UNIVERSIDADE PAULISTA

FELIPE JOSÉ FERREIRA GOMES

EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS AMAZÔNICAS IMPEDEM A REGENERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA

SÃO PAULO

2022

FELIPE JOSÉ FERREIRA GOMES

EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS AMAZÔNICAS IMPEDEM A REGENERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA

Defesa apresentada ao Programa de Pós Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental.

Orientador: Profª.Drª. Ivana Barbosa Suffredini

SÃO PAULO

2022

Gomes, Felipe José Ferreira.
Extratos vegetais de plantas amazônicas impedem regeneração de células tumorais de mama / Felipe José Ferreira Gomes. - 2022.
81 f. : il. color. + CD-ROM.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista, São Paulo, 2022.
Área de concentração: Ecotoxicologia Ambiental.
Orientadora: Prof.ª Dr.ª Ivana Barbosa Suffredini.

1. *Wound healing*. 2. Câncer de mama. 3. Produtos naturais. I. Suffredini, Ivana Barbosa (orientadora). II. Título.

Ficha elaborada pelo Bibliotecário Rodney Eloy CRB8-6450

FELIPE JOSÉ FERREIRA GOMES

EXTRATOS VEGETAIS DE PLANTAS AMAZÔNICAS IMPEDEM A REGENERAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS DE MAMA

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da Universidade Paulista - UNIP para a obtenção do título de Mestre em Patologia Ambiental e Experimental

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

//_____

Profª.Drª. Ivana Barbosa Suffredini
Universidade Paulista–UNIP

//_____

Profª.Drª. Elizabeth Cristina Perez Hurtado
Universidade Paulista–UNIP

//_____

Prof. Dr. Vinícius Cestari do Amaral
Universidade Paulista–UNIP

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a toda minha família, às minhas tias que passaram por tratamentos oncológicos de câncer de mama e desejo que este trabalho possa contribuir um pouco para o avanço das pesquisas nesta área médica. Dedico a todos os professores que agregaram profissionalmente à minha carreira de Biomédico.

.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à DEUS por tudo;

Agradeço pela bolsa de estudos concedida pela Capes e à Universidade Paulista;

Agradeço à minha Mãe, Leila Ferreira da Costa, e ao meu Irmão, Thiago Ian Ferreira Gomes, pela paciência, compreensão, carinho e dedicação nesta etapa tão delicada e de grande esforço intelectual e dedicação à ciência e à pesquisa, obrigado por tudo Mãe!

Agradeço e dedico este trabalho à minha Avó, Maria José Ferreira da Costa, falecida por Covid-19 em Minas Gerais na cidade de Cruzilia - MG, pelos seus incentivos aos estudos e por sempre me dizer: “Sempre estude meu filho, tem que sempre estudar, nunca pare de estudar! Você vai conseguir tudo que sonhar através dos seus estudos”.

À minha orientadora Professora Doutora Ivana Barbosa Suffredini e ao Mestre Sérgio Alexandre Frana pelo seu carisma e ensinamentos de cultura de células, pelo carinho, dedicação, atenção, orientação e ensinamentos nesta pesquisa de grande valor, pois sem eles não teria sido possível a realização deste trabalho muito obrigado por tudo, e nunca me esquecerei de vocês, Professoa Ivana muito obrigado por ter paciência comigo eu te agradeço infinitamente por tudo de coração, obrigado por acreditarem na minha capacidade Profª. Dra. Ivana Barbosa Suffredini e Prof. MsC. Sérgio Alexandre Frana que Deus dê tudo em dobro para vocês.

À minha Líder Beatriz Lima Cachadare pela folga autorizada numa sexta-feira em Dezembro de 2020, encima dos dias previsto, mas bem no dia da minha tão sonhada prova de mestrado e seleção da bolsa Capes, meu muito obrigado Beatriz por este dia, pois nunca me esquecerei dessa atitude tão nobre, mesmo você não sabendo o motivo hoje está ai o resultado desta folga Beatriz!

Ao Supervisor e Coordenador Willian Fidêncio e ao meu Coordenador de operações e futuro Diretor Ryan Despontin Gomes pelos ensinamentos, flexibilidade, paciência, compreenssão, incêntivo e por acreditarem no meu esforço e capacidade profissional durante os meus estudos no mestrado, mediante tudo Ryan e Willian só tenho a te agradecer por serem estes chefes humano, compreensivo, e por acreditar no amor que tenho pela analises clínicas e por continuarem acreditando, mesmo nas fases tão dificeis, agradeço aos colegas de trabalho da DB Diagnósticos, pela

AGRADECIMENTOS

oportunidade de aprendizagem durante todo este período de dedicação à pesquisa, quando muitas vezes precisei me ausentar vocês 3 sempre estavam do meu lado, sempre me inspirando a ir em frente. Nunca me esquecerei de vocês, caros colegas de trabalho, meu muito obrigado a todos e por tudo, Deus os abençoe sempre, sempre porque dar asas também é ganhar asas para voar.

Agradeço a Deus mais uma vez por colocar pessoas humanas no meu caminhos que me fizeram crescer como humano e profissionalmente, pelo meu sonho que está sendo realizado, pois desde os meus tempos como estudante de graduação em Biomedicina lá no Campus de São José dos Campos – SP na Universidade Paulista, quando a vontade de ensinar ao próximo e contribuir com a ciência já me acompanhavam junto ao amor pela Biomedicina e a Ciência.

Meu muito obrigado à toda equipe do Programa de Pós-Graduação em Patologia Ambiental e Experimental da UNIP - Campus São Paulo.

Obrigado a todos aqueles que me incentivaram de coração!

EPÍGRAFE

“Acreditar no que você sente por dentro, é dar aos seus sonhos as asas para voar”.

Believer -ADELE

RESUMO

O câncer de mama é o tipo de neoplasia que acomete a maior parte da população mundial feminina; no Brasil, e está atrás apenas do câncer de pele não melanoma. Estudos anteriores identificaram extratos vegetais com potencial citotóxico contra a célula MCF-7, adenocarcinoma com grau moderado na diferenciação metastática, que induziam as células à apoptose. Uma vez que o conhecimento a respeito da capacidade desses extratos de influenciarem a regeneração celular é desconhecido, o objetivo do trabalho foiavaliar a influênciadesses extratos sobrea regeneração celular, em células MCF-7, MDA-MB-231 e MCF-10A desafiadas ou não por prolactina (PRL), no modelo conhecido como *wound healing*. Verificou-se que dois extratos, N719 (Salicaceae) e N1091 (Annonaceae) entre 15 avaliados apresentaram capacidade de inibir a regeneração celular. Foram testados quanto à capacidade de influenciar na expressão de FAK (*focal adhesion kinase*) e Moesina (*membrane organizing extension spike protein*), proteínas envolvidas com o citoesqueleto, sobre influência de PRL. Observou-se que N719 inibe a regeneração de MCF-10A e MCF-7, FAK está mais expressada em MCF-10A e Moesina em MCF-7 estimulada com PRL 50 ng/mL. Já N1091 e fases de partição N1091-14 e N1091-16 inibem a regeneração celular, enquanto que FAK e Moesina estão mais expressadas em MCF-10A não estimuladas por PRL. Esses resultados confirmam o potencial de N719 e N1091 de serem usados em pesquisas futuras relativas à verificação da capacidade de interferência na migração celular e na verificação dos principais componentes ativos presentes.

Palavras-chave: wound healing, câncer de mama, produtos naturais, citoesqueleto, MCF-7, MDA-MB-231.

ABSTRACT

Breast cancer is the type of neoplasia that affects most of the world's female population; in Brazil, and is only behind non-melanoma skin cancer. Previous studies have identified plant extracts with cytotoxic potential against the MCF-7 adenocarcinoma cancer cell, which also induced the cells to apoptosis. Once the knowledge about the ability of these extracts to influence cell regeneration is unknown, this study's objective was to evaluate these extracts' influence on cell regeneration in MCF-7, MDA-MB-231, and MCF-10A cells challenged or not with prolactin (PRL) in the model known as wound healing. Two extracts, N719 (Salicaceae) and N1091 (Annonaceae) among 15 evaluated, showed the potential to inhibit cell regeneration. They also influenced the expression of FAK (focal adhesion kinase) and Moesin (membrane organizing extension spike protein), which are proteins involved with the cytoskeleton, under the influence of PRL. N719 inhibited the regeneration of MCF-10A and MCF-7, FAK is more expressed in MCF-10A and Moesin in MCF-7 stimulated with PRL 50 ng/mL. N1091 and partition phases N1091-14 and N1091-16, on the other hand, start cell regeneration, while FAK and Moesin are more expressed in MCF-10A not stimulated by PRL. These results confirm the potential of N719 and N1091 to be used in future research related to verifying the interference capacity in cell migration and verifying the main active components present.

Keywords: wound healing, breast cancer, natural products, cytoskeleton, MCF-7, MDA-MB-231.

ABREVIAÇÕES

ATP – adenosina trifosfato

ER – (Enzima Radixim)

ERM (Enzimas Radizi Moesina)

FAK- (quinase de adesão focal, do inglês *Focal adhesion kinase*).

MAPR – (proteína quinase mitógeno-ativada, do inglês *Mitogen-activated protein kinase*)

MEC – matrix extracellular

mL - mililitro

mM – milimolar

ng – nanogramas

PI3K- (fosfatidilinositol-3-OH-quinase, do inglês *Phosphatidylinositol-3-OH-kinase*)

PRL- prolactina

µL - microlitro

µm – micrômetros

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados botânicos aos extratos vegetais citotóxicos utilizados **26**
Tabela 2 - Porcentagens de área das feridas após inoculação dos extratos **30**
Tabela 3 - Porcentagem da área das feridas regenerada da MCF-10 A **40**
Tabela 4 - Porcentagem da área das feridas regeneradas da MCF-7 **47**
Tabela 5 - Porcentagem da área das feridas regeneradas da MDA MB 231 **52**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ação da FAK e Moesina. **21**

Figura 2. Aumento dos filamentos de actinas em formação. **22**

Figura 3. Ação da actina e integrinas na movimentação célular. **23**

Figura 4. Sequência experimental adotada no presente projeto. **26**

Figura 5. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de células após tratamento com 15 extratos vegetais citotóxicos. **35**

Figura 6. Áreas relativas à ação de extratos vegetais inibidores de regeneração celular no modelo de migração celular, ou *woundhealing*, realizado com células MCF-10A, normais de mama humana. Prancha1. **36**

Figura 7. Áreas relativas à ação de extratos vegetais inibidores de regeneração celular no modelo de migração celular, ou *woundhealing*, realizado com células MCF-10A, normais de mama humana. Prancha2. **37**

Figura 8. Áreas relativas à ação de extratos vegetais inibidores de regeneração celular no modelo de migração celular, ou *woundhealing*, realizado com células MCF-7, normais de mama humana. Prancha 1. **38**

Figura 9. Áreas relativas à ação de extratos vegetais inibidores de regeneração celular no modelo de migração celular, ou *woundhealing*, realizado com células MCF-7, normais de mama humana. Prancha 2. **39**

Figura 10. Áreas relativas à ação de extratos vegetais inibidores de regeneração celular no modelo de migração celular, ou *woundhealing*, realizado com células MDA-MB-231, normais de mama humana.
Prancha 1. **40**

Figura 11. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de células MDA-MB-231 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos.
Prancha 2. **41**

Figura 12. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de células MCF-10A após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluiçãodos extratos e frações. **45**

LISTA DE FIGURAS

Figura 13. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-10A após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 1. **46**

Figura 14. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-10A após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 2 **47**

Figura 15. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-10A após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 2 **48**

Figura 16. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de célulasMCF-7 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos. **50**

Figura 17. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-7 apóstratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 1. **51**

Figura 18. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-7 apóstratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 2. **52**

Figura 19. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-7 apóstratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 3. **53**

Figura 20. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de célulasMDA-MB-231 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos. **56**

Figura 21. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MDA-MB- 231 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 1. **57**

LISTA DE FIGURAS

Figura 22. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MDA-MB- 231 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 2. **58**

Figura 23. Cultura de células MDA-MB- 231 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato com PRL. **59**

Figura 24. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de células MCF-10A após tratamento como extrato vegeta N1091; **62**

Figura 25. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de células MCF-10A após tratamento com o extrato vegetal N719; **64**

Figura 26. Indicação da presença de FAK nos sobrenadantes dos meios de cultura coletados das três linhagens celulares MCF-10A; **66**

Figura 27. Indicação da presença de Moesina nos sobrenadantes dos meios de cultura coletados das três linhagens celulares MCF-10A (A), MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C); **67**

Figura 28. Indicação da presença de FAK nos sobrenadantes dos meios de cultura coletados das três linhagens celulares MCF-10A , MCF-7 e MDA-MB-231 **68**

Figura 29. Indicação da presença de Moesina nos sobrenadantes dos meios de cultura coletados das três linhagens celulares MCF-10A (A), MCF-7(B) e MDA-MB-231(C) **70**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17

2 OBJETIVO 25

2.1 Objetivo geral 25

2.2 Objetivos específicos 25

3 . MATERIAL E MÉTODOS 26

3.1 Sequência dos experimentos propostos 26

3.2 Obtenção dos extratos vegetais – procedimento anteriormente realizado 27

3.3 Extratos vegetais e substâncias de referência utilizados 27

3.4 Cultura celular 28

3.5 Regeneração celular ou wound healing 29

3.6 Triagem dos extratos quanto à influência na migração celular 30

3.7 Análise dos extratos ativos e fases de partição em diferentes concentrações. 30

3.8 Análise indicativa da expressãode FAK e Moesina após tratamentos e estímulo com PRL 30

3.9 Análise Estatística 31

4 RESULTADOS 32

4.1 Triagem dos extratos citotóxicos quanto à influência sobre a migração celular. 32

4.2 Avaliação da influência de extratos , fases de partição esubstâncias de referências de regeneração celular 42

4.3 Avaliação da influência dos tratamentos sobre a regeneração celular em cultura estimulada com prolactina 60

4.3.1 Extrato N1091, suas fases de partição e substâncias de referência sobre a regeneração celular em cultura estimulada com prolactina. 60

4.3.2 Extrato N719 e substâncias de referência sobre a regeneração celular em cultura estimulada com prolactina 63

4.4 Avaliação da influência de extratos, fases de partição esubstâncias de referência sobre as proteínas FAK e Moesina na regeneração celular em cultura estimulada com prolactina 65

4.4.1 Extrato N1091 e suasfases de partição e substâncias de referência sobre as proteínas FAK e Moesina na regeneração celular em cultura estimulada com prolactina. 65

4.4.2 Extrato N719 e substâncias de referência sobreas proteínas FAK e Moesina na regeneração celular em cultura estimulada com prolactina. 68

5 DISCUSSÃO 71

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS 777

7 . REFERÊNCIAS 78

1 INTRODUÇÃO

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, do Ministério da Saúde, 66.280 novos casos estavam previstos para 2021 com 18.032 ocorrências de mortes, sendo 207 em homens e 17.825 mulheres (INCA, 2022a). Segundo o boletim deste mesmo Instituto, denominado Estimativa 2020, Incidência de Câncer no Brasil (INCA, 2022a), o câncer de mama é o que mais ocorre entre as mulheres, após o câncer de pulmão, tanto no Brasil como no mundo, não considerando o câncer de pele, que é o mais frequente. No Brasil, a região Sudeste concentra 60% dos casos de câncer, incluindo o de mama, seguido pelas regiões Nordeste (27,8%) e Sul (23,4%).

Quanto aos fatores de risco relacionados ao aparecimento do câncer de mama, o INCA reporta fatores ambientais e comportamentais, fatores relacionados à história reprodutiva, hormonais, fatores genéticos e hereditários, obesidade e sobrepeso, e inatividade física, que compreende não realizar pelo menos 150 minutos de atividade física moderada semanalmente. Além disso, outros fatores também podem contribuir para o aparecimento de câncer, como o consumo de bebida alcoólica frequente, exposição a raios ionizantes, tabagismo e fatores relacionados à história reprodutiva junto a contato precoce com hormônio, primeira menstruação antes dos 12 anos, ter tido filhos na primeira gravidez antes dos 30 anos e parar de menstruar (menopausa) após 55 anos. O uso de contraceptivos hormonais que contenham estrogênio e progesterona na reposição hormonal pós-menopausa por mais de 5 anos, histórico de câncer de mama na família antes dos 50 anos, alterações genéticas dos genes BRCA1 e BRCA2, complementam fatores que influenciam não somente o câncer de mama mas também outros tipos de cânceres.

As estratégias terapêuticas relacionadas ao câncer de mama são feitas em função do tipo de câncer e do estágio de desenvolvimento, que é obtido através do estadiamento da doença. Em uma escala de quatro graus (Estádios I a IV), o câncer é categorizado entre aquele em que o tecido tumoral se encontra mais localizado no órgão afetado e em menor tamanho até aquele que se encontra em vários tecidos diferentes daquele que deu origem ao tumor, apresentando o que se chama de metástases.

A depender do estádio em que se encontra, tratamentos específicos são sugeridos, como cirurgia, radioterapia, quimioterapia antitumoral, hormonioterapia e terapia biológica, que é alvo- direcionada). Deve-se haver a compreensão de que os tratamentos devem ser estudados para cada caso (INCA, 2022b).

Embora o conhecimento relacionado à fisiopatologia do câncer de mama tenha aumentado, nas últimas décadas, o que tem permitido a adoção de protocolos terapêuticos mais eficazes tanto para controlar o desenvolvimento dos tumores como para promover melhor qualidade de vida aos pacientes, a atenção ao aprimoramento das vias metabólicas bioquímicas e hormonais ainda carecem de estudos. Sabe-se que os receptores de estrogênio (ER, da sigla em inglês) estão expressos em 75% dos cânceres de mama, enquanto 20% a 30% dos tumores expressam em grandes quantidades o receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, da sigla em inglês; VENEMA et al., 2019), além dos receptores de progesterona que podem contribuir para o surgimento dos tumores de mama, ou podem estar relacionados ao tumor de mama triplo-negativo, que não expressa esses três receptores (KUMAR; AGGARWAL, 2016).

O estudo contínuo sobre a fisiopatologia dos tumores de mama levou ao relacionamento do desenvolvimento da doença a partir do estímulo de outros receptores hormonais, como o receptor de androgênio (AR, da sigla em inglês; VENEMA et al., 2019) e o receptor de prolactina (PRLR, da sigla em inglês; BRANDÃO et al., 2016). Também existem evidências de que haja um envolvimento entre estímulos feitos a partir dos PRLRs e o remodelamento do citoesqueleto de actina, no que se refere à progressão de tumores.

PRLsR podem ser encontrados em locais como glândulas mamárias, linfócitos, útero, próstata e tecido placentário, onde a relação da PRL (prolactina) com câncer de mama começou a ser estudada ainda nos anos 1990, quando Wennbo e colaboradores (1997) demonstraram a indução de câncer de mama em camundongos transgênicos, e Reynolds e colaboradores (1997) relacionaram o aumento de PRLRs em células humanas de câncer de mama. Porém, estudos clínicos têm demonstrado resultados controversos e inconclusivos a respeito do envolvimento direto entre PRL e o surgimento / desenvolvimento do câncer (BRANDÃO et al., 2016).

Um estudo feito com 235 pacientes mostrou associação entre os níveis plasmáticos de (PRL) prolactina alto acima de 150 ng/mL e o risco do desenvolvimento de câncer de mama, e outro estudo feito com 851 mulheres

menopausadas mostrou uma forte associação entre PRL e o alto aparecimento de câncer de mama, quanto o tipo de tumor apresentou positividade no receptores de estrogênio (TWOROGER; HANKINSON, 2006).

Os mesmos autores, em 2008, demonstraram que PRL como fator de risco para o aparecimento/desenvolvimento de câncer de mama em mulheres em pré-menopausa é baixo, enquanto que em mulheres menopausadas e positivas para ER é mais elevado, confirmando as observações prévias, desta vez relacionando com mulheres que tiveram filhos ou não, além da relevância dos níveis de PRL anteriores ao diagnóstico. Mais tarde, esses dados foram confirmados e também relacionados em mulheres em pós-menopausa com carcinomas in situ e invasivos (LI et al., 2021; WANG et al., 2016).

Independentemente do processo de origem do câncer, uma das maiores preocupações é o aparecimento de metástase. Segundo o sítio do *National Cancer Institute* (NCI, 2022), metástase é o espalhamento do câncer a partir do local onde é formado para outra parte do corpo; durante a metástase, as células do tumor primário (o de origem) se desprendem e viajam pelo corpo através do sistema circulatório sanguíneo ou linfático, e formam novo tumores em outros órgãos do corpo (tumores metastáticos) cujas células são iguais àquelas do tumor primário, por exemplo, se a paciente apresenta tumor de mama que originou metástase no pulmão, o tumor metastático no pulmão terá células de mama, e não células de pulmão.

O movimento observado pelas células do tumor primário para originar as metástases é compreendido como parte de um processo realizado em vários passos que envolvem não somente a capacidade da célula se desprender do tumor primário por ter influência nas alterações da adesão célula-célula que mantém o tecido intacto, como também implica na capacidade da célula tumoral de migrar do tumor primário para o sistema circulatório, processo pelo qual a célula deve passar pela lâmina basal (BISHOP et al., 1994).

Estudos realizados com modelos experimentais desenvolvidos com culturas de células têm sido feitos para mimetizar os processos de metástase, quando feitos com células tumorais, e outros processos fisiológicos normais, como a regeneração de tecidos, quando feitos com células normais. Nesse modelo, uma fenda, ou ferida, é feita na cultura de células e a regeneração do espaço aberto na cultura é acompanhada no tempo, sendo observada com tratamento ou não. Esse modelo é conhecido como teste de migração celular, ou ensaio de wound healing (FREITAS;

JOZIC; BEDOGNI, 2021).

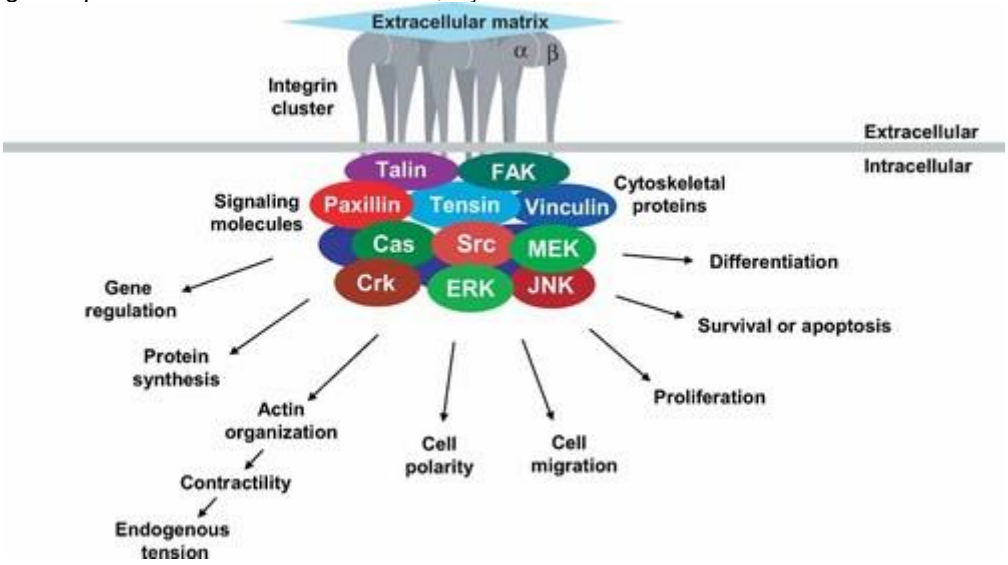
Em um processo de metástase, alterações na capacidade das células de um determinado tecido permanecerem aderidas umas as outras encontra-se comprometida. Em um sistema normal, as células devem estar aderidas para eu o tecido esteja coeso e consiga exercer a sua função fisiológica. Para tanto, deve haver uma inter-relação entre proteínas que formam o citoesqueleto, juntamente com proteínas que transpassam a membrana celular e proteínas que se encontram na matriz extracelular (MEC). Através do citoesqueleto, que é formado basicamente por actina, algumas proteínas específicas estão ligadas e estão envolvidas na ligação célula-célula através das caderinas, que são proteínas transmembrana que ocorrem entre as duas células vicinais, e na ligação célula-matriz extracelular através das integrinas, que são aquelas localizadas na região transmembrana entre a célula e a MEC (BIRK et al., 1994).

