo inflamatório (por exemplo, a via de NF-kB) e por consequência, a produção de fatores e citocinas que promovem a tumorigênese.

Fonte: Adaptado de Kamp; Shacter; Weitzman, 2011.

3.5 ALCALOIDES COMO AGENTES ANTITUMORAIS E ANTIINFLAMATÓRIOS

Alcaloides são compostos naturais que contém nitrogênio e possuem efeitos fisiológicos diversos e importantes para o organismo. Uma classe que chama a atenção dentre os alcaloides existentes, é a classe dos alcaloides indólicos, estes são substâncias que em sua estrutura, possuem o núcleo do indol oxidado, reduzido ou com um substituto equivalente. Estes alcaloides são classificados como derivados do aminoácido triptofano, que apresentam o cromóforo indol e derivados (MEN e TAYLOR, 1965).

Estes compostos são obtidos de plantas e apresentam diversas atividades farmacológicas, incluindo ação antitumoral e antiinflamatória. Nesse sentido, destacam-se os alcaloides da *Catharanthus roseus* G. Don. (Apocynaceae), como os dímeros vincristina e vimblastina e da *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae), por exemplo o paclitaxel, que atuam como inibidores do fuso mitótico. Estes alcaloides exercem efeito antitumoral significativo e são de grande utilidade no tratamento do câncer de mama, linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário, câncer

de testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil (BRANDÃO et al, 2010; SOUZA 2004; HOLANDA et al. 2008). Em relação a alcaloides indólicos com efeito antiinflamatório, pode-se citar, por exemplo, a colchicina, utilizada para o tratamento de gota e artrite gotosa (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006).

Mais exemplos de alcaloides isolados de plantas e que apresentam atividade antitumoral e/ou antiinflamatória estão presentes na Tabela 1.

Tabela 1. Alcaloides que apresentam atividade antitumoral e antiinflamatória.

Alcaloides com atividade antitumoral e antiinflamatória

| <i>Alcaloide</i> | <i>Fonte</i> | <i>Referência</i> |
|-------------------------|-------------------------------|--|
| Camptotecina | <i>Camptotheca acuminata</i> | (ZHANG et al., 2011) (JAYASOORIYA et al., 2015) |
| Caulerpina | <i>Caulerpa genus</i> | (YU et al., 2016) (SOUZA et al., 2009) |
| Piperina | <i>Piper nigrum</i> | (GRINEVICIUS et al., 2016) (BANG et al., 2009) |
| Barberina | <i>Berberis spp</i> | (SUN et al., 2009) (LI et al., 2014) |
| Sanguinarina | <i>Sanguinaria Canadensis</i> | (GAZIANO, 2016) (WANG et al., 2016) |
| Evodiamina | <i>Evodia rutaecarpa</i> | (LIAO et al., 2005) (LIAO et al., 2011) |

3.5.1 Constituição química, atividades farmacológicas e uso popular da espécie

Aspidosperma subincanum

A espécie *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC, conhecida popularmente como guatambu, perobinha ou pereiro, pertence a família Apocynaceae, pode ser encontrada em florestas dos Estados de São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Rio de Janeiro, Paraná, entre outros. Esta árvore pode alcançar 15 a 20 metros de altura e apresenta uma madeira resistente e dura (Figura 9) (LORENZI, 2008; OLIVEIRA, 2015).



Figura 9. *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC. **A** – Árvore, **B** – Superfície do ritidoma e cor da casca interna.
Fonte: KINOSHITA, 2005.

Há poucos estudos acerca da constituição química desta espécie. Alguns metabólitos de interesse medicinal foram isolados e relatados na literatura, sendo que o grupo que apresenta maior destaque é o de alcaloides indólicos (Tabela 2) (KOBAYASHI et al. 2002). Esta planta é utilizada para vários fins na medicina popular como, por exemplo, no combate ao diabetes, hipercolesterolemia e problemas no aparelho digestivo (TRESVENZOL, 1997; MONTELES; PINHEIRO, 2007).

TABELA 2. Exemplos de alcaloides isolados da espécie *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC.

| <i>Aspidosperma subincanum</i> Mart. ex A. DC | | | |
|---|--------------------|--------------------------------|---|
| Classe química | Substâncias | Atividade farmacológica | Referência |
| Alcaloides | Elipticina | Antitumoral; anti-HIV | Marques, 1988; Dalton et al. 1967 |
| | Subincanadinos | Atividade relaxante | Kobayashi et al. 2002 Lino e Garrote 2005; Benvindo et al, 2011. |

| | | |
|------------------|--|---|
| Pausperadina | | Ishiyama et al. 2005 |
| Uleina | Antiinflamatória; antimalárica; inibe a ação da acetilcolinesterase; promove a síntese de oxido nítrico. | Gaskell e Joule 1970; Nardin et al 2008; Seidl et al, 2011; Oiveira, 2010; Souza, 2007. |
| Dasicarpidona | | Gaskell e Joule, 1970 |
| Epidasicarpidona | | Gaskell e Joule, 1970 |

Dentre estes, a uleina (Figura 10), que apresenta estrutura molecular $C_{18}H_{22}N_2$, e foi obtido pela primeira vez em 1957 (SCHMUTZ; HUNZIKER; HIRT, 1957), vem sendo amplamente estudada quanto suas atividades biológicas. Tem sido relatado que este composto é capaz de inibir a acetilcolinesterase (SEIDL et al, 2011), promover a síntese de oxido nítrico (SOUZA, 2007), além de interferir na resposta inflamatória (NARDIN et al, 2008) e de apresentar atividade antimalárica (OLIVEIRA, 2010).

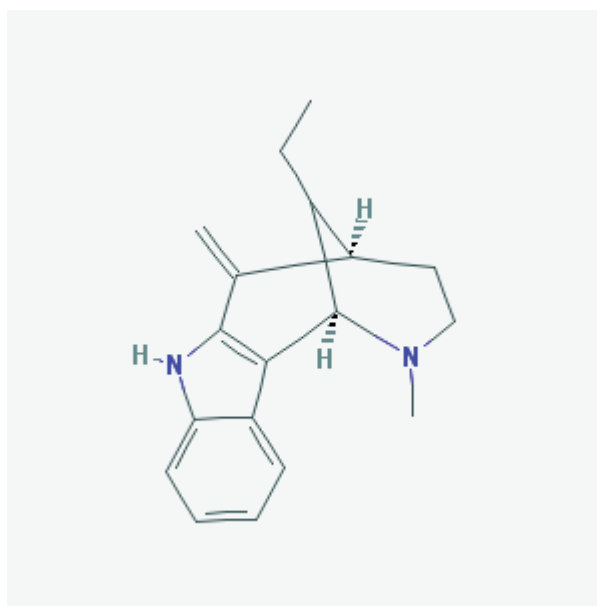


Figura 10. Fórmula estrutural da uleina.
Fonte: PubChem, 2018.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A estratégia experimental utilizada neste trabalho está descrita na Figura 11.

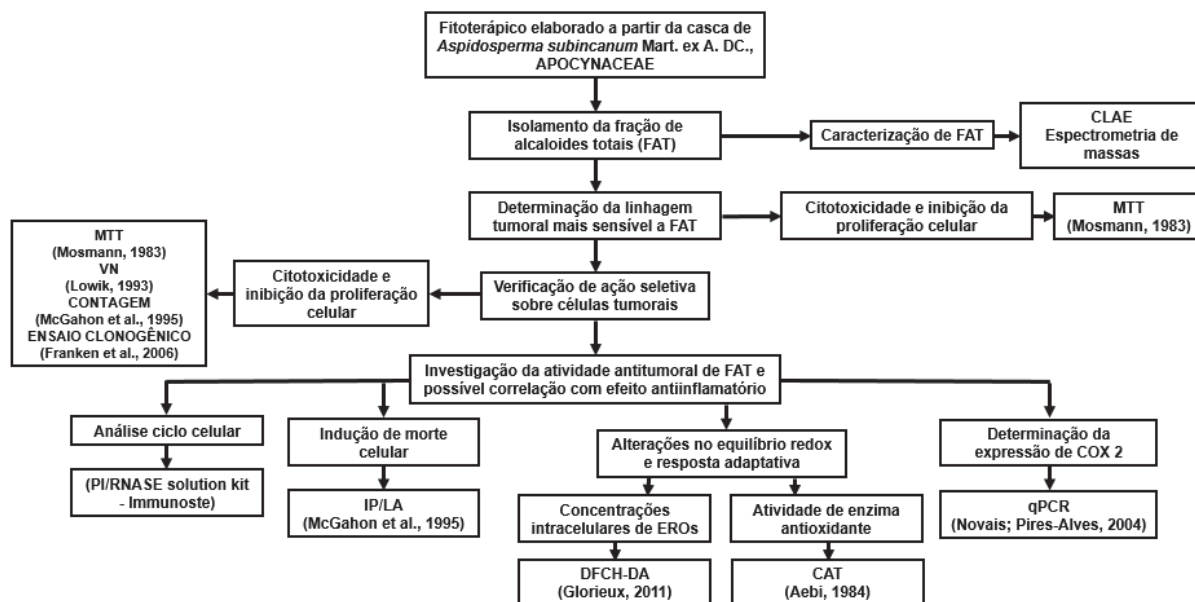


Figura 11. Estratégia experimental adotada para a investigação do potencial citotóxico e antiproliferativo *in vitro* da fração de alcaloides totais obtido de suplemento elaborado a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE.

Fonte: Dados do autor.

4.1 MATERIAL BOTÂNICO

O suplemento alimentar Para Pau Aspido 80[®] PL 430/31 (2 frascos/ 180 capsulas), o qual, como citado anteriormente, foi elaborado a partir das cascas de *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC., APOCYNACEAE, foi gentilmente doado pela empresa Parabolic Biological (Bélgica / França) em Junho de 2016 e intermediado por meio do contato do Prof. Tit. Cid Aimbire de Moraes Santos (UFPR). As cápsulas foram abertas (56,7 g) e o conteúdo colocado em solução de amônia 5% (pH 10 – 2 Litros) durante 7 dias. Em seguida, a cada 24 horas, o macerado foi coletado, filtrado em papel de filtro e armazenado em frasco âmbar. A cada coleta, foi adicionada ao suplemento, nova solução de amônia 5%. Este procedimento foi realizado até a extração completa dos alcaloides. O macerado obtido foi particionado com clorofórmio (CHCl₃) até verificar a ocorrência de reação negativa frente ao reativo de Dragendorff. A fração rica em alcaloides (FAT) foi concentrada em rotaevaporador RV 10 Digital V (IKA) sob pressão reduzida até

secura, obtendo 0,26 g (rendimento 1,7%). Por fim, FAT foi armazenada à temperatura de - 30°C até o momento do uso.

4.2 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS E CROMATOGRÁFICOS

A fração de alcaloides totais (FAT) foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (modelo SYS-LC-240-E, Varian), utilizando detecção UV no comprimento de onda de 305 nm. A cromatografia de fase reversa foi desenvolvida em coluna cromatográfica Microsorb MV 100 C18 (250 x 4,6 mm), tamanho da partícula de 5 µm (CicaMerk, Japão) e utilizando como fase móvel acetonitrila:metanol (10:90). A amostra foi preparada com metanol e a cromatografia realizada com fluxo de 0,8 mL/min; 50 µl da amostra foi injetada e o tempo de corrida total foi de 15 minutos. O padrão de uleina (27 mg) foi gentilmente cedido pela Dra. Cláudia Seidl da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

Os experimentos de infusão direta por espectrometria de massas foram conduzidos em um espectrômetro de massas do tipo triploquadropolo (QqQ) Waters Xevo TQD de baixa resolução equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI). A fonte de ionização foi operada no modo positivo utilizando-se, como solvente de diluição acetonitrila:H₂O (70:30 v/v). A bomba seringa operou em velocidade de 15 µL.min⁻¹ e a concentração das amostras utilizada para análise foi de 100 a 500 ng.mL⁻¹. Os parâmetros de análise foram ajustados manualmente no equipamento para estabilização do sinal e melhor ionização das substâncias. A voltagem do capilar foi ajustada em 3.500 V para o modo positivo com a temperatura da fonte ajustada em 150 °C. O nitrogênio foi utilizado como gás de nebulização com fluxo de 700 L.h⁻¹ e a pressão do gás de interface foi 50 L.h⁻¹. O tempo de aquisição dos espectros de massas (scan time) foi de um espectro por segundo, adquiridos com uma janela de massas de 100 a 500 Da, durante 30 segundos. Os espectros de massas adquiridos foram tratados no software Waters MassLynx® 4.1. Solventes e reagentes foram purificados antes do uso, por meio de métodos padrões e foram utilizados também solventes com grau HPLC. As vidrarias foram lavadas e secas em estufa antes do uso. Unidades e símbolos estão baseados no Système Internationale d'Unités (SI) de acordo com a recomendação da IUPAC.

4.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

4.3.1 Cultivo de células

As células das linhagens tumorais MCF7 (carcinoma humano de mama), HeLa (câncer cervical), U937 (linfoma histolítico) e HRT-18 (adenocarcinoma colorretal) foram obtidas comercialmente junto ao banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ). Já a linhagem celular McCoy (fibroblasto murino), foi obtida comercialmente do Instituto Adolfo Lutz.

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) suplementado com soro fetal bovino (10%), penicilina (100 U/ml) (GIBCO, Baltimore, EUA) e estreptomicina (100 µg/ml) (GIBCO, Baltimore, EUA).

As células foram mantidas em uma densidade de 1×10^5 células/ml de meio, à temperatura de 37°C e em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ e 95% de umidade.

4.3.2 Ensaio de viabilidade celular pelo sal de tetrazolium (MTT)

A viabilidade metabólica das linhagens HeLa, MCF7, HRT-18, U937 e McCoy foi avaliada pelo ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo) de acordo com Mosmann (1983), com modificações.

As células foram plaqueadas em placa de 96 poços (64×10^4 células/cm²), em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) suplementado, seguido de incubação em estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO₂) por 24 horas para adesão celular. Transcorrido esse período de tempo, foi realizada a remoção do meio de cultivo e adicionado meio com diferentes concentrações de FAT (10 – 350 µg/mL), e vincristina (VC) (0,5 – 50 nM), utilizada como controle positivo por ser um alcaloide indólico com efeito antitumoral devidamente caracterizado. Para o controle negativo usou-se meio de cultivo e veículo de diluição da fração (DMSO 0,1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

As células foram tratadas pelo período de 24, 48 e 72 horas. Passados os tempos de tratamento, o meio de cultura com FAT, VC ou veículo foi retirado e realizada a lavagem dos poços com tampão fosfato-salina (PBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 37°C por três vezes. Em seguida, foi adicionada uma solução de MTT

(Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (0,5mg/mL-200 μ L/poço) diluído em meio de cultivo. As placas foram incubadas em estufa por 2 horas. Decorrido o tempo de incubação, a solução contendo MTT foi retirada e acrescentado aos poços DMSO (PA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (100 μ L/poço) para solubilização dos cristais de formazan. As placas foram homogeneizadas e avaliadas espectrofotometricamente por leitor de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) a 570nm.

Este ensaio foi realizado em triplicata. Os valores de absorbância do controle negativo foram considerados como 100% de redução do sal, ou seja, 100% de viabilidade metabólica. Os valores de concentração inibitória mínima (CI_{50}) foram determinados a partir do software GraphPad Prisma 5 (San Diego, EUA).

4.3.3 Ensaio de viabilidade celular pelo vermelho neutro (VN)

A viabilidade lisossomal das linhagens MCF7 e McCoy foi avaliada pelo teste de VN, de acordo com Lowik (1993), onde as células foram plaqueadas, em placa de 96 poços (64 x 10⁴ células/cm²) em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) seguido de incubação em estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO₂) por 24 horas para adesão celular.

Posteriormente, foi realizada a remoção do meio de cultivo e adicionado meio com diferentes concentrações de FAT (10 – 350 μ g/mL), VC (0,5 – 50 nM) e veículo de diluição da fração (DMSO 0,1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) pelo período de 72 h.

Transcorrido o tempo de tratamento, o meio contendo a fração teste e controles foi retirado e realizada a lavagem dos poços com tampão fosfato-salina (PBS) a 37°C por três vezes. Em seguida, foi adicionada uma solução de VN (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (1mg/mL-200 μ L/poço) diluído em meio de cultivo, sendo a placa incubada em estufa por 2 horas. Decorrido o tempo de incubação, a solução contendo VN foi retirada e acrescentado aos poços uma solução de NaH₂PO₄ 0,05M em etanol 50% (100 μ L/poço). A placa foi homogeneizada e avaliada espectrofotometricamente por leitor de placas Multiskan FC (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA) a 540nm, sendo este ensaio realizado em triplicata.

Os valores de absorvância do controle negativo foram considerados como 100% de redução do sal, ou seja, 100% de viabilidade celular. Os valores de CI_{50} foram determinados a partir do software GraphPad Prisma 5 (San Diego, EUA).

4.3.4 Ensaio de contagem celular

Células MCF7 e McCoy foram plaqueadas (cada uma) em 9 poços de uma placa de 12 poços. O plaqueamento foi realizado (64×10^4 células/cm²) em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA), seguido de incubação em estufa (37°Ce atmosfera de 5% de CO₂) por 24 h para adesão celular. Após este período, o meio foi removido e as células foram tratadas por 72 h com FAT (32 µg/mL), VC (16 nM) e veículo (DMSO 0,1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Procedeu-se à contagem imediata das células presentes em três poços, referentes a cada um dos tratamentos descritos anteriormente. A contagem realizada logo após 72 h de exposição ao FAT, foi efetuada com o intuito de caracterizar-se a resposta imediata das células a fração (dia 0). Em relação aos demais poços, realizou-se a retirada do tratamento, seguida pela lavagem com PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e reincubação com meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) livre de compostos. Contagens foram realizadas 2 e 4 dias após o término de tratamento com FAT, com o objetivo de verificar se o efeito citotóxico e/ou antiproliferativo promovido pela fração foi persistente após a retirada da fração (Figura 12) (McGAHON et al., 1995). Este ensaio foi realizado em triplicata e as contagens foram realizadas utilizando hemocitômetro.

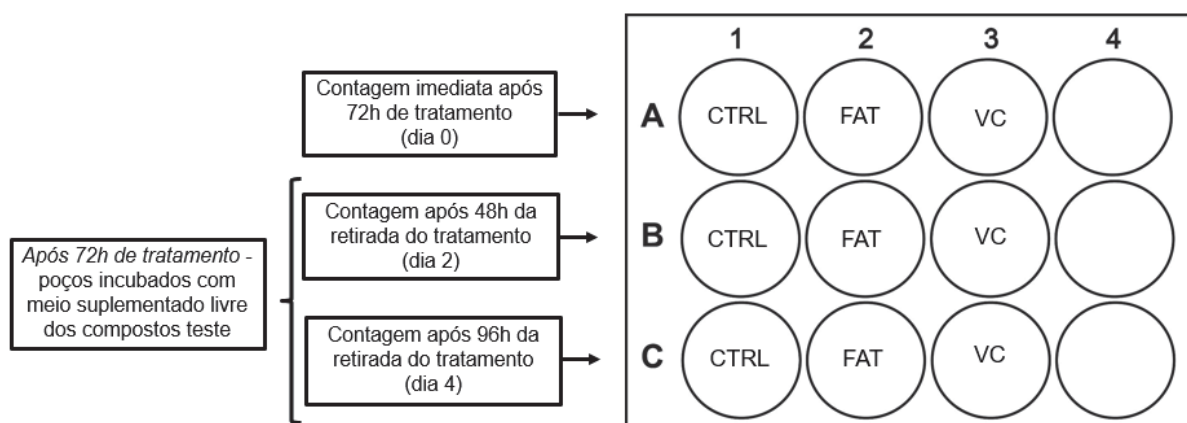


Figura 12. Esquema de contagem das células MCF7 e McCoy após 72 horas de tratamento com FAT e VC.

FONTE: Dados do autor.

4.3.5 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)

Células McCoy e MCF7 foram plaqueadas em placas de 6 poços (64×10^4 células/cm²) em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA), seguido de 24 horas de incubação em estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO₂). Após esse período, as células foram tratadas com os valores correspondentes a CI₂₅ (calculadas por meio da execução do teste do MTT) de FAT e VC. Como controle negativo foi utilizado meio de cultivo e veículo (DMSO 0,1%, Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Ao fim das 72 horas, o meio de cultivo foi retirado e os poços lavados com PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por três vezes. As células foram incubadas com meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA) livre de compostos até verificação da formação de colônias, ou seja, presença de uma ou mais colônias com aproximadamente 50 células (aproximadamente 9 dias para a linhagem MCF7 e 3 dias para a linhagem McCoy).

Visualizadas as colônias, estas foram fixadas com metanol 70% e coradas com uma solução de cristal violeta 0,2% para posterior quantificação (FRANKEN et al, 2006). Este ensaio foi realizado em triplicata. As imagens foram analisadas pelo programa de processamento de imagem ImageJ versão 1.51p, de acordo com Guzmán et al (2014) e pelo software em desenvolvimento descrito no Capítulo 2 deste trabalho. Os resultados foram expressos pela área ocupada pelas colônias em um poço com superfície para crescimento das células de 9,60 cm².

4.3.6 Análise do ciclo celular

A avaliação de modificações induzidas no ciclo celular pelo tratamento com FAT (19,2 µg/mL) e VC (9,6 nM) foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se o kit PI/RNASE solution (Immunostep), de acordo com as instruções do fabricante.

Células MCF7 foram plaqueadas em placas de 6 poços (64×10^4 células/cm²) em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA), sendo incubadas em estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO₂) por 24 horas. Após esse tempo foi realizada a sincronização destas com nocodazol (30 ng/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) por 14 horas. A seguir, as células foram submetidas ao tratamento com FAT e VC por 72 h. Ao fim do tratamento, as células foram tripsinizadas, lavadas com PBS (Sigma-

Aldrich, St. Louis, EUA), ressuspensas em etanol 70% refrigerado e incubadas *overnight* a -20°C .

