

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

SARAH CAIXÊTA CARDOSO

Estudo da atividade antitumoral de extratos de plantas e de fluidos de cultivo de fungos em
linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano

Brasília

2014

SARAH CAIXÊTA CARDOSO

Estudo da atividade antitumoral de extratos de plantas e de fluidos de cultivo de fungos em linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Farmacologia e Toxicologia

Orientadora: Prof^ª: Dra Adriana Lofrano Alves Porto

Brasília

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de ensino, estudo ou pesquisa, desde que citada à fonte.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade de Brasília. Acervo 1017259.

C268e Cardoso, Sarah Caixêta.
Estudo da atividade antitumoral de extratos de plantas e de fluidos de cultivo de fungos em linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano / Sarah Caixêta Cardoso.
-- 2014.
97 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) - Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014

Inclui bibliografia.

Orientação: Adriana Lofrano Alves Porto.

I. Adenocarcinoma. 2. Próstata - Câncer. 3. Matéria médica vegetal. 4. Produtos naturais - Uso terapêutico.
I. Porto, Adriana Lofrano Alves. II. Título.

CDU 616.65-006.6

SARAH CAIXÊTA CARDOSO

Estudo da atividade antitumoral de extratos de plantas e de fluidos de cultivo de fungos em
linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 11 de Agosto de 2014.

Banca Examinadora

Prof^a. Dra^a. Adriana Lofrano Alves Porto
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dra^a. Dâmaris Silveira
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dra^a. Eliete Neves da Silva Guerra
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

DEDICATÓRIA

Dedico a Deus que mesmo quando não tinha forças para continuar, sei que Ele me carregava no colo, e mesmo achando que não merecia tanto cuidado e amor de sua parte, sei que sempre está comigo, porque Ele me dá coisas que nem eu sabia que queria e que era isso que me faria feliz. Mas Ele mesmo diz: *"Nem olhos viram, nem ouvidos ouviram, nem jamais penetrou em coração humano o que Deus tem preparado para aqueles que o amam."* 1 Coríntios 2:9

Dedico a toda minha família que é a minha base, a minha mãe Telma, meu pai Nelson, meus irmãos Gustavo e Gabriel, avós Valdir e Fátima - Nilson e Eni, a todos meus tios e tias, primas e primos. Vovô Valdir e Vovó Fátima, são vocês que mais me incentivam a continuar e, mesmo sem saber, é o seu amor, sua força e garra que me inspira e me encoraja. Ao meu noivo Isac que sempre me apoia por mais difícil que seja minha decisão. Sei que minha conquista também é a de vocês.

AGRADECIMENTOS

À professora Adriana Lofrano, minha orientadora e amiga, você é meu exemplo para querer continuar sempre aprender mais. Não tenho palavras para agradecer tudo que vez por mim não só como orientadora, mas muitas vezes como muito mais que isso, quantas vezes acolheu minhas lágrimas, me deu conselhos sábios e cuidou de mim.

Às professoras Dâmaris Silveira, Pérola Oliveira Magalhães e Maria de Fátima Borin, por disponibilizarem a fonte da minha pesquisa, os extratos de plantas e de fluido de cultivo de fungos.

Ao professor Luiz Simeoni, que muitas vezes contribuiu com seu conhecimento.

À professora Eliete Neves da Silva Guerra, que cedeu o espaço do laboratório de Histopatologia Bucal e ao seu grupo, especialmente a Silvinha Elias, que me ensinou cada experimento para que o projeto fosse adiante. E mesmo com seu tempo corrido, sempre arrumou um espaço para me acompanhar a cada novo tipo de experimento.

Ao professor Francisco de Assis Rocha Neves, coordenador do Laboratório de Farmacologia Molecular, que cedeu o espaço do laboratório.

A todo meu grupo de pesquisa, mestrandos, doutorandos, alunos de iniciação científica (Matheus e Vinícius) e aos demais companheiros de laboratório que se tornaram amigos, compartilhamos conhecimento e também experiências pessoais, que de uma forma ou outra contribuíram com o estudo e com meu crescimento profissional e pessoal.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro através do financiamento do projeto Cerrado.

Vocês todos contribuíram com parte dessa história e me fizeram ser capaz. Deixo essa frase com todo carinho para vocês:

“E um dia você aprende que, realmente, tudo pode suportar, que realmente é forte e que pode ir muito mais longe, mesmo após ter pensado não ser capaz. E que realmente a vida tem seu valor, e você, o seu próprio e inquestionável valor perante a vida.”

