

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ESTUDO DO MECANISMO APOPTÓTICO DO
EXTRATO DE *Guatteria riparia* EM
CÉLULAS MCF-7**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

MICHELLE SANCHEZ FREITAS CORREIA

SÃO PAULO

2020

UNIVERSIDADE PAULISTA

**ESTUDO DO MECANISMO APOPTÓTICO DO
EXTRATO DE *Guatteria riparia* EM
CÉLULAS MCF-7**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Ivana Barbosa Suffredini

MICHELLE SANCHEZ FREITAS CORREIA

SÃO PAULO

2020

Correia, Michelle Sanchez Freitas.

Estudo do mecanismo apoptótico do extrato de *Guatteria riparia* em células MCF-7 / Michelle Sanchez Freitas Correia. - 2020.

65 f. : il. color. + CD-ROM.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental, São Paulo, 2020.

Área de concentração: Modelos em Neuropsicofarmacologia, Toxicologia e Patologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ivana Barbosa Suffredini.

1. Extratos vegetais. 2. Apoptose. 3. Câncer de mama.
4. MCF-7. 5. Produtos naturais. 6. Citometria de fluxo. I. Suffredini, Ivana Barbosa (orientadora). II. Título.



MICHELLE SANCHEZ FREITAS CORREIA

**ESTUDO DO MECANISMO APOPTÓTICO DO EXTRATO DE
Guatteria riparia EM CÉLULAS MCF-7**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista – UNIP, para obtenção do título de Doutora em Patologia Ambiental e Experimental.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

_____/_____/_____
Profª Drª Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista – UNIP

_____/_____/_____
Drª Anuska Marcelino Alvares Saraiva
Universidade Cruzeiro do Sul – UNICSUL

_____/_____/_____
Drª Fabiana Toshie de Camargo Konno

_____/_____/_____
Profª Drª Elizabeth Cristina Perez Hurtado
Universidade Paulista - UNIP

_____/_____/_____
Prof. Dr. Rodrigo Augusto da Silva
Universidade Paulista - UNIP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter conseguido concluir esta etapa tão importante em minha vida. Gratidão. Agradeço aos meus pais, Verenice Sanchez e Antonio Miguel Freitas Correia, por todo apoio, educação e compreensão em todos os momentos da minha vida, pelo exemplo de humildade e gratidão. Sem vocês, nada seria possível. Minha tese é dedicada aos meus pais. Muito obrigada!

Agradeço a minha irmã, Rafaela Alquimim de S. Pessoa Tunu, por todo apoio e por todas as palavras de incentivo desde o início da minha jornada acadêmica, sempre ao meu lado e vibrando comigo por cada conquista pessoal e profissional, inclusive à distância, algo que nunca foi um problema entre nós.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a Dr^a Ivana Barbosa Suffredini, por todos os ensinamentos, pela amizade, pela disponibilidade, atenção, paciência, dedicação, profissionalismo e por ter acreditado e confiado em mim desde o início. Muito obrigada!

Agradeço à Prof^a Dr^a Anuska Marcelino Álvares Saraiva e ao Sergio Alexandre Frana por toda colaboração e apoio durante o desenvolvimento da minha tese.

Agradeço a toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, pela compreensão e incentivo para que eu pudesse desenvolver minha tese.

Agradeço ao meu amigo Jefferson de Souza Silva, por todo apoio e ajuda em momentos críticos e de dificuldades pessoais. Muito obrigada, meu amigo!

Agradeço aos meus amigos Luciane Dalboni, Fabiana Toshie, Juan, Wilton, Anderson, Sandra Kalil, Elza, Euzira e Sr. Osvaldo, por todo apoio, não só durante o doutorado, mas durante todos esses anos de UNIP.

Agradeço à FAPESP pelo Auxílio Financeiro (2018/2127-8) obtido que propiciou a compra dos materiais para o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a Unip, pela concessão da bolsa de estudos para que eu pudesse, enfim, concretizar mais uma etapa da minha vida acadêmica.

Muito obrigada!!!

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de neoplasia mais incidente em mulheres, tanto no Brasil como no mundo ocidental. A evasão de células tumorais a apoptose é uma característica essencial para o desenvolvimento do câncer. O processo de morte celular pela via apoptótica é de grande importância para o controle do crescimento de células tumorais, pois o processo inflamatório é menor, sendo mais vantajoso em um tratamento antitumoral, já que a perda de tecido adjacente também é reduzida. Em estudo anterior, o extrato bruto de *Guatteria riparia* (N1091) induziu, significativamente, células MCF-7 a apoptose. Por isso, o extrato bruto foi fracionado por partição líquido-líquido, resultando em três frações: clorofórmica, butanólica e aquosa. A partir das três novas frações, a avaliação de morte celular foi realizada nos tempos de 6 h, 12 h e 24 h, nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, utilizando os marcadores Anexina V e 7-AAD, e para o ciclo celular, o marcador 7-AAD, ambos os ensaios realizados por citometria de fluxo. As três frações apresentaram maior percentual apoptótico no tempo de 6 h de tratamento, nas concentrações testadas, e a fase do ciclo mitótico em que as células permaneceram foi em SeG2. No ensaio imunoenzimático para apoptose inicial, as proteínas JNK, AKT, P53, caspase 8 e BCL-2 apresentaram quantificação maior ou igual ao controle negativo. Os grupos químicos encontrados nas frações, principalmente alcaloides da fração butanólica, possivelmente, causaram desarranjo na membrana das células tumorais, permitindo que proteínas pró-apoptóticas, como JNK e caspase 8, iniciassem a cascata apoptótica pela via extrínseca. O estudo nos permitiu encontrar, pela primeira vez, um grupo químico da planta *Guatteria riparia* que apresenta atividade indutora de apoptose, a ser potencialmente utilizado na terapêutica contra o câncer de mama.

Palavras-chave: extratos vegetais, apoptose, câncer de mama, MCF-7, produtos naturais, citometria de fluxo.

ABSTRACT

Breast cancer is one of the cancer diseases that most affects women, both in Brazil and worldwide. Tumor cell evasion to apoptosis is an essential feature for the development of cancer. The process of cell death by the apoptotic route is of great importance for the control of tumor cell growth, once the generated inflammatory process is smaller, which becomes advantageous during cancer treatment, and the loss of adjacent tissue is also reduced. In a previous study, the crude extract of *Guatteria riparia* (N1091) significantly induced MCF-7 cells to apoptosis. Thus, the crude extract was fractionated by liquid-liquid partition, resulting in three fractions: chloroform, butanolic and aqueous. From the three new fractions, the evaluation of cell death was performed at 6 h, 12 h and 24 h, at concentrations of 50 µg / mL, 100 µg / mL and 200 µg / mL, using the markers Annexin V and 7-AAD, and for the cell cycle, the marker 7-AAD, both assays were done by flow cytometry. The three fractions showed a higher apoptotic percentage in the 6 h treatment time in all concentrations and the cells remained in the S and G2 phase of the cell cycle. In the immunoenzymatic assay, for early apoptosis, the proteins JNK, AKT, P53, caspase 8 and BCL-2 showed quantification greater than or equal to the negative control. The chemical group found in the fractions were mainly alkaloids, which possibly may have caused some type of breakdown in the tumor cell membrane, allowing pro-apoptotic proteins, such as JNK and caspase 8, to initiate the apoptotic cascade through the extrinsic pathway. The study allowed us the possibility of finding, for the first time, a chemical group from *Guatteria riparia* that has induced apoptosis and that may be a potential therapeutic compound to be used against breast cancer.