Após a fixação das células, as mesmas foram lavadas com uma solução de PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) + BSA 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e incubadas em uma solução de iodeto de propídeo e RNase por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCANTO II (BD Biosciences, New Jersey, EUA). A avaliação dos dados foi realizada utilizando-se o software *Flowing Software 2.5* determinando-se o percentual de células agrupadas em cada fase do ciclo celular. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.7 Coloração diferencial com Iodeto de Propídeo e Laranja de Acridina (IP/LA)

Para análise do tipo de morte celular induzido por FAT, células MCF7 foram plaqueadas (64×10^4 células/cm²) em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA), em placas de 12 poços, seguido de incubação em estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO₂) por 24 horas e posterior tratamento com FAT (32µg/mL) e VC (16 nM). Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), tripsinizadas e ressuspensas em PBS (25µl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) contendo solução corante (1 µl) constituída por IP (100µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e LA (100µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) (1:1). A suspensão celular corada foi observada entre lâmina e lamínula em microscópio de fluorescência Olympus BX41 (Olympus Optical Ltd, Tokio, Japão), obtendo-se o registro fotográfico de 10 campos microscópicos de cada amostra, os quais foram selecionados aleatoriamente. Para captura das imagens foi utilizado o programa Q-capture Pro 5.1, Q-imaging.

Com o auxílio do programa processador de imagem ImageJ versão 1.51p, foram contabilizadas 300 células de cada amostra nas imagens obtidas, quantificando-se o percentual de células viáveis, necróticas e apoptóticas (McGAHON et al., 1995). Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.8 Determinação da concentração intracelular de espécies reativas do oxigênio (EROs)

A avaliação dos níveis intracelulares de EROs foram mensurados de acordo com o método descrito por Glorieux e colaboradores (2011), com pequenas modificações. Células MCF7 foram plaqueadas (64×10^4 células/cm²) em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA), em placas de 6 poços, seguida de incubação em estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO₂) por 24 horas e posterior tratamento com FAT (32 µg/mL), doxorubicina (DOXO) (1 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), N-acetilcisteína (NAC) (5 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), TROLOX (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) (2 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), DOXO (1 nM) + FAT (32 µg/mL), DOXO (1 nM) + NAC (5 mM) e DOXO (1 nM) + TROLOX (2 mM) por 24, 48 e 72 horas. Para validar o ensaio, DOXO foi utilizada como controle positivo para a indução de EROs, enquanto NAC e TROLOX (análogo da vitamina E) foram usadas como controle positivo para ação antioxidante.

Passado o tratamento, as células foram lavadas, tripsinizadas e incubadas em uma solução de 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (10 µM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) previamente diluída em HBSS (KCl 5,3 mM; KH₂PO₄ 0,44 mM; NaHCO₃ 4,2 mM; NaCl 137,9 mM; Na₂HPO₄ 0,34 mM; D-glicose 5,55 mM; vermelho fenol 0,027 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a temperatura ambiente por 30 minutos. Decorrido esse tempo, as células foram centrifugadas, ressuspensas em HBSS (500µl) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e submetidas a análise no citômetro de fluxo BD FACSCANTO II (BD Biosciences, New Jersey, EUA). As análises foram realizadas utilizando-se o software Flowing Software 2.5 para determinação da intensidade da fluorescência em cada amostra. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.9 Determinação da atividade de enzima antioxidante (CAT)

A atividade da enzima antioxidante foi mensurada de acordo com Aebi (1984). Células MCF7 foram plaqueadas em uma densidade celular de 64×10^4 células/cm² em placas de petri de 100 mm² em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA),

seguida de incubação em estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO₂) por 24 horas e posterior tratamento com FAT (32 µg/mL), DOXO (1 nM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e DOXO (1 nM) + FAT (32 µg/mL), por 24, 48 e 72 horas. Passado o tempo de tratamento, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em tampão de lise (tampão fosfato Na/K 20 mM (pH 7,4) em 0,1% de Triton e 150 mM NaCl), sendo as amostras imediatamente armazenadas em nitrogênio até o momento da análise.

Em placa de 96 poços apropriada para leitura em UV, foram adicionados 5 µL de amostra e 200 µL de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mM) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em tampão fosfato (50 mM - pH 7,0). A leitura da queda de absorvância foi medida espectrofotometricamente no SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Microplate Reader (Molecular Devices, Califórnia, EUA) a 240 nm por 5 minutos a cada 20 segundos. A atividade da enzima foi expressa em mmol.min⁻¹.mg⁻¹. Os resultados foram normalizados com o conteúdo protéico das amostras utilizando o método de Lowry (Lowry, 1951). Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.3.10 Avaliação do efeito de FAT sobre a transcrição de COX-2

A expressão de COX-2 foi avaliada plaqueando 64 x 10⁴ células/cm² em placas de petri de 100mm² em meio RPMI 1640 (GIBCO, Baltimore, EUA), seguida de incubação em estufa (37°C e atmosfera de 5% de CO₂) por 24 horas e posterior tratamento com FAT (32µg/ml), dexametasona (DEXA) (100nM – utilizada como controle positivo) e veículo (DMSO 1%), por 72 h. Transcorrido o tratamento, as células foram lavadas com PBS (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), sendo realizada a extração do RNA pela lise das células com Trizol (Invitrogen, Califórnia, EUA). A seguir, o trizol foi coletado e transferido a microtubos contendo 250 µL de clorofórmio, seguido de homogeneização por inversão por 15 segundos e incubação por 3 minutos. Decorrido este tempo, os microtubos foram centrifugados por 15 minutos (10000 RPM, 4°C), sendo coletado o sobrenadante, o qual foi transferido para novos microtubos que continham 500 µl de isopropanol absoluto. Realizou-se incubação *overnight* a -20°C.

Passado o tempo de incubação, uma nova centrifugação foi realizada por 20 minutos (10000 RPM, 4°C) para a formação de pellet, o qual foi lavado duas vezes com 1 mL de etanol 75% (em água DEPC) e centrifugado novamente por 10 minutos

(6000 RPM, 4°C). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 10 µL de água DEPC. A pureza e a concentração do RNA foram verificadas pela razão da absorbância mensurada a 260 nm e 280 nm em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose.

A seguir, o RNA foi convertido em cDNA utilizando-se iniciadores constituintes do kit High Capacity RNA-to-cDNA (AppliedBiosystems, Foster City, EUA). O padrão de expressão do gene da proteína COX-2 foi determinado por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR) com EvaGreen Master Mix S (ABM, Richmond, Canada). Nesta etapa, foram utilizados iniciadores específicos para o gene da COX-2: 5'-GCTCAGGTTGCCTATGTGCT-3' (forward) e 5'-CGGTTACATTTCTCCTCCA-3' (reverse) e do gene normalizador HPRT: 5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' (forward) e 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3' (reverse). A análise foi realizada em sistemas de 10 µL no equipamento Rotor-Gene 6000 (CorbettResearch, Mortlake, Austrália) (NOVAIS; PIRES-ALVES, 2004). A expressão relativa dos genes foi analisada por meio do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (BUSTIN et al., 2009; HUGGETT et al., 2013; LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Este ensaio foi realizado em triplicata.

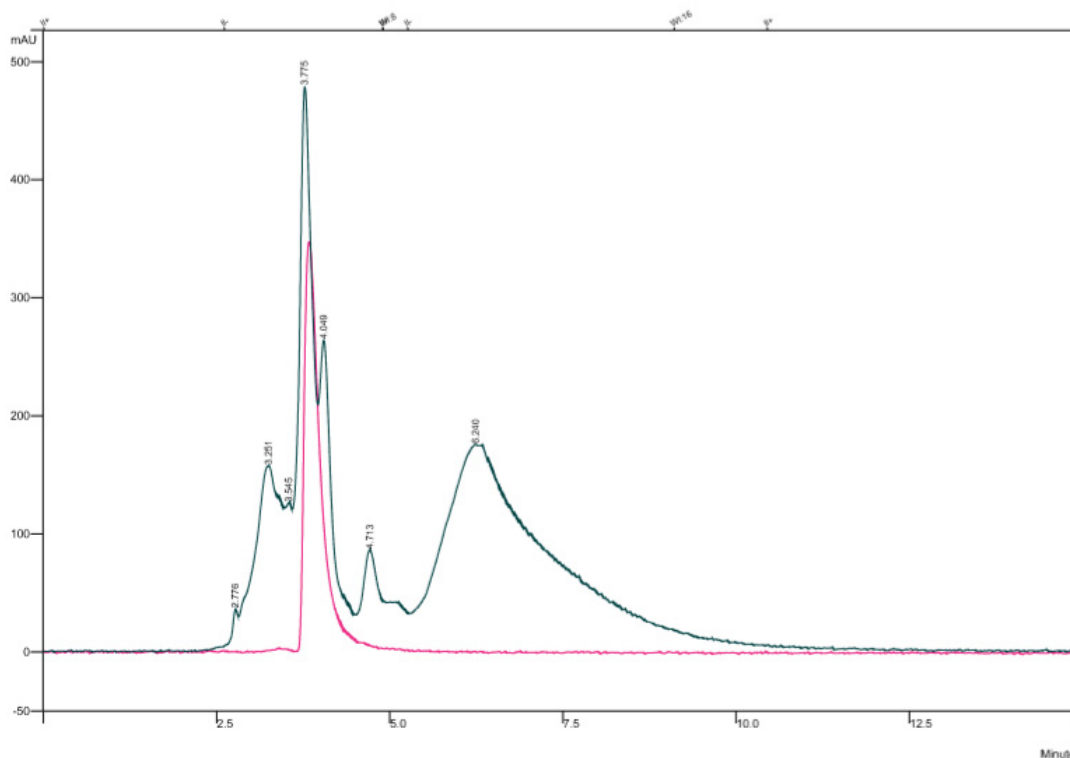
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão ou erro padrão da média. Para avaliar os resultados entre os grupos foram realizadas análise de variância ANOVA, complementada pelo teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,001$, $P < 0,01$ e $P < 0,05$. As análises foram realizadas com o uso do software GraphPad Prisma(San Diego, EUA).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 MÉTODOS ESPECTROMÉTRICOS E CROMATOGRÁFICOS

A análise de FAT por meio de CLAE realizada por meio de detecção UV no comprimento de onda de 305 nm revelou a presença de uma mistura complexa, contendo a presença de pelo menos sete (7) alcaloides, sendo que os principais picos apresentaram tempo de retenção de 3,25 (13,83%), 3,77 (23,24%), 4,04 (10,59%), 4,71 (1,09%), 6,24 min (47,33%) (Figura 13). O pico de 3,77 minutos foi identificado como sendo a uleina. Outros alcalóides indólicos também foram detectados, porém não foram identificados.



Injection Date: Tue Aug 08 09:56:37 2017 Recalculation : Tue Aug 08 10:49:42 2017 **A**
 Operator : Operator Detector Type : 335
 Workstation : Bus Address : 46
 Instrument : Instrument #1 Sample rate : 10.000 Hz
 Channel : 1 = 305 nm Run Time : 15.000 min.

** LC Workstation Version 6.20 ** 01857-20C0-EA4-04E1 **

Run Mode: Analysis Peak Measurement: Area Calc. Type: % Normalize Results: No

| Peak No. | Name | tR (min) | Result | Sep. Code | W 1/2 (sec) | Efficiency Plates | Efficiency Plates/m | k' | R | Tailing (5.0%) |
|----------|------|----------|--------|-----------|-------------|-------------------|---------------------|------|-----|----------------|
| 1 | | 2.796 | 0.027 | BB | 2.64 | 22394 | 89577 | 1.80 | | 0.86 |
| 2 | | 2.946 | 0.036 | BV | 2.92 | 20318 | 81270 | 1.95 | 1.9 | N/A |
| 3 | | 2.999 | 0.026 | VV | 4.35 | 9489 | 37958 | 2.00 | 0.5 | N/A |
| 4 | | 3.101 | 0.041 | VV | 5.60 | 6120 | 24480 | 2.10 | 0.7 | N/A |
| 5 | | 3.234 | 0.109 | VV | 7.60 | 3614 | 14456 | 2.23 | 0.7 | N/A |
| 6 | | 3.320 | 0.131 | VV | 0.00 | 0 | 0 | 2.32 | N/A | N/A |
| 7 | | 3.402 | 0.332 | VV | 0.00 | 0 | 0 | 2.40 | N/A | N/A |
| 8 | | 3.500 | 0.218 | VP | 16.72 | 874 | 3498 | 2.50 | N/A | N/A |
| 9 | | 3.837 | 99.080 | PB | 13.73 | 1559 | 6237 | 2.84 | 0.8 | 2.44 |

Injection Date: Tue Aug 08 10:19:38 2017 Recalculation : Tue Aug 08 10:50:21 2017 **B**
 Operator : Operator Detector Type : 335
 Workstation : Bus Address : 46
 Instrument : Instrument #1 Sample rate : 10.000 Hz
 Channel : 1 = 305 nm Run Time : 15.000 min.

** LC Workstation Version 6.20 ** 01857-20C0-EA4-04E1 **

Run Mode: Analysis Peak Measurement: Area Calc. Type: % Normalize Results: No

| Peak No. | Name | tR (min) | Result | Sep. Code | W 1/2 (sec) | Efficiency Plates | Efficiency Plates/m | k' | R | Tailing (5.0%) |
|----------|------|----------|--------|-----------|-------------|-------------------|---------------------|------|-----|----------------|
| 1 | | 2.776 | 0.549 | BV | 5.06 | 6008 | 24034 | 1.78 | | N/A |
| 2 | | 3.251 | 13.837 | VV | 0.00 | 0 | 0 | 2.25 | N/A | N/A |
| 3 | | 3.545 | 2.543 | VV | 0.00 | 0 | 0 | 2.55 | N/A | N/A |
| 4 | | 3.775 | 23.243 | VV | 13.79 | 1496 | 5984 | 2.78 | N/A | N/A |
| 5 | | 4.049 | 10.595 | VP | 15.62 | 1341 | 5364 | 3.05 | 0.7 | N/A |
| 6 | | 4.713 | 1.903 | PB | 16.88 | 1556 | 6226 | 3.71 | 1.4 | 1.07 |
| 7 | | 6.240 | 47.330 | BB | 71.36 | 153 | 611 | 5.24 | 1.2 | 1.99 |

Figura 13. Perfil cromatográfico da fração de alcaloides totais (FAT) (linha azul escura) e padrão de oleína (linha rosa), usando uma fase móvel de acetonitrila:metanol (10:90), coluna C18, fluxo de 0,8 ml/min e absorvância de 305 nm, apresentando tempo de retenção e com suas respectivas

porcentagens de pureza (retângulo vermelho). **(A)** Porcentagens de pureza do padrão de uleína. **(B)** Porcentagens de pureza da FAT.
 Fonte: Dados do autor.

Foi realizada uma infusão direta da FAT no espectrômetro de massa, onde foi possível detectar o íon de razão massa/carga (m/z) 267 $[M+H]^+$ que caracteriza a uleína ($C_{18}H_{22}N_2$). Fragmentos em m/z 251 $[M-CH_3]^+$ e m/z 237 $[M-C_2H_5]^+$ indicam a presença de um grupo metila terminal (C-18/19) e também a perda de (C_2H_5), respectivamente, como também o aparecimento de sinais de derivados do carbazol (m/z 167) que confirmam a presença de alcaloide do grupo indólico. O fragmento $[M-C_2H_5]^+$ pode ser explicado pela localização de íon na ligação C-14/15, que é ativada pela posição alila, e ocorrendo a quebra da ligação e perda de radical etila com formação subsequente de fragmentos com m/z 237. A perda do substituinte de C-21 com transferência de um hidrogênio N-metil pode ocorrer a formação de m/z 181 e subsequente perda de hidrogênio benzílico de m/z 181 ou perda da cadeia lateral amina formando a espécie totalmente conjugada m/z 180 (Figura 14).

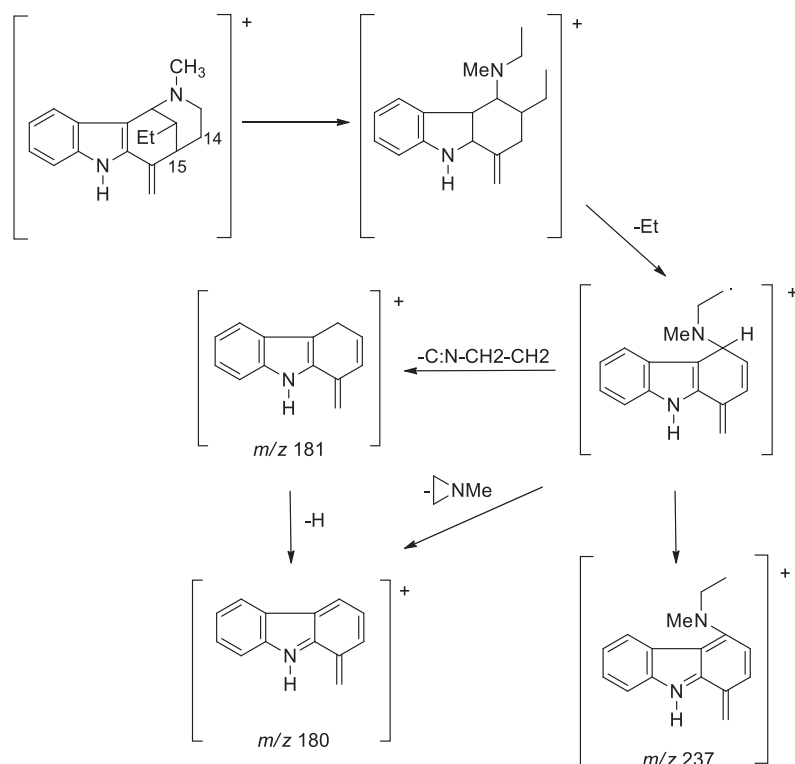


Figura 14. Provável fragmentação da uleína no ESI.

O importante íon m/z 209 pode ser formado por rearranjo de hidrogênio através de um intermediário de seis membros, adicional quebra da ligação benzílica com perda de um radical metila originando o íon m/z 194 (Figura 15).

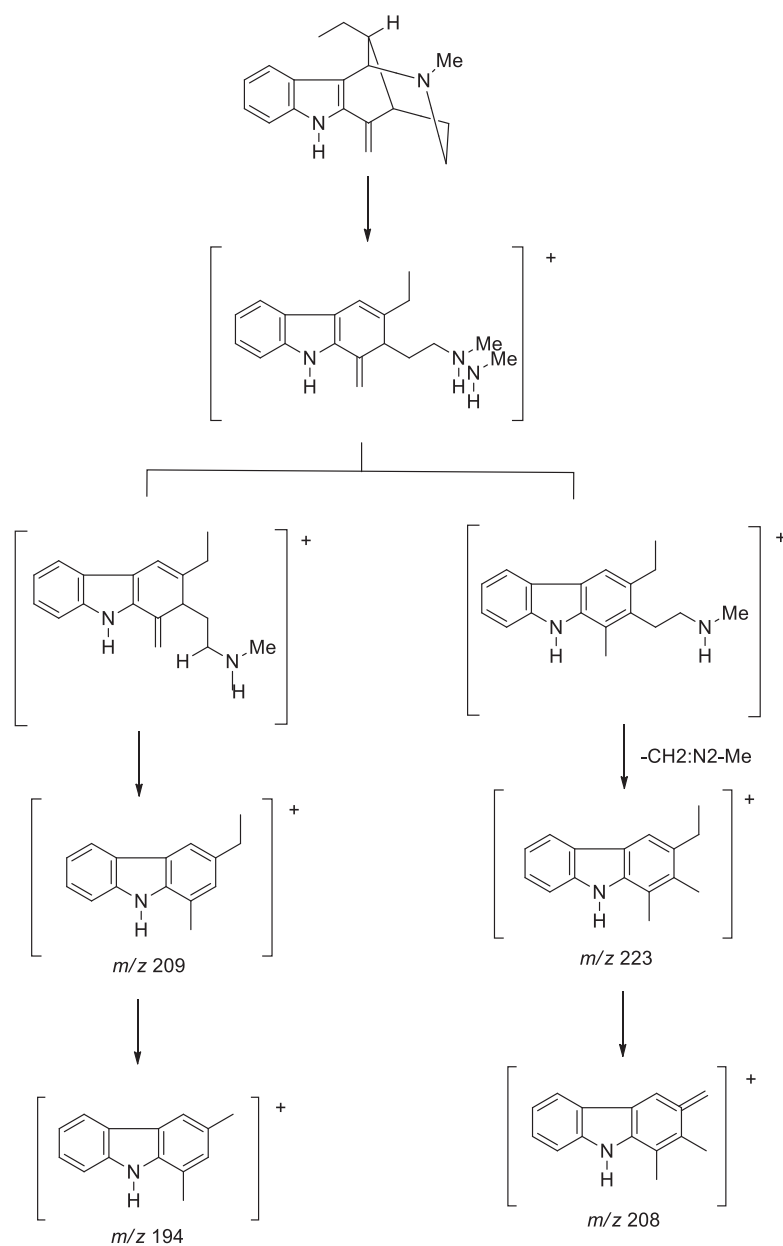


Figura 15. Possível fragmentação da uleína no ESI.

Outros fragmentos estão presentes em m/z 221, 182, 168, 144, 130, 124 e 110 (Figura 16) e de acordo com Budzikiewicz e colaboradores (1964), Manske e Rodrigo (1965) e Dolabela e colaboradores (2015) comprovam a identificação da uleína.