William Shakespeare

RESUMO

CARDOSO, Sarah Caixêta. **Estudo da atividade antitumoral de extratos de plantas e de fluidos de cultivo de fungos em linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano**. Brasília, 2014. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

O câncer de próstata é o tumor mais comum diagnosticado em homens. As opções terapêuticas incluem a prostatectomia, radioterapia e até mesmo a vigilância ativa, em estágio iniciais. Para doença em estágio avançado é indicada terapia local definitiva combinada com radioterapia adjuvante e/ou terapia hormonal de privação androgênica, porém sua eficácia é limitada. Assim os produtos naturais têm um papel importante como fonte na busca de novos agentes antitumorais. A biodiversidade brasileira, destacando o bioma Cerrado por sua enorme variedade de espécies, vem se tornando alvo importante na busca de novas biomoléculas com potencial terapêutico. O presente estudo tem como objetivo investigar a existência de atividade citotóxica de extratos de plantas e extratos de fluido de cultivo de fungos em linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano. Sob cultivo de duas linhagens de adenocarcinoma de próstata humano LNCaP clone FGC (sensível a androgênios), e PC3 (resistente a androgênios), e de uma linhagem controle de queratinócitos humanos normais (HaCat), foram investigados 31 extratos obtidos de plantas e 11 extratos de fluido de cultivo de fungos. O ensaio de viabilidade celular foi utilizado para avaliar a citotoxicidade e a curva dose-resposta. Foi analisado o perfil de morte celular e alterações no ciclo celular por meio de citometria de fluxo, utilizando kit comercial de anexina V e iodeto de propídeo. Foi realizada microscopia eletrônica de transmissão (MET) com o intuito de confirmar morfológicamente o perfil de morte celular. A fim de identificar compostos presentes nos extratos utilizou-se cromatografia em camada delgada. Entre os 31 extratos analisados, 12 extratos de plantas e 3 extratos de fluido de cultivo de fungos apresentaram atividade citotóxica maior que 50% em linhagem de adenocarcinoma de próstata andrógeno sensível (LNCaP). Sete extratos de plantas e 2 de fluido de cultivo de fungos apresentaram resposta dose dependente e índice de seletividade maior para a célula LNCaP. Estes apresentaram tendência a apoptose inicial e tardia e 4 extratos apresentaram parada do ciclo celular na fase G₀/G₁ estatisticamente significativa. Na análise global do efeito citotóxico em LNCaP, considerando também os índices de seletividade, destacaram-se os extratos de: *Pouteria ramiflora* caule etanólico (E), *Pouteria torta* fruto E, *Bauhinia rufa* folha E, *Sapindus saponaria* fruto E e *Alamanda blanchetii* folha E. Na linhagem PC3, 10 extratos de

plantas apresentaram inicialmente resposta citotóxica maior que 50%, porém apenas 3 apresentaram resposta dose dependente. Destacaram-se extratos de *B. rufa* e *P. caimito*, com repressão significativa do ciclo celular e indução expressiva de apoptose tardia. Foi possível obter imagens de MET apenas de células LNCaP tratadas com *A. blanchetii* fruto E e de células PC3 tratadas com *A. blanchetti* folha hexânico (H), que confirmaram os achados pela citometria. Os compostos acetato de lupeíla, friedelenol e acetato de α amirina foram identificados nos extratos *Pouteria ramiflora* caule E e *Pouteria torta* fruto E. Todos os extratos com atividade citotóxica identificados foram etanólicos ou hexânicos. Os extratos citotóxicos identificados possuem potencial como fonte natural de compostos ativos e estudos futuros são necessários para caracterização de sua atividade farmacológica.

Palavras-chave: Adenocarcinoma. Próstata – Câncer. Matéria médica vegetal. Produtos naturais – Uso terapêutico.

ABSTRACT

CARDOSO, Sarah Caixêta. **Study of antitumor activity of plant and culture fluid fungi extracts in cell lineages of human prostate adenocarcinoma.** Brasília, 2014. Dissertação de mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