Keywords: plant extracts, apoptosis, breast cancer, MCF-7, natural products, flow cytometry.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
3.1 Objetivos Gerais	15
3.2 Objetivos Específicos	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Coleta vegetal	16
4.2 Obtenção do Extrato	18
4.2.1 Fracionamento do Extrato.....	18
4.2.2 Cromatografia em camada delgada analítica e preparativa.....	18
4.2.3 Preparo da curcumina e das frações do extrato N1091.....	19
4.3 Citotoxicidade.....	19
4.4 Cultura Celular	21
4.5 Citometria de Fluxo	21
4.5.1 Preparo das amostras e ensaio de de Apoptose e Necrose.....	22
4.5. 2 Análise de ciclo celular.....	22
4.6 Expressão Gênica de Bax, Bid, Bcl-2, Mcl-1 e P53.....	23
4.6.1 Extração de RNA.....	23
4.6.2 DNAfree.....	23
4.6.3 Transcrição reversa – cDNA.....	24
4.6.4 RT-PCR.....	24
4.7 Avaliação imunoenzimática para apoptose.....	25
4.8 Análise Estatística.....	25
7 CONSIDERSÇÕES FINAIS	72
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença que apresenta como principal característica o crescimento celular desordenado em qualquer tipo de tecido. Essas células sofrem mutações em seu DNA e adquirem características específicas de alta resistência aos sinais de homeostase (WEINBERG; HANAHAN, 2000). Os sinais de resistência incluem sinalizações onde a célula não reconhece os fatores de inibição de crescimento, é resistente a morte celular, permitindo a imortalidade replicativa, indução de angiogênese, e ativação de invasão tecidual e metástase ((WEINBERG; HANAHAN, 2010). Mais ainda, as células tumorais são capazes de reprogramar seu metabolismo e escapar da ação imunológica do organismo. As células tumorais também possuem outro nível de complexidade, conseguindo recrutar células normais que contribuem no desenvolvimento do seu “microambiente tumoral”, o que dificulta ainda mais o desenvolvimento de novos meios de tratamentos contra o câncer (WEINBERG; HANAHAN, 2010).

O câncer de mama é o mais comum entre as mulheres no mundo e também no Brasil (INCA, 2020). No Brasil o câncer de mama está em segundo lugar como o tipo de câncer mais frequente, sendo o primeiro o câncer de pele não-melanoma (INCA, 2020). Segundo o INCA, a estimativa para 2020 será de 66.280 novos casos diagnosticados de câncer de mama. O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais frequente entre as mulheres, cujos tratamentos são baseados em quimioterapias, radioterapias e/ou cirurgias (LIEDKE et al., 2013). Os tratamentos convencionais cirúrgicos, quimioterapias e radioterapias são severos e com efeitos colaterais agressivos (SHAHALI et al, 2017). Porém nenhum dos protocolos de tratamento é capaz de eliminar totalmente as células tumorais, além de efeitos colaterais agressivos como a resistência aos fármacos e alta toxicidade, pois dependendo do nível de desenvolvimento do tumor, há a necessidade de doses ainda mais elevadas de medicamentos para que o tecido alvo seja atingido e, com isso, células normais também são atingidas ocasionando sua morte e deixando o indivíduo ainda mais debilitado (AMUJURI et al, 2018). Com o objetivo de buscar novos tratamentos alternativos, as pesquisas com compostos naturais vem crescendo ao longo dos anos, na tentativa de encontrar possíveis fármacos anti-tumorais na tentativa de minimizar os efeitos colaterais que os já utilizados como terapias provocam em pacientes com câncer (SHAHALI et al, 2017).

A busca por novos produtos naturais com atividade antineoplásica levou à identificação de paclitaxel, docetaxel e dos alcaloides da vinca, que já são utilizados em

terapias contra o câncer (SUFFREDINI et al., 2007). A introdução de novos compostos terapêuticos ativos provenientes da natureza no tratamento contra o câncer representa uma importante evolução para a pesquisa e também para os pacientes com neoplasias. Estudos com extratos de plantas já estão além da descoberta de seus agentes químicos, cada vez mais são feitas avaliações desses compostos de forma isolada, sendo possível a descoberta de sua relevância, potencialidade e mecanismos de ação como agente antitumoral (ROCHA et al., 2001).

Aproximadamente 20% da biodiversidade mundial pode ser encontradas em território brasileiro, destacando-se a Amazônia e a Mata Atlântica. Devido a essa vasta biodiversidade e ao fato de que 60% de todos os medicamentos serem provenientes de fontes naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016) os extratos de plantas da Amazônia têm sido triados para a realização de ensaios *in vitro* para descoberta de agentes citotóxicos contra doenças como o câncer de próstata e o câncer de mama (SUFFREDINI et al., 2006a; SUFFREDINI et al., 2007). Por meio de ensaios *in vitro*, os extratos dessas plantas apresentaram atividade antitumoral. Agentes citotóxicos contra células do câncer de próstata da linhagem PC-3 foram encontradas em 17 extratos de plantas (SUFFREDINI et al., 2006) e também evidenciou-se atividade citotóxica e de letalidade celular na linhagem MCF-7 de adenocarcinoma humano, por 11 extratos de plantas (SUFFREDINI et al., 2007).

Estudo com o composto nardosineno (4,9-dihidroxy-nardosina-6-en), um sequiterpeno extraído da planta *Juniperus foetidissima* (Cupressaceae), inibiu o crescimento celular de células MCF-7 de forma dose-tempo dependente, ativou caspase-6, aumentou as espécies reativas de oxigênio (EROS) e levou a perda de potencial de membrana mitocondrial. O tratamento com nardosineno aumentou o nível de expressão de *BAX*, gene pró-apoptótico, e diminuiu o nível de expressão de *BCL2*, gene anti-apoptótico. O estudo indicou que o composto nardosineno induziu apoptose nas células tumorais de mama MCF-7 pela via intrínseca mitocondrial (SHAHALI et al, 2017). Um trabalho realizado com 14 compostos de plantas medicinais africanas avaliou a citotoxicidade de linhagens de células de carcinoma humano, entre elas a MCF-7 de mama, e de linhagem de fibroblastos normais. Dos 14 compostos, o toningiol e seputecarpano D, provenientes das folhas de *Ptychlobium contortum* (Leguminosae), induziram a interrupção do ciclo celular das células MCF-7 na fase G0/G1, enquanto o controle, doxorubicina, interrompeu o ciclo na fase G2/M, sendo mais tardia comparada aos compostos isolados da planta. Os compostos toningiol e seputecarpano D, também

induziram apoptose nas células MCF-7 pela ativação das caspases 3/7 e 9 assim como, elevaram a produção de EROS, sendo moléculas indicativas antiproliferativas tumorais (KUETE et al., 2018).

Os extratos provenientes da Amazônia que apresentaram toxicidade para células tumorais MCF-7 (SUFFREDINI et al., 2007), foram investigados quanto ao tipo de morte celular que se estabeleceu e, de acordo com as análises, 15 extratos foram selecionados pois apresentaram alto índice de apoptose, sendo o extrato N1091 o de maior percentual apoptótico proveniente de *Guatteria riparia* da família Annonaceae (AGUIAR et al., 2017).

Apoptose ou morte celular programada é o tipo de morte onde há a degradação de todos os componentes intracelulares, sem extravasamento para o meio extracelular, pois não há o rompimento da membrana celular, mantendo a homeostase/equilíbrio do tecido (WEINBERG; HANAHAN, 2000).

A apoptose é um modo distinto de morte celular responsável pela eliminação de células senescentes ou indesejáveis em tecidos normais e também em contextos patológicos específicos. Caracteriza-se pela compactação e marginação da cromatina nuclear, a condensação do citoplasma e a convolução dos contornos nucleares e celulares. Em uma fase posterior, os fragmentos de núcleo e as protuberâncias que se formam na superfície da célula, separam-se em corpos apoptóticos que são fagocitados pelas células próximas e degradados dentro dos lisossomos (KERR et al., 2012).