A dinâmica do citoesqueleto nos processos fisiológicos ficou mais conhecida nas últimas várias décadas, como também a influência de hormônios como estrogênio (HWANG; STABILE, 2021), progesterona (BRISKEN; HESS; JEITZINER, 2015) e prolactina (ATICI; GOVINDRAJAN;

LOPETEGUI-GONZÁLEZ; SHEMANKO, 2021), durante o estímulo de crescimento de tumores de mama. Estudaram o processo de migração celular relacionado com metástase com base no envolvimento da PRL com a dinâmica do citoesqueleto, citado em seu artigo, com base em outros trabalhos,Isso se dá através do acoplamento da PRL com proteínas quinases como a MAPK (mitogen-*activatedproteinkinase*) e a PI3K (*phosphatidylinositol-3-OH-kinase*), por exemplo, que vão ativar rotas de sinalização envolvidas na dinâmica do citoesqueleto (ACOSTA et al., 2003, p.17).

Uma vez que a organização espacial do citoesqueleto de actina é estimulada a sofrer alterações, a motilidade celular é alterada e consequentemente sua capacidade de migração também. Ainda, a prolactina tem capacidade de recrutar intermediários da via de sinalização envolvida, como os c-Src (protooncogene-tyrosine-protein-kinase), envolvidos no controle da expressão de PI3K e de FAK (focal adhesion kinase), expressos em células de tumor de mama. As FAKs estão envolvidas nos complexos de adesão focais, através dos quais o citoesqueleto se conecta com a matriz extracelular (TANIGUCHI et al., 2010). A FAK contribui como a principal molécula de sinalização celular por meiodas integrinas que são receptores de membrana glicoprotéico, e tem por função recrutar quinases,que são enzimas que direcionam e doam ATP para o meio de ação intracelular, dando a capacidade de energia para a movimentação inicial das células, como demostrado na fígura 1 abaixo (SANTULLI et al., 2011).

Fígura 1. Processo de ação da FAK intracelular no recrutamento de enzimas e ATP para iniciar a ação de força energetica para aumento dos microtubos, ação de actina e Moesina.



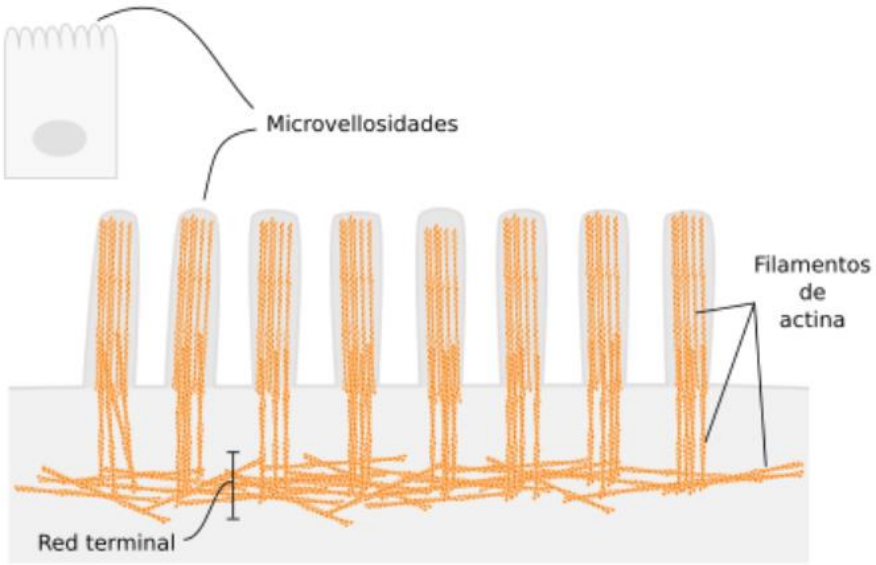
Fonte: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcp.21237, acesso em 11/11/2022. (BERRIER; YAMADA, 2007.)

Estudos anteriores (SONG et al., 2002) mostraram que a administração de prolactina favoreceu a ativação de Moesina (*membrane organizing extension spike protein*), que está ligada à actina, e que proporcionou aumento da migração celular, como consequência de alterações no citoesqueleto (POLLARD; BORISY, 2003; SIMONCINI et al., 2006; FLAMINI et al., 2009; SANCHEZ et al., 2011). Moesina é uma

das proteínas de ligação à actina, da família das ERM (*ezrin-radixin-Moesin*, envolvidas na formação de complexos de actina nesta região, que ajudam na formação de pontes moleculares entre o citoesqueleto de actina, integrinas e complexos de adesão focal, as FAKs, já mencionadas. Essas estruturas são fundamentais para a designação do movimento de células como as observadas na migração de células tumorais e na invasão da matriz extracelular (SIMONCINI et al., 2006; FU et al., 2008, OWENS et al., 1995).

Cada microfilamento de actina tem 1 a 2 µm de comprimento e 0,1 µm de diâmetro, e contém em seu interior várias dezenas de filamentos de actina orientados paralelamente ao eixo longitudinal (Figura 2). Sabendo que estes filamentos estão interligados por proteínas como miosina e fibrina, têm a capacidade de movimentação. Além disso, eles estão ligados à membrana celular por outras proteínas de ligação, na base das microvilosidades, em uma rede chamada de terminal, formada principalmente por actina, miosina e integrinas às quais estão ligados os feixes de actina que formam as microvilosidades (POLLARD, 2019).

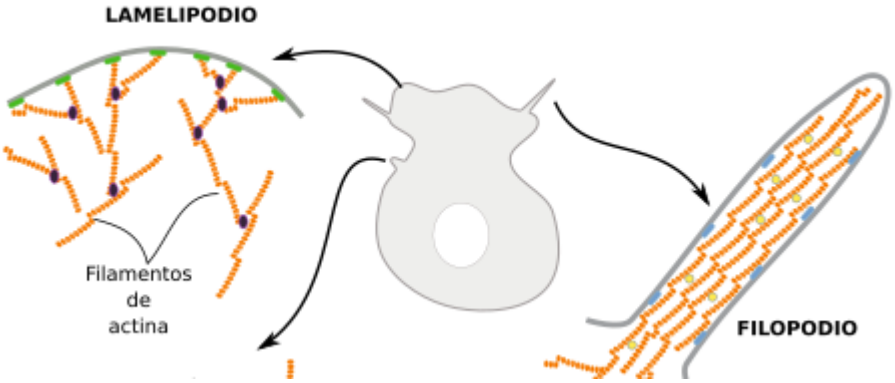
Fígura 2. Aumento dos filamentos de actinas em formação.



Fonte: https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/7-actina-c.php, acesso em 11/11/2022.

A figura 3 mostra os filopódios, que são estruturas que se formam segundo a necessidade da célula em se mover. Sua dinâmica de formação está ligada à capacidade de detectar o que ocorre no entorno das células, em termos de liberação de moléculas sinalizadoras e é guiada pela direção em que a célula vai se mover, ou migrar.

Fígura 3. A movimentação de actina e integrinas se dá pelos filopódios, que são projeções celulares formadas na direção em que a célula vai se movimentar, e detectam o que ocorre no entorno da célula. São movimentos dos filamentos de actina que dão sustentação à movimentação celular.



Fonte: https://mmegias.webs.uvigo.es/5-celulas/7-actina-c.php, acesso em 11/11/2022.

Os processos envolvidos na migração celular relacionados à reparação de tecidos, ao desenvolvimento embrionário e na metástase tumoral, que podem ser modificados pelo estímulo de PRL, passam a ser alvos terapêuticos interessantes, para o tratamento de câncer de mama. Desta forma, a busca por novos fármacos em potencial a serem usados no tratamento de câncer de mama é justificada.

O Brasil é o país com a maior diversidade, no mundo (Reflora – Herbário Virtual, 2022; MMA, 2022), sendo estimadas 116.839 espécies animais e 46.355 espécies vegetais, o que representa 20% do total de espécies estimadas para o planeta Terra. A Floresta Amazônica, a Floresta Pluvial da Mata Atlântica, o Cerrado com savanas e bosques, os Pampas e seus campos, o Pantanal que é a maior planície inundável do mundo e a Caatinga das florestas semiáridas compõem o lar dessas espécies, juntamente com os recifes de corais, dunas, manguezais, lagoas, estuários e pântanos que se encontram no vasto litoral brasileiro.

Tamanha biodiversidade biológica está relacionada à diversidade química, traduzida pelos milhares de metabólitos secundários produzidos por essas espécies, muitos dos quais ainda desconhecidos da ciência e que são potenciais agentes farmacologicamente ativos a serem empregados no tratamento de muitas patologias.

Os pesquisadores do Grupo de Pesquisa “Atividades biológicas, farmacológicas e toxicológicas de produtos naturais” têm testado extratos vegetais obtidos de plantas amazônicas e da Mata Atlântica quanto à potencial atividade citotóxica contra células de tumor de mama (SUFFREDINI et al., 2007a.) e de outros órgãos (SUFFREDINI et al., 2006; SUFFREDINI et al., 2007b). Desses estudos, o

grupo chegou a 114 extratos vegetais cuja citotoxicidade contra células de tumor de mama MCF-7, um adenocarcinoma pouco metastático, foi muito expressiva, e que foram selecionados quanto à capacidade de indução à apoptose (AGUIAR, 2017).

Destes 114 extratos citotóxicos, somente 15 mostraram-se indutores de apoptose. No presente estudo, estes 15 extratos citotóxicos foram testados quanto à capacidade de influenciarem na migração celular, com vistas à identificação de um potencial agente inibidor do processo de metástase tumoral, em células MCF-7 (adenocarcinoma não metastático), MDA-MB-231 (adenocarcinoma metastático) e MCF-10A (células normais de mama).

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Avaliação dos efeitos in vitro de extratos de plantas da Amazônia na migração horizontal de células MCF-7; MCF-10A e MDA MB-231 de câncer de mama estimuladas com prolactina.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a migração horizontal celular, por microscopia de luz;
- Analisar a expressão de moesina por ELISA para os extratos mais promissores;
- Analisar a expressão de FAK por ELISA para os extratos mais promissores.

3 . MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Sequência dos experimentos propostos

A figura 4 mostra a sequência dos experimentos que foram realizados no presente projeto, e para cada etapa foram inseridos os valores correspondentes ao número de repetições experimentais para cada procedimento.

Figura 4. Sequência experimental adotada no presente projeto.

Fonte: Próprio autor, 2022

3.2 Obtenção dos extratos vegetais – procedimento anteriormente realizado

As espécies vegetais foram coletadas em regiões próximas a Manaus, AM, sob licença do Ministério do Meio Ambiente, IBAMA de número 12A/2008. O material vegetal fresco foi encaminhado para o Laboratório de Extração da Universidade Paulista, onde foi limpo retirando-se contaminantes (fragmentos de outros órgãos, poeira, areia, inseto, etc.), seco em estufa com circulação de ar a 40ºC. Em seguida, foi moído em moinho de martelo (Holmes 201 X), o qual está localizado dentro de uma capela com captação de ar. A droga vegetal já processada foi armazenada em um saco plástico e identificada.

A técnica utilizada para obtenção do extrato foi descrita anteriormente (YOUNES et al., 2000). 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 24h e em seguida foi drenado para um balão de fundo chato com a ajuda de uma bomba de vácuo. O extrato bruto orgânico obtido foi concentrado em rota-evaporador até retirada total do solvente orgânico. Com o mesmo material vegetal realizou-se a maceração em água, que foi liofilizado. Os extratos secos foram registrados e armazenados em câmara fria a –20ºC, para posteriormente serem utilizados.

3.3 Extratos vegetais e substâncias de referência utilizados

No presente estudo, foram utilizadas as espécies vegetais que foram identificadas como sendo citotóxicasa partir do modelo da citotoxicidade pela sulforrodamina B (SUFFREDINI et al., 2007) e pelo ensaio de apoptose realizado com as células MCF-7 (AGUIAR, 2017; CORREIA, 2020). Os extratos vegetais selecionados são os seguintes: N30, N80, N144, N172, N178, N238,N246, N284, N321, N719, N934, N1062, N1068, N1091 e N1093, conforme reportados na tabela 1. As substâncias de referência utilizadas foram doxorrubicina e curcumina nas concentrações de 0,0025 µM, 0,025 µM, 0,25 µM, 2,3 µM e 25 µM.

Tabela1. Dados botânicos relativos às plantas utilizadas para a obtenção dos extratos vegetais citotóxicos utilizados no presente projeto.

Extrato	Identificação da coleta	Família	Espécie	Órgão vegetal
N30	PSC187	Clusiaceae	*Calophyllum brasiliense*	CA
N80	PSC386	Malpighiaceae	*Byrsonima* sp.	OA
N144	PSC187	Clusiaceae	*Calophyllumbrasiliense*	FO
N172	IBS06	Leg-Caesalpinioideae	*Macrolobium multijugum*	FO
N178	PSC92	Meliaceae	*Trichilia* cf. *pleeana*	OA
N238	AAO3291	Clusiaceae	*Vismia schultesii*	CA
N246	IBS11	Rubiaceae		OA
N284	PSC80	Violaceae	*Amphirrhox longifolia*	OA
N321	PSC414	Myrtaceae	*Psidium densicomum*	FOe FL
N719	AAO3383	Flacourtiaceae	*Laetia suaveolens*	FOeCA
N934	AAO3470	Flacourtiaceae	*Xylosma psedosalzmanii*	CA
N1062	AAO3583	Rubiaceae	*Duroias* p.	CA
N1068	AAO3551	Clusiaceae	*Clusia spathulaefolia*	CA
N1091	AAO3562	Annonaceae	*Guatteria riparia*	FO
N1093	AAO3562	Annonaceae	*Guatteria riparia*	CA

Fonte: Próprio autor, 2022

3.4 Cultura celular

Células MCF-7 e MDA-MB-231 de câncer de mama e MCF-10A de tecido mamário epitelial normal imortalizado foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) e estão sendo cultivadas conforme Monkset al. (1991; MCF-7), econforme as diretrizes do BCRJ (MDA-MB-231 e MCF-10A). As células MCF-7 foram mantidas em meio RPMI-1640, suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), 2 mM de L-glutamina egentamicina. O RPMI e o SFB foram adquiridos da Lonza (USA) ou da Cultilab (Brasil), enquanto que os outros reagentes foram adquiridos da Sigma (USA). O meio de cultura para a célula MDA é o Leybowitz 15 (Cultilab, Brasil) complementado com SFB 10%, e o meio para a MCF-10A é DMEM suplementado com toxina colérica (Sigma), adquirido do BCRJ (Brasil). O crescimento das células foi monitorado frequentemente com microscópio invertido de contraste de fase e o meio de cultura foi trocado a cada 48 horas, ou de acordo com o metabolismo celular.

Toda a manipulação das células ocorreu em capela de fluxo laminar. Após atingirem confluência de 70% a 80%, as células foram coletadas após a administração de tripsina-EDTA. Para os experimentos, foi feita contagem do número de células viáveis pelo método de exclusão do azul de Tripan,emcâmara de Neubauer, com microscopia óptica. As células foram semeadas em diferentes placas de cultura de 24 poços, nas concentrações de $10x10^5$ células/poço, e foram mantidas em incubadora a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2. A célula MDA-MB-231 é mantida em ambiente sem CO_2 ecom a tampa do frasco de cultura fechada.

3.5 Regeneração celular ou wound healing

O experimento é realizado em microplacas de 24 poços (Coastar) nas quais cada célula é semeada individualmente, segundo as condições adequadas de crescimento. As células foram transferidas para os poços em 1 mL de meio apropriado. Após a colocação das células nos poços, as placas foram incubadas nas condições próprias de cada célula, por 24 h. Passadas as 24 h, foram feitas lesões em cada poço, com o auxílio de uma ponteira de micropipeta de 200 µL, ou com um pincel do tipo microbrush de 0,1 mL. Em seguida, os tratamentos diluídos adequadamente em 1 mL do meio apropriado foram adicionados aos poços correspondentes.

Depois, cada lesão feita na cultura de células foi fotografada no tempo zero, correspondente ao tempo imediatamente após a adição dos tratamentos. Em seguida, as placas foram levadas à incubação, nas condições adequadas a cada célula. As lesões de cada poço foram fotografadas novamente após 24 h e 48 h da adição dos tratamentos. Células sem tratamento foram mantidas para controle de crescimento e parâmetro experimental do crescimento celular em condições normais. As medidas das áreas de lesão foram feitas com o auxílio do programa ImageJ.

3.6 Triagem dos extratos quanto à influência na migração celular.

A partir do modelo experimental descrito, os 15 extratos vegetais citotóxicos e inibidores de apoptose foram submetidos ao ensaio da migração celular, juntamente a doxorrubicina, um agente antitumoral já usado na terapia. Cada tratamento foi feito em triplicata. Os extratos que apresentaram a inibição da regeneração das lesões foram considerados como os mais ativos, neste experimento e foram selecionados para serem analisados em uma próxima etapa.

3.7 Análise dos extratos ativos e fases de partição em diferentes concentrações.

Os extratos vegetais selecionados foram testados em diferentes concentrações finais (no poço), de 100 µg/mL, 10 µg/mL, 1 µg/mL, 0,1 µg/mL e 0,01 µg/mL, a doxorrubicina (Sigma) foi testada nas concentrações de 25 mM, 2,5 mM, 0,25mM, 0,025 mM e 0,0025 mM, enquanto que a curcumina (Sigma) foi sim testada nas concentrações de 25 µM, 2,5 µM, 0,25 µM, 0,025 µM e 0,0025 µM, cada concentração em triplicata, para todos os tratamentos.

Foi testada, também, a toxicidade do dimetilsulfóxido (DMSO) puro e 10%, que foi o solvente usado para diluir as amostras. As fases de partição e N1091 foram testadas em concentração única de 100 µg/mL.

3.8 Análise indicativa da expressãode FAK e Moesina após tratamentos e estímulo com PRL

Os extratos ativos selecionados e tratamentos de referência foram testados nessa fase experimental nas três linhagens celulares. Foram usadas duas concentrações de prolactina para estimular as células, 50 ng/mL e 100 ng/mL, combase em trabalhos prévios (da SILVA et al., 2015). Após 30 minutos da administração dos compostos, foram realizados os procedimentosde análise de

regeneração celular e de expressão proteica por ELISA, de acordocomasinstruções dofabricante, utilizando-se os sobrenadantes das culturas celulares, feitas em microplacas de seis poços, em unicata.

3.9 Análise Estatística

Após a realização dos ensaios, foram feitas análises estatísticas paraverificaçãoda influência dos extratos vegetais sobre a regeneração celular e comparação da atividade inibitória dos extratos, fases de partição, compostos de referência e veículos quanto à regeneração da ferida provocada na cultura de células feita em microplacas de 24 poços. Os dados analisados e usados para os cálculos estatísticos referem-se à porcentagem das áreas da ferida após 24 h e 48 h dos tratamentos.Análise de verificação enormalidade de Shapiro-Wilkfoifeita, bem como verificação da homogeneidade entre os dados (Levene e Welch). Depois, foram aplicados os testesde variância do tipo ANOVA de dois fatores, quando não houve comparação das medidas obtidas dos mesmos poços em tempos diferentes, e ANOVA de dois fatores de medidas repetidas, as porcentagens foram calculadas a partir das mesmas feridas feitas em cada poço da microplaca,seguidos do testepost-hoc de Tukey. A comparação entre grupos foi feita nos dois tempos, de 24 h e 48 h, separadamente.Em todos os testes foi considerada significância de $\alpha < 0,05$. As análises foram efetuadas empregando-se os programas GraphPadPrisma 7 e suplemento do Excel RealStats. As hipóteses para esse trabalho foram assim determinadas: a hipótese nula (H0) determina que as médias obtidas entre os grupos controle de células sem tratamento e os grupos de células tratadas não apresentem diferenças. A hipótese alternativa determina que há diferença entre esses grupos. Asrespostas determinantes para os tratamentos aqui apresentados devem ser aquelas em que se observa a ausência de diferenças significativas entre a curcumina e a doxorrubicina e os tratamentos propostos, mas que apresentem diferenças em relação às células não tratadas de modo que os tratamentos apresentem médias significativamente maiores do que aquelas observadas para as células sem tratamento.

4 RESULTADOS

4.1 Triagem dos extratos citotóxicos quanto à influência sobre a migração celular

A tabela 2 demostra os resultados relativos às áreas sem células, obtidos da influência dos 15 extratos vegetais citotóxicos sobre o processo de migração celular das três células humanas de mama, MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231, logo após os tratamentos em 24h e 48h horas.

Tabela 2. Porcentagens de áreas regeneradas das feridas feitas nas culturas de células de mama humana após tratamento com extratos vegetais citotóxicos em modelo de regeneração celular.

	MCF-10[a]		MCF-7		MDA-MB-231	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
s/trat	82.76	41.63	58.02	40.56	22.69	1.22
	76.68	39.29	73.22	51.68	1.36	0.47
	76.06	51.71	76.37	49.99	1.54	1.00
DOXO	92.48	7.32	72.40	99.03	76.07	80.89
	150.86	8.58	79.44	85.74	97.75	368.62
	124.32	6.00	94.53	106.25	60.40	39.55
N30	134.58	78.88	57.46	49.06	33.72	10.01
	86.37	63.91	46.66	25.04	1.73	15.76
	91.72	70.50	60.47	44.25	19.99	1.73
N80	57.20	48.17	71.28	50.66	4.72	12.16
	95.65	75.64	56.61	25.50	2.55	2.30
	97.37	79.56	42.57	27.16	6.92	1.21
N144	85.62	62.86	60.67	29.63	5.61	5.56
	102.14	71.01	62.82	38.74	26.26	9.87
	78.68	51.99	49.90	19.45	1.93	1.27
N172	136.73	58.62	54.77	37.63	13.16	0.15
	41.34	57.87	56.18	31.75	1.17	0.83
	77.60	73.79	55.41	27.21	0.99	1.55
N178	87.57	64.27	60.97	31.09	16.16	2.13
	90.15	53.50	27.41	18.30	19.44	2.40
	121.34	68.47	69.03	46.23	1.59	0.72
N238	89.08	54.38	72.83	71.22	6.22	1.44
	93.96	62.51	109.33	64.21	48.13	2.40
	72.30	59.37	100.71	55.09	33.47	1.90

Continuação da tabela 2.