Prostate cancer is the most common cancer diagnosed in men. Therapeutic options include prostatectomy, radiation therapy and active surveillance for initial stage tumors. For advanced disease, definitive local therapy combined with adjuvant radiotherapy and / or androgen deprivation hormone therapy are indicated, but their effectiveness is limited, with high mortality. Due to limited therapeutic options, natural products have an important role as a source for discovery of new antineoplastic agents. Brazilian biodiversity, particularly the Cerrado biome and its huge variety of species, is becoming an increasingly important target for the search of new biomolecules with therapeutic potential. The present study aimed to investigate the existence of anti-proliferative activity of plant and fungi extracts in cell lineages of human prostate adenocarcinoma. Under cultivation of two human prostate adenocarcinoma cell lineages, LNCaP clone FGC (androgen-sensitive) and PC3 (androgen-resistant), and a control cell lineage of human keratinocytes (HaCaT), 31 extracts of plants and 11 extracts of culture fluid of fungi were investigated. Cell viability assay was used to assess the cytotoxicity and to determine the dose-response curves. Cell death profile and changes in cell cycle were analyzed by flow cytometry, using propidium iodide and annexin V commercial kits. Transmission electron microscopy was performed to confirm the morphological profile of cell death. Thin layer chromatography was used to identify compounds in selected extracts, which presented significant time- and dose-dependent activity. Among 31 analyzed extracts, 12 extracts of plants and three extracts of culture fluid of fungi showed cytotoxicity greater than 50% in LNCaP cell lineage. Seven plant extracts and 2 extracts of culture fluid of fungi were shown to have a dose-dependent cytotoxic effect, with higher selectivity for cancer cell lineage LNCaP. These extracts showed a tendency to induce early and late cellular apoptosis and 4 extracts exerted a statistically significant inhibitory effect on cell cycle. Upon global analysis of the cytotoxic effect on LNCaP, including the selectivity index, the following extracts showed the most featured effects: *Pouteria ramiflora* stem ethanolic (E), *Pouteria torta* fruit E, *Bauhinia rufa* sheet E, *Sapindus saponaria* fruit E and *Alamanda blanchetii* leaf E. In the androgen-resistant PC3 cell lineage, 10 plant extracts showed a cytotoxic effect initially greater than 50%, but for only 3 extracts

this effect was dose-dependent. The most prominent effects were observed for extracts from *B. rufa* and *P. caimito*, which induced significant cell cycle arrest and late apoptosis. It was possible to obtain images of LNCaP cells treated only with *A. blanchetii* E, and PC3 cells treated with *A. blanchetti* sheet H, which confirmed the findings by flow cytometry. The compounds lupeyl acetate, friedelenol and α amyrin acetate were identified in extracts *Pouteria ramiflora* stem and *Pouteria torta* fruit E. All cytotoxic extracts identified were E or H. The cytotoxic plant extracts identified herein represent a potential natural source of active compounds. Future studies are needed to characterize their pharmacological activity.

Keywords: Adenocarcinoma. Prostate - Cancer. Medical vegetable matter. Natural products - Therapeutic use.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curvas dose-resposta da bicalutamida em linhagens de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP e PC3).

Figura 2 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato hexânico (H) da folha da *Allamanda blanchetii* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 3 - Efeito do extrato hexânico (H) da folha da *Allamanda blanchetii* sobre o ciclo celular em linhagens de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP e PC3).

Figura 4 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato hexânico da *Allamanda blanchetii* em linhagens de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP e PC3).

Figura 5 - Aspecto de células da linhagem PC3 (adenocarcinoma de próstata humano resistente a androgênios) à microscopia eletrônica de transmissão antes (A) e após 6 horas de tratamento com extrato hexânico da folha da *Allamanda blanchetii* (B).

Figura 6 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) da folha da *Allamanda blanchetii* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 7 - Efeito do extrato etanólico (E) da folha da *Allamanda blanchetii* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 8 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico (E) da folha da *Allamanda blanchetii* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 9 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) do fruto da *Allamanda blanchetii* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 10 - Efeito do extrato etanólico (E) do fruto da *Allamanda blanchetii* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 11 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico do fruto da *Allamanda blanchetii* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 12 - Aspecto de células da linhagem LNCaP (adenocarcinoma de próstata humano sensível a andrógenos) à microscopia eletrônica de transmissão após 6 horas de tratamento com extrato etanólico do fruto da *Allamanda A. blanchetii* (B).

Figura 13 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) da folha da *Bauhinia rufa* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 14 - Efeito do extrato etanólico (E) da folha da *Bauhinia rufa* sobre o ciclo celular em linhagens de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP e PC3).

Figura 15 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico da folha da *Bauhinia rufa* em linhagens de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP e PC3).

Figura 16 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) da folha da *Pouteria caimito* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 17 - Efeito do extrato etanólico (E) da folha da *Pouteria caimito* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (PC3).

Figura 18 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico (E) da folha da *Pouteria caimito* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (PC3).