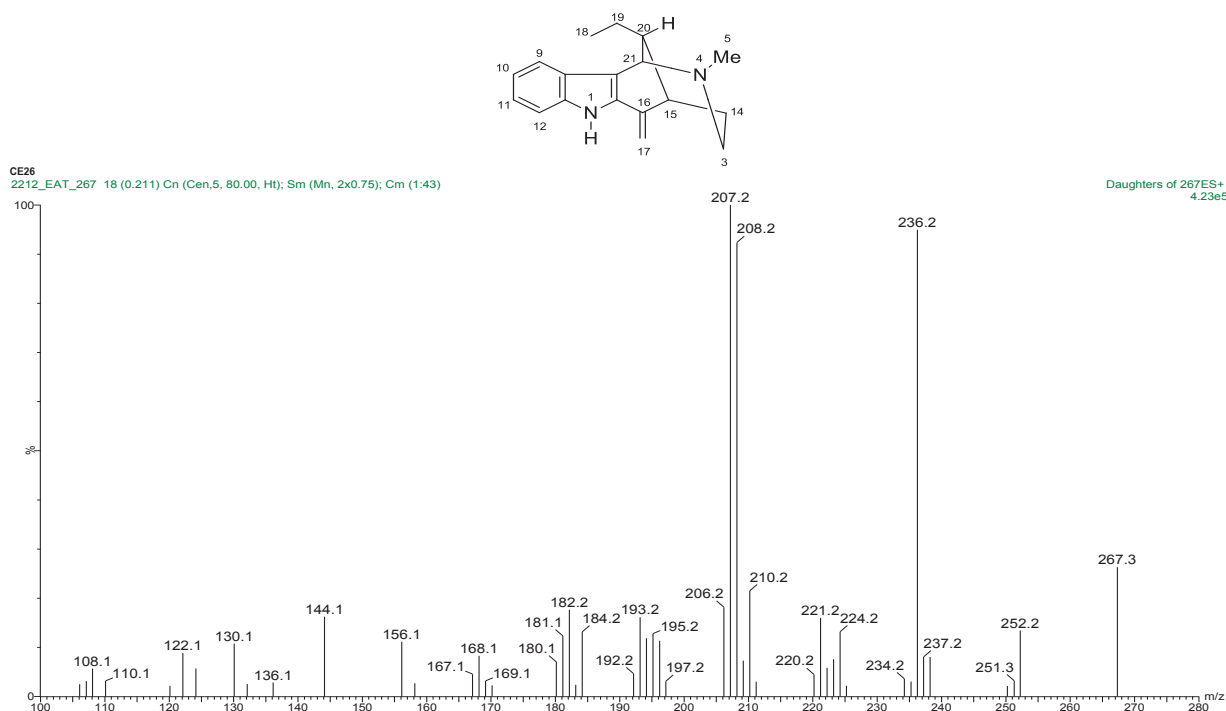


Figura 16. Espectro de massas de FAT por infusão direta (DIMS).

Fonte: Dados do autor.

6.2 ENSAIOS BIOLÓGICOS

6.2.1 Ensaio de viabilidade celular pelo sal de tetrazolium (MTT) e pelo vermelho neutro (VN)

Os resultados obtidos por meio do ensaio MTT nas linhagens HeLa, MCF7, HRT-18 e U937 estão presentes na Tabela 3.

TABELA 3. Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) determinados para FAT em linhagens tumorais tratadas por 24, 48 e 72 horas com diferentes concentrações da fração teste (10 – 350 $\mu\text{g/mL}$).

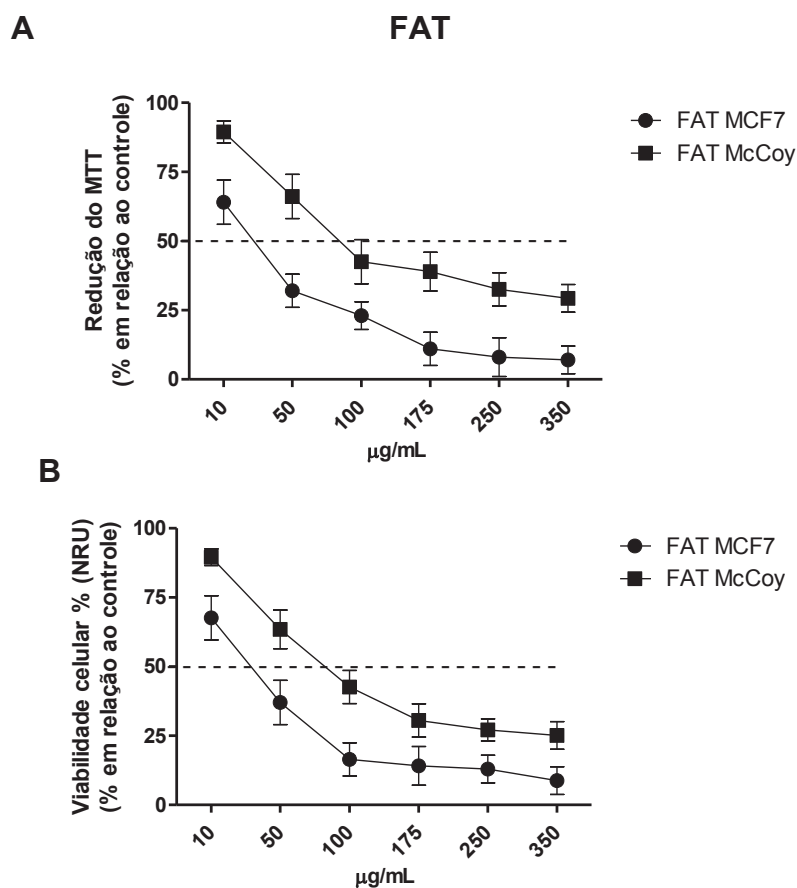
| Tempo de tratamento | Citotoxicidade (CI_{50}) | | | |
|----------------------------|--|-------------|---------------|-------------|
| | HeLa | MCF7 | HRT-18 | U937 |
| 24 horas | 263±20 | 172±15 | 375±13 | 156±25 |
| 48 horas | 136±16 | 95±19 | 297±12 | 143±23 |
| 72 horas | 86±5 | 32± 1 | 107±9 | 120±17 |

Fonte: Dados do autor (2017).

Os resultados indicaram que, dentre todos os períodos de tempo e tipos celulares avaliados, FAT apresentou maior citotoxicidade e/ou efeito antiproliferativo em células MCF7 após 72 horas de tratamento, mostrando que tal ação é tempo dependente e variável entre as diversas linhagens avaliadas, sendo mais efetiva em linhagem de câncer de mama (Tabela 3).

Uma vez que extratos ou frações com valores de CI_{50} inferiores a 30 $\mu\text{g/mL}$ são considerados antineoplásicos em potencial (SUFFINESS e PEZZUTO, 1990; ITHARATA et al., 2004; ALZEER et al., 2014), e, observando-se que a CI_{50} de células MCF7 após a exposição a FAT por 72 h foi de 32 $\mu\text{g/mL}$, verificou-se que estas seriam as condições adequadas (concentração e tempo) para dar continuidade aos ensaios. Nesse segundo momento, procurou-se verificar se a atividade citotóxica e/ou antiproliferativa apresentada por FAT ocorre de maneira seletiva, uma vez que foram realizados paralelamente, ensaios de MTT e VN em linhagem celular tumoral (MCF7) e normal (McCoy).

Os valores obtidos pelo ensaio de MTT e VN para FAT e controles em células MCF7 e McCoy em 72 horas estão apresentados na Figura 17.



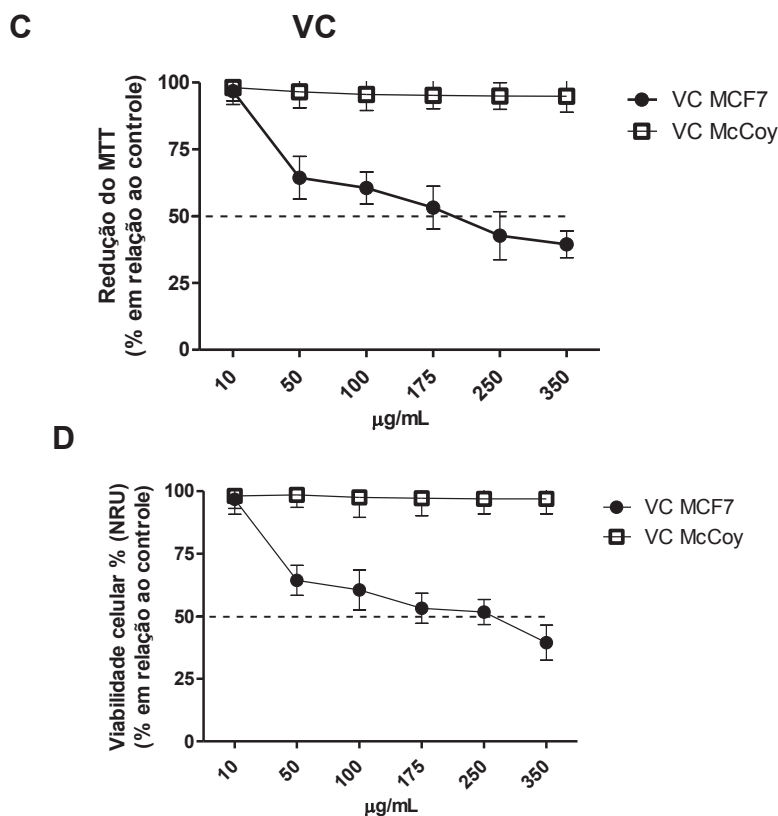


Figura 17. Efeito citotóxico e/ou antiproliferativo da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e da vincristina (VC) sobre células MCF7 e McCoy após 72 h de tratamento. Efeito citotóxico e/ou antiproliferativo de FAT sobre células MCF7 e McCoy de acordo com o ensaio de MTT (A) e VN (B). Efeito citotóxico e/ou antiproliferativo de VC sobre células MCF7 e McCoy de acordo com o ensaio de MTT (C) e VN (D).
Fonte: Dados do autor.

Como mencionado anteriormente, o tratamento com FAT apresentou efeito citotóxico/antiproliferativo sobre a linhagem tumoral, evidenciado agora, pelos testes de MTT e VN. Os valores de CI_{50} obtidos para as células MCF7 foram de 32 e de 42 $\mu\text{g/mL}$ nos ensaios de MTT e VN, respectivamente. Para a linhagem murina (McCoy – não tumoral), FAT apresentou citotoxicidade reduzida quando comparada ao efeito induzido na linhagem tumoral, uma vez que os valores de CI_{50} determinados após 72 h de exposição à fração, foram de 80 $\mu\text{g/mL}$ no ensaio de MTT e de 73 $\mu\text{g/mL}$ no teste de VN. Os dados obtidos evidenciam determinada seletividade da fração sobre a linhagem tumoral humana quando comparada a linhagem não tumoral murina.

Cabe ressaltar que os resultados obtidos estão de acordo com o preconizado pela literatura, tendo sido demonstrado o efeito citotóxico da uleína sobre células tumorais B16F10 (carcinoma de pele murino) (Souza, 2007). Também foi verificada a atividade citotóxica deste alcaloide sobre *Plasmodium falciparum*, evidenciando a ação antimalárica do mesmo (Oliveira et al., 2010). Além disso, De Lima e

colaboradores (2010), mostraram que um extrato de *Himatanthus lancifolia*, rico em alcalóides, particularmente a uleína, apresentou ação citostática em células leucêmicas (K-562, Daudi). Já Nardin e colaboradores (2008), mostraram que concentrações de uleína inferiores a 100 µg/mL não interferiram na viabilidade celular de monócitos e granulócitos humanos, evidenciando a atividade seletiva deste composto sobre linhagens neoplásicas.

A vincristina, utilizada como controle positivo, apresentou como CI_{50} os valores de 16 nM e 26 nM nos ensaios do MTT e VN, respectivamente. Observou-se ainda que VC não apresentou efeito sobre a linhagem McCoy, demonstrando o efeito seletivo deste fármaco e corroborando os dados da literatura, os quais demonstram efeitos seletivos da vincristina sobre linhagens tumorais (BURDMAN, 1966; JOHNSON et al., 1973; VILPO; KOSKI; VILPO, 2000).

Por fim, salienta-se que VC foi selecionada neste estudo como controle positivo por tratar-se de um alcaloide indólico amplamente utilizado na clínica para o tratamento de diversos tipos de câncer (BLAJESKI et al., 2002; GROTH-PEDERSEN et al., 2007; ESMAEILI-MAHANI; FALAHI; YAGHOUBI, 2014), ou seja, optou-se em usar VC pelo fato de pertencer à mesma classe química da uleína, composto presente na fração em estudo, e não pelo mecanismo de ação proposto para FAT, uma vez que VC não apresenta efeito antitumoral vinculado a ação antiinflamatória e sim por atuar na desestabilização dos microtúbulos (JOHNSON et al., 1963; SAITO, 2009).

6.2.2 Ensaio de contagem celular

Os resultados do ensaio de contagem para células MCF7 e McCoy estão presentes na figura 18A e 18B, respectivamente.

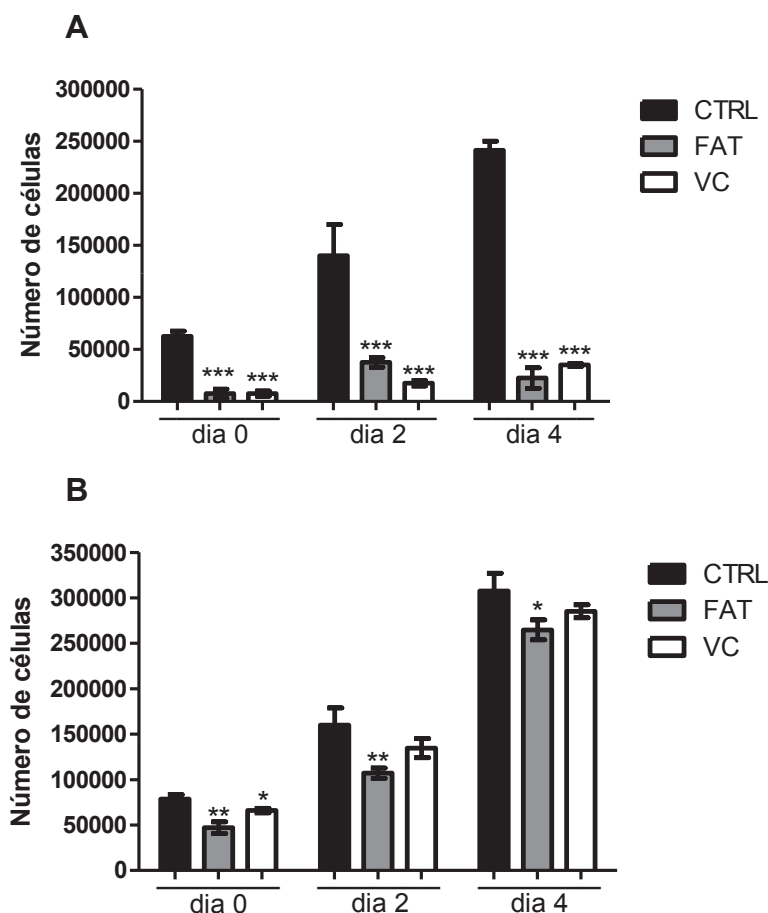


Figura 18. Efeito da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e da vincristina (VC) sobre o número de células das linhagens MCF7 e McCoy. **(A)** - Efeito de FAT e VC em linhagem MCF7 nos dias 0, 2 e 4 após a retirada do tratamento. **(B)** - Efeito de FAT e VC em linhagem McCoy nos dias 0, 2 e 4 após a retirada do tratamento. (*), (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e de $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL).

Fonte: Dados do autor.

O ensaio de contagem celular demonstrou que, após o terceiro e último dia de tratamento (dia 0), há redução significativa do número de células tumorais (88,0%) e esta se mantém por 4 dias após o término do tratamento, tanto para FAT quanto para VC (Figura 18A). Em relação a linhagem normal, o tratamento com FAT também levou a uma diminuição do número de células, porém, de maneira menos significativa (40%) (Figura 18B). Ainda, foi demonstrado que células McCoy tendem a se recuperar mais rapidamente da injúria, voltando a se proliferar 4 dias após a retirada do tratamento, uma vez que observou-se que a redução do número de células passou de 40 para 27%, respectivamente, no dia 0 e 4 após a exposição a FAT (Figura 18B). Esses resultados demonstram claramente a atividade seletiva de FAT sobre a linhagem tumoral MCF7, corroborando os dados apresentados anteriormente.

Para evidenciar melhor o tempo que a célula tumoral leva para adquirir resistência ao tratamento, bem como a duração do efeito promovido pela exposição de células MCF7 a FAT, será executado o ensaio de *population doubling* de acordo com o preconizado por Silva e colaboradores (2016).

6.2.3 Ensaio de formação de colônias (ensaio clonogênico)

Para confirmar o efeito citotóxico e antiproliferativo de FAT, bem como verificar se tais ações promovidas pela fração afetam o potencial clonogênico da linhagem tumoral, realizou-se o ensaio de formação de colônias, cujos resultados obtidos estão apresentados nas Figuras 19 e 20.

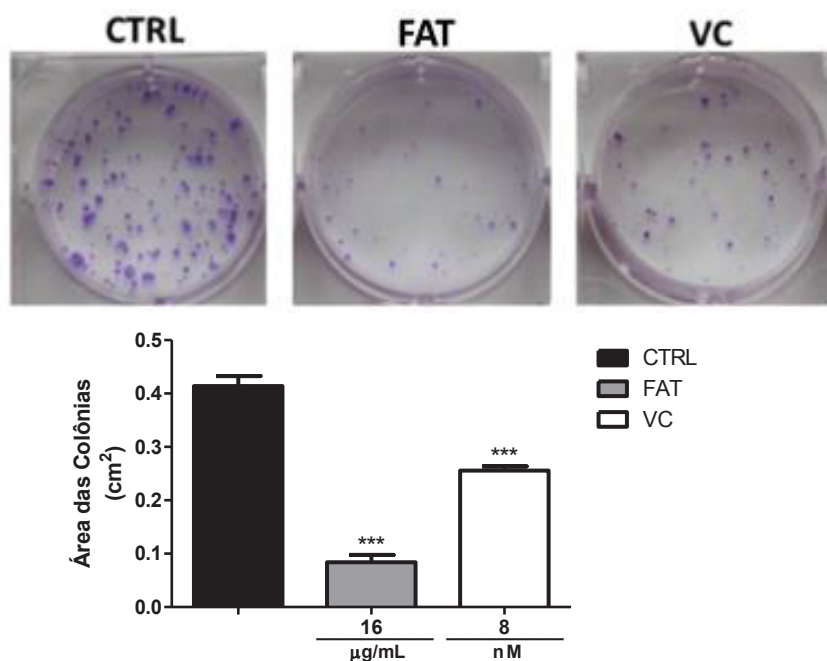


Figura 19. Efeito anticlonogênico da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e do quimioterápico vincristina (VC). Células MCF7 foram cultivadas *in vitro* e tratadas por 72 horas com FAT e VC em concentrações referentes à CI_{25} obtida pelo método do MTT. (***) denota diferença estatística de $p < 0,001$, em relação ao controle (CTRL).

Fonte: Dados do autor.

Em relação as células MCF7, foi demonstrado que FAT e VC reduziram a área das colônias em 79,7 e 38,2%, respectivamente, quando comparadas ao controle negativo, evidenciando o potencial anticlonogênico dos tratamentos e confirmando os dados anteriores (Figura 18A). O efeito seletivo de FAT e VC também foram confirmados, sendo que nenhum dos tratamentos afetou o potencial clonogênico das células McCoy (Figura 20).

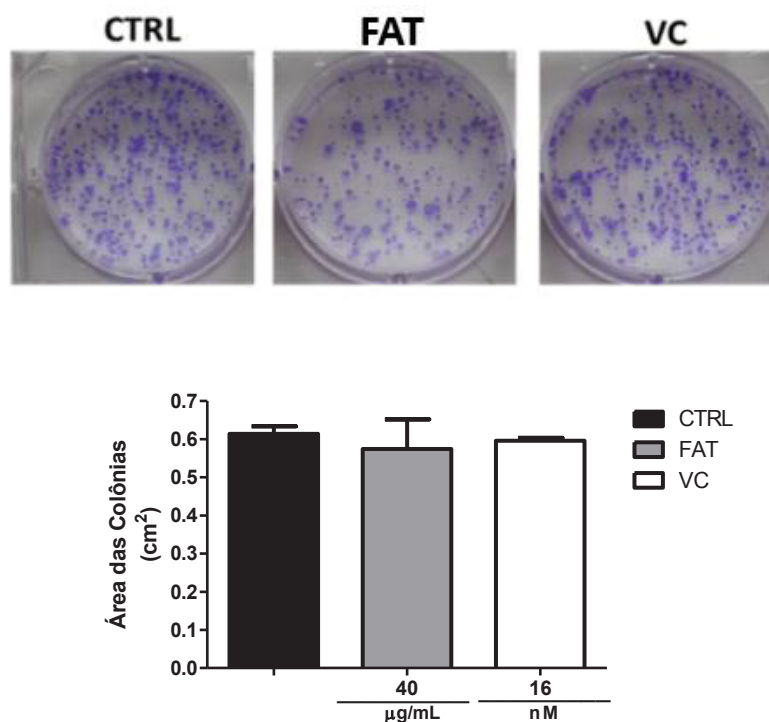


Figura 20. Efeito anticlonogênico da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e do quimioterápico vincristina (VC). Células McCoy foram cultivadas in vitro e tratadas por 72 horas com FAT e VC em concentrações referentes à Cl_{25} obtida pelo método do MTT.

Fonte: Dados do autor.

Em suma, quando observados em conjunto, os resultados obtidos através da execução dos ensaios do MTT, VN, contagem celular e clonogênico, demonstraram claramente a atividade citotóxica, antiproliferativa e seletiva de FAT sobre células de carcinoma de mama MCF7, indicando a presença de compostos com potencial antineoplásico. Neste sentido, sugere-se que a uleína seja um dos compostos responsáveis por estas ações, uma vez tal alcalóide foi detectado na fração (Figura 13). Além disso, tem sido demonstrado que a uleína apresenta efeito citotóxico em parasitas (OLIVEIRA, 2010) e em diversas linhagens tumorais (SOUZA, 2007; NARDIN et al, 2008), de maneira seletiva (NARDIN et al, 2008), corroborando os resultados obtidos.