Duas grandes vias de sinalização (figura 1e 2) controlam a iniciação da apoptose em mamíferos. A via extrínseca é responsável pela eliminação de células indesejadas durante a maturação do sistema imunológico e também pela eliminação de tumores, mediada por imunovigilância (FERREIRA et al., 2010), envolvendo receptores de morte celular de membrana, através de ligantes de TNF (Fator de Necrose Tumoral) e consequentemente ativação da pró-caspase 8 e posterior ativação da caspase 3 efetora (FERREIRA et al., 2010). A via intrínseca está relacionada com a interrupção do funcionamento mitocondrial por estresse intracelular ou extracelular (privação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia). Tais alterações de funcionamento disparam sinais de morte, como aumento de espécies reativas de oxigênio, bloqueio na produção de energia (ATP) (FERREIRA et al., 2010), liberação do citocromo c pela ativação dos membros pró-apoptóticos da família *BCL2* o que promove a ativação da caspase 9 e 3 (LEBLANC et al., 2002; Green, 2005).

Figura 1 – Descrição das vias extrínseca e intrínseca que regulam a indução de apoptose e que levam à ativação de caspases. Na via intrínseca, as proteínas da família BCL-2 regulam a permeabilidade da membrana mitocondrial causando desequilíbrio e o escape de citocromo c que ativam, principalmente, a caspase 9. Na via extrínseca, receptores (TNF, FAS) de membrana plasmática se ligam a proteínas que formam um complexo de "sinalização de morte celular" ativando, principalmente, a caspase 8 (retirado de Yuan et al, 2012).

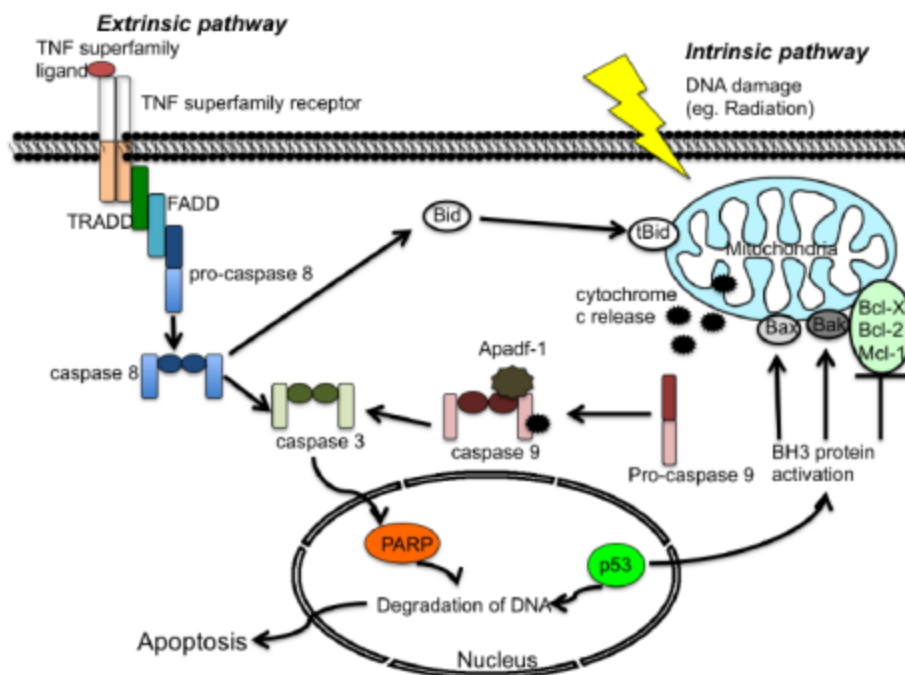


Figura 2 - A figura 2 representa as vias extrínseca e intrínseca de apoptose e suas diversas formas de ativação e /ou inibição. Os genes envolvidos no processo de apoptose estão representados de acordo com a ativação ou inativação de diversas proteínas que

desencadeado pela liberação do material intracelular pela digestão enzimática ocorrida. O processo de necrose está associado ao acúmulo irregular de cromatina, inchaço das organelas e perturbação das membranas. As membranas se desintegram, mas a célula normalmente retém sua forma até que sejam removidas por fagócitos mononucleares. Grupos de células contíguas e a presença de um exsudato inflamatório geralmente fornecem evidências confirmatórias de morte celular por necrose (KERR *et al.*, 2012).

A maior parte dos mecanismos de controle de crescimento celular está ligada a apoptose. A proliferação excessiva ou o crescimento em locais inadequados induzem a morte por apoptose como forma de imunovigilância. As células tumorais podem proliferar além dessas restrições o que limita o crescimento de tecido normal. Assim, a evasão de células tumorais a apoptose é uma característica essencial para o desenvolvimento do câncer (IGNEY E KRAMMER, 2002; WEINBERG E HANAHAN, 2000). As células tumorais são resistentes aos sinais de morte, pois são capazes de inativar e/ou silenciar diversos receptores celulares o que proporcionam a proliferação e crescimento desordenado dessas células (WEINBERG E HANAHAN, 2000).

Muitos dos fármacos utilizados em terapias causam efeitos secundários graves, por gerarem dano excessivo em células normais (SUBARNAS *et al.*, 2015). Estudo realizado com o flavonoide apigenina (encontrado em salsas, tomilho e camomila), evidenciou indução de apoptose em células MCF-7 pelo aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) e baixa toxicidade em células normais. O estudo indica a possibilidade futura de o flavonoide ser utilizado como uma nova terapia antitumoral (MADUNIC *et al.*, 2018). O triptonide (TPI) é um composto isolado da planta chinesa, *Tripterygium wilfordii*, com alto potencial antitumoral. Estudo do TPI com células tumorais de mama MCF-7, evidenciou a indução de apoptose pela via intrínseca mitocondrial, pela ativação da sinalização da via p38/ERK pela regulação do gene pró-apoptótico *BAX* e caspase 3, induzindo a cascata de caspases e posterior apoptose nas células MCF-7. O estudo demonstra que o TPI pode ser uma possível opção de terapia contra o câncer de mama (GAO *et al.*, 2018).

Um trabalho com extrato bruto de *Annona muricata*, espécie pertencente à família Annonaceae, revelou potencial antitumoral contra células tumorais de mama humano MCF-7 e 4T1, de camundongos. O extrato induziu apoptose nas células MCF-7 e nas células 4T1 pelo aumento da externalização de fosfatidilserina na membrana celular, analisadas por citometria de fluxo, após 72 horas de tratamento com o extrato bruto (NAJMUDDIN *et al.*, 2016).

TAHA et al. (2015) realizou estudo com dois compostos químicos isolados do extrato metanólico das folhas de *Pseuduvaria monticola* (Annonaceae), o isopolicerasoidol (6E, 10E) e o isopolicerasoidol-metil-éster (6E, 10E), ambos derivados do composto benzopirano. Os compostos foram testados quanto aos efeitos anti-proliferativos e citotóxicos contra células tumorais de mama MCF-7. O estudo demonstrou que os compostos isolados induzem as células MCF-7 a apoptose pela via intrínseca mitocondrial pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), pela diminuição no potencial de membrana mitocondrial e pelo aumento da permeabilidade na membrana das células tumorais. Os efeitos mencionados ocorreram de forma dose-tempo dependentes pela ativação das caspases 3/7 e 9, pela diminuição da expressão do gene anti-apoptótico Bcl-2 e pelo acúmulo de p38 MAPK no núcleo celular. Tais acontecimentos sugerem a via intrínseca mitocondrial de apoptose (TAHA et al., 2015). Outros estudos com produtos naturais também sugerem que a apoptose seja iniciada pela via intrínseca em células MCF-7 (FERMANI et al., 2016). Por meio de ensaios com o composto tetrametilpirazina, isolado de *Ligusticum chuanxiong* Hort (Umbelliferae / Apiaceae), SHEN et al. (2018) evidenciou a modulação da via de sinalização AKT e caspase 3, de modo que as células tiveram seu ciclo celular interrompido na fase G1 posterior apoptose pela ação dos genes pró-apoptóticos. As respostas positivas de toxicidade contra células tumorais de mama, cada vez mais, sugerem novas alternativas de terapia antitumoral para a medicina (YADAV et al., 2015).