	MCF-10ª		MCF-7		MDA-MB-231	
	24h	**48h**	**24h**	**48h**	**24h**	**48h**
N246	73.96	33.44	52.67	22.17	1.45	0.83
	117.28	34.72	59.96	29.92	12.05	0.89
	74.02	49.62	85.53	50.05	52.85	1.22
N284	57.84	45.89	53.72	0.06	1.11	0.86
	59.23	47.49	88.97	25.30	2.81	1.59
	78.56	0.99	77.10	30.02	18.29	0.43
N321	73.65	2.47	83.05	25.84	37.52	3.41
	50.35	17.22	98.85	39.07	1.43	1.97
	43.21	23.72	75.09	34.38	13.20	0.80
N719	69.93	144.82	83.39	83.23	90.93	103.62
	162.46	126.64	123.30	94.89	99.05	105.73
	111.46	144.02	97.26	91.58	97.55	107.84
N934	43.30	84.24	78.29	33.78	34.96	4.76
	67.89	59.38	76.20	26.78	27.09	12.08
	103.92	91.68	74.98	31.16	34.94	0.67
N1062	82.30	68.74	72.51	23.91	3.36	0.71
	59.27	72.04	75.70	25.50	18.33	1.24
	1.95	79.41	86.87	46.98	0.41	0.40
N1068	120.19	103.80	2.43	1.07	11.14	0.71
	84.07	263.42	77.96	42.23	11.00	0.50
	69.61	0.00	62.52	32.77	20.44	0.43
N1091	58.95	50.67	161.03	103.73	20.54	3.89
	101.87	88.17	83.01	89.73	2.28	0.45
	84.19	95.45	93.34	49.65	19.70	0.20
N1098	52.20	71.62	86.95	33.81	1.55	0.93
	98.19	81.06	98.68	22.53	2.17	0.55
	82.78	63.67	85.50	21.89	1.57	0.69

Legenda: S/trat= sem tratamento, só células.

Fonte: Próprio autor, 2022

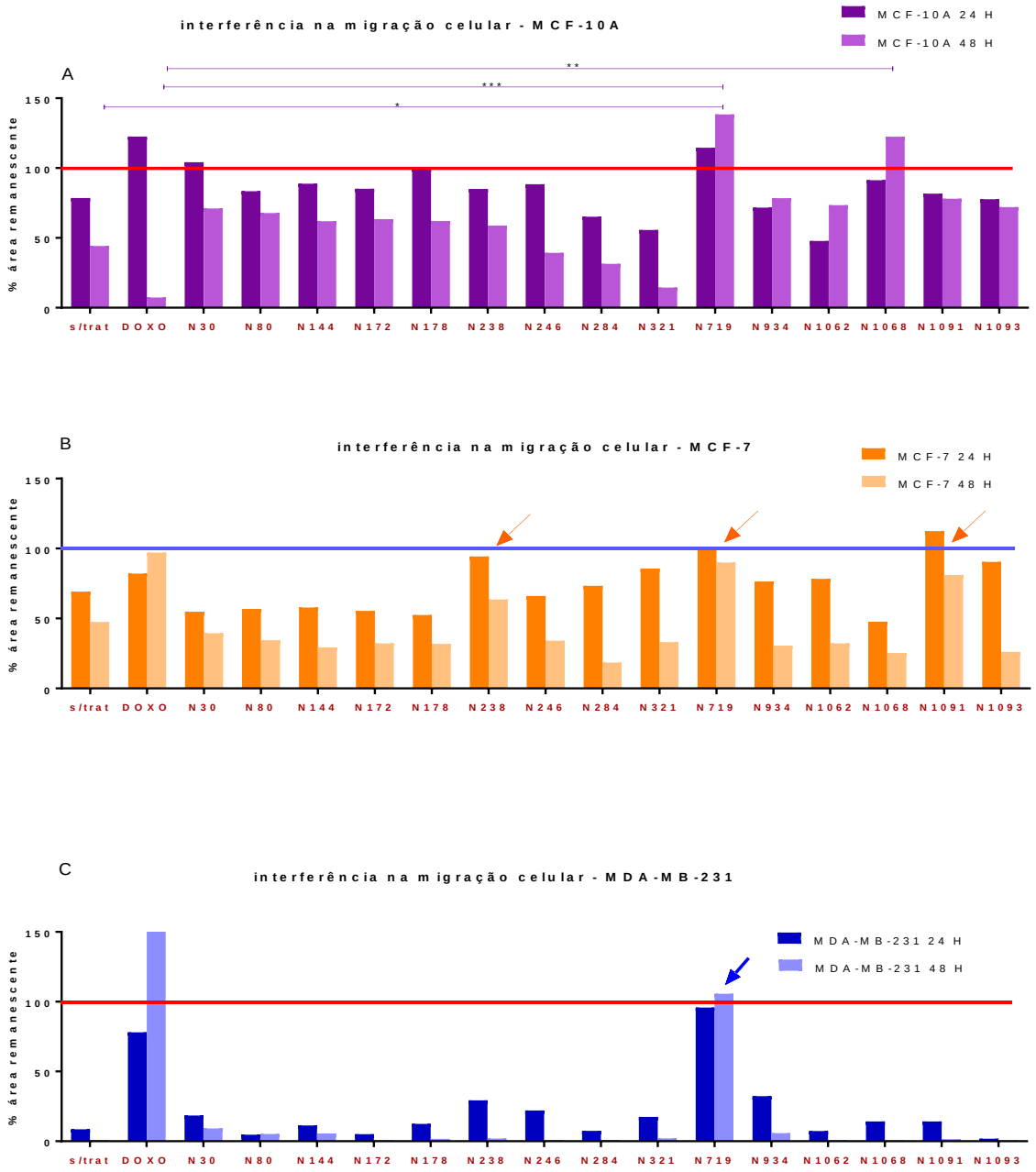
A figura 5 representa os dados dispostos na tabela 2. A partir dos experimentos de triagem realizados com os 15 extratos vegetais citotóxicos,verificou-seque, para a célula normaldemama, MCF-10A (figura 5A) as análises estatísticas demonstraram que o tratamento foi responsável por 27,94% da variância total ($F_{(16,34)}$=2,539; p=0,0110), o tempo foi responsável por 7,68% da variância total ($F_{(1,34)}$=12,23; p=0,0013) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por 19,63% da variância total ($F_{(16,34)}$=1,953; p=0,0499).Nas 24 h após os tratamentos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de área recuperada remanescente entre os tratamentos. Porém, após 48h, N719 apresentou-se mais ativo do que as células sem tratamento (p=0,0348) e em relação à

doxorrubicina (p=0,0003). N1068 e também mostrou-se ativo, em relação à doxorrubicina (p=0,0026). Para a célula normal de mama, os extratos mais ativos ou seja, que inibiram o processo de regeneração celular, foram N719 e N1068.

Para as células MCF-7 (figura 5B), um adenocarcinoma pouco metastático, observou-se que o tratamento foi responsável por 42,06% da variância total ($F_{(16,34)}$=5,129; p<0,0001), o tempo foi responsável por 26,82% da variância total ($F_{(1,34)}$=251,1; p<0,0001) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por 10,07% da variância total ($F_{(16,34)}$=5,893; p<0,0001). Nas primeiras 24 h após os tratamentos, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas em relação às células sem tratamento (p>0,05) ou em relação à doxorrubicina (p>0,05). Após 48 h dos tratamentos, a doxorrubicina apresentou-se mais ativa do que as células sem tratamento (p=0,0330) e os extratos que apresentaram atividade igual à doxorrubicina nas células não metastáticas foram N238 (p=0,4933), N719 (p>0,9999) e N1091 (p=0,9984), enquanto que o restante dos tratamentos apresentou capacidade de inibição da regeneração menor do que a observada para a doxorrubicina (p<0,05), o que não é um fator excludente para a presente análise. Os extratos que mais inibiram a regeneração da ferida em cultura de células MCF-7 foram N238, N719 e N1091.

Observou-se que, para as células MDA-MB-231 (figura 5C), um adenocarcinoma metastático, o tratamento foi responsável por 57,18% da variância total ($F_{(16,34)}$=5,836; p<0,0001), o tempo não apresentou influência significativa sobre a variância total (0,23%; $F_{(1,34)}$=0,554; p=0,4618) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por não significativos 7,396% da variância total ($F_{(16,34)}$=1,093; p=0,3980). Ainda assim, uma vez que a variável tratamento foi significativa, observou-se que nas 24 h dos tratamentos, não houve diferença significativa na capacidade de inibição da regeneração das células (p>0,05) para nenhum tratamento. Nas 48 seguidas aos tratamentos, observou-se que a doxorrubicina inibiu significativamente o crescimento celular em relação às células sem tratamento (p<0,0001), assim como o extrato N719 (p=0,0157). Já em relação à doxorrubicina, apenas o extrato N719 apresentou capaciade similar de inibição da regeneração celular (p=0,7348). Assim, para as células metastáticas de câncer de mama o extrato N719 apresentou melhor potencial de atividade de inibição de regeneração celular. A figura 5 ilustra os achados descritos e as figuras 6 a 11 mostram as áreas da ferida e a recuperação após tratamento nos tempos 24 e 48horas.

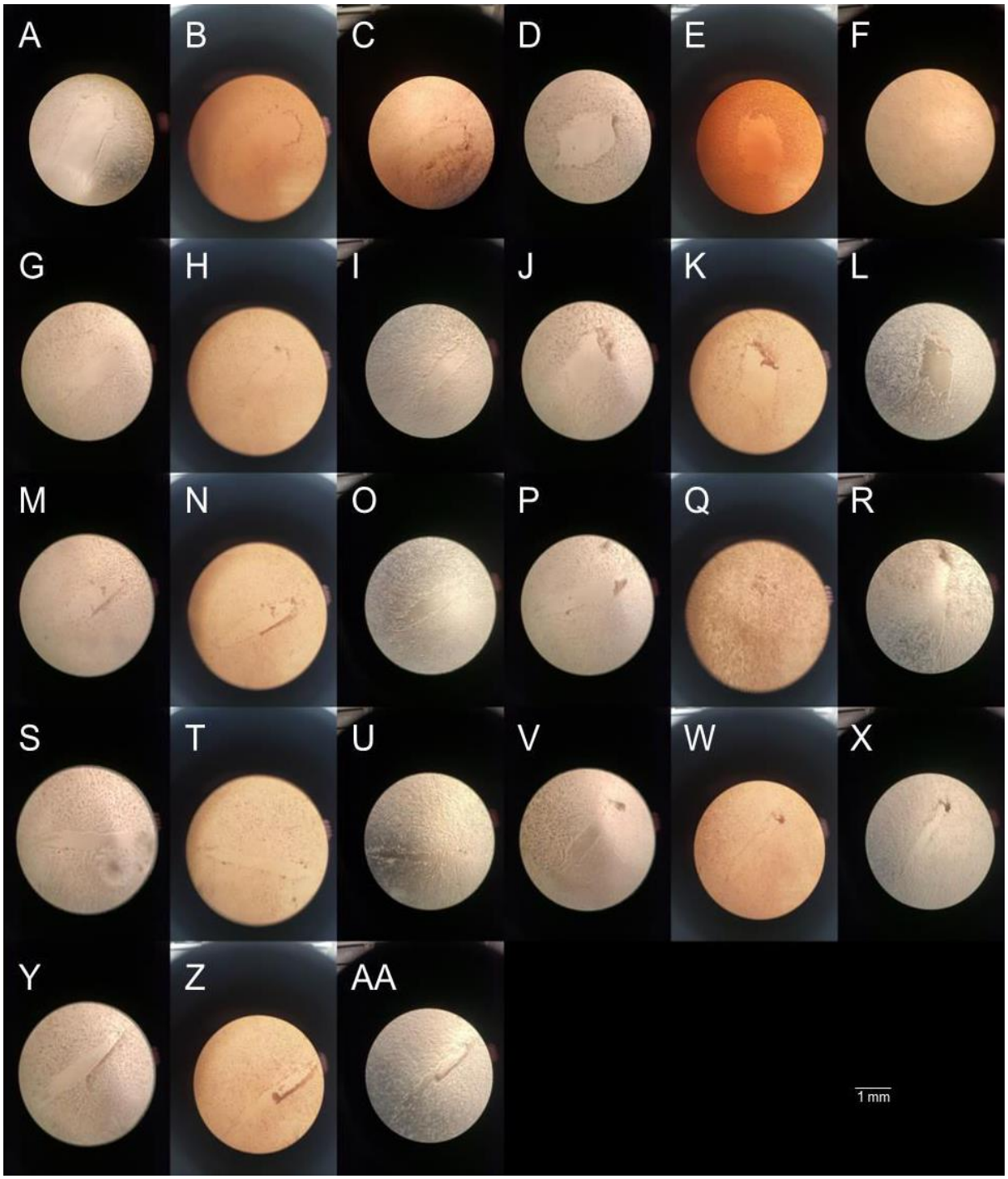
Figura 5. Porcentagens relativas às áreas de regeneração das feridas feitas nas culturas de células de mama humana após tratamento com 15 extratos vegetais citotóxicos no modelo de *wound healing*.



Legenda: DOXO=doxorrubicina. As porcentagens referem-se às áreas remanescentes após análise em 24 h e em 48 h, a partir de uma medida inicial em tempo 0 (T0).

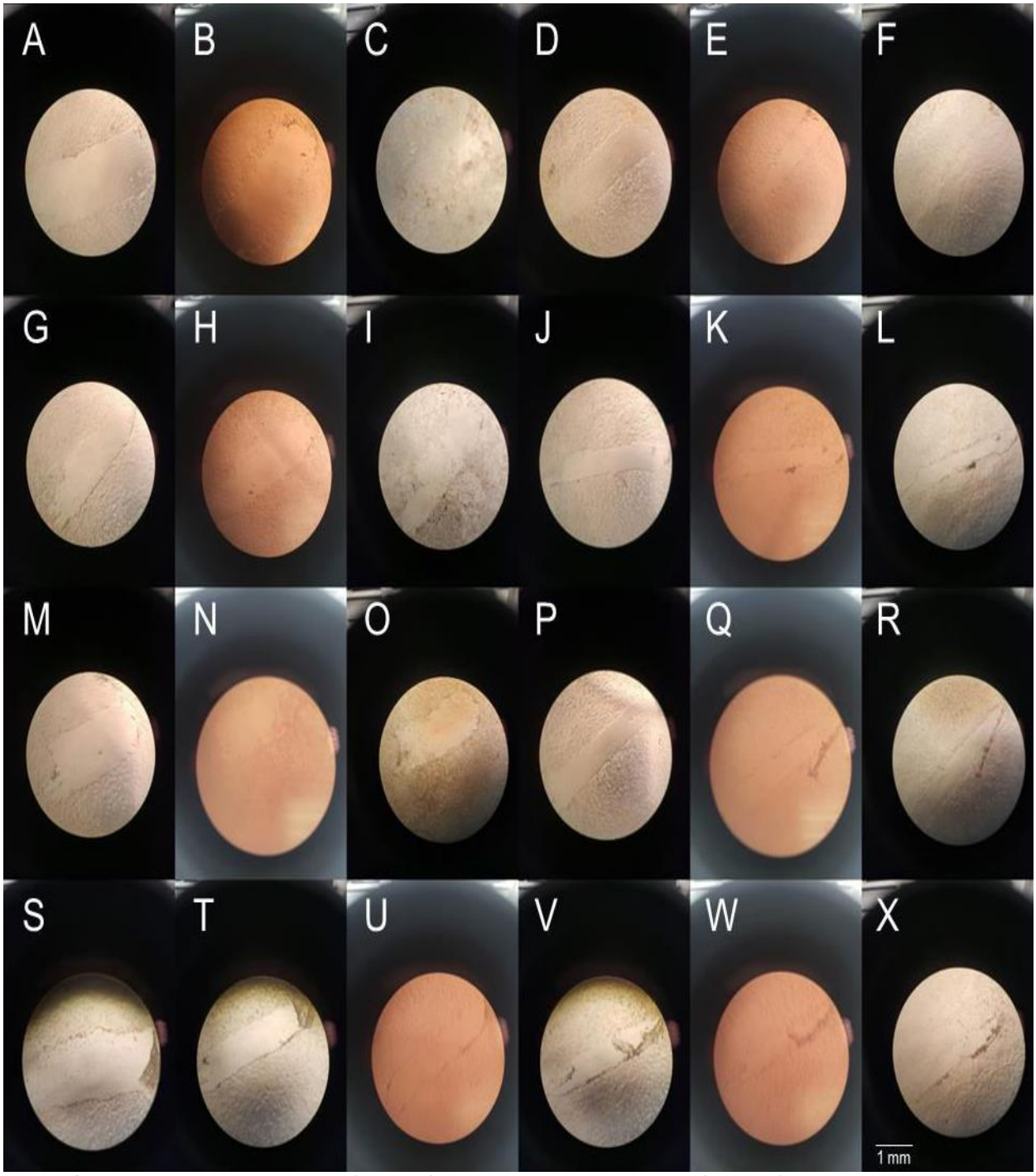
As figuras 6 a 11 mostram a regeneração das células após os tratamentos, nos tempos de 24 e 48 horas.

Figura 6. Áreas das feridas abertas nas culturas de células após ação de extratos vegetais no modelo de regeneração celular, ou *wound healing*, realizado com células MCF-10A, células humanas normais de mama, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h. Prancha1.



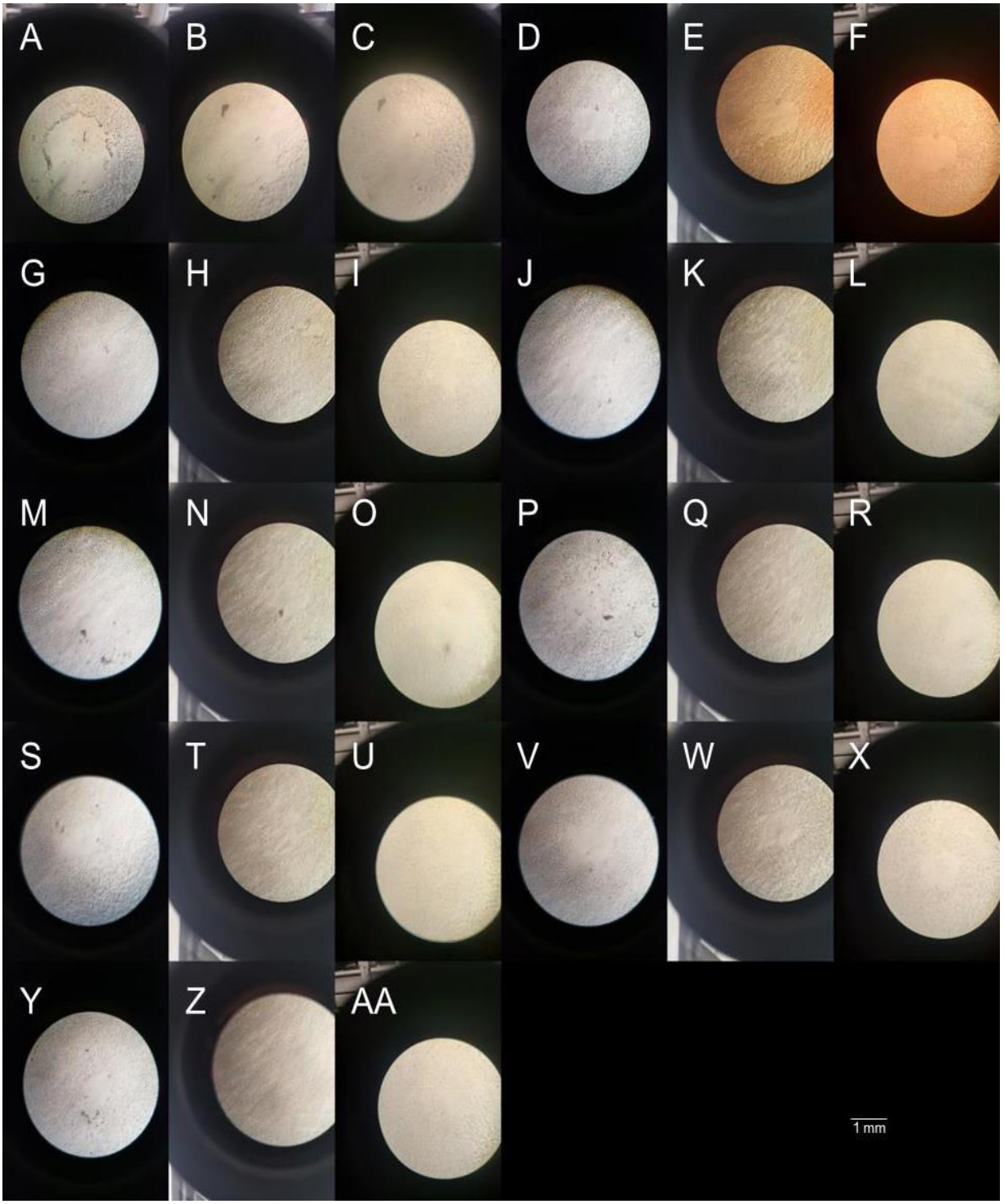
Legenda: A, B e C = só tratamento T0, 24h e 48 h; D, E e F = doxorrubicina T0, 24h e 48 h; G, H e I = N30 T0, 24h e 48 h; J, K e L = N80 T0, 24h e 48 h; M, N e O =N144 T0, 24h e 48 h; P, q e R = N144 T0, 24h e 48 h; S, T e U = N172 T0, 24he 48 h; V, W e X = N178 T0, 24h e 48 h; Y, Z e AA = N238 T0, 24h e 48 h.

Figura 7. Áreas das feridas abertas nas culturas de células após ação de extratos vegetais no modelo de regeneração celular, ou *wound healing*, realizado com células MCF-10A, células humanas normais de mama, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h.Prancha regeneração. Prancha 2.