Uma vez avaliado o efeito citotóxico e antiproliferativo de FAT, passou-se então a caracterizar estas ações, através da avaliação de interferências no ciclo celular, bem como da determinação do tipo de morte celular induzido.

6.2.4 Análise do ciclo celular

Os resultados da análise do ciclo celular de células MCF7 após o tratamento com FAT e VC em concentrações correspondentes a CI_{30} determinadas pelo método do MTT, pelo período de 72 h, estão apresentados na Figura 21.

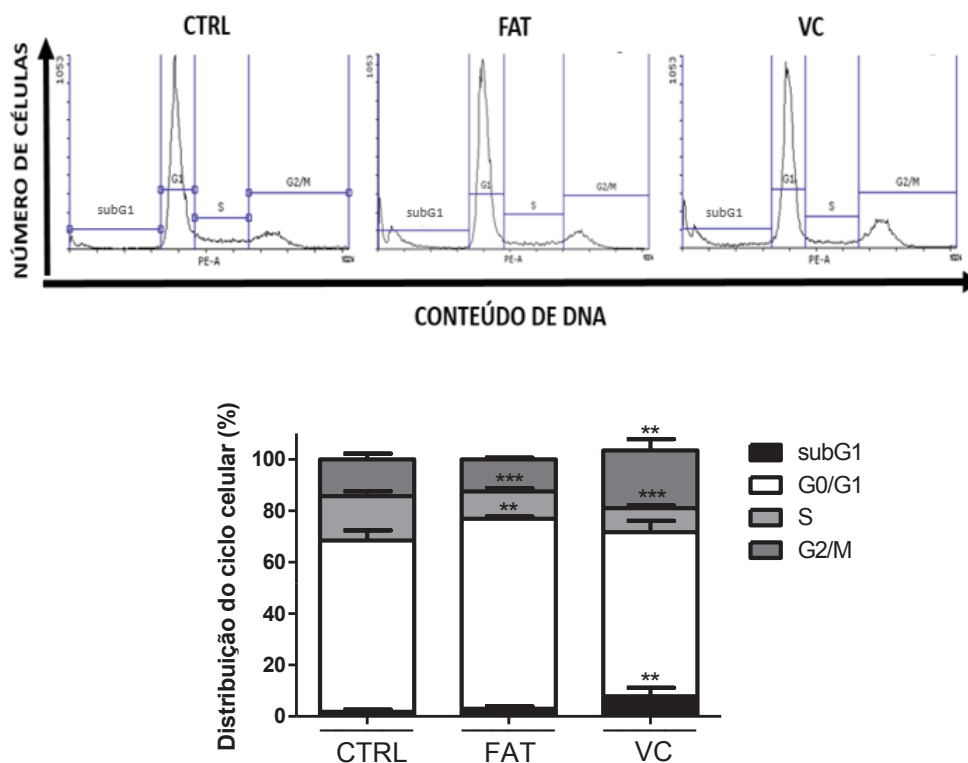


Figura 21. Efeito da fração de alcalóides totais (FAT- CI_{30} - 19,2 μ g/mL) obtida a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e da vincristina (VC - CI_{30} - 9,6 nM) sobre a progressão do ciclo celular de células MCF7 após 72 horas de tratamento. (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente, em relação ao controle (CTRL). Fonte: Dados do autor.

A análise do ciclo celular mostrou que FAT foi capaz de elevar em 11% o número de células na fase G1, bem como de reduzir em 38%, o número de células na fase S, quando comparado ao grupo controle (Figura 21). Estes resultados sugerem que a atividade antiproliferativa de FAT pode estar vinculada a capacidade do mesmo em realizar a parada do ciclo celular na fase G1, justificando a drástica redução do número de células na fase S.

Já o tratamento com VC, como era esperado, elevou em aproximadamente 49,7% o número de células na fase G2/M, visto que este fármaco interrompe o processo de divisão celular na metáfase (GEORGE; JOURNEY; GOLDSTEIN, 1965; CHIUCHETTA; CASTRO-PRADO, 2002; BRANDÃO et al., 2010). Além disso, o

tratamento com VC aumentou o número de células na fase subG1, indicando que este composto, na concentração administrada, foi capaz também de induzir a apoptose. Ainda, observou-se que o tratamento com VC reduziu em torno de 45,4% o número de células na fase S, o que pode ser justificado pela parada do ciclo em G2/M, bem como pela indução do processo apoptótico.

Os resultados obtidos corroboram a literatura, uma vez que diversos estudos evidenciam a interferência de alcaloides com potencial anti-inflamatório sobre o ciclo celular. Paiva e colaboradores (2016) descreveram o efeito de uma fração rica em alcaloides fenantroquinolizidínicos sobre a linhagem NCI-H460 (câncer de pulmão). Neste estudo observou-se um aumento do número de células na fase G2/M após o tratamento das mesmas, pelo período de 24 horas com a fração rica em alcaloides. Além disso, foi mostrado que o alcaloide elipticina, interferiu no ciclo celular da linhagem HepG2 (carcinoma hepatocelular), ao parar o mesmo na fase G1, além de elevar os níveis de p53 (KUO et al., 2006). Ainda, foi verificado que outros alcaloides com efeito antiinflamatório tais como, arohitukina (ISAH, 2016) e a sanguinarina (GAZIANO, 2016) alteraram o ciclo celular das linhagens tumorais MCL (linfoma de células do manto) e MDA-MB-231 (câncer de mama), respectivamente.

Por fim, cabe salientar que experimentos estão sendo conduzidos no sentido de avaliar os níveis de marcadores do ciclo celular que atuam no *checkpoint* G1 como p53, p21, pRb, ciclina D, dentre outros.

6.2.5 Coloração diferencial com Iodeto de Propídeo e Laranja de Acridina (IP/LA)

A coloração diferencial com iodeto de propídeo e laranja de acridina foi realizada com o intuito de identificar o tipo de morte celular induzido, avaliando a integridade de membrana. Este ensaio, baseia-se na capacidade do corante laranja de acridina em atravessar livremente a membrana plasmática, intercalando-se ao DNA e dando coloração verde ao núcleo das mesmas. Já o iodeto de propídeo, por não conseguir atravessar livremente a membrana plasmática, penetra em células que não apresentam membranas íntegras, intercalando-se ao DNA e corando os núcleos das mesmas em vermelho. Assim, células viáveis apresentam o núcleo verde, em função da intercalação pelo laranja de acridina. Células em necrose apresentam o núcleo vermelho em decorrência da intercalação pelo iodeto de propídeo. Por fim, células em apoptose apresentam o núcleo corado em laranja, em

função da intercalação ao DNA realizada por ambos corantes (McGAHON et al., 1995).

Os resultados obtidos por meio do ensaio de IP/LA estão demonstrados na Figura 22. Pode-se observar que FAT promoveu redução significativa de células viáveis, acompanhado pelo aumento de células inviáveis (em apoptose e necrose), quando comparado ao controle negativo (Figura 22).

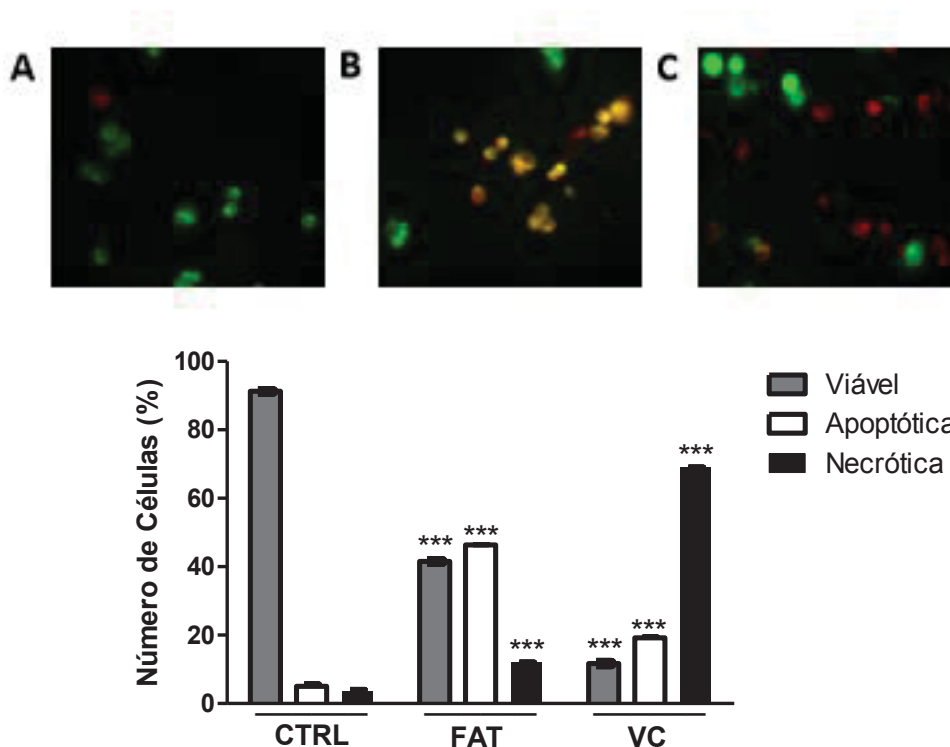


Figura 22. Tipo de morte celular induzido pela fração de alcalóides totais (FAT) (32 $\mu\text{g}/\text{mL}$) obtida a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE e pela vincristina (VC) (16 nM) em linhagem MCF7 após 72 horas de tratamento. **(A)**- Imagem representativa de células tratadas com o veiculo de diluição de FAT (CTRL). **(B)**- Imagem representativa de células após tratamento com FAT. **(C)**- Imagem representativa de células após tratamento com VC. (***) denota diferença estatística de $p < 0,001$ em relação ao controle (CTRL).

Fonte: Dados do autor.

Em relação a elevação do número de células inviáveis, foi demonstrado que o tratamento com FAT pelo período de 72 h, aumentou o número de células apoptóticas e necróticas em 8,2 e 2,3 vezes, respectivamente, quando comparado a CTRL (Figura 22). A indução de apoptose aqui observada, corrobora os resultados obtidos através da análise do ciclo celular (Figura 21). Como mencionado anteriormente, FAT promoveu elevação do número de células em G1 concomitantemente à redução do número celular em S, sugerindo que esta fração

realizou bloqueio do ciclo em G1. Sabe-se que o *checkpoint* da fase G1 está relacionado a verificação da ocorrência de danos ao DNA. Nesse sentido, quando o dano supera a capacidade de reparo, as células são conduzidas à senescência ou apoptose (BARTEK e LUKAS, 2003; WRIGHTON, 2010; LORD e ASHWORTH, 2012). Desta forma, sugere-se que FAT aumentou o número de células na fase G1, devido a tentativa de induzir o reparo da célula após a injúria sofrida; entretanto, o dano promovido pela fração parece ter superado os mecanismos intracelulares de reparo, culminando na morte apoptótica das mesmas e justificando a apoptose detectada.

Ainda, a análise da Figura 22 evidencia que VC também reduziu significativamente o número de células viáveis. Entretanto, este alcaloide apresentou um padrão de morte celular um pouco diferente do mostrado por FAT. VC elevou o número de células em apoptose e necrose, em torno de 2,8 e 17,7 vezes, respectivamente, quando comparado ao controle negativo.

Os dados obtidos corroboram a literatura, uma vez que diversos estudos demonstram também que alcaloides indólicos, tais como a elipticina, a isovoacangina, a voacangina e a sampangina, podem levar a indução de apoptose em várias linhagens tumorais, tais como HepG2, HL-60 (leucemia promielocítica) e THP-1 (leucemia monocítica aguda) (KLUZA et al., 2005; KUO et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2010).

Cabe salientar que experimentos estão sendo conduzidos no sentido de confirmar a indução de apoptose promovida por FAT, através da mensuração da exposição de fosfatidil serina, bem como da avaliação de níveis de marcadores de dano ao DNA (γ H2Ax) e do processo apoptótico tais como p53, BAX, Bcl-2, dentre outros.

6.2.6 Determinação da concentração intracelular de espécies reativas do oxigênio (EROs)

Como mencionado anteriormente, em relação ao câncer, EROs apresentam papel dúbio, uma vez que níveis intracelulares moderados dessas espécies são fundamentais para manutenção da instabilidade genética, estabelecimento de processo inflamatório e a ocorrência de mutações (GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006). Entretanto, quando produzidos em excesso, assim como quando

suas concentrações intracelulares são reduzidas drasticamente, EROS podem levar a morte de células tumorais (GLOIRE; LEGRAND-POELS; PIETTE, 2006). Mediante esses argumentos, bem como pelo fato de a uleína já ter apresentado ação antiinflamatória, achou-se pertinente avaliar se o efeito antitumoral promovido por FAT estaria associado a interferências no equilíbrio redox.

Na Figura 23, estão presentes os resultados obtidos no ensaio realizado para mensuração intracelular de EROS.

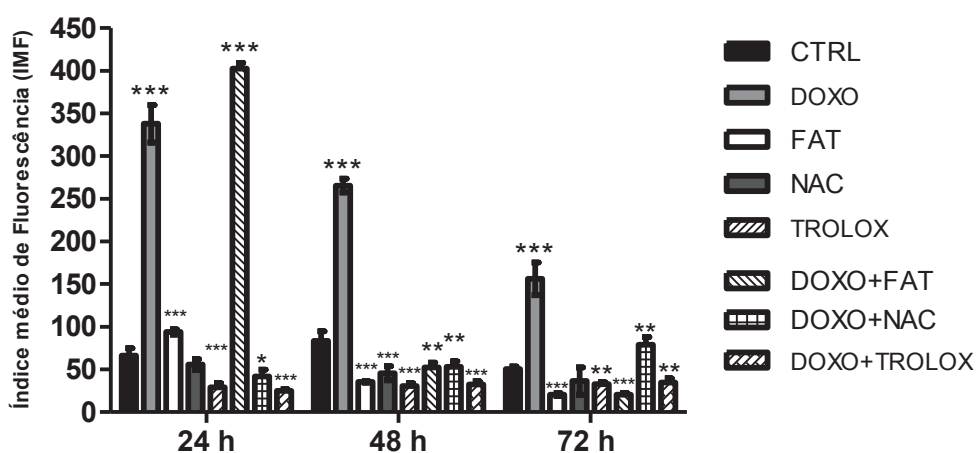


Figura 23. Efeito da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE sobre os níveis intracelulares de H₂O₂ na linhagem MCF7. (*), (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente em relação ao controle (CTRL).

Fonte: Dados do autor.

Os níveis intracelulares de peróxido de hidrogênio sofreram um aumento de 1,2 vezes após o tratamento com FAT por 24 horas e estes decaíram após 48 e 72 horas de exposição à fração. Já o tratamento com o controle positivo (DOXO) induziu o aumento de H₂O₂ nos três períodos de tempo avaliados. Por fim, células quando tratadas com NAC e TROLOX apresentaram níveis de H₂O₂ reduzidos quando comparados ao controle negativo.

Os resultados obtidos com o tratamento utilizando os controles positivo (DOXO, NAC e TROLOX) estão de acordo com a literatura, uma vez que a doxorrubicina, por apresentar um grupo quinona, gera radicais livres via ciclo redox, elevando a quantidade intracelular de EROs (KARIM et al., 2001); assim como NAC

e TROLOX apresentam efeito antioxidante, diminuindo as concentrações de EROs (HAMAD et al., 2010; HALASI et al., 2013; HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2015).

Para validar a técnica utilizada, visto que mensurou-se os níveis intracelulares de H₂O₂ em períodos de exposição bastante prolongados (24 -72 h) e excluir portanto, qualquer hipótese relacionada a dissipação e/ou degradação de peróxido presente no sistema, avaliou-se ainda, os níveis de peróxido intracelulares após a exposição de células a DOXO + FAT, DOXO + NAC e DOXO + TROLOX. Como mencionado anteriormente, esta estratégia foi utilizada uma vez que DOXO atua na formação constante de EROs através da ocorrência do ciclo redox.

Observou-se que o tratamento realizado concomitantemente com DOXO e FAT no período de 24 horas levou ao aumento de H₂O₂ intracelular, quando comparado ao grupo controle. Já a exposição à combinação DOXO + FAT pelo período de 48 e 72 h, promoveu redução dos níveis intracelulares de peróxido. Ainda, os tratamentos DOXO + NAC e DOXO + TROLOX, causaram redução de H₂O₂ em relação ao controle negativo desde as primeiras 24 h de tratamento, conforme o esperado.

Os resultados obtidos demonstram que FAT promoveu alterações significativas no equilíbrio redox de células MCF7. Como mencionado anteriormente, FAT promoveu elevação dos níveis de H₂O₂ nas primeiras 24 h de tratamento e posterior redução significativa dos mesmos (48 e 72 h de tratamento). Sugere-se que, devido a elevação dos níveis de peróxido de hidrogênio observada nas primeiras 24 h de tratamento, ocorreu o desenvolvimento de exacerbada e persistente resposta adaptativa (mediado provavelmente pela ativação de defesas antioxidantes enzimáticas), acarretando na indução de efeito antioxidante e consequente redução significativa dos níveis de H₂O₂ subsequentes (48 e 72 h de tratamento). Ainda, sugere-se que o efeito antitumoral de FAT pode estar associado a tal resposta adaptativa, que culminou na diminuição dos níveis de EROs.

Novamente, os resultados obtidos estão de acordo com o que já foi descrito na literatura. Foi evidenciado que o alcaloide sanguinarina induz a ocorrência de uma resposta antioxidante em linhagens celulares tumorais, levando a morte das mesmas por apoptose (GAZIANO, 2016). Efeitos semelhantes, de diminuição de EROs intracelulares, foram descritos para alguns alcaloides da vinca (vinorelbina e vindolicina), sobre células Beta-TC-6 (insulinoma), A549 (adenocarcinoma alveolar) (TIONG et al., 2013).

Por fim, cabe salientar que experimentos estão sendo realizados a fim de determinar os níveis de peróxido de hidrogênio em intervalos de tempo anteriores aos avaliados (6 e 12 h) e sustentar melhor a hipótese descrita, onde espera-se observar indução de estresse oxidativo, refletido na elevação dos níveis intracelulares de H₂O₂, nos dois períodos de tempo propostos.

6.2.7 Determinação da atividade da enzima antioxidante catalase (CAT)

Com o intuito de confirmar a hipótese anteriormente mencionada, ou seja, de que FAT promoveu a indução de resposta adaptativa exacerbada e persistente, culminando na redução significativa dos níveis de H₂O₂, avaliou-se a atividade da enzima antioxidante CAT, cujos resultados estão expressos na Figura 24.

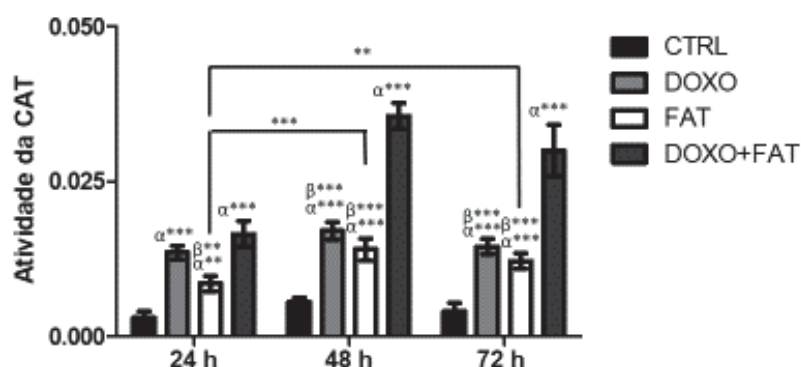


Figura 24. Atividade da CAT em células MCF7 após tratamento com fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE, doxorubicina (DOXO) e associação DOXO+FAT por 24, 48 e 72 horas. (**) e (***) denotam diferença estatística de $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente. (α) e (β) denotam diferença estatística em relação ao controle (CTRL) e ao tratamento com a associação DOXO + FAT, respectivamente.

Fonte: Dados do autor.

O tratamento com FAT levou ao aumento da atividade da enzima, a qual se mostrou elevada após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Observou-se um pico de ativação enzimática, verificado após 48 h de exposição a fração, onde FAT foi capaz de induzir a atividade da catalase de forma semelhante a mediada por DOXO. Tal pico de ativação foi sustentado parcialmente até 72 h de tratamento, acompanhando o perfil do tratamento com DOXO (Figura 24). Os períodos de exposição a FAT (48 e 72 h) em que foi demonstrado o pico de ativação enzimática, tratam-se justamente dos intervalos de tempo em que observou-se redução significativa dos níveis intracelulares de H₂O₂, corroborando assim, os resultados obtidos (Figuras 23 e 24). Logo, sugere-se que a diminuição acentuada dos níveis de H₂O₂ induzidos por FAT

deve-se a uma ativação elevada e persistente da CAT (semelhante a induzida por DOXO), associada a um pequeno aumento dos níveis de peróxido, quando comparada a elevação causada pela DOXO (Figuras 23 e 24).

Como mencionado anteriormente, o tratamento com doxorrubicina também foi capaz de promover a elevação persistente da atividade da CAT (Figura 24). Apesar da DOXO ter aumentado significativamente a atividade da catalase desde as primeiras 24 h de tratamento, a ativação enzimática promovida por esse quimioterápico foi constante ao longo do tempo (Figura 24). Entretanto, como mostrado na Figura 21, o tratamento de células MCF7 com DOXO elevou acentuadamente os níveis intracelulares de H₂O₂ em relação ao aumento promovida por FAT pelo período de 24 h. Assim, quando considerados em conjunto, os resultados obtidos sugerem que o tratamento com DOXO induziu a ocorrência de uma resposta adaptativa mais adequada da linhagem tumoral, onde a catalase foi reduzindo progressivamente o excesso de peróxido de hidrogênio produzido, sem levar à redução drástica (com diferença significativa em relação a CTRL) observada no tratamento com FAT.