Figura 19 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato hexânico (H) do caule da *Pouteria ramiflora* em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 20 - Efeito do extrato hexânico (H) do caule da *Pouteria ramiflora* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 21 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato hexânico (H) do caule da *Pouteria ramiflora* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 22 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) do fruto da *Pouteria torta* em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 23 - Efeito do extrato etanólico (E) do fruto da *Pouteria torta* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 24 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico (E) do fruto da *Pouteria torta* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 25 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) do fruto da *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 26 - Efeito do extrato etanólico (E) do fruto da *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 27 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico (E) do fruto da *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 28 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato do fluido de cultivo do fungo III em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 29 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato do fluido de cultivo do fungo VII em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 30 - Efeito do extrato do fluido de cultivo do fungo VII sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 31 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato do fluido de cultivo do fungo VII em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 32 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato do fluido de cultivo do fungo IX em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

Figura 33 - Efeito do extrato do fluido de cultivo do fungo IX sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 34 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato do fluido de cultivo do fungo IX em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações etnofarmacológicas, atividade farmacológica e compostos já identificados nas plantas incluídas no estudo.

Tabela 2 – Informações sobre as exsicatas depositadas em herbário das plantas estudadas.

Tabela 3 - Identificação, origem e domínio fitogeográfico das plantas utilizadas no estudo.

Tabela 4 - Citotoxicidade induzida por 13 extratos de plantas em duas linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata humano, dentre 31 extratos de plantas investigados.

Tabela 5 - Citotoxicidade induzida por extratos de fluido de cultivo de 7 fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* e de 4 fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado na região Centro-Oeste do Brasil, em 2 linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata humano.

Tabela 6 - Sumário dos principais parâmetros de citotoxicidade observados após tratamento com extratos de plantas e fluidos de cultivo de fungo em células LNCaP

Tabela 7 - Sumário dos principais parâmetros de citotoxicidade observados após tratamento com extratos de plantas em células PC3

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
Akt	Serina/treonina quinase B
AR	Receptor de androgênios
AREs	Elementos responsivos a andrógenos
BHT	Hidroxitolueno butilado
CDK	Ciclina dependente de quinase
CRPC	Câncer de próstata castração resistente
CXCL12	<i>C-X-C</i> quimiocina modificada 12
DHT	Diidrotestosterona
EGF	Fator de crescimento epidermal
EPCA	Antígeno precoce do câncer de próstata
ERG	Gene relacionado ao ETS
ETS	Transformação específica de eritroblasto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
G0/G1; S; G2/M	Fases do ciclo celular: Quiescência, interfase e divisão celular
GnRH	Hormônio liberador de gonodotrofinas
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal 2
IGF 1	Fator de crescimento semelhante a insulina
IL-6	Interleucina-6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IP	Iodeto de Propídeo
IS	Índice de seletividade
KGF	Fator de crescimento de queratinócito
KLK2	Peptidase relacionada a calicreína 2
LDB	Domínio de ligação como o ligante
LH	Hormônio luteinizante
MAGE-A11	Antígeno do melanoma da família A -11

MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	Brometo azul de tetrazólio
PCA3	Antígeno de câncer prostático 3
PI3K	Fosfoinositol 3 quinase
PS	Fosfatidilserina
PSA	Antígeno prostático específico
PTEN	Fosfatase homóloga a tensina
SRC-1 ou NCOA1	Coativador de receptor nuclear 1 ou coativador de receptor esteroide 1
TMPRSS2	Serina protease transmembrana 2
UB	Herbário da Universidade de Brasília
UEC	Herbário da Unicamp
uPA	Ativador do plasminogênio uroquinase
UnB	Universidade de Brasília
WST	Ensaio de Atividade Mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	19
1.1 Próstata normal	19
1.2 Adenocarcinoma de próstata	19
1.3 Diagnóstico do câncer de próstata	20
1.4 Tratamento	21
1.5 Mecanismos moleculares relacionados a tumorigênese e resistência	23
1.6 Informações etnofarmacológicas	26
1.7 Produtos naturais e câncer	28
2 OBJETIVOS	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Obtenção dos extratos	31
3.1.1 Obtenção dos extratos de plantas	31
3.1.1 Obtenção dos extratos de fluido de cultivo de fungos	33
3.2 Ensaio de citotoxicidade e avaliação do padrão de morte celular em culturas imortalizadas de células humanas de adenocarcinoma de próstata (LNCaP clone FGC e PC3) e em uma linhagem de queratinócitos humanos de pele (HaCat)	33
3.2.1 Culturas de Células	33
3.2.2 Teste de citotoxicidade celular ou viabilidade celular	34
3.2.3 Curvas dose-resposta	34
3.3 Citometria de Fluxo	35
3.3.1 Análise do ciclo celular	35
3.3.2 Avaliação do padrão de morte celular (apoptose e necrose)	36
3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão	36
3.5 Cromatografia em camada delgada	37
3.6 Análise estatística	37
4 RESULTADOS	38