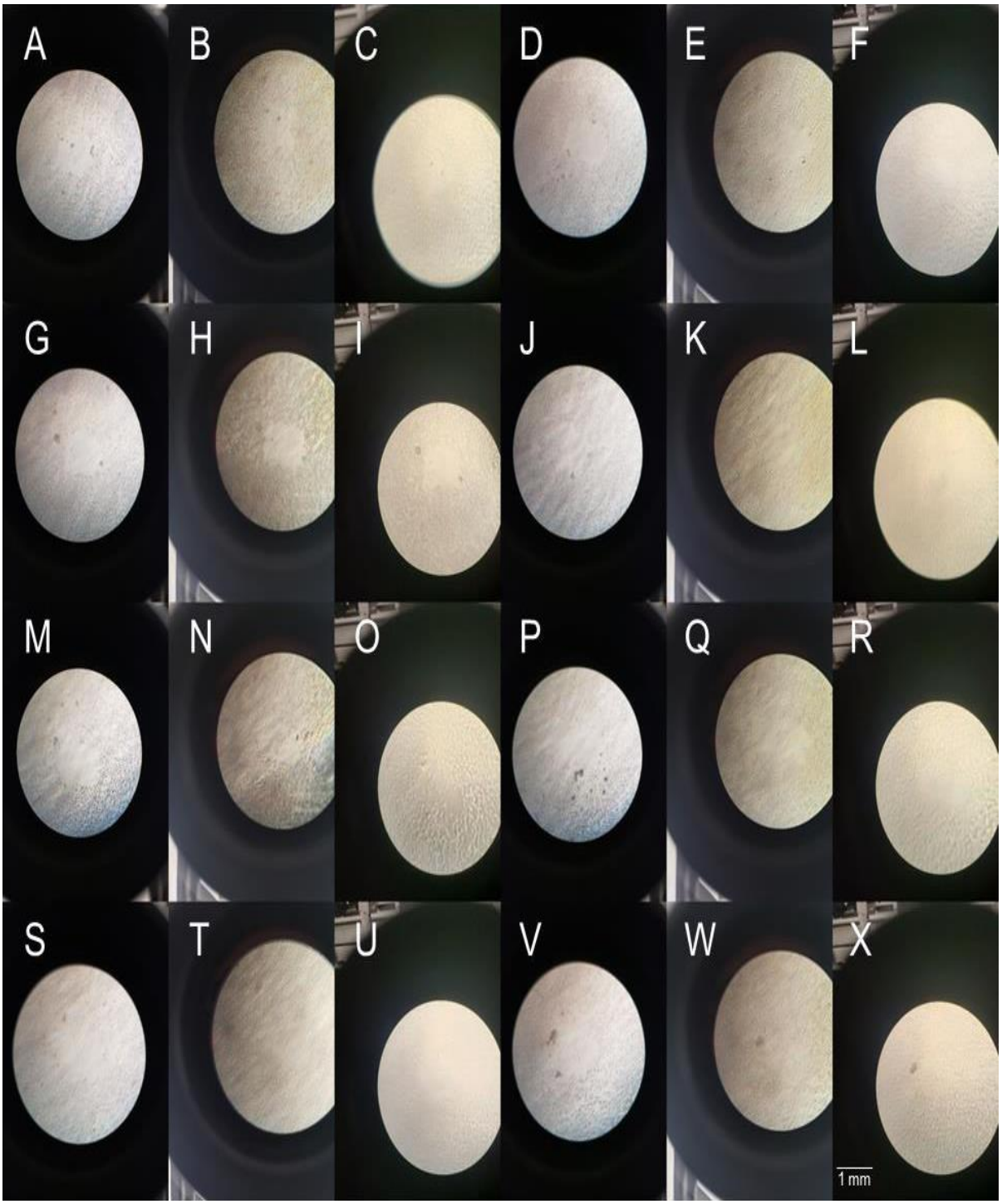
Legenda: A, B e C = N284 T0, 24h e 48 h; D, E e F = N321 T0, 24h e 48 h; G, H e I =N719 T0, 24h e 48 h; J, K e L = N934 T0, 24h e 48 h; M, N e O = N1062 T0,24h e 48 h; P, Q e R = N1068 T0, 24h e 48 h; S, T e U = N1091 T0, 24h e 48 h; V, W e X = N1093 T0, 24h e 48 h.

Figura 8. Áreas das feridas abertas nas culturas de células após ação de extratos vegetais no modelo de regeneração celular, ou *wound healing*, realizado com células MCF-7, células humanas de de adenocarcinoma não-metastatico de mama, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h.Prancha regeneração 1.



Legenda: A, B e C = só tratamento T0, 24h e 48 h; D, E e F = doxorrubicina T0, 24h e 48 h; G, H e I = N30 T0, 24h e 48 h; J, K e L = N80 T0, 24h e 48 h; M, N e O =N144 T0, 24h e 48 h; P, Q e R = N172 T0, 24h e 48 h; S, T e U = N178 T0, 24he 48 h; V, W e X = N238 T0, 24h e 48 h; Y, Z e AA = N246 T0, 24h e 48 h.

Figura 9. Áreas das feridas abertas nas culturas de células após ação de extratos vegetais no modelo de regeneração celular, ou wound healing, realizado com células MCF-7, células humanas de adenocarcinoma não-metastatico de mama, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h.regeneração Prancha 2.



Legenda: A, B e C = N284 T0, 24h e 48 h; D, E e F = N321 T0, 24h e 48 h; G, H e I =N719 T0, 24h e 48 h; J, K e L = N934 T0, 24h e 48 h; M, N e O = N1062 T0,24h e 48 h; P, Q e R = N1068 T0, 24h e 48 h; S, T e U = N1091 T0, 24h e 48 h; V, W e X = N1093 T0, 24h e 48 h.

Figura 10. Áreas das feridas abertas nas culturas de células após ação de extratos vegetais no modelo de regeneração celular, ou wound healing, realizado com células MDA-MB-231, células humanas de adenocarcinoma metastatico de mama, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h.regeneração Prancha 1.
Legenda: A, B e C = só tratamento T0, 24h e 48 h; D, E e F = doxorrubicina T0, 24h e 48 h; G, H e I

= N30 T0, 24h e 48 h; J, K e L = N80 T0, 24h e 48 h; M, N e O =N144 T0, 24h e 48 h; P, q e R = N144 T0, 24h e 48 h; S, T e U = N172 T0, 24he 48 h; V, W e X = N178 T0, 24h e 48 h; Y, Z e AA = N238 T0, 24h e 48 h.

Figura 11. Áreas das feridas abertas nas culturas de células após ação de extratos vegetais no modelo de regeneração celular, ou wound healing, realizado com células MDA-MB-231, células humanas de adenocarcinoma metastatico de mama, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h.regeneração Prancha 2.

Legenda: A, B e C = N284 T0, 24h e 48 h; D, E e F = N321 T0, 24h e 48 h; G, H e I =N719 T0, 24h e 48 h; J, K e L = N934 T0, 24h e 48 h; M, N e O = N1062 T0,24h e 48 h; P, Q e R = N1068 T0, 24h e 48 h; S, T e U = N1091 T0, 24h e 48 h; V, W e X = N1093 T0, 24h e 48 h.

4.2 Avaliação da influência de extratos , fases de partição esubstâncias de referências de regeneração celular

A partir de dados de citotoxicidade e de indução à apoptose obtidos anteriormente com a célula MCF-7, o extrato N1091 apresentou os melhores resultados relativos a esses dois parâmetros (AGUIAR, 2017; CORREIA, 2020). No presente projeto, esse extrato, bem como suas três fases de partição fases de partição anteriormente obtidas, foram testadas no modelo de regeneração celular.

Além do extrato N1091 e suas fases de partição, foram testados o extrato N-719, que também se apresentou muito ativo no modelo de regeneração celular. A curcumina, um produto natural extraído de *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae), foi usada como composto de referência durante o desenvolvimento de todo o projeto, incluindo as etapas de verificação dos efeitos indutores de apoptose. A doxorrubicina também está sendo utilizada por ser um antitumoral de referência.

A tabela 3 apresenta os dados obtidos da análise dos extratos que mais contribuíram para evitar a regeneração das feridas feitas nas culturas de células MCF-10A. As figuras 12, 13 e 14 mostram as áreas resultantes dos tratamentos dos extratos e fases de partição fases de partição e das substâncias de referência utilizadas nos experimentos.

Tabela 3. Porcentagens de áreas relativas à regeneração das feridas em cultura de células tumorais MCF-10A, após tratamento com extratos vegetais citotóxicos e substâncias de referência.

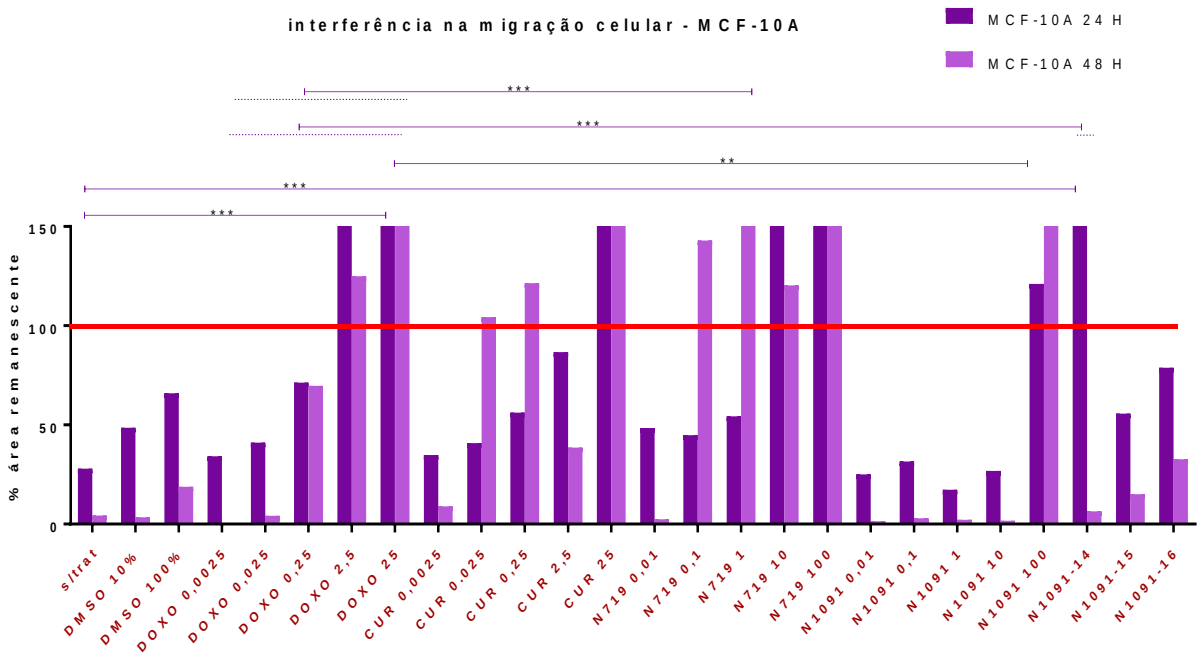
Tratamento	24h	48h	Tratamento	24h	48h
s/trat	24.82	2.79	**N7190,01**	42.54	2.56
s/trat	30.90	2.81	**N7190,01**	49.95	0.95
s/trat	28.20	7.50	**N7190,01**	52.70	3.85
DMSO10%	58.19	8.10	**N7190,1**	23.32	0.41
DMSO10%	27.35	0.54	**N7190,1**	22.85	2.86
DMSO10%	60.22	1.69	**N7190,1**	88.28	425.57
DMSO100%	68.04	15.30	**N7191**	39.36	586.59
DMSO100%	65.25	6.75	**N7191**	33.24	608.71
DMSO100%	64.69	34.20	**N7191**	90.23	711.22
DOXO0,0025	39.92	0.11	**N71910**	231.09	158.44
DOXO0, 0025	31.83	0.66	**N71910**	161.00	119.86
DOXO0, 0025	30.95	0.72	**N71910**	122.96	82.82
DOXO0,025	32.07	0.42	**N719100**	135.13	372.66
DOXO0,025	39.84	2.34	**N719100**	188.61	180.79
DOXO0,025	51.33	9.92	**N719100**	197.33	149.64
DOXO0,25	72.02	80.54	**N10910,01**	32.78	1.38
DOXO0,25	48.51	45.39	**N10910,01**	29.18	1.17
DOXO0,25	93.26	83.03	**N10910,01**	13.24	1.67
DOXO2,5	247.48	107.15	**N10910,1**	30.82	2.63
DOXO2,5	335.00	98.15	**N10910,1**	41.52	3.09
DOXO2,5	300.61	169.66	**N10910,1**	22.23	3.11
DOXO25	647.10	416.52	**N10911**	2.99	1.43
DOXO25	109.01	94.45	**N10911**	31.93	1.15
DOXO25	597.51	226.33	**N10911**	17.15	3.91
CUR0,0025	47.79	8.63	**N109110**	28.12	2.78
CUR0,0025	27.72	6.55	**N109110**	34.24	0.95
CUR0,0025	29.02	11.72	**N109110**	18.11	1.31
CUR0,025	32.96	0.96	**N1091100**	95.93	655.63
CUR0,025	54.02	305.42	**N1091100**	127.21	1175.21
CUR0,025	35.37	6.43	**N1091100**	140.00	1217.29
CUR0,25	46.09	2.90	**N1091-14**	974.19	4.13
CUR0,25	54.93	17.22	**N1091-14**	427.26	1.73
CUR0,25	67.42	344.32	**N1091-14**	1071.90	13.48
CUR2,5	75.12	42.48	**N1091-15**	43.09	15.48
CUR2,5	88.62	38.02	**N1091-15**	62.20	14.07
CUR2,5	96.37	35.12	**N1091-15**	61.80	15.51
CUR25	224.65	74.89	**N1091-16**	67.37	20.42
CUR25	163.25	290.39	**N1091-16**	92.12	48.91
CUR25	113.04	90.23	**N1091-16**	76.82	28.67

Legenda:s/trat=semtratamento;CUR=curcumina[µM];DOXO=doxorrubicina [mM]; DMSO= dimetilsulfóxido[%]; extratos e fases de partição[µg/mL].

Fonte: Próprio autor, 2022

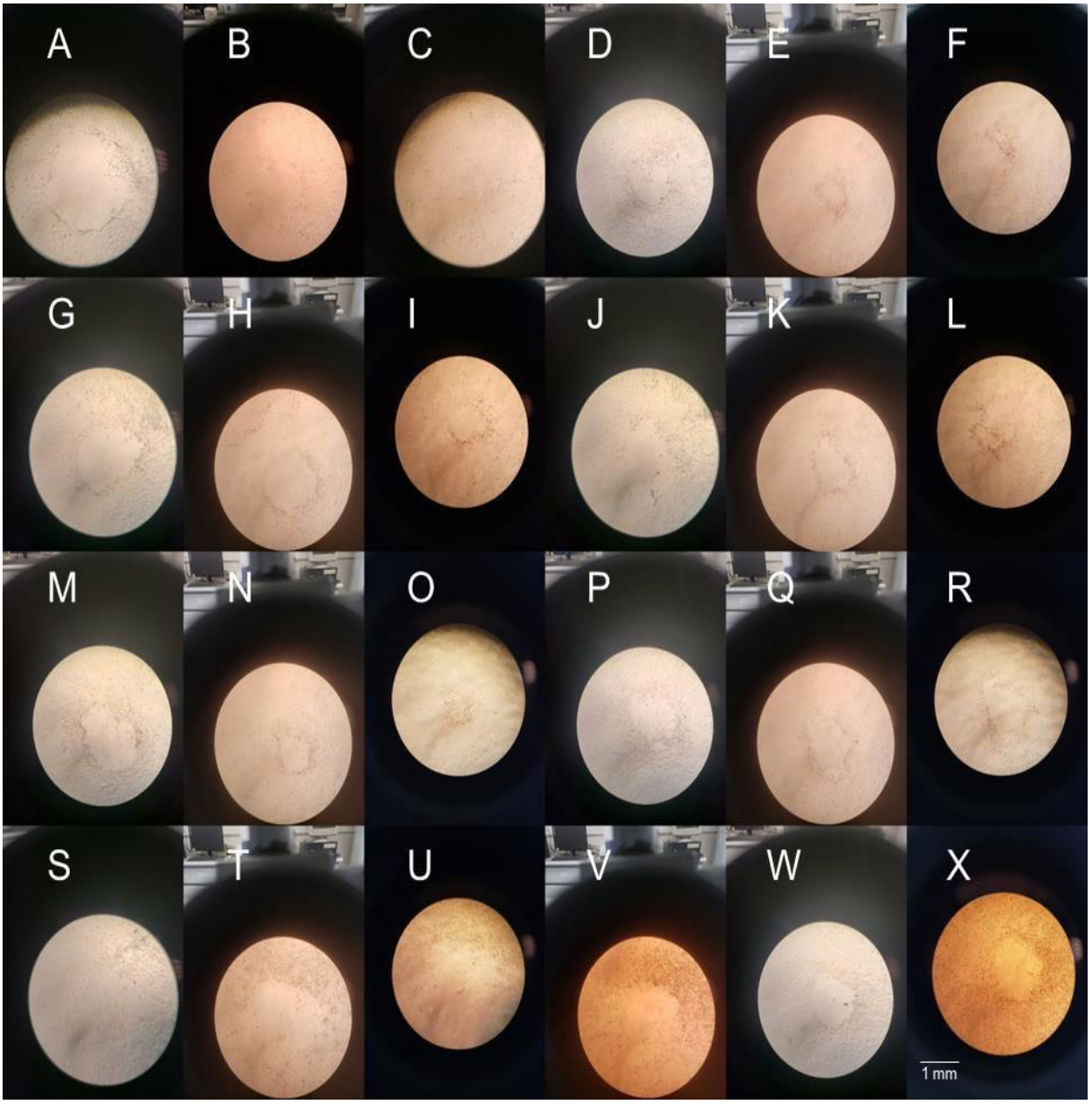
A figura 12 apresenta os gráfcos obtidos da análise dos extratos que mais contribuíram para evitar a regeneração das feridas feitas nas culturas de células MCF-10A. A partirdos experimentos de triagem realizados comos extratos vegetais e fases de partição de N1091, mais os controles doxorrubicina e curcumina, verificou-se que, para essa célula as análises estatísticas demonstraram que o tratamento foi responsável por 45,29% da variância total ($F_{(25,52)}$=10,55; p<0,0001), o tempo não influenciou significativamente na variância total ($F_{(1,52)}$=0,002251; p=0,9623) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por 40,36% da variância total ($F_{(25,52)}$=15,49; p<0,0001). Nas 24 h após os tratamentos, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na porcentagem de área recuperada remanescente entre as células sem tratamento e a doxorrubicina 25 mM (p=0,0003). N1091-14, testado apenas na concentração de 100 µg/mL, mostrou-se significantivamente mais ativo do que as células sem tratamento (p<0,0001) e a todas as concentrações de doxorrubicina testadas (p<0,0001). O mesmo foi observado para N719 na concentração de 1 µg/mL.Após 48 h de tratamento, observou-se que N719 na concentração de 1 µg/mL e N1091 na concentração de 100 µg/mL apresentaram-se mais ativos do que as células sem tratamento (p<0,0001 para ambos), e que ambos também foram mais ativos do que todas as concentrações de doxorrubicina testadas (p<0,0001 para todas as combinações, com exceção de doxorrubicina 25 mM e N719 1 µg/mL, que resultou em p=0,0014). Em resumo, para as células MCF-10A, nesse ensaio, os tratamentos mais significativos foram os feitos com N719 1 µg/mL, N1091 e N1091-14 100 µg/mL.

Figura 12. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de células MCF-10A após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados N719 e N1091, fases de partição fases de partição do extrato N1091, curcumina e doxorrubicina, e dimetil sulfóxido, solvente usado para diluição dos extratos e fases de partição.



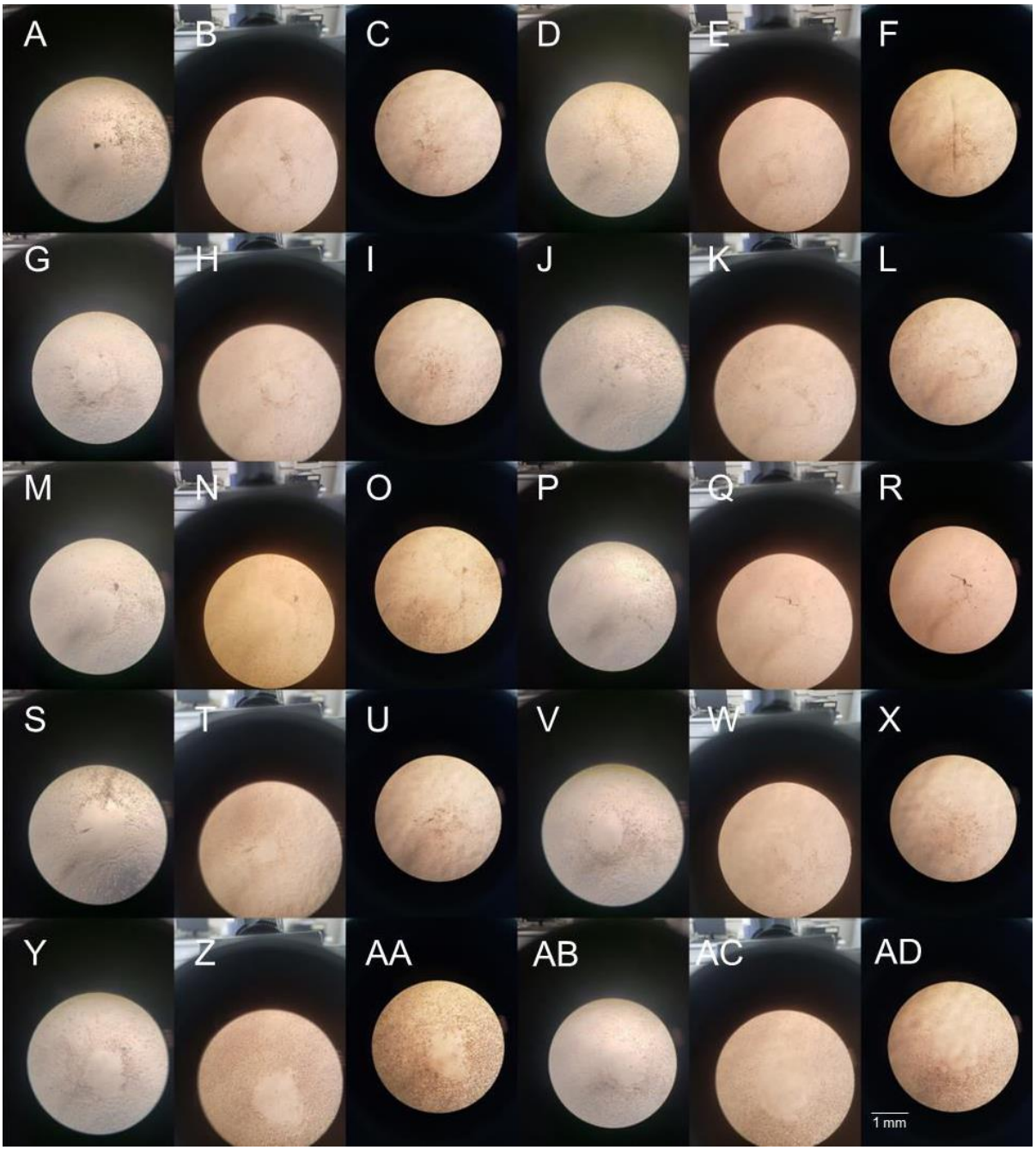
As figuras 13, 14 e 15 mostram as áreas resultantes dos tratamentos dos extratos e frações de partição e das substâncias de referência utilizadas nos experimentos.

Figura 13. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-10A após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 1.