Já a associação DOXO + FAT apresentou perfil semelhante ao tratamento com FAT, ou seja, elevou a atividade da catalase pelo período de 24, 48 e 72 h de tratamento, induzindo a ocorrência de pico de ativação enzimática após 48 h de exposição à associação, o qual foi sustentado nas 24 h subsequentes (72 h de tratamento). Novamente, os resultados obtidos corroboram a redução significativa dos níveis de H₂O₂ observados em 48 e 72 h de tratamento (Figura 23). Ainda, cabe ressaltar que a associação dos tratamentos levou a uma maior atividade da enzima, em relação ao tratamento realizado com cada composto de forma individual (com exceção ao tratamento com DOXO por 24 h) (Figura 24).

Um estudo realizado por Oliveira et al (2016) evidenciou que o aumento da atividade da enzima CAT levou a um efeito citostático, assim como inibiu a ativação de NF-κB em células da linhagem A549 (adenocarcinoma de pulmão humano), causando conseqüentemente, a morte celular. Gupta et al (2004) demonstraram a elevação da atividade da CAT em camundongos inoculados com tumor ascítico de Ehrlich, e tratados com extrato metanólico de *Caesalpinia bonducella* Fleming (Caesalpinaceae). Tais autores associaram o aumento da atividade enzimática ao efeito antitumoral promovido pelo extrato. Extratos de *Aegle marmelos* (L.) Correa (Rutaceae) e *Cocculus hirsutus*(L.) Diels (Menispermaceae) apresentam o

mesmo perfil quando utilizadas no tratamento de camundongos com linfoma ascítico de Dalton (CHOCKALINGAM; KADALI; GNANASAMBANTHAM, 2012; THAVAMANI; MATHEW; PALANISWAMY, 2014).

Por fim, os dados mostrados sugerem que o efeito antitumoral de FAT parece estar associado a redução intracelular drástica de EROs, resultante de uma resposta adaptativa exacerbada, persistente e vinculada a elevação da atividade da CAT. Sugere-se que a redução intracelular significativa dos níveis de EROs pode ter influenciado em diversos mecanismos de sinalização celular, acarretando no efeito citotóxico, antiproliferativo e morte celular anteriormente descritos.

Experimentos estão sendo conduzidos com o intuito de mensurar a atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) e sustentar melhor a hipótese descrita.

6.2.8 Avaliação do efeito de FAT sobre a expressão de COX-2

Como mencionado anteriormente, evidências demonstram claramente uma correlação entre inflamação e câncer, bem como apontam a COX-2 como um importante alvo molecular para novas terapias antitumorais, o qual vem sendo amplamente estudado (SUBHASHINI; MAHIPAL; REDDANNA, 2005). Tem sido relatado que a COX-2 contribui no desenvolvimento de tumores ao ativar mecanismos que levam a indução de resistência a apoptose e ao estímulo da angiogênese (DEMPKE et al., 2001).

Uma vez que Nardin et al. (2008) demonstraram o efeito antiinflamatório da uleína, composto presente na fração analisada, e devido ao papel essencial que a COX-2 apresenta na carcinogênese, achou-se pertinente investigar se o efeito antitumoral de FAT caracterizado neste trabalho, estaria vinculado ao efeito antiinflamatório promovido pelo mesmo, através da avaliação da expressão de COX-2, cujos resultados estão demonstrados na Figura 25.

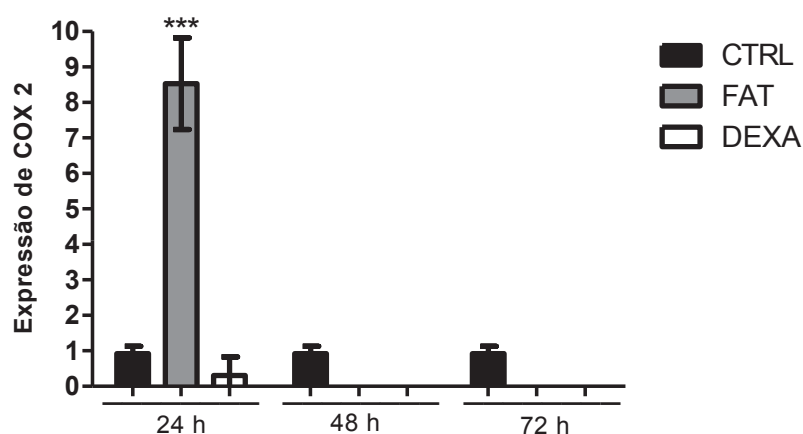


Figura 25. Efeito da fração de alcalóides totais (FAT) obtida a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE, e da dexametasona (DEXA- 100 nM) sobre a expressão de COX-2 após 24, 48 e 72 horas de tratamento. (***) denota diferença estatística de $p < 0,001$ em relação ao controle (CTRL).
Fonte: Dados do autor.

Os dados obtidos mostram que, após 24 h de tratamento com FAT, a expressão de COX-2 foi elevada em 7 vezes em relação as células não tratadas. Já após 48 e 72 h de tratamento com a fração, a expressão da enzima foi inibida (Figura 25). Cabe ressaltar que este resultado seguiu o comportamento da produção de H_2O_2 anteriormente descrita, onde foi relatado um aumento da produção de peróxido de hidrogênio nas primeiras 24 h de tratamento, seguido de uma queda brusca dos níveis intracelulares do mesmo após 48 e 72 horas de exposição a fração (Figura 21).

Tem sido demonstrado na literatura que EROs podem induzir a expressão de COX-2 através da ativação direta ou indireta do NF- κ B (BARBIERI, 2003; MARI et al., 2003). Dessa forma, sugere-se que a redução dos níveis intracelulares de EROs resultantes da ativação exacerbada e persistente da CAT, podem estar associados à inibição da expressão da COX-2 aqui observada, onde tal resposta favoreceu o encaminhamento das células para a morte, através da indução de apoptose.

No que se refere ao tratamento com DEXA, foi observado que este fármaco reduziu drasticamente a expressão de COX-2 nas primeiras 24 h de tratamento, inibindo completamente a expressão da enzima nos demais intervalos de tempo avaliados.

Os dados obtidos corroboram a literatura, uma vez que estudos mostram que diversos alcaloides são capazes de inibir e/ou reduzir a expressão de COX-2. Chandel e colaboradores (2017) descreveram este mesmo efeito ao tratarem células

HeLa (câncer cervical) e Colo 205 (adenocarcinoma colorretal) com uma fração rica em alcaloides de *Anthocephalus cadamba* (Roxb.) Miq. (Rubiaceae). Ainda, foi mostrado que os alcaloides 3-(Hydroxymethyl)-6,7-dihydroindolo[2,3-a]quinolizin-(12H)-one e barberina, foram capazes de reduzir a expressão de COX-2 em células RAW 264.7 (macrófagos murinos), A375 e Hs294 (melanomas) respectivamente (SINGH et al., 2010; ZHAO et al., 2013). Antiinflamatórios seletivos para COX-2 como, por exemplo, celecoxibe, etoricoxibe, valdecoxibe, parecoxibe e lumiracoxibe (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006) também tiveram seu efeito descrito na literatura. De acordo com Bocca e colaboradores (2010) o celecoxibe foi capaz de inibir fortemente a proliferação e a invasão de células MDA-MB-231. Este mesmo efeito já foi observado em modelos *in vivo* e em humanos (DAI et al., 2012; BRANDÃO et al., 2013)

Experimentos estão sendo realizados com o intuito de verificar se o tratamento com a fração é capaz de evitar a ativação do NF-kB, bem como de mensurar os níveis de interleucinas associadas ao processo inflamatório e produzidas mediante atividade da COX-2.

Levando-se em consideração todos os resultados obtidos, sugere-se que o mecanismo com que FAT exerce efeito antitumoral está relacionado ao fato dessa fração causar um desequilíbrio redox, ao promover uma elevação exacerbada e persistente da atividade da CAT, induzindo a ocorrência de efeito antioxidante e culminando na redução drástica dos níveis intracelulares de EROs. Tal redução pode acarretar na diminuição ou até mesmo na inibição da atividade do NFkB, inibindo a expressão de COX-2 e levando ao efeito citotóxico e antiproliferativo observados (Figura 26).

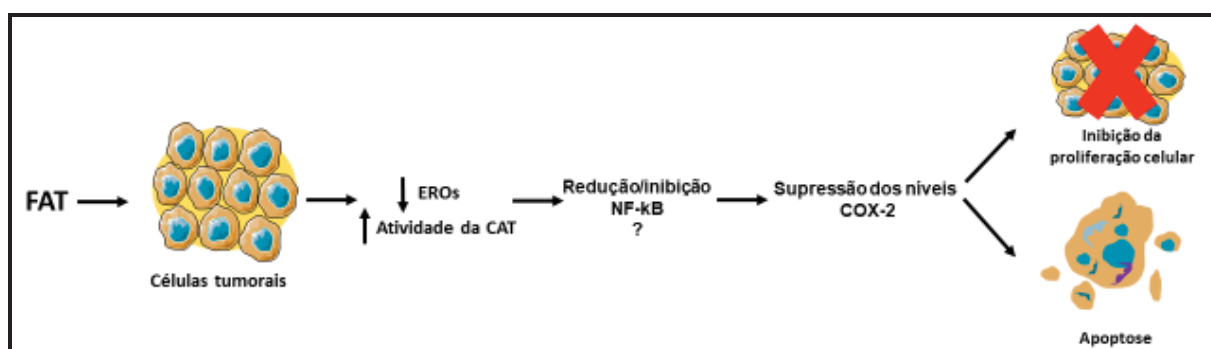


Figura 26. Hipótese do mecanismo de ação citotóxica e antiproliferativa da fração de alcaloides totais (FAT) obtido de suplemento elaborado a partir da casca de *Aspidosperma subincanum* MART. ex A. DC., APOCYNACEAE.
Fonte: Dados do autor.

7 CONCLUSÕES

A execução deste trabalho permite concluir que:

- A uleína está presente em FAT, juntamente com outros alcaloides não identificados no trabalho;
- FAT apresentou atividade citotóxica e antiproliferativa seletiva sobre a linhagem tumoral de câncer de mama MCF7;
- A atividade antiproliferativa de FAT sobre células MCF7 está provavelmente relacionada ao fato desta fração aumentar o número de células na fase G1 do ciclo celular;
- Sugere-se que o tipo de morte celular induzido por FAT em células MCF7 trata-se de apoptose;
- Possivelmente, o efeito antitumoral de FAT está associado a capacidade desta fração em promover um desequilíbrio redox em células MCF7, representado pela redução drástica dos níveis intracelulares de EROs e elevação persistente da atividade da enzima antioxidante catalase;
- O efeito antitumoral de FAT sobre células MCF7 provavelmente está correlacionado a ação antiinflamatória desta fração, uma vez que observou-se que FAT suprimiu a expressão de COX-2 neste tipo celular.

CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE SOFTWARE DE MENSURAÇÃO DE ÁREA E CONTAGEM DE NÚMERO DE COLÔNIAS

8 OBJETIVOS

8.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver e validar um software de mensuração de área e de contagem de número de colônias.

8.1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um software capaz de mensurar a área e contar o número de colônias;
- Padronizar o método de obtenção das imagens do ensaio de formação de colônias para as determinações descritas (área e número de colônias);
- Realizar a análise das imagens pelos métodos: manual, plugin (método computacional) já descrito na literatura e software em desenvolvimento;
- Validar o software por meio da comparação dos resultados obtidos pelos métodos anteriormente mencionados.

9 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

9.1 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*

Testes *in vitro* são comumente utilizados para a detecção da toxicidade de compostos antes do uso em animais e humanos, a fim de minimizar efeitos adversos e possíveis lesões ao paciente (ROGERO et al., 2003). Estes ensaios são considerados preliminares, pois uma vez caracterizada a não citotoxicidade pode se dar continuidade a experimentos em animais, por exemplo (ISO,10993).

Ensaio de citotoxicidade e de atividade antiproliferativa *in vitro* são utilizados também na descoberta de novos fármacos. Com estes testes é possível realizar um *screening* quanto a interferência de novos compostos sobre a adesão, perfil clonogênico, integridade de membrana e sobrevivência celular (NILES; A MORAVEC; RISS, 2008).

Estes ensaios foram padronizados em cultura de células (Tabela 3), onde se expõem linhagens celulares de mamíferos ao composto de interesse para posterior analisar a ocorrência de possíveis alterações celulares, o que é realizado principalmente através do uso de métodos colorimétricos que avaliam a atividade metabólica celular, ou de ensaios que permitam visualizar a inibição da formação de colônias (CRUZ et al., 1987; ROGERO et al., 2000).

A principal vantagem destes métodos em comparação aos ensaios *in vivo* se deve a limitação de variáveis, o que leva a resultados mais significativos e reprodutíveis. Outra vantagem é o baixo custo para realização dos mesmos (ROGERO et al., 2003).

TABELA 4. Principais ensaios diretos e indiretos para análise de viabilidade e proliferação celular.

| ENSAIO | PRINCÍPIO DO ENSAIO |
|---------------|--|
| MTT | O ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) é um teste colorimétrico quantitativo, utilizado para a avaliação da sobrevivência e proliferação celular. Células metabolicamente ativas possuem a capacidade de reduzir o sal de tetrazólio levando a formação de formazan, o qual possui coloração roxa e esta pode ser avaliada espectrofotometricamente. Células |

mortas não apresentam a capacidade de reduzir este sal (MOSMANN, 1983).

RESAZURINA

O ensaio da resazurina também é utilizado para avaliar viabilidade e proliferação celular, onde células metabolicamente viáveis reduzem a resazurina a resofurin, que apresenta cor rosa podendo ser mensurada espectrofotometricamente. Células inviáveis não possuem tal capacidade de redução (ROLÓN et al., 2006). Após a redução, o sal formado não precipita, diferentemente do ensaio de MTT (OBRIEN et al., 2000).

VERMELHO NEUTRO

O ensaio de absorção de vermelho neutro avalia a atividade antiproliferativa e viabilidade celular de forma quantitativa, com base na habilidade de células com lisossomos viáveis em endocitar e ligar o corante nos mesmos, o qual apresenta coloração vermelha que pode ser mensurada espectrofotometricamente. Células com lisossomos não viáveis não apresentam a capacidade de incorporação do corante (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). Um dos problemas associados a este teste se deve a ocorrência de falso negativo perante a indução de autofagia. Se o tratamento utilizado induz a autofagia, ocorrerá o aumento do número de lisossomos a fim de degradar as organelas lesadas. Como estes lisossomos são capazes também de endocitar o vermelho neutro, o composto indutor de autofagia pode ser caracterizado como não citotóxico, porém este composto, pode ter afetado a viabilidade celular, dependendo da intensidade do processo autofágico (ESKELINEN; SAFTIG, 2009; MARTINS et al., 2013).

COLORAÇÃO CRISTAL VIOLETA

O ensaio de coloração por cristal violeta avalia indiretamente a viabilidade e proliferação celular, uma vez que células viáveis não perdem a capacidade de adesão, diferentemente das células inviáveis. Assim, ao serem coradas, é possível mensurar a relação de células viáveis e inviáveis (FEOKTISTOVA; GESERICK; LEVERKUS, 2016).

AZUL DE TRIPAN

O ensaio do azul de Tripán é utilizado para avaliar a viabilidade celular pela verificação da integridade de membrana. Células viáveis apresentam membranas celulares íntegras, o que leva a

exclusão do corante; já células mortas acabam incorporando o azul de Tripán, o que permite quantificar o número de células viáveis e inviáveis por meio do microscópio óptico (STROBER, 2001).

LDH

O ensaio da lactato desidrogenase (LDH) também é utilizado para avaliar a viabilidade celular através da verificação da integridade de membrana. Tal enzima está presente em todas as células, sendo extravasada para o espaço extracelular quando estas apresentam a membrana celular danificada, demonstrando que as mesmas estão mortas. Logo, a mensuração da LDH extracelular é diretamente proporcional ao número de células inviáveis (CHAN; MORIWAKI; ROSA, 2013).

9.1.1 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico, tem como principal objetivo avaliar o potencial clonogênico de uma única célula frente a alguma injúria, como por exemplo, exposição a radiação ou quimioterápicos (RUDIN et al., 1991). A perda da capacidade de proliferação celular é um indicativo de morte, uma vez que isto impossibilita a geração de células filhas. Células viáveis apresentam a capacidade de gerar clones e levar a formação de colônias, sendo consideradas como clonogênicas (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005).

Este ensaio é utilizado por várias áreas como, microbiologia, imunologia, biologia molecular e celular (RUDIN et al., 1991; RUUSUVUORI et al., 2014) e a avaliação manual ainda é considerada o padrão-ouro de análise, podendo-se avaliar a morfologia, número, cor e tamanho das colônias (RUDIN et al., 1991), quando as mesmas são observadas a olho nu ou em microscópio óptico, o que permite análises diferenciadas. Apesar de ser frequentemente utilizada, a análise manual do ensaio clonogênico trata-se de uma forma de avaliação lenta, além de apresentar baixa reprodutibilidade e ser inviável para ensaios de alto rendimento (CHOUDHRY, 2016). Alternativamente, um método mais efetivo para análise das colônias é a mensuração da área ocupada pelas mesmas em relação ao suporte onde estão aderidas, permitindo avaliar o desenvolvimento de colônias (refletido no aumento do tamanho das mesmas) ou a diminuição das mesmas. Neste sentido, diversos

plugins e macros foram desenhados para este fim (ICHINOSE, 2005; NIEMELÄ et al., 2012).

Ainda, devido ao maior acesso a tecnologia, tenta-se automatizar este ensaio com o intuito de ganhar velocidade, precisão e reprodutibilidade, obtendo-se imagens das colônias com câmeras digitais e fazendo uso de macros e plug-ins em programas de imagens pré-existentes, os quais atuam delimitando as colônias e diferenciando-as do plano de fundo do suporte em que se encontram. Um dos problemas em relação a estas ferramentas, se deve a presença de artefatos (detritos celulares, bolhas, excesso de corante ou de meio de cultura) que por ventura acabam interferindo na análise da imagem (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005; CHOUDHRY, 2016). Apesar das tentativas, nenhum método existente alcançou um uso generalizado (NIYAZI; NIYAZI; BELKA, 2007).

Outro fator que pode interferir na análise por macros e plug-ins é a qualidade das imagens obtidas, a qual depende diretamente de diversos parâmetros como iluminação, tamanho e contraste; evidenciando a necessidade de padronização das imagens obtidas para a análise. Além disso, ajustes também devem ser feitos em relação ao macro ou plugin para cada imagem a ser analisada (CHOUDHRY, 2016). Por fim, cabe ressaltar que a análise por meio de imagem, algumas vezes requer o uso de equipamentos e softwares de alto valor, o que pode inviabilizar a realização das mesmas (ELKIND; HAN; VOLZ, 1963).

Fica evidente então, a necessidade de se criar um programa apropriado para análise do ensaio clonogênico, o qual propicie otimização de tempo, reprodutibilidade e precisão.

9.2 A LINGUAGEM PYTHON™

O processo de programar se restringe a sequenciar uma lista de instruções (códigos fonte) que informam ao hardware, tal como o computador, os procedimentos necessários para que as tarefas listadas sejam realizadas com êxito. A ferramenta utilizada para se programar é dita linguagem, tais como a C, C++, Java™ e Python™ (ZELLE, 2004).

Após a inserção do código fonte, a linguagem deve ser traduzida para a linguagem da máquina (notação binária) sendo este processo realizado por intermédio de um compilador. O compilador é um programa complexo que traduz a

linguagem utilizada pelo programador na linguagem de máquina, fazendo com que esta possa compreender o código e seguir as instruções fornecidas a ela (ZELLE, 2004).

O compilador tendo executado a sua função, tornará o software ativo, o qual estará aguardando um *input* (comando) por meio de uma interface gráfica, para realizar uma ação com o código fonte. Assim que o *input* for fornecido, o código fonte será processado e irá fornecer um *output*, ou seja, uma resposta (Figura 27) (ZELLE, 2004).

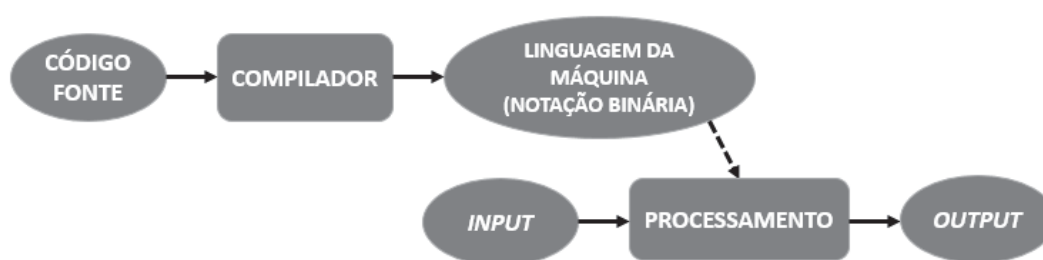


Figura 27. Esquema de compilação de linguagem computacional.
Fonte: Adaptado de ZELLE, 2004

Uma das linguagens mais populares para computação é a linguagem de programação Python™, desenvolvida por Guido van Rossum em 1991. Esta se mostra uma excelente escolha para desenvolvimento algorítmico e exploratório de dados científicos (DUBOIS, 2007).

Comparado as demais linguagens computacionais o Python™ é mais consiso, o que simplifica o desenvolvimento de aplicativos e softwares, além de ser executável em vários sistemas operacionais (DUBOIS, 2007).

A linguagem Python™ é uma poderosa e moderna ferramenta utilizada até mesmo pelos grandes nomes da tecnologia, tais como o Youtube® (LLC), Google® (LLC) e Industrial Light & Magic® (ILM) (MORO, 2013).

10 MATERIAL E MÉTODOS

10.1 ENSAIO CLONOGÊNICO

Células da linhagem McCoy e MCF7 foram plaqueadas, tratadas, fixadas e coradas conforme item 4.3.5 deste trabalho. Os ensaios foram realizados em triplicata a fim de fornecer um maior número de imagens para a comparação dos métodos de análise.