O extrato bruto N1091, de *G. riparia* (Annonaceae), induz apoptose em células MCF-7, conforme evidenciado por AGUIAR et al. (2017). A proposta do trabalho foi realizar a separação química dos compostos do extrato bruto de *Guatteria riparia* e avaliar o percentual de apoptose nas células MCF-7 que cada grupo químico causa de forma isolada e, possivelmente, identificar qual o grupo químico da planta é responsável pelo processo de apoptose das células tumorais MCF-7 e também investigar se a morte celular programada sugere a via extrínseca ou intrínseca mitocondrial de indução de apoptose.

2 JUSTIFICATIVA

A espécie *Guatteria riparia* apresenta um grande potencial para a descoberta de novas moléculas naturais que apresentem atividade antitumoral. Pesquisa anterior demonstrou que o extrato dessa planta desencadeia morte celular por apoptose em células de câncer de mama (AGUIAR, 2017). Estudos sobre a descoberta de seu mecanismo de ação de diversas plantas têm sido cada vez mais ampliados com o objetivo de alcançar novas

terapias e /ou tratamentos preventivos. (SUFFREDINI et al., 2006a; SUFFREDINI et al. 2007). O extrato bruto N1091 de *G. riparia* apresenta alto índice apoptótico em células tumorais de mama MCF-7, sendo assim, um importante alvo para maiores estudos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os grupos de compostos químicos do extrato de *Guatteria riparia* quanto à apoptose em células tumorais de mama humano (MCF-7).

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o índice apoptótico das células MCF-7, após o tratamento com os diferentes grupos químicos que serão isolados do extrato N1091 da espécie da planta *Guatteria riparia*, que apresenta alto potencial apoptótico, quando utilizada *in vitro* em forma de extrato bruto, na linhagem MCF-7.
- Avaliar em qual fase do ciclo mitótico os grupos químicos do extrato de *Guatteria riparia* inibirão o crescimento celular
- Avaliar a expressão dos genes pró-apoptóticos *BAX* e *BID*, genes anti-apoptóticos *BCL2* e *MCL1* e do oncogene *P53*, envolvidos no processo apoptótico pela via intrínseca mitocondrial, por PCR *Real Time*.
- Quantificar as proteínas de apoptose inicial, envolvidas na cascata apoptótica, que são ativadas ou inibidas pelos genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, por ensaio imunoenzimático na plataforma multiplex Magpix.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do material vegetal

A espécie vegetal foi coletada a 2° 38' 91" Lat Sul e 60° 55' 585" Long Oeste, em região próxima a Manaus, AM, sob licença do Ministério do Meio Ambiente, IBAMA de número 12A/2008. O material vegetal fresco está depositado no Herbário da UNIP, do Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade – NPBio-UNIP, sob número [AAO 3562]. No Herbário, foi limpo retirando-se contaminantes (fragmentos de outros órgãos, poeira, areia, inseto, etc.), e no Laboratório de Extração, do mesmo Núcleo, foi seco em estufa com circulação de ar a 40°C. Em seguida, foi moído em moinho de martelo (Holmes 201X), o qual está localizado dentro de uma capela com sucção de ar. O material vegetal já processado foi armazenado em um saco plástico e identificado. A técnica utilizada para obtenção do extrato foi descrita por YOUNES *et al.* (2014).

Durante a coleta do material ainda foi retirada uma amostra dos órgãos aéreos de cada espécie coletada contendo ramos com folhas, flores e/ou frutos, denominados de exsiccatas, que foram depositados como material testemunho e registrados no Herbário UNIP, onde foram identificados pelo Dr. Mateus Luís Barradas Paciencia, curador do Herbário (figura 3).

Figura 3 – Exsicata N1091 – *Guatteria riparia* (Annonaceae). Herbário UNIP - Núcleo de Pesquisas em Biodiversidade – NPBio.



4.2 Obtenção do Extrato

O material pulverizado foi extraído em percolador de vidro, no qual o pó da planta foi colocado em contato com diclorometano/metanol 1:1 (v/v), em quantidade suficiente para cobrir todo o pó. O material permaneceu em maceração por 24 horas e em seguida foi drenado para um balão de fundo chato com a ajuda de uma bomba de vácuo. O extrato bruto orgânico assim obtido foi concentrado em rota-evaporador até retirada total do solvente orgânico. O extrato seco foi registrado e armazenado em câmara fria a -20°C .

4.2.1 Fracionamento do Extrato

O extrato orgânico EB1091, que apresenta alto percentual apoptótico em células MCF-7, foi submetido à partição líquido-líquido em coluna de vidro. O extrato foi ressuspenso em metanol (MeOH) 90%, para ser submetido à extração sucessiva com CHCl_3 e BuOH. Ambas as frações resultantes, clorofórmica e butanólica, foram levadas à capela, em temperatura ambiente, para que os solventes fossem evaporados, enquanto a fração aquosa foi congelada e posteriormente liofilizada para remoção da água. Foram obtidas as fases de partição clorofórmica (fase de partição CHCl_3), butanólica (fase de partição BuOH) e aquosa (fase de partição H_2O) do extrato bruto EB1091.

4.2.2 Cromatografia em camada delgada analítica e preparativa

A cromatografia em camada delgada analítica (CCD) foi empregada para analisar as frações geradas do fracionamento e avaliá-las quanto à semelhança. Para isso, foram empregadas placas de sílica gel GF254 (Merck), medindo 20 cm x 10 cm, em que as amostras foram aplicadas e eluídas em mistura de solventes composta por acetato de etila: metanol: água (100: 35: 10; Wagner e Bladt, 1996). Após o desenvolvimento da placa, as amostras foram reveladas sob luz U.V. 254 nm e 365 nm, posteriormente com reagente de Dragendorff, reagente NP para compostos fenólicos e com ácido sulfúrico (H_2SO_4) 20% seguido de aquecimento, como uma metodologia mais geral de análise.

4.2.3 Preparo da curcumina e das frações do extrato N1091

A curcumina (Sigma) foi utilizada como substância indutora de apoptose de referência para os ensaios. A concentração estoque de curcumina foi de 10 mM (LV *et al.*, 2014). As concentrações finais de curcumina nas placas de 24 poços dos ensaios de 6 h, 12 h e 24 h foram de 12,5 μ M, 25 μ M e 50 μ M.

A concentração estoque do das frações do extrato vegetal foi de 40 mg/mL. Os extratos vegetais orgânicos foram diluídos em dimetilsulfóxido 50% (DMSO 50%). Os extratos vegetais aquosos foram diluídos em água grau Milli-Q. As concentrações finais dos extratos nas placas de 24 poços dos ensaios de 6 h, 12 h e 24 h foram de 50 μ g/mL, 100 μ g/mL e 200 μ g/mL.

4.3 Citotoxicidade

A avaliação da atividade citotóxica foi realizada segundo a metodologia descrita por Monks, Scudiero, Skehan *et al.* (1991), com adaptações (SUFFREDINI; PACIENCIA; VARELLA *et al.*, 2007a e b, SUFFREDINI; PACIENCIA; VARELLA *et al.*, 2006).