4.1 Análise das curvas dose-reposta, efeitos sobre o ciclo celular e padrão de morte celular induzidos pelos extratos de plantas selecionados	44
4.1.1 <i>Allamanda blanchetii</i>	45
a) <i>A. blanchetii</i> extrato hexânico da folha	45
b) <i>A. blanchetii</i> extrato etanólico da folha	47
c) <i>A. blanchetii</i> extrato etanólico do fruto	49
4.1.2 <i>Bauhinia rufa</i>	51
4.1.3 <i>Pouteria caimito</i>	53
4.1.4 <i>Pouteria ramiflora</i>	55
4.1.5 <i>Pouteria torta</i>	57
4.1.6 <i>Sapindus saponaria</i> variedade <i>inaequalis</i>	58
4.2 Análise das curvas dose-reposta, efeitos sobre o ciclo celular e padrão de morte celular induzidos pelos extratos de fluido de cultivo de fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i>	61
4.2.1 Fungo III	61
4.2.2 Fungo VII	62
4.2.3 Fungo IX	63
4.3 Resultados das análises de Cromatografia de Camada Delgada de extratos de plantas selecionados	65
4.3 Sumário dos resultados (Tabelas 5 e 6)	65
5 DISCUSSÃO	68
6 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	82
APÊNCICE.....	90

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Próstata normal

A próstata humana está localizada na base da bexiga ao redor da uretra. É um tecido derivado do endoderma embrionário, constituído de epitélio pseudoestratificado que apresenta três tipos celulares: células basais, luminais e neuroendócrinas. Possui arquitetura zonal, que corresponde a uma zona de transição, localizada na região central periuretral, e às zonas periféricas, juntamente com uma porção anterior de estroma fibromuscular. A zona periférica mais externa ocupa a maior parte do volume e é onde se desenvolve a maioria dos carcinomas da próstata (SHEN, ABATE-SHEN, 2010).

Sua formação embrionária é estimulada por interações entre o mesênquima do seio urogenital e o epitélio, por meio de sinalização mediada pela interação dos androgênios ao seu receptor. A função primordial da próstata adulta é a produção de componentes importantes do fluido seminal (SHEN, ABATE-SHEN, 2010).

1.2 Adenocarcinoma de próstata

O câncer de próstata é o tumor mais comum diagnosticado em homens, sem contar o câncer de pele não melanoma. É um problema de saúde crescente em todo o mundo, sendo a segunda causa de morte relacionada a cânceres (BRASIL, 2014a).

No Brasil, segundo Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa para novos casos em 2014 é de 68.800, o que representa 70,42 casos a cada 100.000 homens. A idade é o fator relacionado mais importante; 62% dos casos ocorrem em pessoas com 65 anos ou mais (BRASIL, 2014a).

Fatores como história familiar, raça negra, dieta e estilo de vida são considerados fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata. Outros fatores relacionados à inflamação, infecção e modulação da ativação do receptor de andrógenos (AR) participam no desenvolvimento e progressão do tumor e para a resistência das células tumorais à terapia antiandrogênica (HOFFMAN, *et al*, 2011; NELSON, *et al*, 2003).

A maioria dos cânceres de próstata é classificada como adenocarcinomas. Esses tumores caracterizam-se histologicamente pela ausência de células basais e pela proliferação

descontrolada de células tumorais com características de células luminais, incluindo a formação glandular e a expressão de AR e de antígeno prostático específico (PSA) (CHEN, *et al.*, 2012).

1.3 Diagnóstico do câncer de próstata

O diagnóstico envolve várias etapas: o rastreamento por meio da dosagem do antígeno prostático específico (PSA) no sangue, o exame retal digital e a biópsia da glândula, esta última é considerada o exame diagnóstico definitivo (OTTLEY, GOLD, 2012).

O antígeno prostático específico (PSA) é uma serina protease relacionada à calicreína. É o principal componente do fluido seminal, produzido pela expressão de um gene que é regulado pelo AR. Presente nas secreções da próstata normal, também é secretado no sangue, em consequência a distorções na arquitetura normal da próstata. Assim, é possível sua utilização como um importante biomarcador patológico (SHEN, ABATE-SHEN, 2010).

Homens com concentrações plasmáticas elevadas de PSA usualmente realizam biópsia para avaliar a possibilidade de câncer de próstata, porém sua elevação não se associa necessariamente com a presença de câncer. O aumento do PSA no sangue pode também estar associado à hiperplasia benigna na glândula ou a prostatites. Assim, trata-se de um marcador de elevada sensibilidade, porém com especificidade limitada. Com a biópsia, é possível estabelecer o diagnóstico e a classificação histopatológica do tumor, por meio do escore de Gleason, o qual define a estratificação em grupos de risco para o desenvolvimento ou ocorrência de doença avançada e agressiva (SHEN, ABATE-SHEN, 2010).