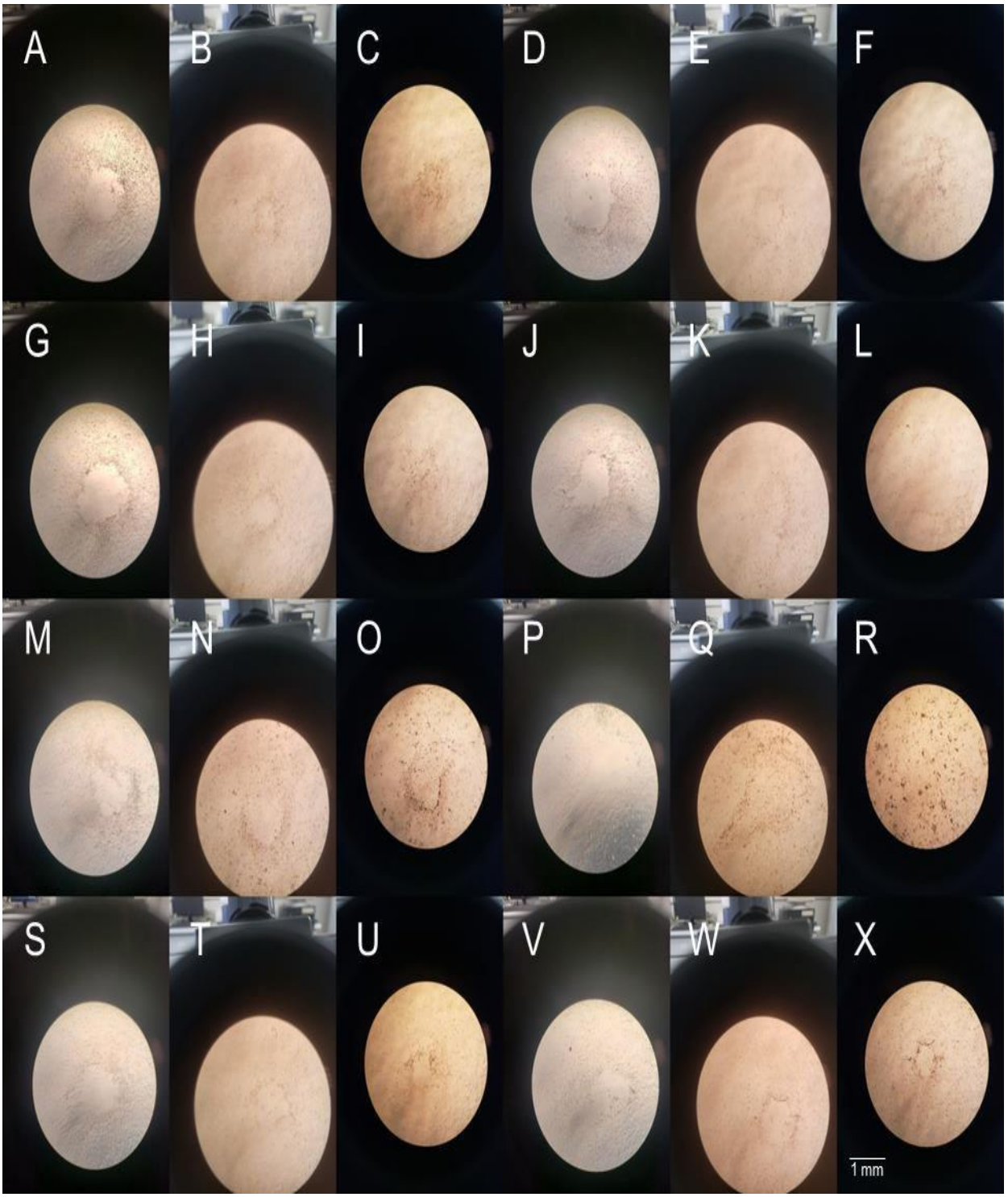
Legenda: A, B e C = sem tratamento T0, 24h e 48 h; D, E e F = dimetilsulfóxido 10% T0, 24h e 48 h; G, H e I = dimetilsulfóxido 100% T0, 24h e 48 h; J, K e L = doxorrubicina 0,0025 mM T0, 24h e 48 h; M, N e O = doxorrubicina 0,025 mM T0, 24h e 48 h; P, Q e R = doxorrubicina 0,25 mM T0, 24h e 48 h; S, T e U = doxorrubicina 2,5 mM T0, 24h e 48 h; V, W e X = doxorrubicina 25 mM T0, 24he 48 h.

Figura 14. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-10A após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 2



Legenda: A, B e C = curcumina 0,0025 mM T0, 24h e 48 h; D, E e F = curcumina 0,025 mM T0, 24h e 48 h; G, H e I = curcumina 0,25 mM T0, 24h e 48 h; J, K e L = curcumina 2,5 mM T0, 24h e 48 h; M, N e O = curcumina 25 mM T0, 24h e 48h; P, Q e R = N719 0,01 µg/mL T0, 24h e 48 h; S, T e U = N719 0,1 µg/mL T0, 24h e 48 h; V, W e X = N719 1 µg/mL T0, 24h e 48 h; Y, Z e AA = N719 10 µg/mL T0, 24h e 48 h; AB, AC e AD = N719 100 µg/mL.

Figura 15. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-10A após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 3.



Legenda: A, B e C = N1091 0,01 µg/mL T0, 24h e 48 h; D, E e F = N1091 0,1 µg/mL T0, 24h e 48 h; G, H e I = N1091 1 µg/mL T0, 24h e 48 h; J, K e L = N1091 10 µg/mL T0, 24h e 48 h; M, N e O = N1091 100 µg/mL T0, 24h e 48 h; P, Q e R = N1091-14 100 µg/mL T0, 24h e 48 h; S, T e U = N1091-15 100 µg/mL T0, 24h e 48 h; V, W e X = N1091-16 100 µg/mL T0, 24h e 48 h.

A tabela 4 e figura 16 apresentam os dados obtidos da análise dos extratos que mais contribuíram para evitar a regeneração das feridas feitas nas culturas de células MCF-7. As figuras 17, 18 e 19 mostram as áreas resultantes dos tratamentos dos extratos e frações de partição e das substâncias de referência utilizadas nos experimentos.

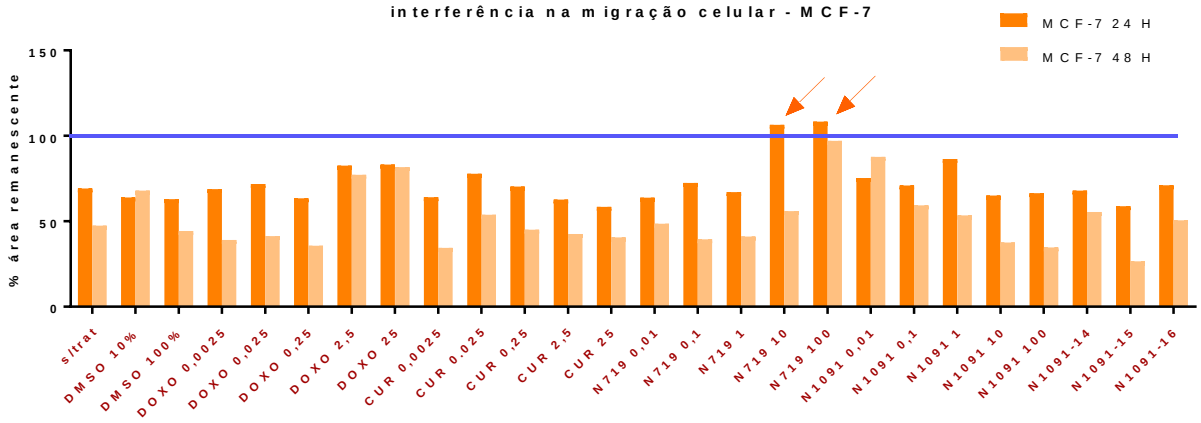
Tabela 4. Porcentagens de áreas relativas à regeneração das feridas em cultura de células tumorais MCF-7, após tratamento com extratos vegetaiscitotóxicos, frações e substâncias de referência.

Tratamento	24h	48h	Tratamento	24h	48h	Tratamento	24h	48h
s/trat	58.02	40.56	CUR0,0025	55.74	25.88	N719100	107.61	123.19
S/trat	73.22	51.68	CUR0,0025	62.58	35.38	N719100	105.76	76.59
s/trat	76.37	49.99	CUR0,025	76.49	66.17	N10910,01	80.99	68.62
DMSO10%	63.16	3.37	CUR0,025	94.25	59.83	N10910,01	77.23	33.05
DMSO10%	73.01	185.49	CUR0,025	76.46	46.02	N10910,01	67.59	161.44
DMSO10%	55.54	14.84	CUR0,25	73.36	56.44	N10910,1	70.17	46.35
DMSO100%	92.02	39.89	CUR0,25	61.06	32.61	N10910,1	63.28	68.4
DMSO100%	12.84	32.94	CUR0,25	39.43	24.95	N10910,1	79.27	63.2
DMSO100%	84.09	60.1	CUR2,5	56.17	34.82	N10911	85.32	57.8
DOXO0,0025	71.05	42.55	CUR2,5	92.62	68.1	N10911	84.59	49.93
DOXO0,0025	65.42	35.29	CUR2,5	44.1	26.4	N10911	89.29	52.47
DOXO0,0025	69.86	39.29	CUR25	65.25	48.47	N109110	59.46	101.37
DOXO0,025	66.81	36.1	CUR25	66.15	46.85	N109110	68.72	41.06
DOXO0,025	74.31	39.67	N7190,01	58.69	48.43	N109110	66.88	38.18
DOXO0,025	74.17	48.23	N7190,01	60.78	43.03	N1091100	54.18	15.04
DOXO0,25	58.25	31.75	N7190,01	72.08	54.27	N1091100	71.84	36.9
DOXO0,25	66.54	41.92	N7190,1	70.98	32.67	N1091100	73.15	51.96
DOXO0,25	65.57	33.48	N7190,1	74.83	40.37	N1091-14	75.05	70.97
DOXO2,5	67.75	71.03	N7190,1	71.38	45.13	N1091-14	59.54	36.05
DOXO2,5	82.04	75.07	N7191	55.57	36.78	N1091-14	69.18	59.19
DOXO2,5	97.87	85.56	N7191	74.53	46.56	N1091-15	72.02	33.83
DOXO25	90.68	85.36	N7191	71.23	39.67	N1091-15	59.08	26.18
DOXO25	77.7	77.93	N71910	104.82	0	N1091-15	45.26	19.51
DOXO25	81.06	81.67	N71910	105.12	82.69	N1091-16	73.22	41.96
CUR0,01	70.66	40.5	N71910	109.25	84.95	N1091-16	68.53	40.56
CUR0,0025	65.75	37.03	N719100	111.39	91.29	N1091-16	71.6	69.31

Legenda:s/trat=semtratamento;CUR=curcumina[µM];DOXO=doxorrubicina[mM];DMSO=dimetilsulfóxido[%];extratos e fases de partição[µg/mL].
Fonte: Próprio autor, 2022.

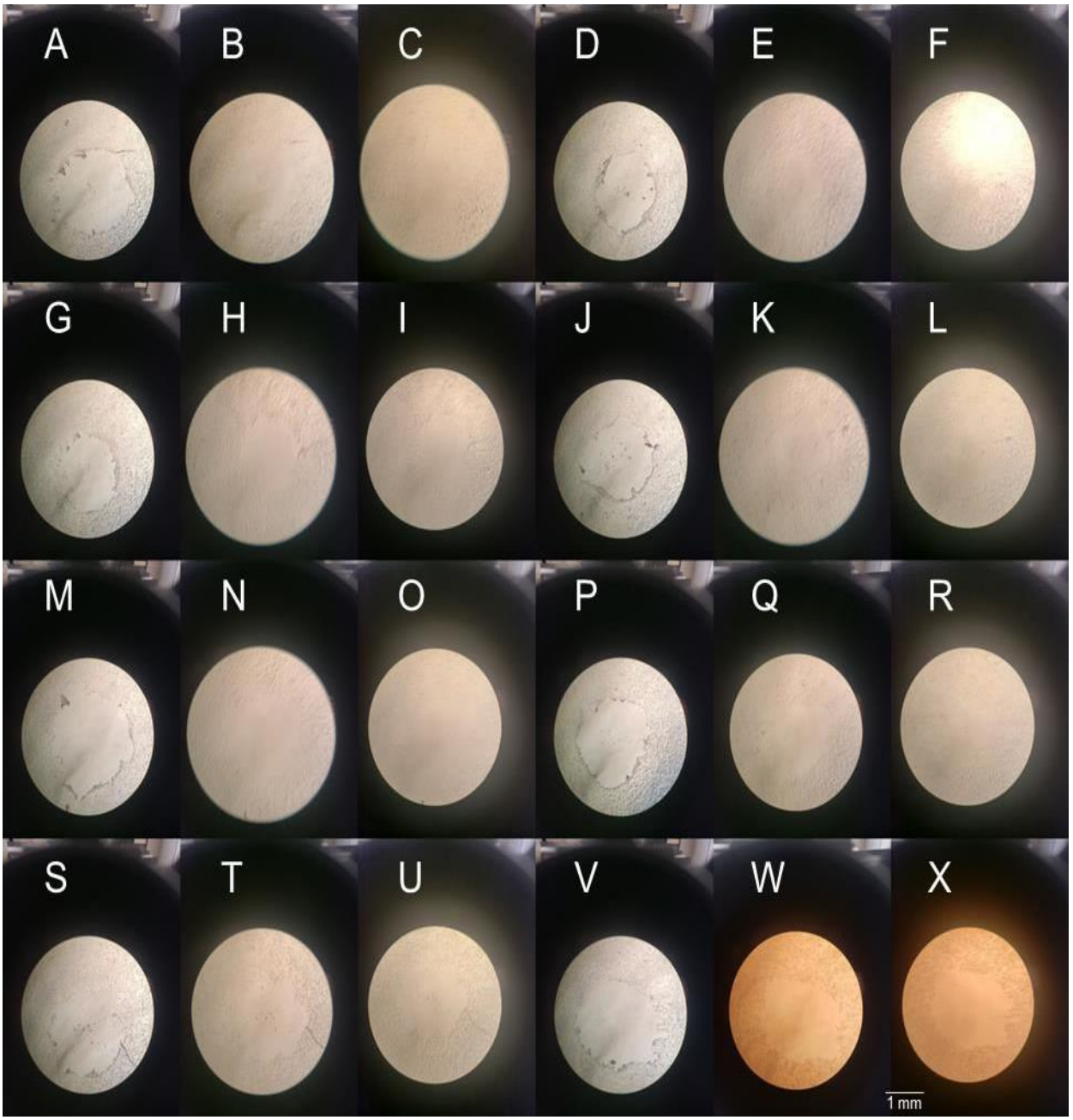
A figura 16 apresenta os dados estatisticos obtidos para a célula MCF-7. A partir dos experimentos de triagem realizados comos extratos vegetais e fases de partição de N1091, mais os controles doxorrubicina e curcumina,verificou-seque,para essacélula as análises estatísticas demonstraram que o tratamento foi responsável por 28,02% da variância total (F(25,52)=1,964; p=0,0202), o tempo foi responsável por 16,61% da variância total (F(1,52)=45, 61; p<0,0001) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por insignificantes 6,572% da variância total (F(25,52)=0,7149; p=0,8179). Não foram observadas diferenças estatísticas em 24 h ou em 48 h entre os tratamentos realizados com essa célula, nas condições experimentais (p>0,05).

Figura 16.Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de células MCF-7 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados N719 e N1091,fases de partição do extrato N1091, curcumina e doxorrubicina, e dimetilsulfóxido, solvente usado para diluição dos extratos e fases de partição.



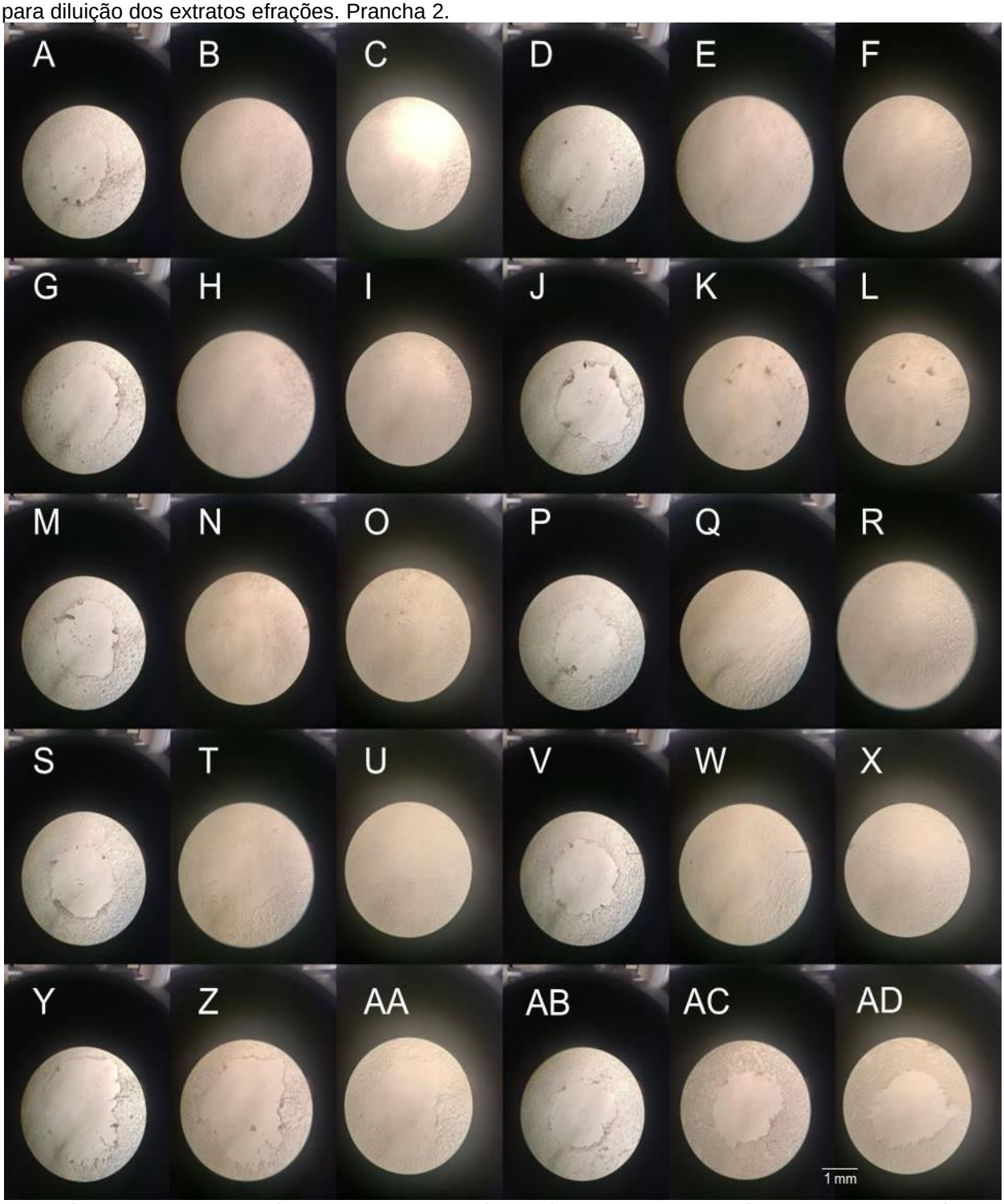
As figuras 17, 18 e 19 mostram as áreas resultantes dos tratamentos dos extratos e fases de partição e das substâncias de referência utilizadas nos experimentos.

Figura 17. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-7 apóstratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, fases de partição de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extrato se fases de partição. Prancha1.



Legenda: A, B e C = sem tratamento T0, 24h e 48 h; D, E e F = dimetilsulfóxido 10% T0, 24h e 48 h; G, H e I = dimetilsulfóxido 100% T0, 24h e 48 h; J, K e L = doxorrubicina 0,0025 mM T0, 24h e 48 h; M, N e O = doxorrubicina 0,025 mM T0, 24h e 48 h; P, Q e R = doxorrubicina 0,25 mM T0, 24h e 48 h; S, T e U = doxorrubicina 2,5 mM T0, 24h e 48 h; V, W e X = doxorrubicina 25 mM T0, 24he 48 h.

Figura 18. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-7 apóstratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos efrações. Prancha 2.



Legenda: A, B e C = curcumina 0,0025 mM T0, 24h e 48 h; D, E e F = curcumina 0,025 mM T0, 24h e 48 h; G, H e I = curcumina 0,25 mM T0, 24h e 48 h; J, K e L = curcumina 2,5 mM T0, 24h e 48 h; M, N e O = curcumina 25 mM T0, 24h e 48h; P, Q e R = N719 0,01 µg/mL T0, 24h e 48 h; S, T e U = N719 0,1 µg/mL T0, 24h e 48 h; V, W e X = N719 1 µg/mL T0, 24h e 48 h; Y, Z e AA = N719 10 µg/mL T0, 24h e 48 h; AB, AC e AD = N719 100 µg/mL.

Figura 19. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MCF-7 apóstratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos efrações. Prancha 3.

Legenda: A, B e C = N1091 0,01 µg/mL T0, 24h e 48 h; D, E e F = N1091 0,1 µg/mL T0, 24h e 48 h; G, H e I = N1091 1 µg/mL T0, 24h e 48 h; J, K e L = N1091 10 µg/mL T0, 24h e 48 h; M, N e O = N1091 100 µg/mL T0, 24h e 48 h; P, Q e R = N1091-14 100 µg/mL T0, 24h e 48 h; S, T e U = N1091-15 100 µg/mL T0, 24h e 48 h; V, W e X = N1091-16 100 µg/mL T0, 24h e 48 h.

A tabela 5 e figura 20 apresentam os dados obtidos da análise dos extratos que mais contribuíram para evitar a regeneração das feridas feitas nas culturas de células MDA-MB-231. As figuras 21, 22 e 23 mostram as áreas resultantes dos tratamentos dos extratos e frações de partição e das substâncias de referência utilizadas nos experimentos.

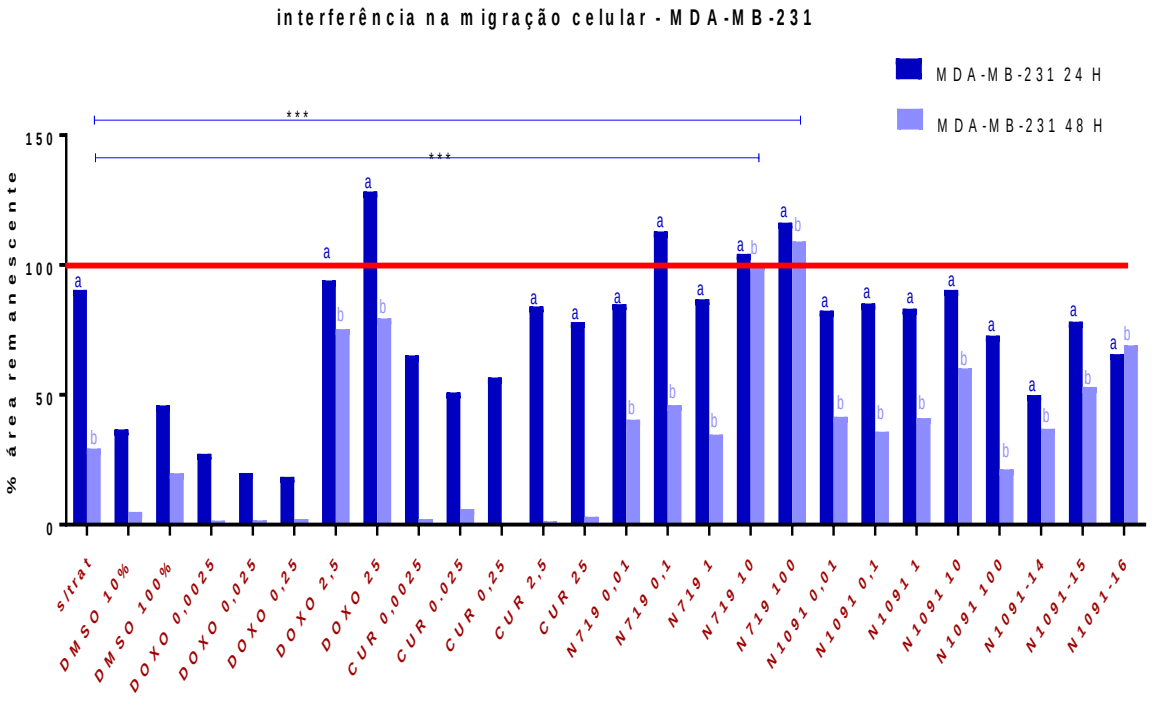
Tabela 5. Porcentagens de áreas relativas à regeneração das feridas em cultura de células tumorais MDA-MB-231, após tratamento com extratos vegetais citotóxicos e substâncias de referência.