10.2 DESENVOLVIMENTO DO SOFTWARE

O software para contagem automática de colônias foi desenvolvido em parceria com o aluno Elberth Manfron Schiefer do Programa de Pós graduação em Física da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em linguagem Python™, com o intuito de gerar uma interface gráfica amigável e de fácil utilização para a contagem de colônias e de suas respectivas áreas.

O programa analisa imagens de poços de placas de cultivo, delimitando a área total e individual de cada colônia e o número das mesmas. Este processo ocorre pela subtração da imagem do poço pela imagem do *background* para reduzir os ruídos, e então uma distorção gaussiana é aplicada sobre a imagem para que pontos não corados das colônias sejam encobertos. Na sequência, é realizada a separação de cores (*threshold*) da imagem, sendo determinado o tamanho e centro do poço. Após estes passos, o programa calcula as áreas das colônias em relação a área do poço, assim como seu respectivo número, e por fim, o programa gera um Documento de Texto (.txt) que informa o número de colônias, área total das colônias em pixels e em cm², área individual das colônias em pixels e em cm², e porcentagem da área ocupada pelas colônias em relação ao tamanho do poço.

10.3 MÉTODO DE OBTENÇÃO DAS IMAGENS

Para análise automatizada foram utilizadas imagens das colônias obtidas por meio do uso de uma câmera digital de um smartphone de 16 mega pixels, as quais foram captadas sobre um plano branco e com iluminação feita por luz branca. A altura da obtenção das imagens foi padronizada, assim como o posicionamento dos

poços em relação a câmera (Figura 28). Posteriormente à obtenção das imagens, as mesmas foram analisadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento.

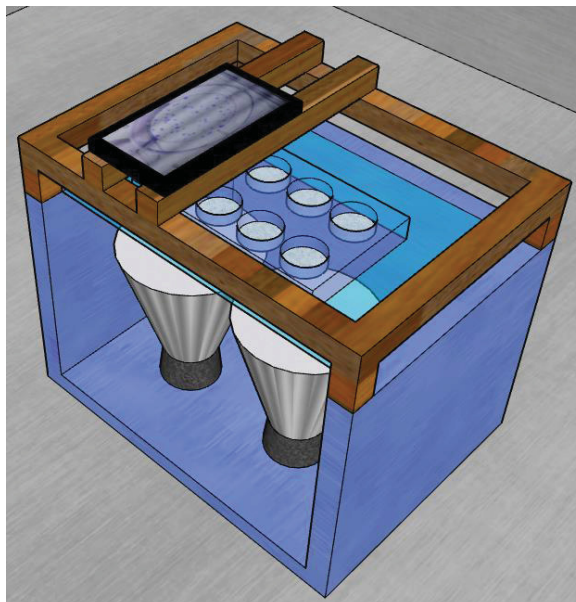


Figura 28. Desenho representativo do suporte para obtenção das imagens das colonias nos respectivos poços.

Fonte: O autor.

10.4 ANÁLISE DA FORMAÇÃO DE COLÔNIAS

10.4.1 Análise manual

As colônias foram analisadas manualmente com auxílio de microscópio óptico, realizando a contagem do número de colônias em cada poço. A divisão do poço por quadrantes foi realizada a fim de facilitar a contagem do número de colônias (Figura 29).

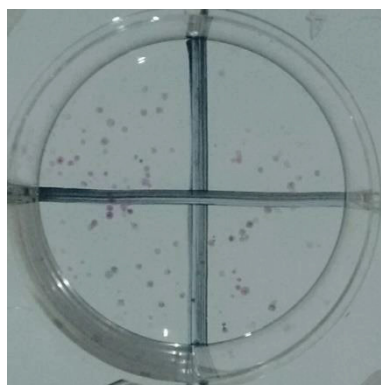


Figura 29. Divisão do poço em quadrantes para facilitar a contagem manual do número de colônias.

Fonte: O autor.

Após a análise, os dados foram tabelados a fim de realizar a comparação dos resultados obtidos entre os métodos.

10.4.2 Análise por plugin (ImageJ)

Para análise das imagens por um programa de imagem pré-existente, determinou-se a utilização de um plugin pelo ImageJ, de acordo com Guzmán et al (2014). O esquema de avaliação utilizado está demonstrado na Figura 30.

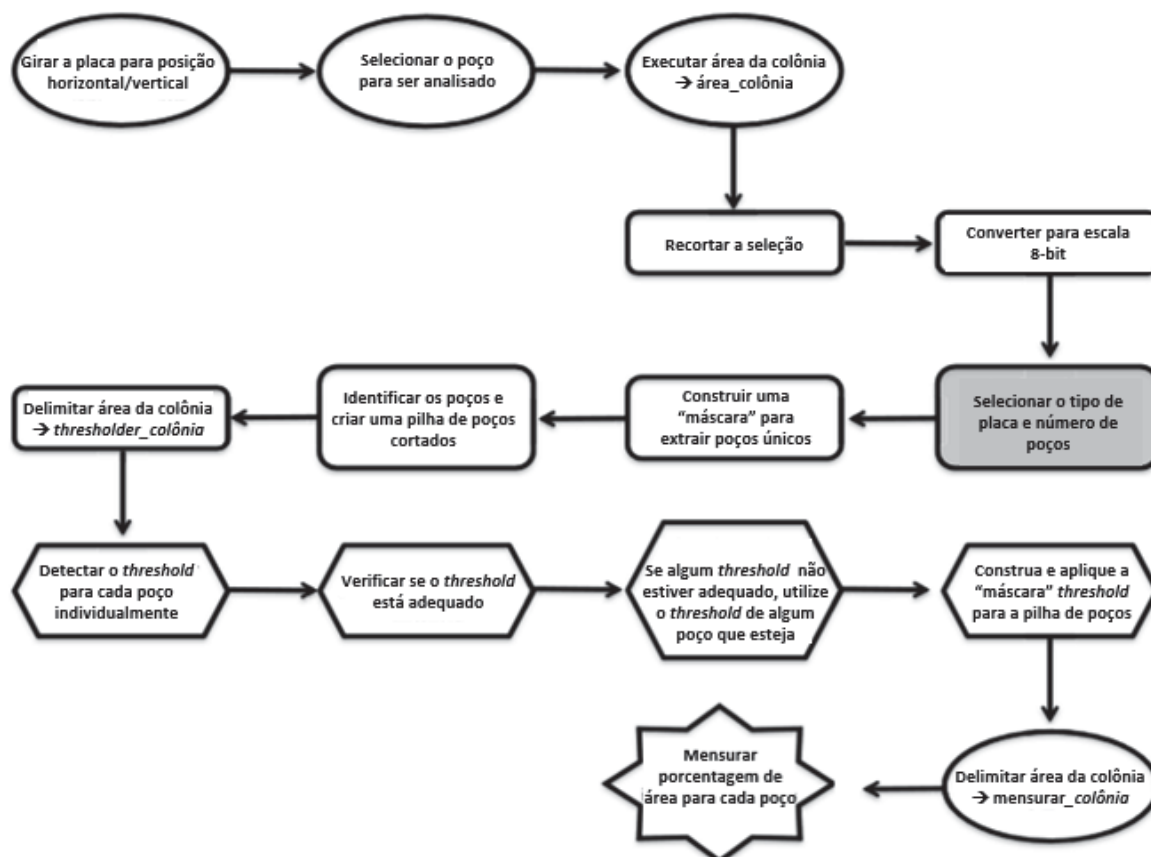


Figura 30. Passos a serem seguidos para análise das colônias pelo plugin.

Fonte: Adaptado de Guzmán et al., 2014

Ao inserir as imagens no ImageJ, estas foram convertidas para 8-bits. Após este passo, iniciou-se a análise pelo plugin, o qual seleciona o centro do poço, realiza a separação de cores e fornece os valores de porcentagem da área das colônias em relação a área do poço (Figura 31). Cada poço foi avaliado de forma individual.

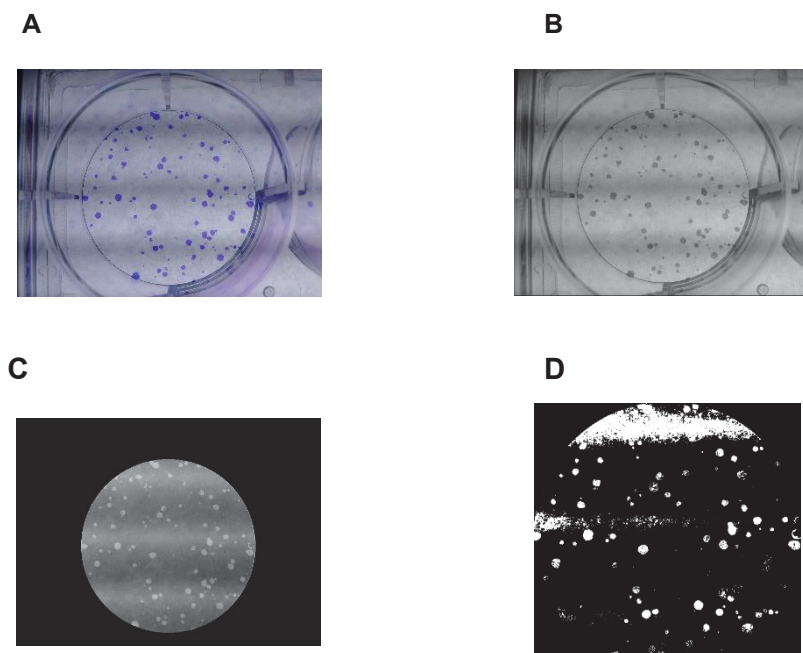


Figura 31. Etapas de análise da imagem pelo ImageJ utilizando o plugin desenvolvido por Guzmán et al, 2014. **(A)** Imagem inserida no programa. **(B)** Conversão da imagem em 8-bits. **(C)** Determinação do local do centro do poço. **(D)** Colonias a serem avaliadas.

Fonte: Dados do autor.

| Well # | Area Percent | Intensity Percent |
|--------|--------------|-------------------|
| 1 | 6.45 | 6.45 |

Figura 14. Imagem final fornecida pelo plugin com os resultados obtidos

Fonte: Dados do autor.

Após a análise, os dados foram tabelados a fim de realizar a comparação dos resultados obtidos entre os métodos em estudo.

10.4.3 Análise automatizada pelo software em desenvolvimento

As imagens obtidas das colônias foram inseridas no software e analisadas seguindo os passos descritos na Figura 33.

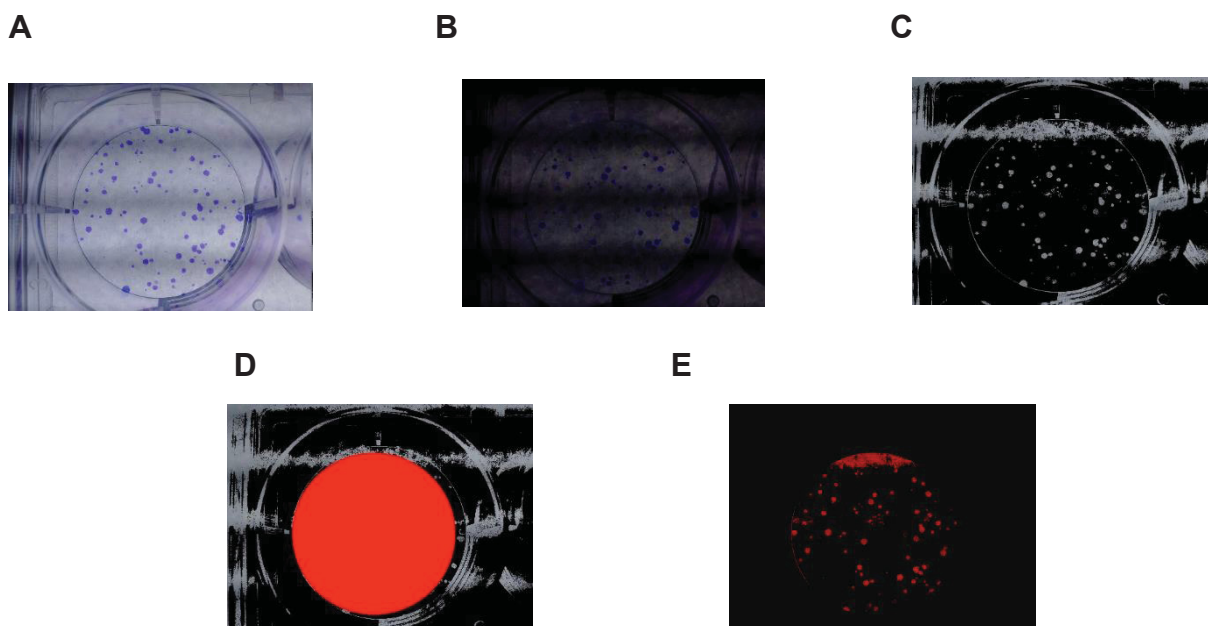


Figura 33. Etapas de análise da imagem pelo software e desenvolvimento. **(A)** Imagem inserida no programa. **(B)** Subtração da imagem do poço pela imagem do background. **(C)** Separação das cores da imagem em preto e branco. **(D)** Determinação do local do centro do poço. **(E)** Colônias a serem analisadas.

Fonte: Dados do autor.

Por fim, é gerado um documento de texto, o qual fornece os dados obtidos por meio do programa (Figura 34).

```

Resultados - Bloco de notas
Arquivo Editar Formatar Exibir Ajuda
Número de colônias: 35 colônias
Area individual das colônias: [ 374. 783.5 2010. 1848.5 433.5 1715.5 626.5 4046.5 2348.
2670.5 348.5 355. 1587.5 414. 829. 338. 1716.5 1894.5
447. 4495. 512.5 593. 626. 1218. 826. 312. 479.5
338. 475.5 1452.5 3214. 384. 659.5 4009.5 653.5] pixels
Area total das colônias: 45035.0 pixels
Area estimada do poço: 1734313.0828215918 pixels
Porcentagem estimada da area das colônias em relação ao poço: 2.596705314978745%
Area total estimada das colônias em relação ao valor médio de 9,6 cm²: 0.002704901369769526 cm²
Area individual estimada das colônias em relação ao valor médio de 9,6 cm²:
[ 2.24632644e-05 4.70587371e-05 1.20725031e-04 1.11024985e-04
2.60369656e-05 1.03036711e-04 3.76289710e-05 2.43041710e-04
1.41026056e-04 1.60396117e-04 2.09316782e-05 2.13220825e-05
9.53487493e-05 2.48657526e-05 4.97915673e-05 2.03010250e-05
1.03096774e-04 1.13787846e-04 2.68478053e-05 2.69979608e-04
3.07818797e-05 3.56168871e-05 3.75989399e-05 7.31557648e-05
4.96113807e-05 1.87394077e-05 2.87998270e-05 2.03010250e-05
2.85595781e-05 8.72403517e-05 1.93039925e-04 2.30638864e-05
3.96110237e-05 2.40819408e-04 3.92506505e-05] cm²

```

Figura 15. Documento de texto gerado pelo software em desenvolvimento.

Fonte: Dados do autor.

Após a análise, os dados foram tabelados a fim de realizar a comparação dos resultados obtidos entre os métodos.

10.5 VALIDAÇÃO DO SOFTWARE PARA AS LINHAGENS ESTUDADAS

A fim de validar o uso do software para as linhagens estudadas (MCF7 e McCoy), os dados obtidos pela análise manual, por meio do plugin e pelo software em desenvolvimento foram tabelados e comparados utilizando o software Microsoft Office Excel 2013.

11 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos a partir dos três métodos de análise constam nas Tabelas 5, 6, 7 e 8. O plugin não fornece o número de colônias, por este motivo estes valores não constam nas tabelas e são descritos por (-), assim como a área das colônias pelo método manual.

TABELA 5. Número de colônias da linhagem MCF7 contadas pelo método manual e pelo software em desenvolvimento.

| <i>NÚMERO DE COLÔNIAS (MCF7)</i> | | | |
|----------------------------------|---------------|---------------|-----------------|
| <i>IMAGEM</i> | <i>MANUAL</i> | <i>PLUGIN</i> | <i>SOFTWARE</i> |
| CTRL 1 | 130 | - | 146 |
| CTRL 2 | 107 | - | 104 |
| CTRL 3 | 99 | - | 109 |
| FAT 1 | 33 | - | 38 |
| FAT 2 | 36 | - | 37 |
| FAT 3 | 23 | - | 24 |
| VC 1 | 39 | - | 42 |
| VC2 | 50 | - | 53 |
| VC3 | 40 | - | 41 |

Fonte: Dados do autor.

TABELA 6. Número de colônias da linhagem McCoy contadas por meio manual e pelo software em desenvolvimento.

| <i>NÚMERO DE COLÔNIAS (McCoy)</i> | | | |
|-----------------------------------|---------------|---------------|-----------------|
| <i>IMAGEM</i> | <i>MANUAL</i> | <i>PLUGIN</i> | <i>SOFTWARE</i> |
| CTRL 1 | 240 | - | 155 |
| CTRL 2 | 210 | - | 162 |
| CTRL 3 | 290 | - | 158 |

| | | | |
|-------|-----|---|-----|
| FAT 1 | 136 | - | 165 |
| FAT 2 | 195 | - | 152 |
| FAT 3 | 166 | - | 146 |
| VC 1 | 156 | - | 149 |
| VC2 | 219 | - | 144 |
| VC3 | 203 | - | 142 |

Fonte: Dados do autor.

Como mencionado anteriormente, uma grande desvantagem que a contagem manual apresenta sobre os demais métodos de análise do ensaio clonogênico, refere-se ao fato de que a mesma permite somente determinar o número de colônias. Tal particularidade muitas vezes limita a análise do resultado, pois dependendo da injúria causada nas células, pode não haver a redução do número de colônias, mas a diminuição da área das mesmas, devido a um menor número de células por colônia, como por exemplo na indução de senescência. Outras desvantagens do método manual referem-se a alta demanda de tempo para análise (em média 30 minutos por poço) e falta de reprodutibilidade, devido à variabilidade interpessoal e possíveis erros nos processos de contagem.

TABELA 7. Área das colônias da linhagem MCF7 determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento.

| ÁREA DAS COLÔNIAS (cm²) (MCF7) | | | |
|--|---------------|---------------|-----------------|
| IMAGEM | MANUAL | PLUGIN | SOFTWARE |
| CTRL 1 | - | 0,22 | 0,31 |
| CTRL 2 | - | 0,14 | 0,15 |
| CTRL 3 | - | 0,21 | 0,36 |
| FAT 1 | - | 0,07 | 0,04 |
| FAT 2 | - | 0,07 | 0,09 |
| FAT 3 | - | 0,06 | 0,06 |

| | | | |
|------|---|------|------|
| VC 1 | - | 0,98 | 0,06 |
| VC2 | - | 0,15 | 0,10 |
| VC3 | - | 0,09 | 0,09 |

Fonte: Dados do autor.

TABELA 8. Área das colônias da linhagem McCoy determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento.

| <i>ÁREA DAS COLÔNIAS (cm²) (McCoy)</i> | | | |
|---|---------------|---------------|-----------------|
| <i>IMAGEM</i> | <i>MANUAL</i> | <i>PLUGIN</i> | <i>SOFTWARE</i> |
| CTRL 1 | - | 1,82 | 0,61 |
| CTRL 2 | - | 1,00 | 0,52 |
| CTRL 3 | - | 1,36 | 0,60 |
| FAT 1 | - | 1,81 | 0,48 |
| FAT 2 | - | 0,05 | 0,51 |
| FAT 3 | - | 0,04 | 0,67 |
| VC 1 | - | 0,07 | 0,47 |
| VC2 | - | 0,05 | 0,53 |
| VC3 | - | 0,05 | 0,55 |

Fonte: Dados do autor.

Como mencionado anteriormente, o uso do plugin permitiu apenas a análise da área total das colônias, a qual foi realizada em aproximadamente 2 minutos por imagem. Contudo, esta análise se mostrou limitada, pois além da necessidade de se ter um programa de análise de imagem (ImageJ) instalado ao computador, deve-se seguir uma sequência de passos, muitas vezes difícil de compreender se o analisador não está habituado à linguagem computacional. Outro problema detectado através da execução da análise da imagem pelo plugin, refere-se a necessidade de se ajustar parâmetros de separação de cor para cada imagem. Estes pontos acabam dificultando e tornando a análise demorada. Deve-se destacar

também a falta de reprodutibilidade causada pela variação do método de separação de cores (NIYAZI; NIYAZI; BELKA, 2007).

Já a análise por meio do software em desenvolvimento permitiu a análise das colônias por todos os parâmetros analisados (número de colônias, determinação da área ocupada pelas mesmas nos poços e área média de cada colônia individualmente), realizando isto apenas com a inserção da imagem no programa e em um intervalo de tempo de aproximadamente 7 segundos por imagem, o que torna a análise rápida e prática. Os passos para análise das imagens são pré definidos pelo programa, o qual desconsidera distorções nas imagens, assim como delimita a área do poço sozinho, o que não torna necessário ajusta-los a cada imagem. Logo, nos quesitos tempo e praticidade, o software em desenvolvimento apresentou desempenho superior à contagem manual, bem como a utilização do plugin.

Para comparação da reprodutibilidade dos métodos avaliados, levou-se em consideração o erro aleatório de desvio padrão médio (σ_m), bem como demais erros aleatórios. A análise manual do número de colônias resultou em um erro aleatório de desvio padrão médio (σ_m) dado por $\sigma_m = 37$ colônias. Contando com este desvio, os valores do número de colônias e seus desvios padrão (σ_p), dependente dos demais erros aleatórios (σ_r) estão presentes nas tabelas 9 e 10 onde $\sigma_p = \sqrt{\sigma_m^2 + \sigma_r^2}$. Os valores foram representados pela média e desvio padrão.

TABELA 9. Média \pm desvio-padrão do número de colônias da linhagem MCF7 determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento.

| NÚMERO DE COLONIAS (MCF7) | | |
|----------------------------------|---------------|-----------------|
| | MANUAL | SOFTWARE |
| CTRL | 112 \pm 40 | 120 \pm 23 |
| FAT | 31 \pm 38 | 33 \pm 8 |
| VC | 43 \pm 38 | 45 \pm 7 |

Fonte: Dados do autor.