Embora o PSA seja o único biomarcador utilizado na prática clínica, outros marcadores são apontados. Dentre esses, destaca-se o antígeno de câncer prostático 3 (PCA3), um gene cuja expressão pode estar aumentada de 6 a 34 vezes no tecido tumoral, a fusão dos genes serina protease transmembrana 2 e gene relacionado ao ETS (TMPRSS2:ERG), encontrada apenas em situação de câncer, o ativador do plasminogênio uroquinase (uPA), outras calicreínas, peptidase relacionada a calicreína 2 (KLK2) e o antígeno precoce do câncer de próstata (EPCA) (OTERO, *et al.*, 2014).

Entretanto, as estratégias de rastreamento e diagnóstico mais utilizadas atualmente, baseadas na determinação da concentração plasmática de PSA, exame retal digital e o escore

de Gleason na biópsia de próstata não são capazes de prever perfeitamente quais serão os casos com evolução mais agressiva. Assim, na maioria dos casos de câncer de próstata, mesmo em estágios iniciais, ainda se opta por tratamento curativo como radioterapia ou cirurgia. Estes tratamentos resultam frequentemente em efeitos adversos importantes, como incontinência urinária e fecal e disfunção erétil e poderiam ser desnecessários em alguns casos (HOFFMAN, 2011).

1.4 Tratamento

Na maioria dos casos, o câncer apresenta-se na forma latente, restrito à próstata, o que corresponde a aproximadamente 80% dos casos. Em 20% dos casos ocorre a forma letal, metastática, agressiva. Para os estágios iniciais, as opções terapêuticas incluem a prostatectomia, radioterapia (externa ou braquiterapia) e até mesmo a vigilância ativa. Para doença em estágio avançado, com extensão capsular, para vesículas seminais ou linfonodos regionais, é indicada a terapia local definitiva combinada com radioterapia adjuvante e/ou terapia hormonal de privação androgênica, porém sua eficácia é limitada. Nesses casos, o câncer pode evoluir para um tumor resistente à terapia antiandrogênica, conhecido como câncer de próstata resistente à castração (CRPC - *castration resistant prostate cancer*) (HOFFMAN, 2011; OTTLEY, GOLD, 2012).

A terapia alvo para o câncer de próstata avançado é feita por meio da supressão da produção de andrógenos e/ou de sua ligação ao AR. Essa modalidade terapêutica induz um estado semelhante à castração, isto é, de ausência de secreção ou atividade androgênica. Entretanto, ela não é curativa e quando o tumor é refratário a essa modalidade terapêutica, as opções terapêuticas são limitadas (HU, *et al*, 2009).

A castração pode ser cirúrgica ou farmacológica, a qual envolve fármacos análogos do hormônio liberador de gonodotrofinas (GnRH - *gonadotropin-releasing hormone*), agonistas inversos ou antagonistas. Também podem ser utilizados inibidores da síntese de testosterona e antagonistas do AR (ATTAR, 2009).

O estímulo para a produção de testosterona pelo testículo é regulado pelo hormônio luteinizante (LH), produzido pela hipófise, o qual, por sua vez, é regulado pelo GnRH, produzido no hipotálamo e secretado diretamente na hipófise. Os análogos do GnRH agem por meio do bloqueio funcional do eixo hipotálamo-hipófise-testículos, resultando em

redução significativa da produção de testosterona testicular. Os agonistas inversos disponíveis atualmente são leuprolide, goserelin, triptorelin, e histrelin. Nesse caso, por serem fármacos agonistas com grande afinidade pelo receptor do GnRH, resultam em aumento inicial da secreção de testosterona, seguido de bloqueio devido à competição com o GnRH endógeno, cuja secreção pulsátil é responsável pela produção fisiológica de testosterona. O aumento inicial da secreção de testosterona induzida por esses agonistas resulta em baixa eficácia terapêutica. Com intuito de prevenir esse estímulo androgênico inicial, os análogos agonistas de GnRH podem ser associados com terapia antiandrogênica, que bloqueia o AR. Por outro lado, a busca por antagonistas do GnRH é crescente, sendo que poucos fármacos se encontram disponíveis no mercado. O degarelix, ganirrelix e cetrorelix são opções, porém com custo elevado (HELSEN *et al.*, 2014; ANVISA, 2014).

Em estágios avançados, o câncer pode adaptar-se e progredir mesmo quando há bloqueio da produção de testosterona pelos testículos. Nesses casos, alguns fármacos como cetoconazol e abiraterona também são usados. Esses fármacos inibem a enzima CYP17A1, a qual é responsável pela etapa final da síntese de testosterona tanto nos testículos como na glândula adrenal e próstata, o que leva a deprivação androgênica completa (HELSEN *et al.*, 2014).