Previamente ao ensaio, as células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Bio Whittaker) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina (Sigma) e antibióticos por um período de 96 horas. Após esse período, cada célula foi preparada de acordo com a densidade celular necessária, de 10.000 células/poço para as células de mama (MONKS, SCUDIERO, SKENHAN *et al.*, 1991). Placas de 96 poços foram desenhadas de modo a apresentarem grupo controle de crescimento celular, grupo controle de atividade óptica resultante do meio+extrato, grupos testes que receberam as amostras de extratos e frações. Além das placas de 96 poços utilizadas para execução dos testes, foi feita uma placa com células tumorais sem tratamento para que representasse o crescimento celular até o momento anterior à adição dos tratamentos. A leitura dessa placa resultou na obtenção do valor correspondente ao tempo zero (T0).

Para o procedimento experimental, 100 μ L de meio + células foram adicionados aos poços correspondentes, inicialmente. As placas de 96 poços foram levadas à incubadora, a 37 °C, umidade relativa de 100% e 5% de CO₂, onde permaneceram por 24 h. Após 24 h, 100 μ L de meio + tratamento foram adicionados aos poços correspondentes, e 100 μ L de meio aos poços controle. A preparação dos meios + tratamentos foi feita em recipientes de vidro, em que em 1990 μ L de meio foram adicionados 10 μ L do tratamento, diluído em 40 mg/ml. Desse modo, ao se adicionar os 100 μ L correspondentes a cada poço do grupo tratamento, ocorreu uma diluição de 400 vezes, gerando uma concentração final de 100 μ g/mL, no poço. Após a

adição dos tratamentos, as placas de 96 poços foram incubadas a 37 ° C, umidade relativa de 100% e 5% de CO₂, por um período de 48 horas. Ao mesmo tempo, as placas T₀, com um dos controles de crescimento, foi preparada para ser lida, segundo procedimento descrito abaixo.

Depois desse período de 72 h do início do experimento, as células viáveis foram fixadas nas placas de 96 poços com solução de ácido tricloroacético 50%, e foi mantida em contato com as células por uma hora, sob refrigeração. As placas foram lavadas cinco vezes com água corrente até remoção completa do agente fixador e das células não fixadas (mortas). As placas foram mantidas ao ar por 24 horas, para secarem. Depois desse período, 100 µl de uma solução de sulforrodamina B (SRB, que se liga a proteínas mitocondriais de células viáveis), preparada a 0,4% em ácido acético 1%, foi adicionada às células, por 10 min. O excesso de SRB foi retirado com solução de ácido acético (1%), com auxílio de lavador de microplacas. Após a remoção do excesso do corante de viabilidade celular, as placas foram novamente expostas ao ar para secarem por mais 24 h. O corante remanescente nas células viáveis foi ressuspenso com 100 µL de tampão Tris e foi submetido a 10 min de agitação em agitador de placas. Depois desse período, as placas foram lidas em leitor espectrofotométrico de placas (Biotek) em 515 nm, em que as atividades ópticas foram obtidas. A porcentagem de inibição de crescimento (% IC) foi obtida a partir da fórmula:

$$\% \text{ IC} = [(T - T_0) / (C - T_0)] * 100$$

sendo:

T: valores de densidade óptica obtidos para os poços correspondentes ao tratamento.

T₀: valores de densidade óptica obtidos para os poços correspondentes ao tempo zero. O tempo zero representa o crescimento celular nas 24 h que antecedem a adição do tratamento.

C: valores relativos ao crescimento celular sem o tratamento, ou controle do crescimento 100%.

Caso tenha havido resultado de inibição de crescimento, a amostra correspondente é submetida à análise para obtenção da concentração de inibição 50% (IC₅₀), em que os tratamentos são testados em cinco diluições logarítmicas subsequentes, de 100 mg/mL, 10 mg/mL, 1 mg/mL, 0,1 mg/mL e 0,01 mg/mL.

4.4 Cultura de células

As células MCF-7 (receptor estrogênico positivo de adenocarcinoma de mama) foram cultivadas em frascos de cultura de tecidos (Coastar), suplementado com meio RPMI-1640, acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) (ambos Cambras) e 1% de glutamina (Sigma), e para o caso da célula MCF-10A será cultivada em meio enriquecido com hidrocortisona, soro fetal de cavalo, insulina, EGF e toxina da cólera, no caso de MCF-10A. As células são mantidas em incubadora (Thermo Fisher) a 37° C com 5 % de CO₂ e 100 % de umidade relativa. As células são submetidas a passagens semanais (tripsina-EDTA, Cambras), conforme verificação de confluência e coloração do meio, através de indicação de acidez. Para os experimentos, as células são passadas em maior concentração, para que haja concentração suficiente para a realização dos ensaios. A concentração de cada célula, ajustada à leitura de densidade óptica adequada a cada uma, é obtida por meio do método de exclusão por azul de Tripán. Os testes são realizados em placas de 24 poços, e para a célula MCF-7, a densidade celular inicial por poço é de 150.000 células. Após inoculação, as placas são mantidas em incubadora por 24 h até atingir densidade de $3,0 \times 10^5$ células por poço. Posteriormente, as frações obtidas do extrato N1091 foram adicionadas de modo que as concentrações finais de teste sejam de 200 µg/mL, 100 µg/mL e 50 µg/mL, em tratamentos realizados em 6 h, 12 h e 24 h.

4.5 Citometria de Fluxo

Por citometria de fluxo foi realizado ensaio para identificar o percentual de morte das células MCF-7. Utilizando o ensaio de apoptose anexina V e 7-AAD (Becton Dickinson – BD) foi detectado apoptose inicial (Anexina⁺ / 7-AAD⁻), apoptose tardia/necrose (Anexina⁺ / 7-AAD⁺) e necrose (Anexina⁻ / 7-AAD⁺). As células vivas não apresentam positividade para ambos marcadores. Para calibração e validação dos marcadores, utilizou-se células MCF-7 mortas pelo calor marcadas somente com Anexina V, somente com 7-AAD ou duplo marcadas (Anexina V e 7-AAD) (anexo 1). Técnica realizada utilizando-se o template disponibilizado pelo fabricante (Becton Dickinson – BD) para Anexina V conjugada a ficoeritrina (PE) e 7-AAD. Aquisição de 30 segundos para cada amostra.

4.5.1 Preparo das amostras e ensaio de apoptose e necrose

O sobrenadante de cada poço foi coletado em um tubo de fundo cônico de 15 mL. Cada poço foi lavado com 100 µL de PBS (Dulbeco) e todo conteúdo foi adicionado ao sobrenadante do tubo inicial. Um volume de 250µL de tripsina foi adicionado em cada poço e a placa armazenada em estufa a 37° C por 10 min para soltura das células; posteriormente 100 µL de meio de cultura suplementado com 5 % SFB foi adicionado em cada poço para neutralização da tripsina. O conteúdo de cada poço foi adicionado em seu respectivo tubo. Finalizada a coleta, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos a 4° C e o sobrenadante desprezado. Após a centrifugação, o *pellet* formado foi lavado 1x com 500 µL de PBS gelado, centrifugado novamente a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C e o sobrenadante desprezado. O *pellet* foi ressuspenso em 100 µL de tampão de ligação (“Annexin V Binding Buffer” - Becton Dickinson – BD) 1x diluído (1:10) e foi adicionado 1 µL de Anexina V e 1 µL de 7-AAD em cada tubo. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro. Após 15 minutos, todo o conteúdo foi colocado em um novo tubo com filtro (*cell-strainer cap* 12x75 mm, malha de 35µm – Corning) e foi adicionado mais 100 µL do tampão de ligação 1x diluído para análise em citometria de fluxo. A análise de todas as amostras foi feita dentro do período de 1 hora conforme padrões estabelecidos pelo fabricante (Becton Dickinson – BD). As amostras foram adquiridas e analisadas em *software C6 Sampler BD Accuri*.