TABELA 10. Média \pm desvio-padrão do número de colônias da linhagem McCoy determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento.

| NÚMERO DE COLONIAS (McCoy) | | |
|-----------------------------------|---------------|-----------------|
| | MANUAL | SOFTWARE |
| CTRL | 247 \pm 55 | 158 \pm 4 |
| FAT | 166 \pm 47 | 154 \pm 10 |
| VC | 193 \pm 49 | 145 \pm 4 |

Fonte: Dados do autor.

Pode-se observar que o número de colônias não apresentou diferença estatística entre os métodos avaliados, entretanto, o desvio-padrão obtido por meio da contagem manual mostrou ser até 13,75 vezes maior do que o desvio padrão obtido pelo software, o que evidencia a melhor reprodutibilidade do programa.

A análise da Tabela 9, referente à comparação da determinação do número de colônias pelo método manual e pelo software, mostra que ambas análises apresentaram um padrão similar de redução do número de colônias frente aos tratamentos, resultado que confere com a literatura (BLAJESKI et al., 2002; GROTH-PEDERSEN et al., 2007; ESMAEILI-MAHANI; FALAHI; YAGHOobi, 2014).

Em relação a linhagem McCoy (Tabela 10), os valores obtidos pelos dois métodos, não apresentaram diferença estatística entre controle e tratados, o que era esperado, uma vez que já foi demonstrado que os tratamentos em questão não exercem efeito estatisticamente significativo sobre linhagens não tumorais, quando comparados ao controle (BURDMAN, 1966; JOHNSON et al., 1973; VILPO; KOSKI; VILPO, 2000).

Dessa forma, os resultados obtidos validam, mesmo que de forma preliminar, a utilização do software para a determinação do número de colônias.

A análise da área total das colônias realizada pelo plugin resultou em um erro aleatório de desvio padrão médio (σ_m) dado por $\sigma_m = 37$ colônias. Contando com este desvio, os valores do número de colônias e seus desvios padrão (σ_p),

dependente dos demais erros aleatórios (σ_r) estão presentes nas tabelas 11 e 12 onde $\sigma_p = \sqrt{\sigma_m^2 + \sigma_r^2}$. Os valores foram representados pela média e desvio padrão.

TABELA 11. Média \pm desvio-padrão dos valores das áreas das colônias da linhagem MCF7 determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento.

| ÁREAS DAS COLONIAS (MCF7) | | |
|----------------------------------|-----------------|-----------------|
| | PLUGIN | SOFTWARE |
| CTRL | 0,19 \pm 0,04 | 0,27 \pm 0,11 |
| FAT | 0,07 \pm 0,01 | 0,06 \pm 0,03 |
| VC | 0,41 \pm 0,50 | 0,08 \pm 0,02 |

Fonte: Dados do autor.

TABELA 12. Média \pm desvio-padrão dos valores das áreas das colônias da linhagem McCoy determinadas pelo plugin e pelo software em desenvolvimento.

| ÁREAS DAS COLONIAS (McCoy) | | |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|
| | PLUGIN | SOFTWARE |
| CTRL | 1,39 \pm 0,41 | 0,58 \pm 0,05 |
| FAT | 0,63 \pm 1,02 | 0,55 \pm 0,10 |
| VC | 0,06 \pm 0,01 | 0,52 \pm 0,04 |

Fonte: Dados do autor.

A observação da Tabela 11 mostra que o plugin utilizado apresentou diferença estatística em relação ao controle, na redução das áreas das colônias quando células da linhagem MCF7 foram tratadas com FAT. Contudo, não houve diferença estatística quando foram comparados CTRL e VC. Este fato sinaliza um problema na interpretação das imagens pelo plugin, uma vez que o esperado era uma redução significativa da área das colônias quando as células foram tratadas com VC, visto que este fármaco já teve sua atividade citotóxica e antiproliferativa em linhagem MCF7 descrita na literatura (BLAJESKI et al., 2002; GROTH-PEDERSEN et al., 2007; ESMAEILI-MAHANI; FALAHI; YAGHOUBI, 2014).

O software, diferentemente do plugin, indicou uma redução estatisticamente significativa entre controle e os tratamentos (incluindo VC) para a linhagem MCF7, conforme o descrito pela literatura (Tabela 11).

Os resultados obtidos para a linhagem McCoy por meio do plugin, indicaram uma redução estatisticamente significativa entre controle e VC (Tabela 12), contrariando os dados obtidos anteriormente neste trabalho e na literatura (BURDMAN, 1966; JOHNSON et al., 1973; VILPO; KOSKI; VILPO, 2000). Esses dados reforçam a existência de problemas durante o processamento das imagens. Por sua vez, o software indicou o resultado esperando, sendo que não houve diferença estatística entre as amostras (Tabela 12).

Dessa forma, os resultados obtidos validam, mesmo que de forma preliminar, a utilização do software para a determinação da área total e do número das colônias.

Experimentos estão sendo conduzidos utilizando-se outras linhagens celulares (MDA-MB-231, NIH, HeLa, HRT 18) e outros quimioterápicos clássicos (doxorubicina, cisplatina, paclitaxel, vimblastina) para validação do software. Estes experimentos estão sendo realizados em maior número de replicatas a fim de delimitar parâmetros como exclusão de *clusters*, delimitação mais precisa de *threshold*, e sensibilidade do software.

12 CONCLUSÕES

A execução deste trabalho permite concluir que:

- A análise do número de colônias pelo software em desenvolvimento demonstrou-se eficiente, uma vez que os resultados obtidos foram coerentes com a literatura e com a contagem manual;
- A contagem do número de colônias pelo software em desenvolvimento foi mais reprodutível que o método manual, apresentando menor desvio-padrão;
- O software em desenvolvimento demonstrou ser mais eficaz na mensuração das áreas das colônias quando comparado ao uso de plugin, apresentando resultados que corroboram o que é descrito pela literatura;
- O software em desenvolvimento analisa uma maior quantidade de parâmetros (número de colônias, área individual e total das colônias em pixels e em cm^2) quando comparado à contagem manual e plugin;
- O uso do software em desenvolvimento para a determinação do número de colônias e da mensuração da área das mesmas otimizou o tempo de análise.
- O tempo de análise da contagem manual foi 257 vezes maior do que o tempo da análise pelo software, assim como a análise das imagens pelo plugin é 17 vezes mais lenta que a análise pelo software.

REFERÊNCIAS

AGGARWAL, S.; et al. Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor- κ B signaling. **International Journal of Cancer**, [s.l.], v. 111, n. 5, p.679-692, 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.20333>.

ALFADDA, A. A.; SALLAM, R. M. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. **Journal of Biomedicine And Biotechnology**, [s.l.], v. 2012, p.1-14, 2012. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/936486>.

ALMEIDA, V. L.; et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.118-129, fev. 2005. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422005000100021>.

AMARAVADI, R. K.; THOMPSON, C. B.. The Roles of Therapy-Induced Autophagy and Necrosis in Cancer Treatment. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 13, n. 24, p.7271-7279, 15 dez. 2007. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-1595>.

AUDIC, Y.; HARTLEY, R. S. Post-transcriptional regulation in cancer. **Biology of The Cell**, [s.l.], v. 96, n. 7, p.479-498, set. 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biolcel.2004.05.002>.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow?. **The Lancet**, [s.l.], v. 357, n. 9255, p.539-545, fev. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(00\)04046-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(00)04046-0).

BARBIERI, S. Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: critical role of NADPH oxidase. **Cardiovascular Research**, [s.l.], v. 60, n. 1, p.187-197, 15 out. 2003. Oxford University Press (OUP). [http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363\(03\)00365-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0008-6363(03)00365-1).

BARBOSA, K. B. F.; et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.629-643, ago. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-52732010000400013>.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Natural products with antileptotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.141-148, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2007000100022>.

BARNUM, K. J.; O'CONNELL, M. J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. **Methods In Molecular Biology**, [s.l.], p.29-40, 2014. Springer New York. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4939-0888-2_2.

BARREIROS, A.L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, n. 1, p.113-123, fev. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422006000100021>.

BARTEK, J.; LUKAS, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**, [s.l.], v. 3, n. 5, p.421-429, maio 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1535-6108\(03\)00110-7](http://dx.doi.org/10.1016/s1535-6108(03)00110-7).

BEHL, C.; ZIEGLER, C. Cell Cycle: The Life Cycle of a Cell. **Cell Aging: Molecular Mechanisms and Implications for Disease**, [s.l.], p.9-19, 19 dez. 2013. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-45179-9_2.

BENVINDO, O. D. et al. Relaxant effect and possible mechanism of 17-nor-subincanadine E in rabbit corpora cavernosa. **Asian Journal of Andrology**, [s.l.], v. 13, n. 5, p.747-753, 18 jul. 2011. Medknow. <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2011.41>.

BLAJESKI, A. L. et al. G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. **Journal of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 110, n. 1, p.91-99, 1 jul. 2002. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci13275>.

BOCCA, Claudia et al. Antiproliferative effects of COX-2 inhibitor celecoxib on human breast cancer cell lines. **Molecular And Cellular Biochemistry**, [s.l.], v. 350, n. 1-2, p.59-70, 8 dez. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-010-0682-4>.

BONASSA, E. M. A. Conceitos gerais em quimioterapia antineoplásica. Em: Bonassa E. M. A, Santana TR. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. São Paulo (SP): Atheneu; 2005. p. 3-19 .

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, [s.l.], v. 33, n. 6, p.1359-1369, 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010000600026>.

BRANDÃO, R. D. et al. A randomised controlled phase II trial of pre-operative celecoxib treatment reveals anti-tumour transcriptional response in primary breast cancer. **Breast Cancer Research**, [s.l.], v. 15, n. 2, p.1-12, abr. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/bcr3409>.

BREYER, R. M.; et al. PROSTANOIDRECEPTORS: Subtypes and Signaling. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.661-690, abr. 2001. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.661>.

BURDMAN, J. A. A Note on the Selective Toxicity of Vincristine Sulfate on Chick-Embryo Sensory Ganglia in Tissue Culture². **Jnci: Journal of the National Cancer**

Institute, [s.l.], v. 37, n. 3, p.331-332, 1 set. 1966. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/37.3.331>.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 51, p.15-25, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>.

CASTILHOS, T. S.; et al. Avaliação in vitro das atividades antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana do alcalóide montanina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.209-214, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2007000200013>.

CHAN, F.; MORIWAKI, K.; ROSA, M. J. de. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase Activity. **Methods in Molecular Biology**, [s.l.], p.65-70, 2013. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7

CHANCE, B; SIES, H; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological Reviews**, [s.l.], v. 59, n. 3, p.527-605, jul. 1979. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>.

CHANDEL, M.; et al. Investigations on Antioxidant, Antiproliferative and COX-2 Inhibitory Potential of Alkaloids from *Anthocephalus cadamba*(Roxb.)Miq. Leaves. **Chemistry & Biodiversity**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.1-24, 20 mar. 2017. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/cbdv.201600376>.

CHENG, H. H. et al. Control of cyclooxygenase-2 expression and tumorigenesis by endogenous 5-methoxytryptophan. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 33, p.13231-13236, 31 jul. 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1209919109>.

CHIU, W.; et al. Vinca alkaloids cause aberrant ROS-mediated JNK activation, Mcl-1 downregulation, DNA damage, mitochondrial dysfunction, and apoptosis in lung adenocarcinoma cells. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 83, n. 9, p.1159-1171, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2012.01.016>.

CHIUCHETTA, S. J. R.; CASTRO-PRADO, M. A. A. de. Vincristine induces somatic segregation, via mitotic crossing-over, in diploid cells of *Aspergillus nidulans*. **Biological Research**, [s.l.], v. 35, n. 1, p.1-7, 2002. SciELO Comisión Nacional de Investigación Científica Y Tecnológica (CONICYT). <http://dx.doi.org/10.4067/s0716-97602002000100006>.

CHOCKALINGAM, V.; KADALI, S.; GNANASAMBANTHAM, P. Antiproliferative and antioxidant activity of *Aegle marmelos* (Linn.) leaves in Dalton's Lymphoma Ascites transplanted mice. **Indian Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.225-235, 2012. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0253-7613.93854>.

CHOUDHRY, P. High-Throughput Method for Automated Colony and Cell Counting by Digital Image Analysis Based on Edge Detection. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 2, p.1-23, 5 fev. 2016. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0148469>.

COLAVITTI, R.; et al. Reactive Oxygen Species as Downstream Mediators of Angiogenic Signaling by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2/KDR. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 277, n. 5, p.3101-3108, 21 nov. 2001. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m107711200>.

COLOTTA, F. et al. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. **Carcinogenesis**, [s.l.], v. 30, n. 7, p.1073-1081, 25 maio 2009. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgp127>.

COURTOIS, G; GILMORE, T. D. Mutations in the NF- κ B signaling pathway: implications for human disease. **Oncogene**, [s.l.], v. 25, n. 51, p.6831-6843, out. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209939>.

CROWLEY, L. C.; CHOJNOWSKI, G.; WATERHOUSE, N. J. Measuring the DNA Content of Cells in Apoptosis and at Different Cell-Cycle Stages by Propidium Iodide Staining and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s.l.], v. 2016, n. 10, p.905-911, out. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot087247>.

DAI, Zhi-jun et al. Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in Vitro and in Vivo. **Cancer Cell International**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.53-61, 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2867-12-53>.

DALTON, L. K.; et al. Synthesis of the tumour-inhibitory alkaloids, ellipticine, 9-methoxyellipticine, and related pyrido[4,3-b]carbazoles. **Australian Journal Of Chemistry**, [s.l.], v. 20, n. 12, p.2715-2730, 1967. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/ch9672715>

DEMPKE, W.; et al. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy?. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, [s.l.], v. 127, n. 7, p.411-417, 1 jul. 2001. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s004320000225>.

DENG, W.; ZHU, Y.; WU, K. K. Up-regulation of p300 Binding and p50 Acetylation in Tumor Necrosis Factor- α -induced Cyclooxygenase-2 Promoter Activation. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 278, n. 7, p.4770-4777, 5 dez. 2002. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.m209286200>.

DIAZ-MORALLI, S.; et al. Targeting cell cycle regulation in cancer therapy. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 138, n. 2, p.255-271, maio 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2013.01.011>.

DOLABELA, Maria Fâni et al. Aspidosperma species as sources of anti-malarials: uleine is the major anti-malarial indole alkaloid from *Aspidosperma parvifolium* (Apocynaceae). **Malaria Journal**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-12, dez. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/s12936-015-0997-4>.

EDINGER, A. L.; THOMPSON, C. B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion In Cell Biology**, [s.l.], v. 16, n. 6, p.663-669, dez. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2004.09.011>.

ELKIND, M. M.; HAN, A.; VOLZ, K. W. Radiation Response of Mammalian Cells Grown in Culture. IV. Dose Dependence of Division Delay and Postirradiation Growth of Surviving and Nonsurviving Chinese Hamster Cells. Jnci: **Journal of the National Cancer Institute**, [s.l.], p.705-721, abr. 1963. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jnci/30.4.705>.

ENGERS, R.; GABBERT, H. E. Mechanisms of tumor metastasis: cell biological aspects and clinical implications. **Journal of Cancer Research And Clinical Oncology**, [s.l.], v. 126, n. 12, p.682-692, 17 nov. 2000. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s004320000148>.

ESKELINEN, E.; SAFTIG, P. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Cell Research**, [s.l.], v. 1793, n. 4, p.664-673, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.07.014>.

ESMAEILI-MAHANI, S.; FALAHI, F.; YAGHOUBI, M. M. Proapoptotic and Antiproliferative Effects of Thymus caramanicus on Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7) and Its Interaction with Anticancer Drug Vincristine. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, [s.l.], v. 2014, p.1-7, 2014. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/893247>.

FAVALORO, B.; et al. Role of Apoptosis in disease. **Aging**, [s.l.], v. 4, n. 5, p.330-349, 31 maio 2012. Impact Journals, LLC. <http://dx.doi.org/10.18632/aging.100459>.

FEOKTISTOVA, M.; GESERICK, P.; LEVERKUS, M. Crystal Violet Assay for Determining Viability of Cultured Cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s.l.], v. 2016, n. 4, p.343-347, abr. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/pdb.prot087379>.

FIGUEIREDO, E. R.; et al. Isolamento, identificação e avaliação da atividade antileucêmica de alcaloides indólicos monoterpênicos de *Tabernaemontana salzmannii* A. DC., Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.75-81, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2010000100016>.

FRANKEN, N. A. P.; et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 1, n. 5, p.2315-2319, dez. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2006.339>.

FRIDOVICH, I. The trail to superoxide dismutase. **Protein Science**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.2688-2690, dez. 1998. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/pro.5560071225>.

FULDA, S. The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells. **Cancer Biology & Therapy**, [s.l.], v. 14, n. 11, p.999-1004, nov. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/cbt.26428>.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. FADD: an endogenous inhibitor of RIP3-driven regulated necrosis. **Cell Research**, [s.l.], v. 21, n. 10, p.1383-1385, 6 set. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.147>.

GASKELL, A.J.; JOULE, J.A. Subincanine, a C22 - carbazole alkaloid. **Tetrahedron Letters**, [s.l.], v. 11, n. 1, p.77-82, jan. 1970. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0040-4039\(01\)87568-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0040-4039(01)87568-7).

GAZIANO, R. Antitumor effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine: Evidence and perspectives. **World Journal Of Gastrointestinal Oncology**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.30-39, 2016. Baishideng Publishing Group Inc. <http://dx.doi.org/10.4251/wjgo.v8.i1.30>.

GEORGE, P.; JOURNEY, L. J.; GOLDSTEIN, M. N. Effect of Vincristine on the Fine Structure of HeLa Cells during Mitosis. **Jnci: Journal of the National Cancer**

Institute, [s.l.], p.355-375, ago. 1965. Oxford University Press (OUP).
<http://dx.doi.org/10.1093/jnci/35.2.355>.

GILMORE, T D. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. **Oncogene**, [s.l.], v. 25, n. 51, p.6680-6684, out. 2006. Springer Nature.
<http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1209954>.

GLOIRE, Geoffrey; LEGRAND-POELS, Sylvie; PIETTE, Jacques. NF- κ B activation by reactive oxygen species: Fifteen years later. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 72, n. 11, p.1493-1505, nov. 2006. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2006.04.011>.

GLORIEUX, C.; et al. Catalase overexpression in mammary cancer cells leads to a less aggressive phenotype and an altered response to chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 82, n. 10, p.1384-1390, nov. 2011. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2011.06.007>.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, [s.l.], v. 140, n. 6, p.883-899, mar. 2010. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.025>

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

GROTH-PEDERSEN, L.; et al. Vincristine Induces Dramatic Lysosomal Changes and Sensitizes Cancer Cells to Lysosome-Destabilizing Siramesine. **Cancer Research**, [s.l.], v. 67, n. 5, p.2217-2225, 1 mar. 2007. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-06-3520>

GUPTA, M.; et al. Antitumor Activity and Antioxidant Status of Caesalpinia bonducella Against Ehrlich Ascites Carcinoma in Swiss Albino Mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 94, n. 2, p.177-184, 2004. Japanese Pharmacological Society. <http://dx.doi.org/10.1254/jphs.94.177>

GUPTA, S. C.; et al. Inhibiting NF- κ B activation by small molecules as a therapeutic strategy. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Gene Regulatory Mechanisms**, [s.l.], v. 1799, n. 10-12, p.775-787, out. 2010. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2010.05.004>.

GUZMÁN, C.; et al. ColonyArea: An ImageJ Plugin to Automatically Quantify Colony Formation in Clonogenic Assays. **Plos One**, [s.l.], v. 9, n. 3, p.1-9, 19 mar. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092444>.

HALASI, M.; et al. ROS inhibitor N-acetyl-L-cysteine antagonizes the activity of proteasome inhibitors. **Biochemical Journal**, [s.l.], v. 454, n. 2, p.201-208, 1 set. 2013. Portland Press Ltd.. <http://dx.doi.org/10.1042/bj20130282>.

HALLIWELL, B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 141, n. 2, p.312-322, 1 jun. 2006. American Society of Plant Biologists (ASPB). <http://dx.doi.org/10.1104/pp.106.077073>.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 142, n. 2, p.231-255, maio 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>.

HAMAD, I.; et al. Intracellular scavenging activity of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchromane-2-carboxylic acid) in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. **Journal Of Natural Science, Biology And Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.16-21, 2010. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0976-9668.71667>.

HAN, J.; ZHONG, C.; ZHANG, D. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. **Nature Immunology**, [s.l.], v. 12, n. 12, p.1143-1149, 16 nov. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2159>.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, [s.l.], v. 144, n. 5, p.646-674, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.

HARVEY, M. Focusing the international personnel performance appraisal process. **Human Resource Development Quarterly**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.41-62, 1997. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/hrdq.3920080106>.

HENRIQUEZ, J. P.; et al. Wnt signaling promotes AChR aggregation at the neuromuscular synapse in collaboration with agrin. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 105, n. 48, p.18812-18817, 19 nov. 2008. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0806300105>.

HILÁRIO, Maria Odete Esteves; TERRERI, Maria Teresa; LEN, Cláudio Arnaldo. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de**

Pediatrics, [s.l.], v. 82, n. 5, p.206-212, nov. 2006. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0021-75572006000700011>.

HOLANDA, C. M. de C. X. Effect of paclitaxel (Taxol®) on the biodistribution of sodium pertechnetate (Na^{99m}TcO₄) in female Wistar rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, [s.l.], v. 51, p.191-196, dez. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132008000700031>.

HOLOHAN, C.; et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 13, n. 10, p.714-726, 24 set. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3599>.

HUBER, O. et al. Pontin and Reptin, Two Related ATPases with Multiple Roles in Cancer. **Cancer Research**, [s.l.], v. 68, n. 17, p.6873-6876, 1 set. 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.can-08-0547>.

ICHIM, G.; TAIT, S. W. G. A fate worse than dFATH: apoptosis as an oncogenic process. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 16, n. 8, p.539-548, 1 jul. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.58>.