Adicionalmente, utilizam-se fármacos antagonistas do AR, também chamados antiandrogênicos, esteroidais ou não-esteroidais. Eles impedem a ligação da testosterona ao AR, ao ligarem-se ao domínio de ligação ao ligante (LDB - *ligand-binding domain*) do AR. Dentre os antiandrogênicos esteroidais podem ser citados, ciproterona, megestrol e medroxiprogesterona. Os antiandrogênicos não esteroidais compreendem a flutamida, bicalutamida, nilutamida, enzalutamida (HELSEN *et al.*, 2014).

Quando o tumor não responde à terapia hormonal inicial, é indicada terapia antineoplásica sistêmica para câncer de próstata metastático, a qual tem resposta clínica muito limitada e ainda dispõe de poucas alternativas e quimioterápicos disponíveis.

Até 2012, apenas os seguintes agentes eram aprovados pela *Food and Drug Administration* dos EUA (FDA): estramustina (um agente alquilante), mitoxantrona (estabiliza o complexo DNA – topoisomerase tipo II e leva ao rompimento do DNA), docetaxel e cabazitaxel (estabiliza os microtúbulos), sipuleucel-T, abiraterona (inibe a síntese androgênica através da inibição da CYP17) (HWANG, 2010, 2012; KIM, RYAN, 2012).

Os medicamentos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uso no Brasil para quimioterapia em pacientes com câncer de próstata são, docetaxel, cabazitaxel, mitoxantrona, estramustina, doxorubicina, etoposídeo, vinblastina, paclitaxel, carboplatina e vinorelbina (ONCOGUIA, 2014)

Segundo Omlin e colaboradores (2014), seis fármacos são considerados como opções terapêuticas para pacientes com câncer de próstata castração resistente, os quais têm mostrado aumento na sobrevivência global: docetaxel e cabazitaxel, sipuleucel-T (imunoterápico), abiraterona, enzalutamida e radium 223. (OMLIN; PEZARO; SOMMER, 2014) Entretanto, a mortalidade no câncer de próstata em estágios avançados e que evolua para resistência à castração ainda é elevada. No Brasil, em 2011, o número de mortes foi de 13.129 (BRASIL, 2014a).

1.5 Mecanismos moleculares relacionados a tumorigênese e resistência

Inúmeros mecanismos moleculares têm sido analisados e propostos como potenciais interferentes na progressão e resistência à resposta terapêutica do câncer de próstata. Dentre eles, destacam-se as alterações na sinalização do AR, a perda de função do supressor tumoral fosfatase homóloga a tensina (PTEN - *Phosphatase and Tensin homolog*), a ativação da sinalização pela via serina/treonina quinase ou proteína quinase B; alvo da rapamicina em mamíferos (Akt/mTOR) e a desregulação da sinalização mediada por algumas tirosina-quinases oncogênicas.

Os hormônios androgênicos têm papel central no desenvolvimento e crescimento da glândula prostática normal, assim como desempenham papel na proliferação e progressão do câncer de próstata. A testosterona e a diidrotestosterona (DHT) medeiam esta ação através do AR (CHERIAN, *et al*, 2012).

O receptor de androgênicos controla o estágio de diferenciação e proliferação das células prostáticas. Na próstata normal predomina a diferenciação, enquanto na progressão para o câncer observa-se predomínio para a proliferação. Isto ocorre devido à alteração de genes responsáveis pela regulação destas etapas.

Os hormônios androgênicos quase que na sua totalidade são sintetizados pelos testículos, porém em menor proporção são sintetizados pelas glândulas adrenais e próstata. A

testosterona é o andrógeno principal circulante, e é convertido em DHT, nos tecidos sensíveis a androgênios. A DHT possui maior afinidade pelo AR (ATTAR, *et al.*, 2009).

A próstata é capaz de converter a testosterona em DHT, devido à presença de enzimas alfa-redutases, o que confere uma alta taxa de ativação do AR no epitélio luminal (CAI, BALK, 2011).

O receptor de androgênios (AR) é um membro da família dos receptores nucleares hormonais. É um fator de transcrição dependente de ligantes, sendo atuante tanto no desenvolvimento da próstata normal, quanto do câncer (TSAO *et al.*, 2012).

Atualmente os mecanismos pelos quais o câncer se torna resistente, onde o AR é ativado mesmo em baixos níveis ou ausência de hormônios, são classificados em duas vias: a) mecanismos dependentes de ligantes: presença de androgênios no microambiente tumoral mesmo após a castração ou amplificação da expressão do AR; b) mecanismos independentes de ligantes: mutações no AR, alterações epigenéticas, variantes de *splicing* alternativo, modificações na atuação de co-ativadores e co-repressores (TSAO *et al.*, 2012). Ainda a ativação através de vias que envolvem proteínas tipo tirosina-quinase, como o aumento da ativação da AKT e consequente maior fosforilação de tirosinas do AR (MIYAMOTO *et al.*, 2012).