Tratamento	24h	48h	Tratamento	24h	48h	Tratamento	24h	48h
s/trat	124.73	43.24	CUR0,0025	58.83	0.25	N719100	101.05	104.45
s/trat	80.07	27.32	CUR0,025	30.86	0.34	N719100	133.03	120.24
s/trat	66.41	17.37	CUR0,025	41.43	0.31	N10910,01	104.38	63.55
DMSO10%	43.04	6.64	CUR0,025	80.49	17.52	N10910,01	76.03	38.34
DMSO10%	43.77	1.7	CUR0,25	39.38	0.5	N10910,01	66.82	22.62
DMSO10%	23.11	6.63	CUR0,25	100.4	0.41	N10910,1	69.24	27.39
DMSO100%	12.3	0.57	CUR0,25	30.26	1.05	N10910,1	76.69	41.44
DMSO100%	43.61	10.09	CUR2,5	75.73	1.2	N10910,1	109.68	38.43
DMSO100%	81.9	48.95	CUR2,5	24.04	0.19	N10911	84.54	40.11
DOXO0,0025	40.11	0.46	CUR2,5	152.58	2.36	N10911	85.65	35.73
DOXO0,0025	24.07	1.72	CUR25	98.78	7.59	N10911	79.52	47.39
DOXO0,0025	17.75	2.6	CUR25	65.17	0.78	N109110	97.92	80.07
DOXO0,025	21.99	1.5	CUR25	70.34	0.99	N109110	100.76	53.35
DOXO0,025	11.39	1.87	N7190,01	75.58	34.05	N109110	72.79	46.98
DOXO0,025	26.53	1.85	N7190,01	106.34	45.28	N1091100	51.76	16.36
DOXO0,25	23.55	2.3	N7190,01	72.96	41.93	N1091100	78.56	31.48
DOXO0,25	16.8	1.86	N7190,1	64.31	22.84	N1091100	88	16.07
DOXO0,25	15.05	2.58	N7190,1	119.57	50.01	N1091-14	55.52	42.23
DOXO2,5	72.34	64.32	N7190,1	155.06	65.46	N1091-14	46.04	44.77
DOXO2,5	106.07	74.83	N7191	92.01	19.62	N1091-14	48.09	23.84
DOXO2,5	103.67	86.63	N7191	69.66	27.75	N1091-15	87.85	41.11
DOXO25	134.61	93.33	N7191	98.68	56.58	N1091-15	83.42	60.85
DOXO25	134.72	69.5	N71910	112.44	106.32	N1091-15	63.26	57.3
DOXO25	115.5	75.38	N71910	100.92	87.61	N1091-16	68.75	77.31
CUR0,0025	71.46	4.16	N71910	99.63	106.75	N1091-16	63.31	47.78
CUR0,0025	65.14	2.28	N719100	114.97	102.53	N1091-16	64.87	81.97

Legenda:s/trat=semtratamento;CUR=curcumina[µM];DOXO=doxorrubicina[mM];DMSO=dimetilsulfóxido[%];extratose fases de partição[µg/mL].
Fonte: Próprio autor, 2022.

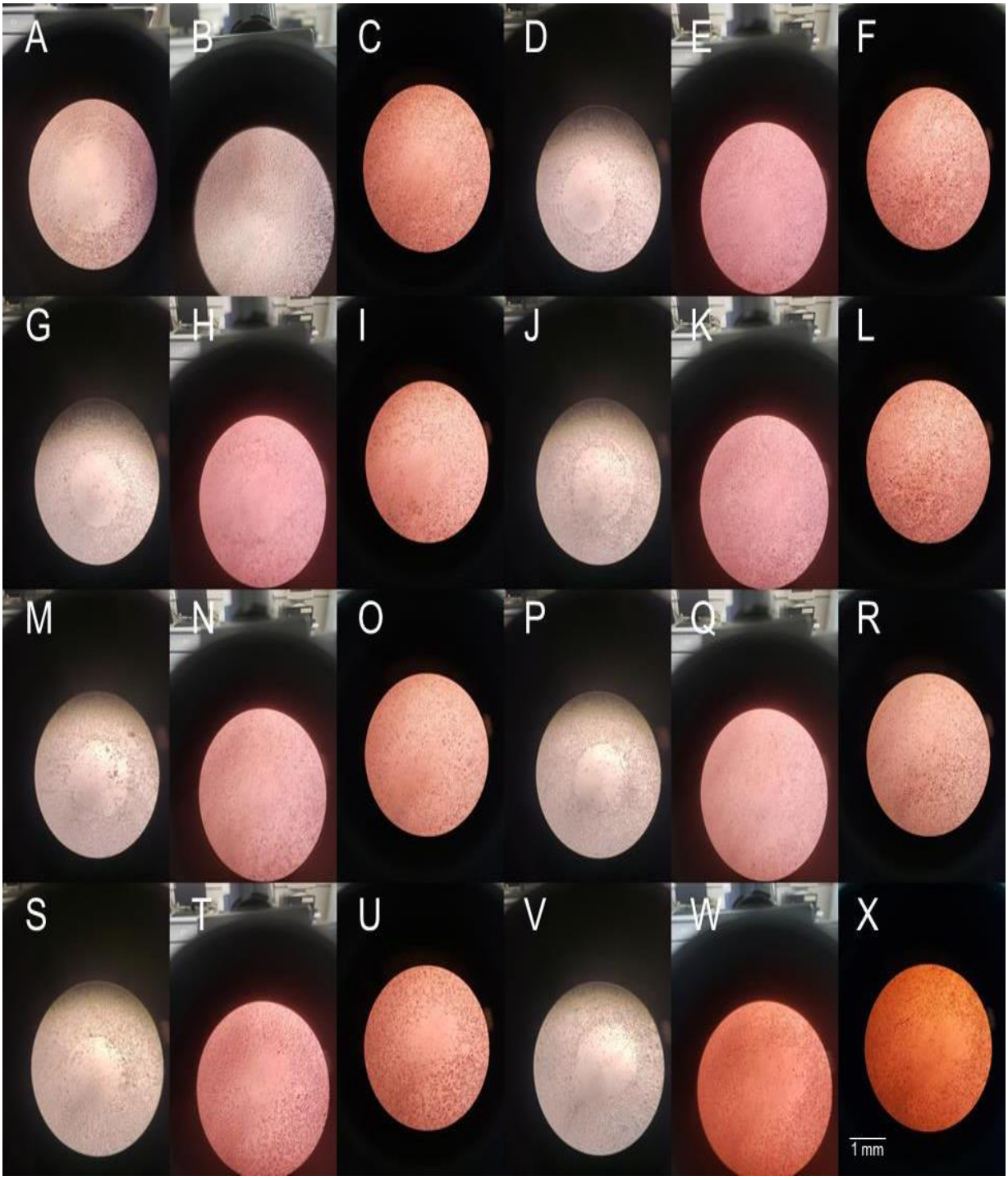
A figura 20, apresenta os dados estatisticos obtidos para a célula MCF-7. Apartirdos experimentosdetriagemrealizadoscomos extratosvegetaise fases de partição de N1091, mais os controles doxorrubicina e curcumina,verificou-seque,para essacélula as análises estatísticas demonstraram que o tratamento foi responsável por 51,72% da variância total ($F_{(25,52)}$=9,688; p<0,0001), o tempo foi responsável por 24,49% da variância total ($F_{(1,52)}$=282,9; p<0,0001) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por 8,191% da variância total ($F_{(25,52)}$=3,785; p<0,0001). Após 24 h do tratamentos, observou-se que os tratamentos não apresentaram diferenças significativas quando comparadas às obtidas para as células sem tratamento. A ausência de diferenças significativas entre os grupos quando comparados à doxorrubicina também ocorreram, o que para a presente análiseos resultados são considerados bons, visto que a atividade assemelha-se àquela da doxorrubicina. Comparando-se o extrato N1091 100 µg/mL, que tem atividade similar àquela da doxorrubicina 25 mM (p=0,0744) e suas fases de partição N1091-14, N1091-15 e N1091-16, observa-se que a fase N1091-15 (p=0,8866) é mais ativa do que N1091-16 (p=0,0175), que por sua vez é mais ativa que N1091-14 (p=0,0004), em relação a doxorrubicina 25 mM, em 24 h. Após 48 h, a ordem de atividade se altera como N1091-16 (p>0,9999) sendo mais ativa que N1091-15 (p=0,9916), que é mais ativa do que N1091-14 (p=0,4949), com relação à doxorrubicina 25 mM.

Figura 20. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de célulasMDA-MB 231 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados N719 e N1091,fases de partição do extrato N1091, curcumina e doxorrubicina, e dimetilsulfóxido, solvente usado para diluição dos extratos e fases de partição



As figuras 21, 22 e 23 mostram as áreas resultantes dos tratamentos dos extratos e fases de partição e das substâncias de referência utilizadas nos experimentos.

Figura 21. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MDA-MB-231 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, fases de partição de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e fases de partição.Prancha1.



Legenda: A, B e C = sem tratamento T0, 24h e 48 h; D, E e F = dimetilsulfóxido 10% T0, 24h e 48 h; G, H e I = dimetilsulfóxido 100% T0, 24h e 48 h; J, K e L = doxorrubicina 0,0025 mM T0, 24h e 48 h; M, N e O = doxorrubicina 0,025 mM T0, 24h e 48 h; P, Q e R = doxorrubicina 0,25 mM T0, 24h e 48 h; S, T e U = doxorrubicina 2,5 mM T0, 24h e 48 h; V, W e X = doxorrubicina 25 mM T0, 24he 48 h.

Figura 22. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MDA-MB- 231 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 2.

Legenda: A, B e C = curcumina 0,0025 mM T0, 24h e 48 h; D, E e F = curcumina 0,025 mM T0, 24h e 48 h; G, H e I = curcumina 0,25 mM T0, 24h e 48 h; J, K e L = curcumina 2,5 mM T0, 24h e 48 h; M, N e O = curcumina 25 mM T0, 24h e 48h; P, Q e R = N719 0,01 µg/mL T0, 24h e 48 h; S, T e U = N719 0,1 µg/mL T0, 24h e 48 h; V, W e X = N719 1 µg/mL T0, 24h e 48 h; Y, Z e AA = N719 10 µg/mL T0, 24h e 48 h; AB, AC e AD = N719 100 µg/mL.

Figura 23. Áreas remanescentes das feridas em cultura de células MDA-MB- 231 após tratamento com extratos vegetais citotóxicos selecionados, frações de extrato, substâncias de referência e solventes usados para diluição dos extratos e frações. Prancha 3.

Legenda: A, B e C = N1091 0,01 µg/mL T0, 24h e 48 h; D, E e F = N1091 0,1 µg/mL T0, 24h e 48 h; G, H e I = N1091 1 µg/mL T0, 24h e 48 h; J, K e L = N1091 10µg/mL T0, 24h e 48 h; M, N e O = N1091 100 µg/mL T0, 24h e 48 h; P, Q e R = N1091-14 100 µg/mL T0, 24h e 48 h; S, T e U = N1091-15 100 µg/mL T0, 24h e 48 h; V, W e X = N1091-16 100 µg/mL T0, 24h e 48 h.

4.3 Avaliação da influência dos tratamentos sobre a regeneração celular em cultura estimulada com prolactina

4.3.1 Extrato N1091, suas fases de partição e substâncias de referência sobre a regeneração celular em cultura estimulada com prolactina.

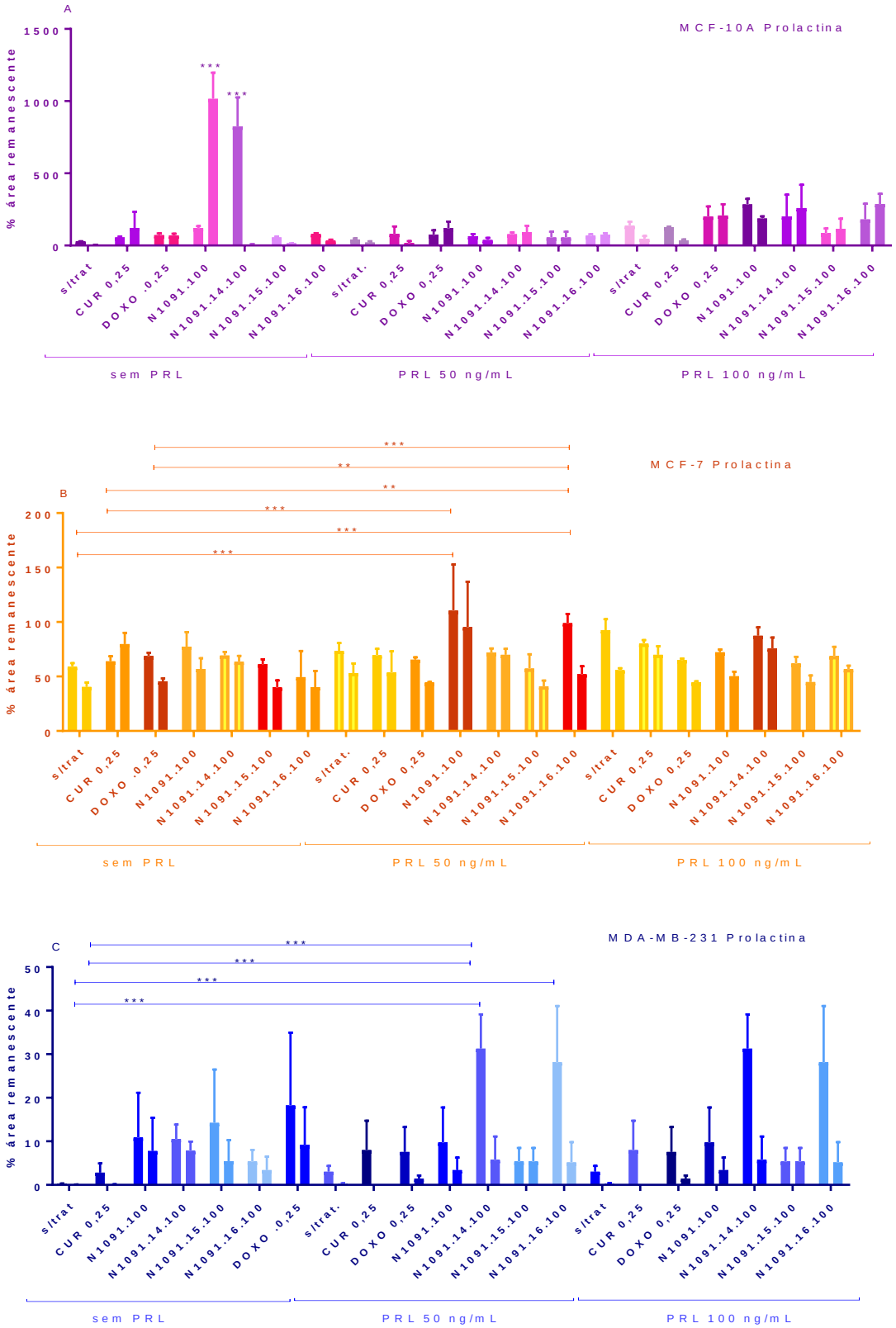
O extrato vegetal N1091, suas fases de partição e substâncias de referência foram testados nas concentrações mais efetivas de cada um, nos tempos de 24 h e de 48 h, com e sem estímulo de prolactina testada em duas concentrações distintas, de 50 ng/mL e de 100 ng/ml A figura 21 mostra as porcentagens de áreas remanescentes após os tratamentos, para as células MCF-10A (figura 24A), MCF-7 (figura 24B) e MDA-MB-231 (figura 24C).As análises estatísticas feitas para as células MCF-10A desafiadas ou não com PRL demonstraram que o tratamento foi responsável por 40,37% da variância total ($F_{(20,40)}$=6,138; p<0,0001), o tempo foi responsável por apenas 0,01036% da variância total ($F_{(1,2)}$=0,1527; p=0,7337) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por significantes 40,32% da variância total ($F_{(20,40)}$=15,86; p<0,0001).Observou-se que, entre as células que não receberam tratamento com PRL, N1091-14 100 µg/mL em 24 hinibiu de modo significativo a regeneração celular (p<0,0001), assim comoN1091 100 µg/mL em 48 h (p<0,0001; p<0,0001), em relação às células sem tratamento, doxorrubicina 0,25 mM e curcumina 0,25 µM. Observou-se que esses dois tratamentos apresentaram-se mais eficaz do que todos os outros tratamentos feitos nas células desafiadas com PRL em ambas as concentrações (p<0,0001) (figura 24A).

Para as células MCF-7 (figura 24B), observou-se que o tratamento foi responsável por 29,75% da variância total ($F_{(20,40)}$=1,37; p=0,1947), o tempo foi responsável por 12,06% da variância total ($F_{(1,2)}$=138; p=0,0072) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por significantes 6,215% da variância total ($F_{(20,40)}$=3,144; p=0,0010).Para as células MCF-7, os tratamentos smais significativos foram N1091 100 µg/mL e N1091-14 100 µg/mL, que se mostraram significativos em inibir aregeneração celular em comparação com a maioria dos tratamentos e desafios propostos, cujas principais comparações foram feitas em relação às células sem tratamento e sem desafio (p<0,0001 e p=0,0003, respectivamente), em relação à

doxorrubicina (p=0,0003 e 0,0354, respectivamente) e em relação à cucurbitacina (p<0,0001 e p=0,0052, respectivamente).

Para as células MDA-MB-231 (figura 24C), observou-se que o tratamento foi responsável por 22,5% da variância total ($F_{(20,40)}$=1,166; p=0,3299), o tempo foi responsável por 11,61% da variância total ($F_{(1,2)}$=15,31; p=0,0595) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por significantes 11,9% da variância total ($F_{(20,40)}$=2,801; p=0,0027). Embora os fatores nçao tenham apresentado significância, a interação entre eles apresentou, e por isso, há uma possibilidade de se indicar as comparações entre os grupos. Observou-se que as frações N1091-14 100 µg/mL e N1091-16 100 µg/mL apresentaram os tratamentos mais eficazes para a inibição da regeneração celular, frente às células sem tratamento (p=0,0002 para ambos os tratamentos) e à curcumina 0,25 µM (p=0,0010 e p-0,0060, respectivamente).

Figura 24. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de célulasMCF-10A após tratamento como extrato vegeta N1091,suas fases de partição, curcumina e doxorrubicina, após estímulo de crescimento com prolactina nas concentrações de 50 ng/mL e 100 ng/mL.



4.3.2 Extrato N719 e substâncias de referência sobre a regeneração celular em cultura estimulada com prolactina.

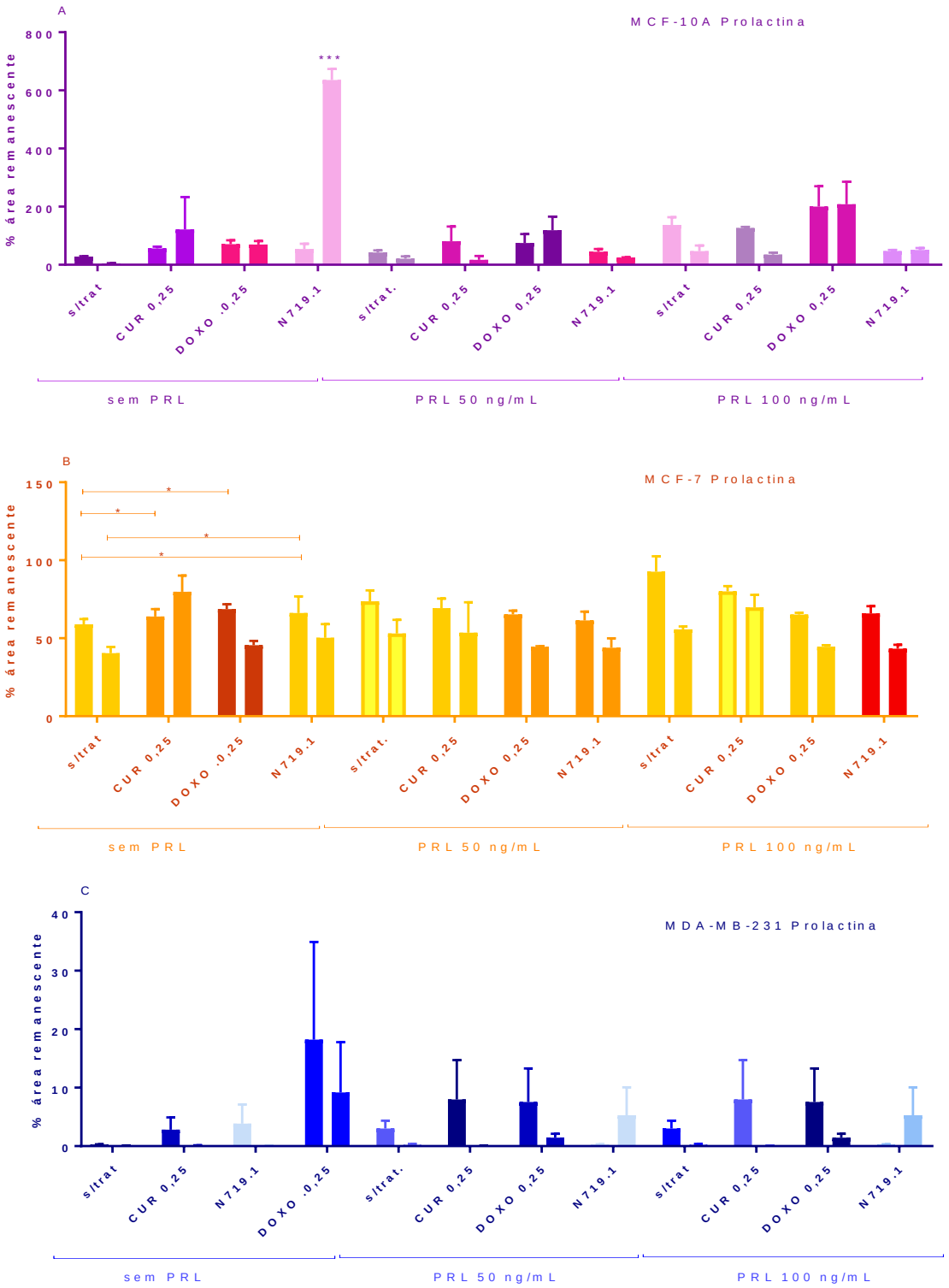
O extratos vegetal N719 e substâncias de referência foram testados nas concentrações mais efetivas de cada um, nos tempos de 24h e de 48h, com e sem estímulo de prolactina testada em duas concentrações distintas, de 50 ng/mL e de 100 ng/ml A figura 25 mostra as porcentagens de áreas remanescentes após os tratamentos, para as células MCF-10A (figura 25A), MCF-7 (figura 25B) e MDA-MB-231 (figura 21.C).

A figura 25 mostra as porcentagens de áreas remanescentes após os tratamentos, para as células MCF-10A (figura 25A), MCF-7 (figura 25B) e MDA-MB-231 (figura 25C). As análises estatísticas feitas para as células MCF-10ª desafiadas ou não com PRL (figura 25A) demonstraram que o tratamento foi responsável por 42,91% da variância total ($F_{(11,22)}$=7,7478; p<0,0001), o tempo foi responsável por 1,456% da variância total ($F_{(1,2)}$=30,12; p=0,0316) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por significantes 40,62% da variância total ($F_{(11,22)}$=26,56; p<0,0001).Observou-se que o tratamento com N719 1 µg/mL inibiu significativamente a regeneração celular em relação a todos os outros tratamentos e desafios (p<0,0001).