4.5.2 Análise do ciclo celular

Após o tratamento de 6 h (maior significância de apoptose entre os tempos testados e concentrações) com as frações de N1091 nas concentrações estipuladas, de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, as células foram tripsinizadas, coletadas em tubos cônicos, centrifugadas a 1500 rpm, a 4° C por 5 min, lavadas com 500 µL de PBS (DULBECO) e centrifugadas, novamente, a 1500 rpm, a 4° C por 5 minutos. Um volume de 4,5 mL de etanol 70 % gelado foi adicionado a cada tubo, que foram armazenados a 4° C, por 30 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 1500 rpm, a 4° C, por 5 min, lavadas com 500 µL de PBS, centrifugadas a 1500 rpm, a 4° C por 5 min e ressuspenso em 100 µL de solução tampão 1x e 1 µL de 7-AAD. As amostras foram mantidas em temperatura de 37° C, por 30 min (YAP *et al.*, 2017) e, após este período, a aquisição dos dados foram obtidos pelo software do equipamento BD Accuri™ C6

(*Software Quick Start Guide*) e, posteriormente, análise pelo software Flowjo seguindo a plataforma de ciclo celular disponibilizada pelo software sob o modelo de Watson.

4.6 Expressão gênica de *BAX*, *BID*, *BCL2*, *MCL1* e *P53*

Após os tratamentos, as células foram coletadas e armazenadas em *RNA later* (ThermoScientific) e foram analisadas quanto à expressão dos genes pró-apoptóticos *BAX* e *BID*, e anti-apoptóticos *BCL2*, *MCL1*, envolvidos no processo intrínseco / mitocondrial de apoptose, e do oncogene *P53*, que está envolvido no processo de morte celular por apoptose na presença de falha gênica e se apresenta alterado em células tumorais de mama (DUFFY *et al.*, 2018), pela técnica de PCR *Real Time*.

4.6.1 Extração de RNA

As células foram coletadas após os tratamentos e centrifugadas a 11.500 rpm por 5 minutos para a remoção do *RNA later* e extração do RNA pelo método do reagente TRIZOL (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA). As amostras foram colocadas em 1mL de TRIZOL e agitadas por 30 segundos. Após esse procedimento, foi adicionado 0,2 mL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA), agitado e centrifugado a 11.500 rpm por 15 minutos em uma temperatura de 4° C. Após a centrifugação a parte aquosa das amostras foram transferidas para um outro tubo com 500 µL de isopropanol, agitadas, incubadas por 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas novamente a 11.500 rpm por 15 minutos a 4° C. O *pellet* formado foi lavado com etanol gelado a 75 %, centrifugado a 11.500 por 5 minutos e seco em temperatura ambiente. Após esse procedimento, as amostras foram ressuspensas em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenadas a -20° C.

4.6.2 DNAfree

As amostras de RNA foram tratadas com kit DNAfree para eliminação de possíveis resíduos de DNA (*DNA-free*[™], Ambion Inc., Austin, TX, USA), conforme recomendações do fabricante. Nos microtubos com as amostras de RNA, foram adicionados 3 µL do *buffer* e 1 µL do turbo *DNAase*. As amostras foram agitadas e incubados em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, foi adicionado 3 µL do inativador e a solução foi agitada e centrifugada a 11.500 rpm por 2 min. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram

coletados e acondicionados a -20°C . A concentração em $\text{ng}/\mu\text{L}$ de RNA foi quantificada por espectrofotometria *NanoDrop Lite* (ThermoFisher Scientific).

4.6.3 Transcrição reversa – cDNA

Para a síntese do DNA complementar, será utilizado 1 μg da amostra de RNA livre de DNA. As amostras de DNA complementar serão realizadas utilizando-se o *kit first-strand cDNA synthesis* (Roche Diagnostic Co., Indianápolis, IN, USA), conforme recomendações do fabricante. As amostras serão incubadas em termociclador por 10 minutos a 65°C . Posteriormente, será adicionado solução tampão (1x), MgCl_2 (5 mM), mistura de deoxinucleotídeos (1 mM), “primers” randomizados - p[dN]6 (3,2 μg), inibidor de Rnase (50 U), e transcriptase reversa – AMV (20 U) e será incubada novamente em termociclador por um ciclo de 40 min a 45°C , um segundo ciclo de 5 minutos a 95°C e então um terceiro ciclo de 5 min a 4°C , para resfriamento.

4.6.4 RT-PCR

Os primers *GAPDd*, *BCL2*, *MCL1* e *P53*, foram desenhados com o auxílio do programa *LightCycler* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Todos os primers foram verificados quanto a sua especificidade por meio da verificação da curva de *Melting*. A eficiência das reações para cada primer foi otimizada anteriormente ao início dos ensaios. As reações de RT-PCR foram realizadas com o sistema *LightCycler96* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), utilizando-se o *kit FastStart Essencial DNA Green Master* (Roche Diagnostic Co.). Para cada uma das leituras, a água será utilizada como controle negativo, e o produto das reações foi quantificado utilizando o programa do fabricante (*LightCycler Relative Quantification Software* - Roche Diagnostics GmbH). O gene GAPDH foi utilizado como o gene de referência (*housekeeping*) para a normalização dos valores.

4.7 Avaliação Imunoenzimática para apoptose

Os níveis de proteínas sinalizadoras de apoptose foram determinados por meio da plataforma multiplex MAGpix, a qual permite determinar a presença e quantificar de forma absoluta a concentração de diferentes marcadores em uma mesma amostra. As análises

foram realizadas em placa de 96 poços, com o auxílio do painel de alta sensibilidade: *MILLIPLEX MAP Early Apoptosis Magnetic Bead 7-plex Kit - Cell Signaling Multiplex Assay* (JNK, P53, BCL-2, BAD, AKT, capase 8 e caspase 9 - *Millipore Corporation*, Billerica, MA, USA), seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram preparadas com buffer de lise celular acrescido de um coquetel inibidor de fosfatase. A quantificação de proteínas totais foi determinada e todas as amostras ficaram com concentração final de trabalho de 5µg/mL de proteínas. Os poços foram lavados com tampão de lavagem e aspirados. *Beads* magnéticas exclusivas conjugadas a anticorpos monoclonais contra os diferentes analíticos serão adicionadas aos poços. Amostras e controles positivos e negativo foram pipetados nos poços e incubados *overnight* a 4° C. Os poços serão lavados e uma mistura de anticorpos secundários foi adicionada. Após a incubação por 1 h, a detecção final será feita através com um terceiro marcador fluorescente, Estreptavidina-Ficoeritrina (PE) ligada ao anticorpo de detecção. A concentração de cada analítico será expressa em MFI. As amostras foram avaliadas em duplicata e a razão entre o controle negativo e o valor obtido de cada amostra foi utilizado para calcular as concentrações de cada marcador.