IGNEY, F.; H.; KRAMMER, P. H. DEATH AND ANTI-DEATH: TUMOUR RESISTANCE TO APOPTOSIS. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 2, n. 4, p.277-288, 1 abr. 2002. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc776>.

INCA. **ESTIMATIVA 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Ed. Coordenação de prevenção e vigilância, Rio de Janeiro, 2016.

INOUE, H.; TANABE, T. Transcriptional Role of the Nuclear Factor κB Site in the Induction by Lipopolysaccharide and Suppression by Dexamethasone of Cyclooxygenase-2 in U937 Cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 244, n. 1, p.143-148, mar. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/bbrc.1998.8222>.

ISAH, T. Anticancer alkaloids from trees: Development into drugs. **Pharmacognosy Reviews**, [s.l.], v. 10, n. 20, p.90-99, 2016. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/0973-7847.194047>.

ITHARAT, A.; et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 90, n. 1, p.33-38, jan. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2003.09.014>

JAWAD, A.; et al. The influence of extraction solvents on the anticancer activities of Palestinian medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, [s.l.], v. 8, n. 9, p.408-415, 3 mar. 2014. Academic Journals. <http://dx.doi.org/10.5897/jmpr2013.5044>.

JOHNSON, F. Leonard et al. Seizures associated with vincristine sulfate therapy. **The Journal Of Pediatrics**, [s.l.], v. 82, n. 4, p.699-702, abr. 1973. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476\(73\)80602-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476(73)80602-x).

JONES, S.; et al. The human tumor clonogenic assay in human breast cancer. **Journal Of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.92-97, jan. 1985. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.1985.3.1.92>

KARIM, S.; BHANDARI, U.; KUMAR, H.; SALAM, A.; SIDDIQUI, M. A. A.; PILLAI, K. K. Doxorubicin induced cardiotoxicity and its modulation by drugs. **Indian Journal of Pharmacology**, Ahmedabad, v. 33, p. 203-207, 2001.

KARIN, M; BEN-NERIAH, Y. Phosphorylation Meets Ubiquitination: The Control of NF- κ B Activity. **Annual Review of Immunology**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.621-663, abr. 2000. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.18.1.621>.

KIL, I. S.; KIM, S. Y.; PARK, J. Glutathionylation regulates I κ B. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s.l.], v. 373, n. 1, p.169-173, ago. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.06.007>.

KLUZA, J.; et al. Induction of apoptosis by the plant alkaloid sampangine in human HL-60 leukemia cells is mediated by reactive oxygen species. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 525, n. 1-3, p.32-40, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.09.050>

KOBAYASHI, J.; et al. Subincanadines A–C, Novel Quaternary Indole Alkaloids from *Aspidospermasubincanum*. **The Journal Of Organic Chemistry**, [s.l.], v. 67, n. 18, p.6449-6455, set. 2002. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jo025854b>.

KOCH, A.; et al. Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 101, n. 1-3, p.95-99, out. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.03.011>.

KOKI, A.t.; et al. Characterization of cyclooxygenase-2 (COX-2) during tumorigenesis in human epithelial cancers: evidence for potential clinical utility of COX-2 inhibitors in epithelial cancers. **Prostaglandins, Leukotrienes And Essential Fatty Acids**

(plefa), [s.l.], v. 66, n. 1, p.13-18, jan. 2002. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1054/plef.2001.0335>.

KUROSAKA, K.; et al. Silent Cleanup of Very Early Apoptotic Cells by Macrophages. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 171, n. 9, p.4672-4679, 20 out. 2003. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.171.9.4672>.

KUMARI, R.; KOHLI, S.; DAS, S. P53 regulation upon genotoxic stress: intricacies and complexities. **Molecular & Cellular Oncology**, [s.l.], v. 1, n. 3, p.1-13, 15 set. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.4161/23723548.2014.969653>.

KUO, Y.; et al. Ellipticine induces apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Life Sciences**, [s.l.], v. 78, n. 22, p.2550-2557, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.041>.

LI, F.; RAJENDRAN, P.; SETHI, G. Thymoquinone inhibits proliferation, induces apoptosis and chemosensitizes human multiple myeloma cells through suppression of signal transducer and activator of transcription 3 activation pathway. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 161, n. 3, p.541-554, 3 set. 2010. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00874.x>.

LIOU, G.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radical Research**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.479-496, jan. 2010. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10715761003667554>.

LIPINSKI, B. Hydroxyl Radical and Its Scavengers in Health and Disease. **Oxidative Medicine And Cellular Longevity**, [s.l.], v. 2011, p.1-9, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/809696>.

LOBERG, R. D. et al. The Lethal Phenotype of Cancer: The Molecular Basis of Death Due to Malignancy. **Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, [s.l.], v. 57, n. 4, p.225-241, 1 jul. 2007. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.3322/canjclin.57.4.225>.

LONGLEY, D.; JOHNSTON, Pg. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of Pathology**, [s.l.], v. 205, n. 2, p.275-292, jan. 2005. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/path.1706>.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, [s.l.], v. 481, n. 7381, p.287-294, 18 jan. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10760>.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. v. 1. 5ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 384p.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. **J Biol Chem**,v.193. p. 265-275, 1951.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends In Biochemical Sciences**, [s.l.], v. 30, n. 11, p.630-641, nov. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibs.2005.09.005>.

MARI, J. F.; et al. IL-1 α -induced COX-2 expression in human intestinal myofibroblasts is dependent on a PKC ζ -ROS pathway,**Gastroenterology**, [s.l.], v. 124, n. 7, p.1855-1865, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0016-5085\(03\)00399-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0016-5085(03)00399-8).

MARNETT, L. J.; et al. Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2. **Journal of Biological Chemistry**, [s.l.], v. 274, n. 33, p.22903-22906, 13 ago. 1999. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.274.33.22903>.

MARQUES, M.F.S. **Contribuição ao estudo químico do gênero *Aspidosperma*: *Aspidosperma ramiflorum* Muell.** Arg. 1988. 148p. Dissertação (Mestrado-Área de Concentração em Química Orgânica) - Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MARTINS, Waleska K. et al. Rapid screening of potential autophagic inductor agents using mammalian cell lines. **Biotechnology Journal**, [s.l.], v. 8, n. 6, p.730-737, 21 mar. 2013. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/biot.201200306>.

MCGAHON, A. J.; et al. Chapter 9 The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in Vitro. **Cell Death**, [s.l.], p.153-185, 1995. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61929-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61929-9).

MEEK, D. W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response?. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], p.16-27, 22 out. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc2716>.

MEER, F. J.; et al. Apoptosis- and necrosis-induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography. **Lasers in Medical Science**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.259-267, 10 set. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10103-009-0723-y>.

MEN, J. L.; TAYLOR, W. I. A uniform numbering system for indole alkaloids. **Experientia**, [s.l.], v. 21, n. 9, p.508-510, set. 1965. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02138961>.

MILLER, A. B. et al. Reporting results of cancer treatment. **Cancer**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.207-214, 1 jan. 1981. Wiley-Blackwell. [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142\(19810101\)47:13.0.co;2-6](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0142(19810101)47:13.0.co;2-6).

MISRA, N.; GUPTA, A. K. Effect of salinity and different nitrogen sources on the activity of antioxidant enzymes and indole alkaloid content in *Catharanthus roseus* seedlings. **Journal Of Plant Physiology**, [s.l.], v. 163, n. 1, p.11-18, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2005.02.011>.

MOFFATT, J. Apoptosis induced by 1'-acetoxychavicol acetate in Ehrlich ascites tumor cells is associated with modulation of polyamine metabolism and caspase-3 activation. **Carcinogenesis**, [s.l.], v. 21, n. 12, p.2151-2157, 1 dez. 2000. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/21.12.2151>.

MORGAN, M. J; LIU, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. **Cell Research**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.103-115, 28 dez. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.178>.

MORO, E. M. **Algebraic geometry modeling in information theory**, Vol. 8, World Scientific Publishing Co Pte Ltd, 2013.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [s.l.], v. 65, n. 1-2, p.55-63, dez. 1983. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

MONTELES, R.; PINHEIRO, C.U.B. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. **Revista Biologia e Ciências da Terra**, v.7, n.2, p.38-48, 2007.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic Cell Survival Assay. **Chemosensitivity**, [s.l.], p.021-028, 2005. Humana Press. <http://dx.doi.org/10.1385/1-59259-869-2:021>.

MURPHY, P.; TIFFANY, H. Cloning of complementary DNA encoding a functional human interleukin-8 receptor. **Science**, [s.l.], v. 253, n. 5025, p.1280-1283, 13 set. 1991. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1891716>.

NARDIN, J.; et al. Effects of Himatanthus lancifolius on Human Leukocyte Chemotaxis and their Adhesion to Integrins. **Planta Medica**, [s.l.], v. 74, n. 10, p.1253-1258, ago. 2008. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-2008-1074582>.

NARKO, K.; et al. COX-2 inhibitors and genetic background reduce mammary tumorigenesis in cyclooxygenase-2 transgenic mice. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, [s.l.], v. 76, n. 1-4, p.86-94, maio 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2005.01.002>.

NAUDÉ, P. J. W.; et al. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. **Febs Journal**, [s.l.], v. 278, n. 6, p.888-898, 8 fev. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08017.x>

NIEMELÄ, M.; et al. CIP2A signature reveals the MYC dependency of CIP2A-regulated phenotypes and its clinical association with breast cancer subtypes. **Oncogene**, [s.l.], v. 31, n. 39, p.4266-4278, 16 jan. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.599>.

NIIDA, H.; NAKANISHI, M. DNA damage checkpoints in mammals. **Mutagenesis**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.3-9, 28 nov. 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gei063>.

NILES, A. L. A.; MORAVEC, R.; RISS, T. L. Update on in vitro cytotoxicity assays for drug development. **Expert Opinion On Drug Discovery**, [s.l.], v. 3, n. 6, p.655-669, 22 maio 2008. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.3.6.655>.

NIYAZI, M.; NIYAZI, I.; BELKA, C. Counting colonies of clonogenic assays by using densitometric software. **Radiation Oncology**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.4-7, 2007. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1748-717x-2-4>.

OBRIEN, J.; et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal Of Biochemistry**, [s.l.], v. 267, n. 17, p.5421-5426, set. 2000. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, [s.l.], v. 4, n. 8, p.592-603, ago. 2004. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrc1412>.

OLIVEIRA, A. de.; et al. Antimalarial activity of ulein and proof of its action on the Plasmodium falciparum digestive vacuole. **Malaria Journal**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.1-2, 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2875-9-s2-o9>.

OLIVEIRA, A. K. M.; et al. Germinação de sementes de *Aspidosperma subincanum* Mart. ex A. DC em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, [s.l.], v. 17, n. 4, p.642-648, dez. 2015. FapUNIFESP (SciELO). http://dx.doi.org/10.1590/1983-084x/14_082.

OLIVEIRA, V. A. de.; et al. In vitro evaluation of antitumoral efficacy of catalase in combination with traditional chemotherapeutic drugs against human lung adenocarcinoma cells. **Tumor Biology**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.10775-10784, 12 fev. 2016. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-4973-6>.

ONODERA, Y.; et al. Reactive oxygen species induce Cox-2 expression via TAK1 activation in synovial fibroblast cells. **Febs Open Bio**, [s.l.], v. 5, n. 1, p.492-501, 1 jan. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2015.06.001>.

PAIVA, P. P. Avaliação da atividade antitumoral e anti-inflamatória da fração rica em alcaloides fenantroquinolizidínicos de *Boehmeria caudata* Sw. Campinas – SP. [s.n.], 2016.

PAPAYANNOPOULOS, V.; ZYCHLINSKY, A. NETs: a new strategy for using old weapons. **Trends In Immunology**, [s.l.], v. 30, n. 11, p.513-521, nov. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2009.07.011>.

PARCHMENT, R. E.; et al. Pharmacologic validation of human tumor clonogenic assays based on pleiotropic drug resistance: Implications for individualized chemotherapy and new drug screening programs. **The International Journal Of Cell Cloning**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.359-368, 1992. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/stem.5530100608>.

DUBOIS, P. F. Python: Batteries Included, vol. 9 of **Computing in Science & Engineering**. IEEE/AIP, May 2007.

RAJAGOPALAN, S.; et al. Mapping the physical and functional interactions between the tumor suppressors p53 and BRCA2. **Proceedings of The National Academy Of**

Sciences, [s.l.], v. 107, n. 19, p.8587-8592, 26 abr. 2010. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1003689107>.

REED, J. C. Bcl-2 family proteins. **Oncogene**, [s.l.], v. 17, n. 25, p.3225-3236, dez. 1998. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1202591>.

REPETTO, G.; PESO, A. del.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, [s.l.], v. 3, n. 7, p.1125-1131, jun. 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2008.75>.

REUTER, S.; et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 49, n. 11, p.1603-1616, dez. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006>.

ROGERO, S. O.; et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.317-320, jun. 2003. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-14392003000300003>.

ROLÓN, M.; et al. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, [s.l.], v. 99, n. 2, p.103-107, 28 fev. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-006-0126-y>.

RUDIN, M.; et al. Determination of rat heart morphology and function in vivo in two models of cardiac hypertrophy by means of magnetic resonance imaging. **Basic Research in Cardiology**, [s.l.], v. 86, n. 2, p.165-174, mar. 1991. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/bf02190549>.

RUUSUVUORI, P.; et al. Quantitative analysis of colony morphology in yeast. *Biotechniques*, [s.l.], v. 56, n. 1, p.18-27, 1 jan. 2014. Informa UK (Informa Life Sciences). <http://dx.doi.org/10.2144/000114123>

SAITO, S. Toxins Affecting Actin Filaments and Microtubules. **Marine Toxins as Research Tools**, [s.l.], p.187-219, 2009. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-87895-7_7

SCHIEBER, M.; CHANDEL, N. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. **Current Biology**, [s.l.], v. 24, n. 10, p.1-10, maio 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.034>.

SCHMUTZ, J.; HUNZIKER, F.; HIRT, R.. Ulein, das Hauptalkaloid von *Aspidosperma ulei* Mgf. *Aspidosperma*-Alkaloide, 1. Mitteilung. **Helvetica Chimica Acta**, [s.l.], v. 40, n. 5, p.1189-1200, 1957. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/hlca.19570400510>.

SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M. A. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, [s.l.], v. 23, n. 36, p.9408-9421, 20 dez. 2005. American Society of Clinical Oncology (ASCO). <http://dx.doi.org/10.1200/jco.2005.01.5594>.

SEIDL, C.; et al. Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Uleine from *Himatanthus lancifolius*. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, [s.l.], v. 65, n. 7-8, p.440-444, 1 jan. 2010. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/znc-2010-7-804>.

SHIH, V. F.; et al^A. A single NF κ B system for both canonical and non-canonical signaling. **Cell Research**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.86-102, 23 nov. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.161>.

SHIH, Y.; et al^B. Arecoline, a major alkaloid of the areca nut, causes neurotoxicity through enhancement of oxidative stress and suppression of the antioxidant protective system. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 49, n. 10, p.1471-1479, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.017>.

SINGH, T.; et al. Berberine, an isoquinoline alkaloid, inhibits melanoma cancer cell migration by reducing the expressions of cyclooxygenase-2, prostaglandin E2 and prostaglandin E2 receptors. **Carcinogenesis**, [s.l.], v. 32, n. 1, p.86-92, 25 out. 2010. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgg215>.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.427-439, jun. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2779>.

SOUZA, M. V. N. Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 2, p.308-312, abr. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000200022>.

SOUZA, W. M.; et al. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.191-196, jun. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2007000200010>.

SPIZZO, G.; et al. Correlation of COX-2 and Ep-CAM overexpression in human invasive breast cancer and its impact on survival. **British Journal Of Cancer**, [s.l.], v. 88, n. 4, p.574-578, fev. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjc.6600741>.

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. **Frontiers In Bioscience**, [s.l.], v. 10, n. 1-3, p.1881-1896, 2005. Frontiers in Bioscience. <http://dx.doi.org/10.2741/1667>.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, [s.l.], p.1-2, maio 2001. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs21>.

SU, M.; MEI, Y.; SINHA, S. Role of the Crosstalk between Autophagy and Apoptosis in Cancer. **Journal Of Oncology**, [s.l.], v. 2013, p.1-14, 2013. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/102735>.

SUBHASHINI, J.; MAHIPAL, S.V.K.; REDDANNA, P. Anti-proliferative and apoptotic effects of celecoxib on human chronic myeloid leukemia in vitro. **Cancer Letters**, [s.l.], v. 224, n. 1, p.31-43, jun. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016>

SUN, S. CYLD: a tumor suppressor deubiquitinase regulating NF- κ B activation and diverse biological processes. **Cell Death & Differentiation**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.25-34, 17 abr. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2009.43>.

TELLIEZ, A.; et al. Mechanisms Leading to COX-2 Expression and COX-2 Induced Tumorigenesis: Topical Therapeutic Strategies Targeting COX-2 Expression and Activity. **Anti-cancer Agents In Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 6, n. 3, p.187-208, 1 maio 2006. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/187152006776930891>.

THAVAMANI, B. S.; MATHEW, M.; PALANISWAMY, D. S. Anticancer activity of *Cocculus hirsutus* against Dalton's lymphoma ascites (DLA) cells in mice. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 52, n. 7, p.867-872, 7 fev. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/13880209.2013.871642>.

TIONG, S.; et al. Antidiabetic and Antioxidant Properties of Alkaloids from *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Molecules**, [s.l.], v. 18, n. 8, p.9770-9784, 15 ago. 2013. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18089770>.

TOLEDANO, M. B.; LEONARD, W. J. Modulation of transcription factor NF-kappa B binding activity by oxidation-reduction in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 88, n. 10, p.4328-4332, 15 maio 1991. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.10.4328>.

TRABER, M. G.; STEVENS, J. F. Vitamins C and E: Beneficial effects from a mechanistic perspective. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 51, n. 5, p.1000-1013, set. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.017>.

TRESVENZOL, L.M.F.; et al. Levantamento das plantas medicinais do estado de Goiás. IV Encontro de Pesquisadores da UFG; Goiânia, Brasil, 1997.

TRUMP, B.; et al. The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. **Toxicologic Pathology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.82-88, jan. 1997. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/019262339702500116>.

UMEZAWA, T.; et al. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. **Current Opinion In Biotechnology**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.113-122, abr. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.002>.

VALLABHAPURAPU, S.; KARIN, M. Regulation and Function of NF-kB Transcription Factors in the Immune System. **Annual Review Of Immunology**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.693-733, abr. 2009. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.021908.132641>

VELU, V.; et al. Elevated Expression Levels of Inhibitory Receptor Programmed Death 1 on Simian Immunodeficiency Virus-Specific CD8 T Cells during Chronic Infection but Not after Vaccination. **Journal of Virology**, [s.l.], v. 81, n. 11, p.5819-5828, 21 mar. 2007. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00024-07>.

VANDENABEELE, P.; et al. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 11, n. 10, p.700-714, 8 set. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2970>.

VERMEULEN, K.; BERNEMAN, Z. N.; VAN BOCKSTAELE, D. R. Cell cycle and apoptosis. **Cell Proliferation**, [s.l.], v. 36, n. 3, p.165-175, jun. 2003. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00267.x>.

VILPO, J. A.; KOSKI, T.; VILPO, L. M. Selective toxicity of vincristine against chronic lymphocytic leukemia cells in vitro. **European Journal Of Haematology**, [s.l.], v. 65, n. 6, p.370-378, dez. 2000. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0609.2000.065006370.x>.

WARIS, G.; SIDDIQUI, A. Hepatitis C Virus Stimulates the Expression of Cyclooxygenase-2 via Oxidative Stress: Role of Prostaglandin E2 in RNA Replication. **Journal Of Virology**, [s.l.], v. 79, n. 15, p.9725-9734, 13 jul. 2005. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.79.15.9725-9734.2005>.

WAUGH, D. J.J.; WILSON, C. THE Interleukin-8 Pathway in Cancer. **Clinical Cancer Research**, [s.l.], v. 14, n. 21, p.6735-6741, 1 nov. 2008. American Association for Cancer Research (AACR). <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.ccr-07-4843>.

WILLIAMS, G. H; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **The Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 226, n. 2, p.352-364, 28 out. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/path.3022>.

WOLF, J. K.; RAMIREZ, P. T. The Molecular Biology of Cervical Cancer. **Cancer Investigation**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.621-629, jan. 2001. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1081/cnv-100104290>.

WRIGHTON, K. H. DNA repair: A new FAN of the Fanconi anaemia pathway. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s.l.], v. 11, n. 9, p.603-603, 11 ago. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2958>.

WU, M.; et al. Sustained oxidative stress inhibits NF- κ B activation partially via inactivating the proteasome. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 46, n. 1, p.62-69, 1 jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.09.021>.

ZHAO, F.; et al. Inhibition of Lipopolysaccharide-Induced iNOS and COX-2 Expression by Indole Alkaloid, 3-(Hydroxymethyl)-6,7-Dihydroindolo[2,3-a]Quinolizin-(12H)-one, via NF- κ B Inactivation in RAW 264.7 Macrophages. **Planta Medica**, [s.l.], v. 79, n. 09, p.782-787, 13 maio 2013. Georg Thieme Verlag KG. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1328550>.

ZHENG, C.; YIN, Q.; WU, H. Structural studies of NF- κ B signaling. **Cell Research**, [s.l.], v. 21, n. 1, p.183-195, 7 dez. 2010. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2010.171>.

ZELLE, J. M. Python Programming: an introduction to computer science, 2002. em: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download;jsessionid=705DBB76E6B4968C80081DE53075CA75?doi=10.1.1.111.6062&rep=rep1&type=pdf>

ZHOU, L. Z.; JOHNSON, A. P. A.; RANDO, T. NF κ B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells. **Free Radical Biology And Medicine**, [s.l.], v. 31, n. 11, p.1405-1416, dez. 2001. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849\(01\)00719-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0891-5849(01)00719-5).