Para as células MCF-7 (figura 25B), o tratamento foi responsável por 24,85% da variância total ($F_{(11,22)}$=1,767; p=0,1233), o tempo foi responsável por 26,86% da variância total ($F_{(1,2)}$=117,5; p=0,0084) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por 12,35% da variância total ($F_{(11,22)}$=3,895; p=0,0032).Embora a capacidade de inibição da regeneração celular de N719 1 µg/mL seja maior do que a observada para as células sem tratamento (p=0,0358 em 24 h e p=0,0467 em 48 h), N719 não apresentou diferenças na capacidade de inibir a regeneração celular em relação à curcumina (p=0,8130) e à doxorrubicina (p=0,1600), que também inibiram a regeneração celular em relação às células sem tratamento (p=0,0163 e p=0,0197, respectivamente).

Para as células MDA-MB-231 (figura 25C), o tratamento foi responsável por 16,56% da variância total ($F_{(11,22)}$=0,6572; p=0,7619), o tempo foi responsável por 4,008% da variância total ($F_{(1,2)}$=7,888; p=0,1068) e a interação entre esses dois fatores foi responsável por 7,51% da variância total ($F_{(11,22)}$=0,8504; p=0,5964). Nenhum desses fatores apresentou significância na análise. Não houve diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos.

Figura 25. Porcentagem de área remanescente da ferida em cultura de célulasMCF-10A após tratamento com o extrato vegetal N719, doxorrubicina e curcumina, após estímulo de crescimento com prolactina nas concentrações de 50 ng/mL e 100 ng/mL.



4.4 Avaliação da influência de extratos, fases de partição esubstâncias de referência sobre as proteínas FAK e Moesina na regeneração celular em cultura estimulada com prolactina

4.4.1 Extrato N1091 e suasfases de partição e substâncias de referência sobreas proteínas FAK e Moesina na regeneração celular em cultura estimulada com prolactina.

A presença de FAK e Moesina nos sobrenadantes das culturas de células tratadas com os extratos vegetais, fases de partição e substâncias de referência foi avaliada, segundo protocolo desenvolvido com o estímulo da prolactina, nos tempos de 24 h e de 48 h.As figuras 26 e 27 mostram um indicativo das quantidades dessas duas proteínas relacionadas ao citoesqueleto das células tratadas com as substâncias controles e com os tratamentos com o extrato vegetal N1091 e suasfases de partição, comparadas a doxorrubicina e curcumina.

Figura 26. Indicação da presença de FAK nos sobrenadantes dos meios de cultura coletados das três linhagens celulares MCF-10A (A), MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C), após tratamento com o extrato N1091, suas fases de partição, doxorrubicina e curcumina.

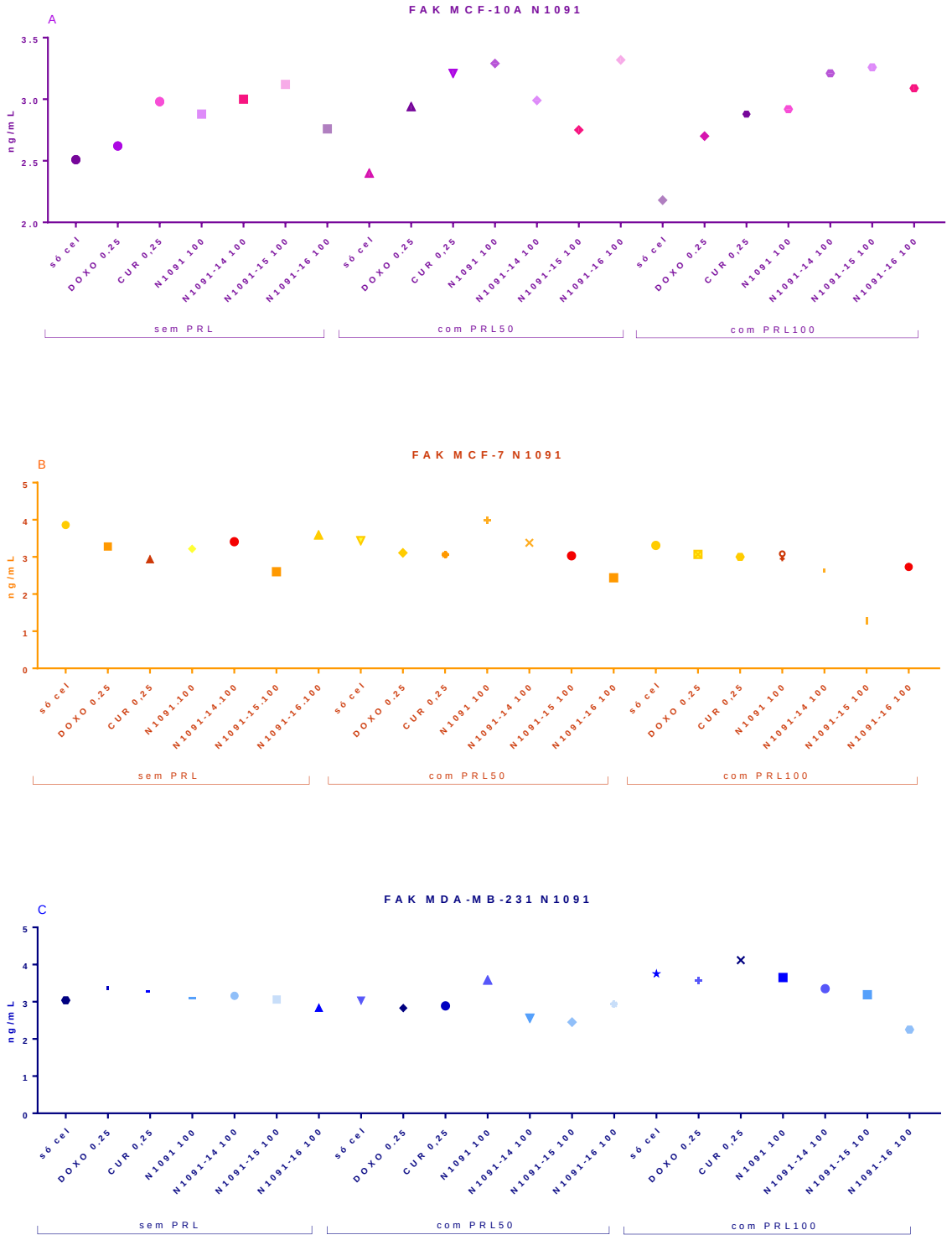
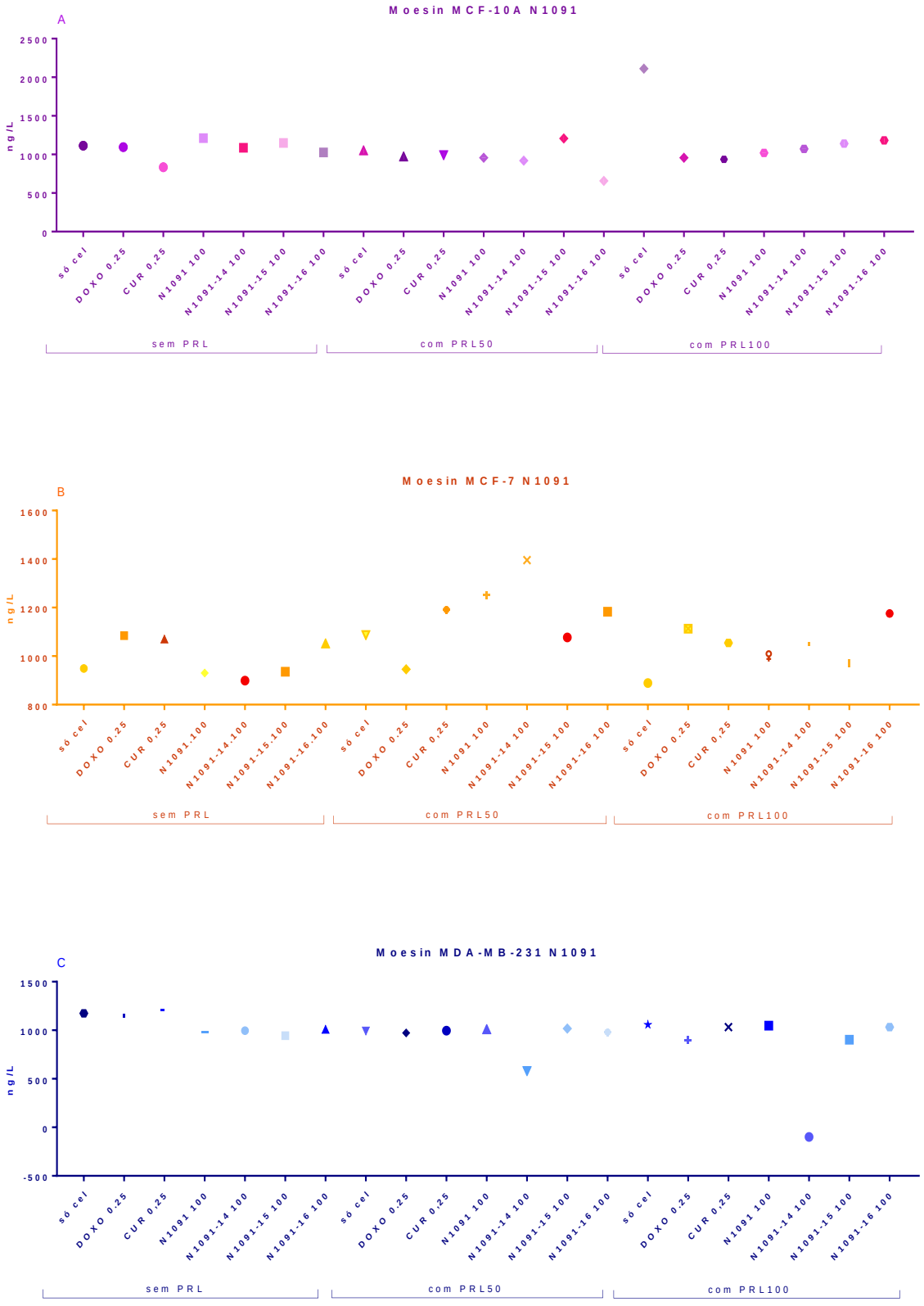


Figura 27. Indicação da presença de Moesina nos sobrenadantes dos meios de cultura coletados das três linhagens celulares MCF-10A (A), MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C), após tratamento com o extrato N1091, suas fases de partição, doxorrubicina e curcumina.



4.4.2 Extrato N719 e substâncias de referência sobreas proteínas FAK e Moesina na regeneração celular em cultura estimulada com prolactina

A presença de FAK e Moesina nos sobrenadantes das culturas de células tratadas com os extratos vegetais, fases de partição e substâncias de referência foi avaliada, segundo protocolo desenvolvido com o estímulo da prolactina, nos tempos de 24 h e de 48 h. As figuras 28 e 29 mostram um indicativo das quantidades dessas duas proteínas relacionadas ao citoesqueleto das células tratadas com as substâncias controles e com os tratamentos com o extrato vegetal N719, comparadas a doxorrubicina e curcumina.

Figura 28. Indicação da presença de FAK nos sobrenadantes dos meios de cultura coletados das três linhagens celulares MCF-10A (A), MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C), após tratamento com o extrato N719, doxorrubicina e curcumina.

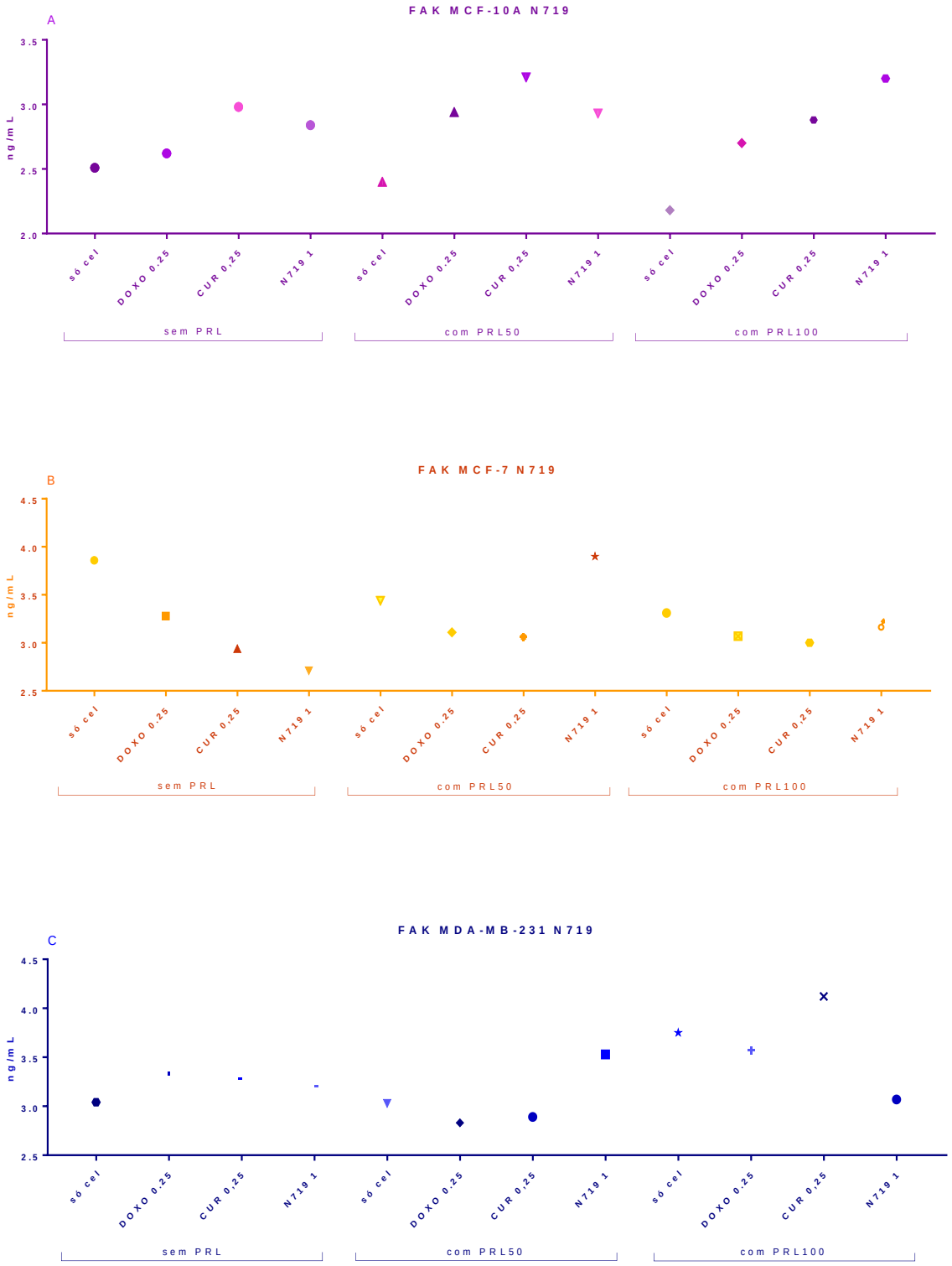
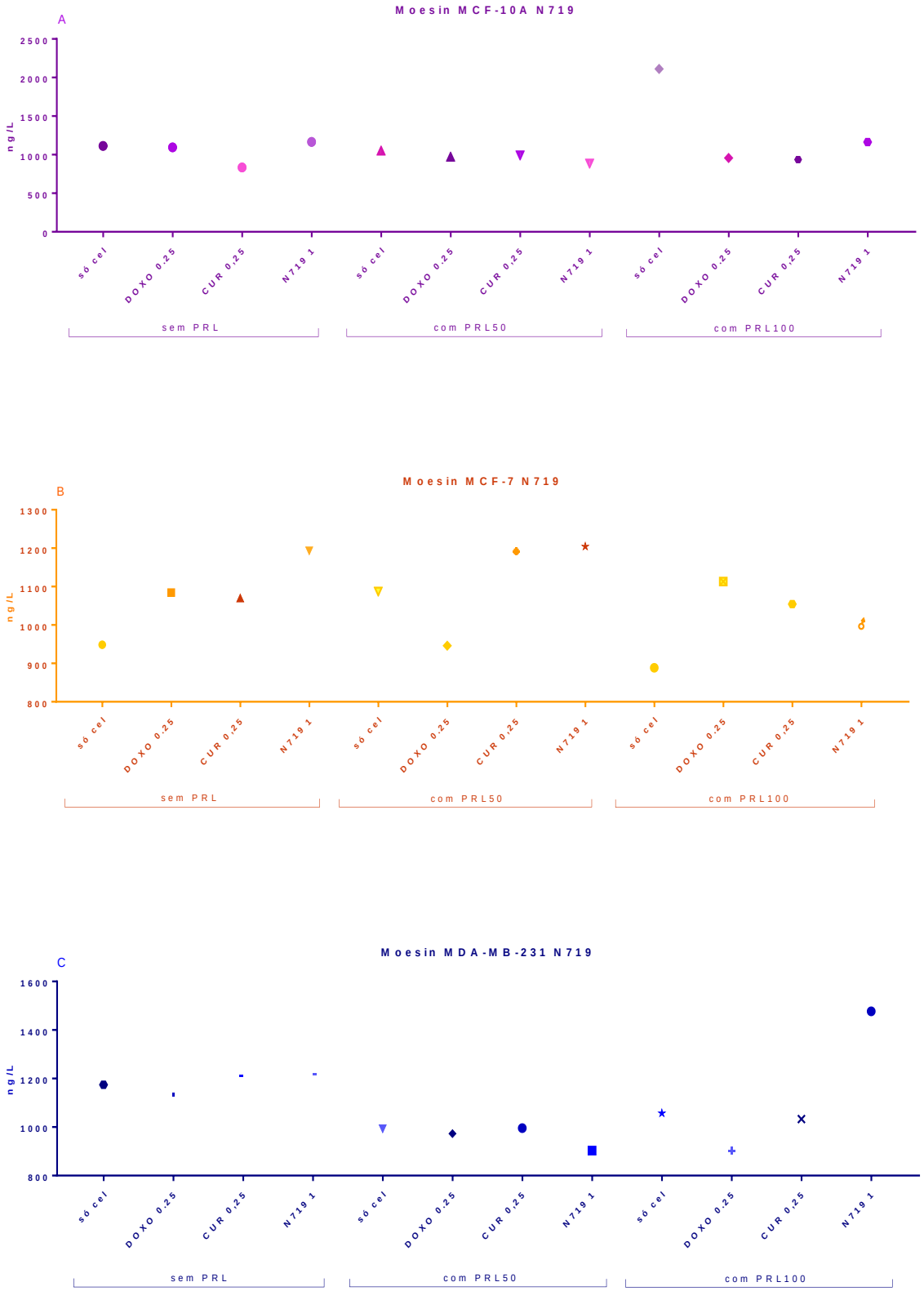


Figura 29. Indicação da presença de Moesina nos sobrenadantes dos meios de cultura coletados das três linhagens celulares MCF-10A (A), MCF-7 (B) e MDA-MB-231 (C), após tratamento com o extrato N719, doxorrubicina e curcumina.



5 DISCUSSÃO

O processo de regeneração celular é um dos vários métodos empregados para o estudo relativo à descoberta de novos fármacos antitumorais, juntamente com outras técnicas relacionadas ao entendimento dos processos de viabilidade celular e citotoxicidade, apoptose, senescência celular, e angiogênese (EDIRIWEERA; TENNEKOON; SAMARAKOON, 2019). O teste deregeneração celular é conveniente devido aos baixos custos envolvidos em suaexecução, à qualidade de resposta e à abrangência de análises possíveis de serem executadas, tanto para ensaios realizados com células tumorais, como com células normais (YUE;LEUNG;MAK;WONG,2010).

No presente trabalho com 15 extratos vegetais que apresentaram citotoxicidadee atividade indutora de apoptose contra células de tumor de mama MCF-7 foram testados quanto à capacidade de inibir a regeneração da ferida em cultura de células MCF-10A, MCF-7 e MDA-MB-231, no modelo de regeneração celular,ou *wound healing*. Entre os extratos que tiveram a capacidade de inibir a regeneração da área da ferida na cultura de células MCF-10A, logo os que impediram a regeneração da cultura foram N719 e N1068. Para as células MCF-7, os extratos vegetais N238, N719 e N1091 apresentaram os resultados mais significativos. Para as células MDA-MB-231, apenas o extrato N719 foi ativo.

Entre os quatro extratos que apresentaram atividade de inibição do processo de regeneração celular nas três células, dois foram obtidos de espécies pertencentes às Clusiaceae, e um foi obtido de Annonaceae e outro foi obtido de uma espécie de Flacourtiaceae (Salicaceae).

Espécies de Clusiacea e têm sido muito estudadas quanto ao seu potencial farmacológico, como bacuri (*Garcinia brasiliensis* Mart.) ou lacre-branco (*Vismia guianensis* (Aubl.) Choisy). No presente trabalho, dois extratos vegetais obtidos de duas espécies desta família foram identificados como ativos:

Clusia spathulaefolia Engl. e *Vismia schultesii* N.Robson. já foram estudadas no modelo de *wound healing*. Tangsuksan et al. (2021) demonstraram que α-mangostin incorporado em um adesivo de mucosa oral solúvel mostrou atividade citotóxica contra as células de carcinoma de origem oral e de propriedades estimuladoras da regeneração celular, em modelo de *wound healing*, com baixa toxicidade. Wang, Sanderson e Zhang (2012) demonstraram que este mesmo composto inibiu a regeneração da ferida feita na cultura de células tumorais de pele humanas A-431.

Dos extratos ativos, um foi obtido de uma espéciede Annonaceae, *Guatteria riparia* R.E.Fr., sendo um extrato obtido das folhas e o outro, do caule.Não existem estudos relacionados à atividade farmacológica realizados com essa espécie vegetal .Outras espécies de *Guatteria* já foram estudadas, porém, não no modelo de *wound healing*. A graviola, *Annona muricata* L., fruto nativo da América Central, tem sido bastante estudada quanto a seu potencial uso como anti tumoral . Najmuddin et al. (2016). Estudaram extratos vegetais obtidos desta espécie, coletada em diferentes áreas de cultivo em diversos modelos experimentaispara avaliação das propriedades citotóxicas, análise do ciclo celular, apoptose, regeneração e regeneração celular e alguns experimentos antitumorais *in vivo* desses extratos. Em uma revisão, Mutakin et al. (2022) reuniram informações a respeitodos compostos até então identificados na graviola: anomuricinase anonacinas, coreximina ereticulina, quercetina, sendo acetogeninas, alcaloides e flavonoides, respectivamente.

Entre os extratos ativos, um foi obtido de espécie de Flacourtiaceae, *Laetia suaveolens* (Poeppig) Benth. (atualmente classificada como Salicaceae, mas no presente trabalho considerada ainda Flacourtiaceae). Desta família,uma das espécies bem conhecidas pela população é a guaçatonga (*Casearia sylvestris* Sw.), usada em afecções orais inclusive as de fundo viral. *Laetia suaveolens*, conhecida popularmente como casinga-cheirosa , já foi estudada quanto ao potencial tóxico em animais de laboratório e demonstrou determinado grau de toxicidade nos modelos utilizados. Espécies de *Xylosma* já foram estudadas, porém, não quanto ao efeito sobre a regeneração de culturas de células (ESTORK et al, 2016).