4.8 Análise Estatística

Para se saber se o tratamento aplicado sobre células de tumor de mama humanos MCF-7 com frações de diferentes polaridades obtidas do extrato bruto N1091, nas concentrações de 50 µg/mL, 100 µg/mL e 200 µg/mL, por 6 h, 12 h e 24 h resultaram em apoptose ou necrose, foram realizados o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a normalidade, sobre dados obtidos de forma aleatória e independente. Após a verificação de normalidade, foi aplicada ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey, em um nível de significância adotado de $\alpha < 0,05$.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir do fracionamento do extrato bruto de *Guatteria riparia* (N1091), foi possível identificar inicialmente algumas proteínas que estão envolvidas no processo inicial da apoptose das células de adenocarcinoma de mama humano. Contudo, é possível sugerir que há moléculas específicas atuando na permeabilidade da membrana das células e, dessa forma, possibilitando a fosforilação de proteínas envolvidas na via extrínseca de morte celular por apoptose. Porém, maiores estudos devem ser realizados para isolar, de fato, as moléculas existentes em cada uma das frações e estudá-las de forma isolada para elucidar o mecanismo de ação de tais compostos sobre a morte celular nas células MCF-7. Dessa forma, as frações de *Guatteria riparia*, apresentam alto potencial como antitumoral indutor de apoptose.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, M. S. C. Apoptose em célula de adenocarcinoma de mama humano como metodologia de triagem de extratos citotóxicos de plantas amazônicas. 2017. 62 folhas – **Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Ambiental e Experimental**. Universidade Paulista – UNIP, São Paulo, 2018.

AKHTAR, F., BOKHARI, S. R. A. Apoptosis. 2020 May 26. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020

AMUJURI, D.; SILVA, B.; POORNIMA, B.; SIRISHA, K.; SARMA, A.V.S.; NAYAK, V. L.; TIWARI, A. K.; PURUSHOTHAM, K.; BABU, S. Synthesis and biological evaluation of Schizandrin derivatives as potential anti-cancer agents. **European Journal of Medicine Chemistry**, v. 149, p. 182-192, 2018.

BEROUKHIM, R., MERMEL, C. H., PORTER, D., *et al.*: **The landscape of somatic copynumber alteration across human cancers**. *Nature*. 2010; **463**(7283): 899–905

BRAGA, DL.; MOTA, S.T.S.; ZÓIA, M.A.P.; LIMA, P.M.A.P. ORSOLIN, P.C.; VECCHI, L.; NEPOMUCENO, J.C.; FÜRSTENAU, C.R.; MAIA, Y.C.P.; GOULART, L.R.; ARAÚJO, T.G. Ethanolic Extracts from *Azadirachta indica* Leaves Modulate Transcriptional Levels of Hormone Receptor Variant in Breast Cancer Cell Lines. **International Journal of Molecular Sciences**. v.19, n.7, E1879, 2018.

CAMPBELL, K. J., DHAYADE, S., FERRARI, N., *et al.*: **MCL-1 is a prognostic indicator and drug target in breast cancer**. *Cell Death Dis*. 2018; **9**(2): 19.

CORREA, J.E.; RÍOS, C.H.; DEL ROSARIO CASTILLO, A.; ROMERO, L.I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A.; HELLER, M.V.; GERWICK, W.H.; RÍOS, L.C. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with antileishmanial activity. *Planta Med*. v. 72, n. 3, p. 270-2, 2006. doi: 10.1055/s-2005-916179. PMID: 16534735.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; KENNETH M. SNADER, K. M. Natural Products in Drug Discovery and Development. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 52-60, 1997.

CZABOTAR, P. E., LESSENE, G., STRASSER, A., *et al.*: Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: Implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; **15**(1): 49–63.

DAWSON, S. J., MAKRETSOV, N., BLOWS, F. M., *et al.*: **BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received**. *Br J Cancer*. 2010; **103**(5): 668–75

DUFFY, M. J.; SYNNOTT, N. C.; CROWN, J. Mutant P53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. **Breast cancer Research and Treatment**, p. 1-7, 2018.

FARMANI, F.; MOEIN, M.; AMANZADEH, A.; KANDELOUS, H. M.; EHSANPOUR, Z.; SALIMI, M. Antiproliferative Evaluation and Apoptosis Induction in MCF- 7 Cells by *Ziziphus spina Christi* Leaf Extracts. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, p. 315-321, 2016.

FERREIRA, C. S.; MAGANHIN, C. C.; SIMOES, R. S.; GIRAO, M. J. B. C.; BARACAT, E. C.; JR-SOARES, J. M. Melatonina: Modulador de morte celular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.56, p. 715-718, 2010.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death & Differentiation*, v. 25, n. 3, p. 486-541, 2018.

GAO, H.; ZHANG, Y.; DONG, L.; QU, X. Y.; TAO, L. N.; ZHANG, Y. M.; ZHAI, J. H.; SONG, Y. Q. Triptolide induces autophagy and apoptosis through ERK activation in human breast cancer MCF-7 cells. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, p. 3413-3419, 2018.

GILMORE, A., KING, L. Emerging approaches to target mitochondrial apoptosis in cancer cells. *F1000Res*. 2019 Oct 24;8:F1000 Faculty Rev-1793.

GREEN, D. R., KROEMER, G. **The pathophysiology of mitochondrial cell death.** *Science*. 2004; **305**(5684): 626–9.

GREEN, D. R. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead (Minireview). **Cell**, v. 121, p. 671-674, 2005.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57–70, 2000.
IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature Reviews**, v.2, p. 277-288, 2002.

HONG, J.; SUN, Z.; LI, Y.; GUO, Y.; LIAO, Y.; LIU, M.; WANG, X. Folate – modified Annonaceous acetogenins nanosuspensions and their improved antitumor efficacy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 5053 – 5067, 2017.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and anti-death: tumor resistance to apoptosis. **Nature Reviews**, v.2, p. 277-288, 2002.

Instituto Nacional de Câncer “José Alencar Gomes da Silva”. **INCA**. 2020. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home> Acesso em: 25 de outubro de 2020.

KUETE, V.; NGNINTENDO, D.; FOTSO, G. W.; KARAOSMANOGLU, O.; NGADJUI, B. T.; KEUMEDIJO, F.; YEBOAH, S. O.; MAROBELA, K. A.; SIVAS, H. Cytotoxicity of seputhecarpan D, thoningiol and 12 other phytochemicals from Africa flora towards human carcinoma cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, p. 1-9, 2018.

KUMAR DE, A.; MUTHIYAN, R.; MONDAL, S.; MAHANTA, N.; BHATTACHARYA, D.; PONRAJ, P.; UNISWAMY, K.; KUNDU, A.; KUNDU, M. S.; SUNDER, J.; KARUNAKARAN, D.; BERA, A. K.; ROY, S. D.; MALAKAR, D. A Natural quinazoline derivative from marine sponge *Hyrtios erectus* induces apoptosis of breast cancer cells via ROS production and intrinsic or extrinsic apoptosis pathways. **Journal Marine Drugs**. V. 17, p. 1-20, 2019.

KUNNUMAKKARA AB, BORDOLOI D, PADMAVATHI G, MONISHA J, ROY NK, PRASAD S, AGGARWAL BB. Curcumin, the golden nutraceutical: multitargeting for multiple chronic diseases. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1325-1348, 2017.

LEBLANC, H.; LAWRENCE, D.; VARFOLOMEEV, E.; TOTPAL, K.; MORLAN, J.; SCHOW, P.; FONG, S.; SCHWALL, R.; DOMINICK SINICROPI, D.; ASHKENAZI, A. Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. **Nature Medicine**, v.8, p. 274-281, 2002.

LIEDKE, P. E. R.; FINKELSTEIN, D. M.; SZYMONIFKA, J.; BARRIOS, C. H.; GUERRA, Y. C.; BINES, J.; VASCONCELOS, C.; SIMON, S. D.; GOSS, P. E. Outcomes of Breast Cancer in Brazil Related to Health Care Coverage: A Retrospective Cohort Study. **Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention**, v. 23, p. 126-133, 2014.

MADUNIC, I. V.; MADUNIC, J.; ANTUNOVIC, M.; PARADZIK, M.; VRHOVAC, V. G.; BRELJAK, D.; MARIJANOVIC, I.; GAJSKI, G. Apigenin, a dietary flavonoid, induces apoptosis, DNA damage, and oxydative stress in human breast cancer MCF-7 and MDA MB-231 cells. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, p. 1-14, 2018.