Dos quatro extratos ativos, somente N719 e N1091 foram selecionados para serem estudados com mais profundidade, uma vez que, entre todos os extratos, o N719 foi oque apresentou o mais alto grau de inibição de regeneração celular nas

culturas utilizadas, enquanto que o N1091 é um extrato que vem sendo estudado não somente quanto ao potencial de inibir a regeneração celular ,mas também o de induzir a apoptose, o que é assunto de outros projetos.

Sendo assim, dos quatro extratos selecionados a partir da triagem, N1091e três fases de partição obtidas desse extrato, N719, doxorrubicina, curcumina e dimetilsulfóxido foram testados emdiferentes concentrações, nos empos de 24 h e de 48 h, para se avaliar a menor concentração a causar ainibição da regeneração das células em cultura sem que haja citotoxicidade. Depois desse estudo, foram selecionadas as concentrações de doxorrubicina (0,25 mM), curcumina (0,25 µM), N791 (1 µg/mL), N1091 (100 µg/mL), N1091-14 (100 µg/mL), N1091-15 (100 µg/mL) e N1091-16 (100µg/mL).

Uma vez determinados os melhores tratamentos, foi realizada análise da capacidade de inibição da regeneração celular dos tratamentos em cultura de células desafiada com prolactina adicionada aos poços de cultura decélulas nas concentrações de 50 ng/mL e 100 ng/mL, no modelo de *wound healing*. Trabalhos anteriores (SILVA et al, 2015) avaliaram que a prolactina teve a capacidade de induzir a migração celular por alterar o remodelamento da estrutura do citoesqueleto de actina através de um processo de despolimerização e realocação de actina, no qual há o envolvimento de proteína quinases como a FAK, necessárias para a formação de complexos actina-vinculina que mediam adesão com a matriz extracelular. Esses eventos são por sua vez regulados por uma tirosina proteína quinase chamada c-Src, que é suscetível a estímulos hormonais, como o causado pela prolactina. Observa-se que o modelo experimental denominado de “migração celular” é avaliado pela técnica de *wound healing*, porém, em tempo muito inferior ao que foi usado no presente trabalho, que teve como foco a avaliação da regeneração celular, realizada em tempo acima de 24 h de cultura celular.

No presente trabalho, foi verificado o processo de regeneração celular, que tem como base a nececssidade das células estarem em fase de divisão celular para recobrir a ferida feita na cultura celular,desafiada com prolactina. A prolactina não ofereceu estímulo de crescimento estatisticamente diferente para as células tumorais, em relação às células normais de mama.Em ensaios futuros a avaliação sobre a migração celular, realizada em tempos mais precoces em relação à aplicação do tratamento deverá ser feita.

No ensaio com desafio com PRL, verificou-se que o extrato N1091 e suas fases de partição N1091-14, N1091-15 e N1019-16 apresentaram atividades específicas para cada célula. Para MCF-10A, os tratamentos mais eficazes foram de N1091 e de N1091-14, verificados para as células não desafiadas com PRL. Para as células desafiadas, N1091 apresentou os resultados mais satisfatórios. Para ambas as células tumorais, MCF-7 e MDA-MB-231, os melhores tratamentos observados foram os feitos com N1091 e com N1091-16, sobre as células estimuladas com PRL 50 ng/mL. Observa-se que a fase de partição a N1091-14 foi obtida de partição com diclorometano, um solvente de baixa polaridade, enquanto que a fase de partição N1091-16 e a fase aquosa, mais polar.

O extrato N1091 foi obtido da espécie *Guatteria riparia* (Annonaceae). Espécies de *Guatteria* foram estudadas e apresentaram alcaloides aporfínicos (COSTA et al., 2016) e de utros grupos, como 9-metoxi-O-metilmoscatolina, 9-metoxiisomoscatolina, isocerasonina (3), 8-oxopseudopalmatina, O-metilmoscatolina, lisicamina, liriodenina, 10-metoxiliriodenina, nornuciferina, anonaina, xilopina, coreximina e isocoreximina (COSTA et al., 2010) e óleos essenciais com atividade antitumoral (GALVÃO et al., 2022), ou tripanicida (BAY et al., 2019). Quanto ao Extrato N1091, a fased e partição de baixa polaridade pode apresentar os compostos organicos voláteis que fazem parte de óleos essenciais, e alcaloides odem ser encontrados dispersos em fases de partição de polaridades diferentes.

O extrato N719 mostrou capacidade de inibir a regeneração de células normais de mama, no experimento proposto nesse trabalho, assim como apresentou capacidade inibidora da regeneração celular semelhante à observada para doxorrubucuna e curcumina, contra a célula de tumor não metastático MCF-7. Para a célula de tumor metastático MDA-MB-231, as diferenças de atividade não foram significativas. Esse extrato foi obtido de *Laetia suaveolens* (Flacourtiaceae). Estork et al (2014) isolaram α-tocoferol, sitosterol, ácido 3-O-cafeoilquínico, ácido 4-O-cafeoilquínico, ácido 5-O-feruloilquínico, hyperosídeo ed isoquercitrina, e extratos obtidos dos órgãos aéreos dessas espécie apresentaram potencial citotóxico contra células squamosas orais (OZI et al., 2011).

Finalmente, os ttratamentos foram novamente realizados nas três células de mama, e o sobrenadante das culturas foi testado quanto à presença de FAK e de Moesina. A avaliação foi feita qualitativamente. Dos resultados observados, FAK ocorreu em maior quantidade nos grupos que receberam tratamento com N1091 e

suas fases de partição e desafio de PRL, na célula normal de mama, ao passo que apresentaram-se em menores quantidades nas células de tumor não metastático e em quantidades semelhantes nas células de tumor metastático, em relação às células que não foram tratadas.

A expressão de Moesina foi maior nas células com e sem desafio de PRL de mama tratadas com a fase de partição N1091-16, que apresentaram expressão dessa proteína quinase similar às células tratadas com doxorrubicina e curcumina. Para as células normais de mama e metastáticas, a variação de Moesina entre os tratamentos não foi expressiva.

Quanto à presença de FAK no experimento realizado, observou-se uma presença maior desta proteína nas células normais de mama tratadas com N719, enquanto que as células MCF-7 tratadas com N719 apresentaram menor expressão de FAK, que nas células metastáticas MDA-MB-231 apresentram-se em quantidade mais elevada ou semelhante à doxorrubicina e curcumina, exceto para as células desafiadas com PRL 100 ng/mL.

Quanto à expressão de Moesina pelas células tratadas com N719 em relação aos controles, observou-se que para as células normais de mama não houve diferença, enquanto que para as células MCF-7 o tratamento com N719 causou aumento na expressão da proteína nas células sem desafio e com desafio de PRL na concentração de 50 ng/mL, ao passo que na concentração de 100 ng/mL de PRL não houve aumento da expressão. Para as células de tumor metastático, observou-se o inverso, ou seja, a expressão foi maior para as células desafiadas com PRL 100 ng/mL em comparação com os tratamentos feitos nas células normais sem desafio e nas células com desafio de PRL 50 ng/mL.

Embora a expressão de FAK e de Moesina não tenham um significado direto para a regeneração celular, visto que estão ligadas aos processos de remodelação do citoesqueleto de actina, envolvido na migração celular, as alterações observadas na expressão dessas proteínas são indicativos de que os tratamentos estão influenciando, de algum modo, processos celulares ligadosà c-Src. No trabalho de Silva et al. (2015), foi demonstrado o aumento da expressão dessa proteína e de fosforilação, que são indicativos de aumento da movimentação horizontal das células. Outros trabalhos demontraram a relação entre c-Src e a pro-caspase-8 na adesão celular e em sua motilidade e como a c-Src fosforilada controla essa relação (FRISCH, 2008). A caspase-8 é uma proteína indutora de apoptose muito estudada nos

processos tumorais. Uma vez que os extratos vegetaisestudados foram primeiramente selecionados por sua capacidade indutora de apoptose, é de se esperar que alterações na expressão das proteína quinases envolvidas na migração celular sejam observadas, embora estudos mais aprofundados devam ser feitos, em momentos futuros

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Dos 15 extratos vegetais testados, apenas quatro foram selecionados como tendo apresentado atividade de inibição da regeneração celular de culturas de células de mama. Destes q uatro, apenas dois foram estudados com maior profundidade;
- Os dois extratos selecionados, N719, N1091, N1091-14 e N1091-16, apresentaram capacidade de inibir a regeneração das células de mama normais e das células tumorais, inclusive após desafio das células com prolactina em diferrentes concentrações;
- Os tratamentos alteraram a expressão de FAK e de Moesina nas culturas de células.

Os extratos N719 e N1091, assim como as fases de partição N1091-14 e N1091-16 apresentam-se como tratamentos potenciais contra tumores de mama, uma vez que inibem a regeneração dessas células em meio de cultura. Além disso, estão possivelmente envolvidos na indução da migração celular e de apoptose por mecanismos de ação ligados à FAK, Moesina e possivelmente a outras proteínas como c-Src, não estudadas no presente trabalho, mas que abrem possibilidades de relacionar os mecanismos aqui sugeridos com mecanismos já observados de indução à apoptose e de citotoxicidade já observados para esses extratos vegetais, em estudos anteriores realizados pelo Grupo.

7 . REFERÊNCIAS

ACOSTA, J.J.; MUNOZ, R.M.; GONZÁLES, L.; SUBTIL, R. A.; DOMINGUEZ C. M. A.; GARCIA M. J. M.; CALCABRINE, A.; LAZARO T. I.; MARTÍN, P. J. Mediates prolactin-dependent proliferation of T47D and MCF7 cells via the activation of focal adhesion kinase/ Erk1/2 and phosphatidylinositol 3-kinase pathways: **Mol.Endocrinol.,**v.11, p.72268-821, 2003.

AGUIAR, M.S.C. **Apoptose em célula de adenocarcinoma de mama humano como metodologia de triagem de extratos citotóxicos de plantas amazônicas**. Dissertação. Universidade Paulista – UNIP, 2017.

AQUINO, R; TOMMASI N.D; TAPIA M; LAURO M.R; RASTRELLI L. New 3-methyoxyflavones, an iridoid lactone and a flavonol from *Duroia hirsuta*. **J. Nat. Prod.,** v.4, n.62, p.560-2, Apr.1999.doi: 10.1021/np9803631. PMID: 10217708.

ARSHARD, F. et al. Blood – Brain Barrier integrity and breast cancer metastasis to the brain. **Pathology. Res. Int.**, v. 2011, article ID 920509, 12 p., 2011.

BERRIER, A.L.; YAMADA, K.M. Cell-matrix adhesion. **J. Cell. Physiol.**, v.213, n.3, p. 565-573, 2007.

BIRK, D.; COHEN, R.; GEIGER, B.; GOODENOUGH, D. GUMBINER, B.; HYNES, R.; REICHARD, L.; ROUSLAHTI, E.; TRELSTAD, R.; WALSH, F.; YURCHENCO, P. Cell junctions, cell adhesion, and the Extracellular Matrix. In.: Molecular Biology of the Cell. Nova York: **Garland Pub**. ed.3, p.949-1009, 1994.

BISHOP, M.; DOWNWARD, J.; LANE, D.; VARMUS, H. Cancer. In.: Molecular Biology of the Cell. Nova York: **Garland Pub**. ed.3, p.1255-1294, 1994.

BRANDÃO, D.F.; STRASSER W. K.; GOSS, P. E. Prolactin and breast cancer: the need to avoid undertreatment of serious psychiatric illnesses in breast cancer patients. a review. **Cancer**, v.2, n.122, p.184-8, 2016,

BRISKEN, C.; HESS, K.; JEITZINER, R. Prgesterone and Overlooked Endocrine Pathways in Breast Cancer Pathogenesis**. Endocrinology,** v.10, n.156, p. 3442-50, Oct. 2015.doi: 10.1210/en.2015-1392. Epub 2015 Aug 4. PMID: 26241069; PMCID: PMC4588833.

CHIA, C.Y.; MEDEIROS, A.D.; CORRAES, A.M.S.; MANSO, J.E.F.; SILVA, C.S.C.D.; TAKIYA, C.M.; VANZ, R.L. Healing effect of andiroba-based emulsion in cutaneous wound healing via modulation of inflammation and transforming growth factor beta 31. **Acta Cir. Bras.,**. v.33, n.11, p.1000-1015, 2018.doi: 10.1590/s0102-865020180110000007. PMID: 30517327

CORREIA, M. S. F. **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 - Universidade Paulista – UNIP, São Paulo, 2021.

De CASTILHO, A.L.; DA SILVA, J.P.; SARACENI, C.H.; DÍAZ, I.E.; PACIENCIA, M.L.; VARELLA, A.D.; SUFFREDINI, I.B**.** In vitro activity of Amazon plant extracts against *Enterococcus faecalis*. **Braz. J. Microbiol.,** v.45, n.3, p.769-79, 2014.doi: 10.1590/s1517-

83822014000300002. PMID: 25477906; PMCID: PMC4204957.

EDIRIWEERA, M.K.; TENNEKOON, K.H.; SAMARAKOON, S.R. In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. **J. Appl. Toxicol.,** v.39, n.9, p.38-71, 2019. doi: 10.1002/jat.3658. Epub. PMID: 30073673.

ESTORK, D.M.; GUSMÃO, D.F.; PACIENCIA, M.L.; DÍAZ, I.E.; VARELLA A.D.; YOUNES, R.N.; REIS, L.F.; MONTERO, E.F.; BERNARDI, M.M.; SUFFREDINI, I.B. First chemical evaluation and toxicity of *Casinga-cheirosa* to Balb-c male mice. **Molecules,** v.19, n.4, p.3973-87,2014.doi: 10.3390/molecules19043973. PMID: 24699143; PMCID: PMC6271492.

ESTORK, D.M.; GUSMÃO, D.F.; PACIENCIA, M.L.B.; FRANA, S.F.; DÍAZ, I.E.C.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N.; REIS, L.F.L.; MONTERO, E.F.S.; BERNARDI, M.M.; SUFFREDINI, I.B. *Casinga-cheirosa* organic extract impairment over Balb-c male mice behavior phenotype. **Rev. Bras. Farmacogn,** v.26, n.2, p.216-24, 2016.

FERREIRA MACEDO, J.G; LINHARES RANGEL, J.M.; DE OLIVEIRA SANTOS, M.; CAMILO, C.J.; MARTINS DA COSTA J.G.; MARIA DE ALMEIDA SOUZA, M. Therapeutic indications, chemical composition and biological activity of native Brazilian species from *Psidium genus* (Myrtaceae): A review. **J. Ethnopharmacol.,** v.278, p.114248, 2021.doi: 10.1016/j.jep.2021.114248. Epub 2021 May 28. PMID: 34058313

FLAMINI, M.I.; FU, X. D.; SANCHEZ, A. M.; GIRETTI, M.S.; GARIBALDI, S.; GOGLIA, L.; PISANESCHI, S.; TOSI, V.; GENAZZANI, A. R.; SIMONCINI, T. Effects of raloxifene on breast cancer cell migration invasion through the actin cytoskeleton. **J. Cell. Mol. Med.,** v.13, n. 8B, p. 2396-407, 2009.

FREITAS, J.T.; JOZIC, I.; BEDOGNI, B. Wound Healing Assay for Melanoma Cell Migration**.** **Methods Mol. Biol.,** v. 2265, p.65-71, 2021. doi: 10.1007/978-1-0716-1205-7_4. PMID: 33704705.

FU, X. D.; FLAMINE, M.; SANCHEZ, A. M.; GOGLIA, L.; GIRETTI, M. S.; et al. Progestogens regulate endothelia lactin cytoskeleton cell movement via the actin-binding protein Moesin. **Mol. Hum. Reprod.,** v.14, n.4, p. 225- 34, 2008.

HWANG, N.M.; STABILE, L.P. Estrogen Receptor ß in Cancer: To ß(e) or not to ß(e)? **Endocrinology**. doi: 10.1210/endocr/bqab162. PMID: 34370841. v.4, n.11, p.162, 11 Nov. 2021.

INCA, 2022a.https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama.Acesso em: 28 Apr. 2022.

INCA,2022b.https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf. Acesso em: 28 Apr. 2022

KUMAR, P.; AGGARWAL, R. An overview of triple-negative breast cancer. **Arch. Gynecol. Obstet.,** v.2, n.293, p. 247-69, 2016. doi: 10.1007/s00404-015-3859-y. Epub 2015 Sep 4. PMID: 26341644.

LI, Y.; KONG, X.; XUAN, L.; WANG, Z.; HUANG, Y.H. Prolactin and endocrine therapy resistance in breast cancer: The next potential hope for breast cancer treatment.**J. Cell. Mol. Med.,** v.22,

n.25, p.10327-10348, 2021. doi: 10.1111/jcmm.16946.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade/fauna-e-flora/ Acesso em 28/04/2022.

MUTAKI, M.; FAUZIATI, R.; FADHILAH, F.N.; ZUHROTUN, A.; AMALIA, R.; HADISAPUTRI, Y.E. Pharmacological Activities of Soursop (*Annona muricata* Lin.). **Molecules**, v.10, cap.4, n.27, p. 1201, 2022. doi: 10.3390/molecules27041201. PMID: 35208993; PMCID: PMC8878098.

NAYAK, B.S.; KANHAI, J.; MILNE, D.M.; SWANSTON, W.H.; MAYERS, S.; EVERSLEY, M.; RAO, A.V**.** Investigation of the wound healing activity of *Carapa guianensis* L. (Meliaceae) bark extract in rats using excision, incision, and dead space wound models**. J. Med. Food.,** v.13, n.5, p.1141-6, 2010. doi: 10.1089/jmf.2009.0214. PMID: 20828307.

NCI. National Cancer Institute. https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/metastasis, acesso em 09/05/2022.

OWENS, L.V.; XU, L.; CRAVEM, R. J.; DENT, G. A.; WEINER, T.M.; KORNENBER, L.; LIU, E.T.; CANCE W.G. Overexpression of the Focal Adhesion Kinase (p125FAK) in Invasive Human Tumors: **Cancer Res.,** v.2, n.55, p. 5-275,1995.

POLLARD, T.D.; BORYSI, G.G.; Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. **Cell,** v.4.n.112, p.453-65, 2003.

POLLARD, T.D**.** Cell motility and cytokinesis: from mysteries to molecular mechanisms in five decades. **Ann. Rev. Cell Devel. Biol.,** v. 35, p. 1-28, 2019.

Reflora - Herbário Virtual. Disponível em:http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/. Acessoem: 28 Apr. 2022.

REYNOLDS, C.; MONTONE, K.T.; POWELL, C.M.; TOMASZEWSKI, J.E.; CLEVENGER, C. Expression of prolactin and its receptor in human breast carcinoma. **Endocrinology,** v.138, n.12, p. 5555-60, 1997.

SANCHEZ, A.M.; FLAMINI, M.I.; ZULINO, S.; GOPAL, S.; GENAZZARI, A.R.; SIMONICI, T. Estrogen receptor-{alpha} promotes endothelial cell motility through focal adhesion kinase. **Mol. Hum. Reprod.,** v.4, n.17, p.219-26, 2011.

SANTULLI, G. et al. Evaluation of the – angiogenecpropertics of the new selective integrin antagonist. **J. Transl. Med.,** 9; 7, 2011.

SILVA, P.L.; AMARAL V.C.; GABRIELLI, V.; MONTT, G. M. M.; MANELLA, P.; BARACAT, E.C.; SOARES, J.R.J.M.; SIMONICI, T. Prolactin promotes breast cancer cell migration through actin cytoskeleton remodeling. **Front. Endocrinol.,** v.6, n.186, 2015.

SIMONCINI, T.; SCORTICATI, C.; MANELLA, P.; FADIEL,A.; GIRETTI, M.S.; FU, X.D.; et al. Estrogen receptor alpha interacts with Galpha13 to drive actin remodeling and endothelial cell migration via the RhoA/Rho kinase/Moesina pathway. **Mol. Endocrinol.,** v.8, n.28, p.1756-71,2006.

SONG, R.X.; MCPHERSON, R.A.; ADAM, L.; BAO, Y.; SHUPHIK, M.; KUMAR, R, et al. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER alpha-Shc association and Shc pathway activation. **Mol. Endocrinol.,** v.1, n.16, p.116-27,2002.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; FRANA, S. A.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. *in vitro* breast cancer cell lethality by Brazilian plant extracts. **Pharmazie,** v.62, n.10, p.798-800, 2007.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; FRANA, S.A.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. *In vitro* breast cancer cell lethality by Brazilian plant extracts**. Pharmazie,** v.62, n.10, p.798-800, 2007a.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against a human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoterapia,** v.78, n.3, p.223-6, 2007b.

SUFFREDINI, I.B.; PACIENCIA, M.L.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. *In vitro* prostate cancer cell growth inhibition by Brazilian plant extracts. **Pharmazie.** v. 61, n.8, p. 722-24, 2006.

TANGSUKSAN, P.; CHUERDUANGPHUI, J.; TAKAHASHI, Y. C.; SRICHANA T.; HITAKOMATE, E.; PIENTONG, C.; EKALAKSANANAN, T.; NITTAYANANTA, W. Mucoadhesive film containing α-mangostin shows potential role in oral cancer treatment**. BMC Oral Health,** v.21, n.1, p.512, 2021. doi: 10.1186/s12903-021-01845-0. PMID: 34629065; PMCID: PMC8504111.

TWOROGER, S.S.; HANKINSON, S.E. Prolactin and breast cancer etiology**:** an epidemiologic perspective**. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia**, v.13, n.1, p. 41-53, 2008. doi: 10.1007/s10911-008-9063-y. Epub 2008 Feb 2. PMID: 18246319.

TWOROGER, S.S.; HANKINSON, S.E. Prolactin and breast cancer risk**. Cancer Lett.** v.243, n.2, p.160-9, 2006. doi: 10.1016/j.canlet.2006.01.032. Epub 2006 Mar 10. PMID: 16530327.

VENEMA, C.M.; BENSE, R.D.; STEENBRUGGEN, T.G.; NIENHUIS, H.H.; QIU, S.Q.; et al. Consideration of breast cancer subtype in targeting the androgen receptor. **Pharmacol. Ther.,** v.200, p.135-147, 2019. doi: 10.1016/j.pharmthera.2019.05.005. Epub 2019 May 8. PMID: 31077689.

WANG, J.J.; SANDERSON, B.J.; ZHANG, W. Significant anti-invasive activities of α-mangostin from the mangosteen pericarp on two human skin cancer cell lines. **Anticancer Rev.,** v.9, n.32, p.3805-16, 2012.PMID: 22993323.

WANG, M.; WU, X.; CHAI, F.; ZHANG, Y.; JIANG, J. Plasma prolactin and breast cancer risk: a meta- analysis. **Sci. Rep.,** v.6, n. 17, p.259-98, 2016.doi: 10.1038/srep25998. PMID: 27184120; PMCID: PMC4869065.

WENNBO, H.; GEBRE, M.M.; GRITLILINDE, A.; OHLSSON, C.; ISAKSSON, O.G.; TORNELL, J. Activation of the prolactin receptor but not the growth hormone receptor is important for induction of mammary tumors in transgenic mice. **J. Clin. Invest.,** v.100, n.11, p. 2744-51,1997.

YUE, P.Y.K.; LEUNG, E.P.Y.; MAK, N.K.; WONG, R.N.S. A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. **J. Biomolec. Screen.,** v.4, n.15, p. 427-433, 2010. doi:10.1177/1087057110361772.