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guateria boliviana* (Annoneaceae). **Phytochemistry**, v. 54, p. 709-716, 2000.

MOLINIE, N.; GAUTREAU, A. Directional collective migration in wound healing assays. **Methods in molecular biology**, v. 1749, p. 11-14, 2018.

NAJMUDDIN, S. U. F. S.; ROMLI, M. F.; HAMID, M.; ALITHEEN, N. B.; RAHMAN, N. M. A. N. A. Anti-cancer effect of *Annona muricata* linn leaves crude extract (AMCE) on breast cancer cell line. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 1-20, 2016.

NAKANO, K., VOUSDEN, K. H. **PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by P53.** *Mol Cell*. 2001; **7**(3): 683–94

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**.v. 79, p. 629-661, 2016.

ODA, E., OHKI, R., MURASAWA, H., *et al.*: **Noxa, a BH3-only member of the Bcl-2 family and candidate mediator of P53-induced apoptosis.** *Science*. 2000; **288**(5468): 1053–8.

PUMIPUTAVON, K.; CHAOWASKU, T.; SAENJUM, C.; OSATHANUNKUL, M.; WUNGSINTAWEEKUL, B.; CHAWANSUNTATI, K.; WIPASA, J.; LITHANATUDOM, P. Cell cycle arrest and apoptosis induction by methanolic leaves extracts of four Annonaceae plants. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 1-11, 2017.

PRASAD, C. P.; RATH, G.; MARTHUR, S.; BHATNAGAR, D.; RALHAN, R. Potent growth suppressive activity of curcumin in human breast cancer cells: Modulation of Wnt / β - catenin signaling. **Chemico – Biological Interactions**, v. 181, p. 263-271, 2009.

RACHAKHOM, W.; KHAW-ON, P.; POMPIMON, W.; BANJERDPONGCHAI, R. Dihydrochalcone derivative induces breast cancer cell apoptosis via intrinsic, extrinsic, and ER stress pathways but abolishes EGFR/MAPK pathway. **BioMed Research International**. v. 2019, ID:7298539, p. 1-18, 2019.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 364-369, 2001.

SALDAÑA, C. A.R.; ORTEGA, M. R. C.; VÁRQUEZ M.M.; CHACÓN, I. D. C.; MORENO, M. C.; ESQUINCA, A.R. G. Acetogenins and alkaloids during the initial development of *Annona muricata* L. (Annonaceae). **Journal of Basic and Clinic Physiology and Phamacology**, v. 28, p. 1-10, 2017.

SANTHA, S.; BOMMAREDDY, A.; RULE, B.; GUILLERMO, R.; KAUSHIK, R. S.; YOUNG, A.; DWIVEDI, C. Antineoplastic effects of α -santalol on estrogen receptor-positive and estrogen receptor-negative breast cancer cells through cell cycle arrest at G2/M phase and induction of apoptosis. **Plos One**, v. 8, p. 1-12, 2013.

SHAHALI, A.; GHANADIAN, M.; JAFARI, S. M.; AGHAEI, M. Mitochondrial and caspase pathways are involved in the induction of apoptosis by nardosinen in MCF-7 breast cancer cell line. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 13, p. 12-21, 2018.

SHEN, J.; ZENG, L.; PAN, L.; YUAN, S.; WU, M.; KONG, X. Tetramethylpyrazine regulates breast cancer cell viability, migration, invasion and apoptosis by affecting the activity of Akt and caspase 3. **Oncology letters**, v. 15, p. 4557-4563, 2018.

SUBARNAS, A.; DIANTINI, A.; ABDULAH, R.; ZUHROTUN, A.; HADISAPUTRI, Y.; PUSPITASARI, M. I.; YAMAZAKI, C.; KUWANO, H.; KOYAMA, H. Apoptosis induced in MCF-7 human breast cancer cells by 2',4'-dihydroxy-6-methoxy-3,5-dimethylchalcone isolated from *Eugenia aquea* Burm f. leaves. **Oncology Letters**, v.9, p. 2303-2306, 2015.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M. L. B.; Frana, S.A.; Varella, D. A.; Younes, R. N. In vitro breast cancer cell lethality of Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v. 62, p. 798-800, 2007.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M. L. B.; VARELLA, D. A.; YOUNES, R. N. In vitro prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. **Pharmazie**, v.61, p. 722-724, 2006.

SUFFREDINI, I.B.; VARELLA, D. A.; YOUNES, R.N. Cytotoxic Molecules from Natural Sources: Tapping the Brazilian Biodiversity. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 6, p 1-9, 2006a.

TAHA, H.; LOOI, C. Y.; ARYA, A.; WONG, W. F.; YAP, L. F.; HASANPOURGHADI, M.; MOHD, M. A.; PATERSON, I. C.; ALI, H. M. (6E, 10E) Isopolycerasoidol methyl ester, prenylated benzopyran derivates from *Pseuduvaria monticola* induce mitochondrial – mediatedapoptosis in human breast adenocarcinoma cells. **Plos OneJournal**, p. 1-19, 2015.

THOMADAKI, H., SCORILAS, A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. **Crit Rev Clin Lab Sci**. 2006;43(1):1-67.

VOSS, A. K., STRASSER, A. The essentials of developmental apoptosis. F1000Res. 2020 Feb 26;9:F1000 Faculty Rev-148.

XIE, P.; HORIO, F.; FUJII, I.; ZHAO, J.; SHINOHARA, M.; MATSUKURA, M. A novel polysaccharide derived from algae extract inhibits cancer progression via JNK, not via the p38 MAPK signaling pathway. **International Journal Of Oncology**. v. 52, p. 1380-1390, 2018.

YADAV, N. K.; SAINI, K. S.; HOSSAIN, Z.; OMER, A.; SHARMA, C.; JIAUR R. GAYEN, J. R.; SINGH, P.; K. R. ARYA,K. R. A.; SINGH, R. K. *Saraca indica* bark extract shows *in vitro* antioxidant, antibreast cancer activity and does not exhibit toxicological effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 1, p. 1-15, 2015.

YUAN, C.H.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. **Viruses**.v. 4, p. 3831-3850, 2012.

YAP, C. V.; SUBRAMANIAM, K. S.; KHOR, S. W.; CHUNG, I. Annonacian exerts antitumor activity through induction of apoptosis and extracellular signal-regulated kinase inhibition. **Pharmacognosy Research**, v. 9, p. 378-383, 2017.

YOUNES, R. N.; VARELLA, D. A.; SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v. 62, p. 763-768, 2008.

YOUNES, R.N.; VARELLA, D.; SUFFREDINI, I.B. Extração e rastreamento de novas drogas em plantas brasileiras. **Acta Oncológica Brasileira**, v. 20, p. 15–19, 2000.

ZHANG, C. Z., ZHANG, J. X., ZHANG, A. L., *et al.*: **MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma**. *Mol Cancer*. 2010; **9**: 229.

ZHOU, Q.; WANG, X.; LIU, X.; ZHANG, H.; LU, Y.; SU, S. Curcumin enhanced antiproliferative effect of mitomycin C in human breast cancer MCF-7 cells *in vitro* and *in vivo*. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, p. 1402-1410, 2011.

ZINGUE, S.; MICHEL, T.; CISILOTTO, J.; TUECHE, A.B.; NDINTEH, D.T.; MELLO, L.J.; NJAMEN, D.; CRECZYNSKI-PASA, T.B. The hydro-ethanolic extract of *Acacia seyal* (Mimosaceae) stem barks induced death in an ER-negative breast cancer cell line by the intrinsic pathway of apoptosis and inhibited cell migration. **Journal of Ethnopharmacology**. v.223, p.41-50, 2018.