O AR contém três domínios, o N-terminal responsável pela transativação, o domínio de ligação ao DNA e o domínio C-terminal, região onde ocorre a ligação com os ligantes. Quando ativado por um ligante há uma alteração conformacional do receptor, translocação para o núcleo e ligação com DNA em regiões que possuem elementos responsivos a andrógenos (AREs), assim regulando a transcrição de outros genes (WATSON, *et al.*, 2010).

Na região N-terminal está o domínio regulatório transcricional chamado AF-1, o qual, mesmo na ausência de ligante, pode ser funcional. No domínio C-terminal está o sítio de ligação do ligante que também regula a transcrição, conhecido como AF-2. Estas regiões estão envolvidas na dimerização do receptor e também em sua ligação a proteínas reguladoras (KORYAKINA, TA, GIOELI, 2014).

O AR pode sinalizar na ausência de andrógenos através de interação com proteínas que ativem a fosforilação em resíduos de serina, treonina e tirosina, o que leva a diferentes atividades, sendo importantes na progressão tumoral. A fosforilação pode ser ativada pelas proteínas coativadoras, como o coativador de receptor nuclear 1, também conhecido como

coativador de receptor esteroidal (SRC-1 ou NCOA1) e pela proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), as quais resultam em ativação do AR independente de ligante. Pode também ser ativada por serina/treonina proteína quinase B (AKT - *serine/threonine protein kinase B*), quinase dependente da ciclina (CDK - *Cyclin-dependent kinase*), fatores de crescimento, fator de crescimento epidermal (EGF - *Epidermal growth factor*), fator de crescimento de queratinócito (KGF- *Keratinocyte Growth Factor*) e fator de crescimento semelhante a insulina (IGF - *Insulin-like growth factor 1*) neuropeptídeos (neurotensina e bombensina), mediadores inflamatórios, citocinas como C-X-C quimiocina modificada 12 (CXCL12) e interleucina-6 (IL-6) (KORYAKINA, TA, GIOELI, 2014; KASINA, MACOSKA, 2012).

Já é sabido que existem mais de sete variantes do AR resultantes de *splicing* alternativo, as quais possuem uma alteração no domínio de ligação com o ligante, na região C-terminal. Essa alteração pode levar essas variantes de AR a serem constitutivamente ativas, isto é, ativadas independentemente da ligação aos androgênios (WATSON, *et al*, 2010).

Uma das mutações somáticas mais comuns relacionadas ao câncer de próstata é a deleção do gene supressor tumoral fosfatase homólogo a tensina (PTEN - *Phosphatase and Tensin homolog*), que está presente em aproximadamente 70% dos casos. A perda de função de PTEN resulta no aumento da regulação da via de sinalização Akt /mTOR, principalmente através da ativação de Akt1 ou através da ativação da isoforma da fosfoinositol 3 quinase (PI3K - *Phosphoinositol 3 kinase*). As consequências da ativação desta via Akt / mTOR contribuem para a resistência à castração do câncer da próstata, ainda está relacionada ao aumento da fosforilação da tirosina quinase AKT e tem correlação com câncer resistente (ABOU-KHEIR *et al.*, 2010). A fosforilação da AKT também ocorre pela hiperexpressão do receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (HER2 - *Human Epidermal growth factor Receptor 2*), que leva à fosforilação da PI3K e fosforilação de PIP2 em PIP3, via complexo mTOR, culminando em ativação da sinalização para o crescimento e sobrevivência celular. Esse mecanismo é regulado pelo PTEN que remove o grupamento hidroxila do PIP3 (LE PAGE, *et al*, 2012).

A sinalização por tirosina quinases, através de Her2 ou tirosina-quinases SRC, está relacionada com doença agressiva, progressão de metástases e resistência. Essa via constitui um dos principais alvos terapêuticos em pacientes com doença avançada. A estimulação do

AR leva à ativação de SRC, podendo resultar em fosforilação do AR, resistência à castração, proliferação celular e invasividade.

A proteína SRC é da família da tirosina quinases não acopladas a receptores, responsáveis pela transdução de sinais de vários receptores. É um oncogene e participa do processo de ativação do AR, sendo um co-ativador. Está envolvido com a metástase óssea pelo câncer de próstata (ATTAR, 2009; FIZAZI, 2007).

O aumento da expressão de genes que regulam o AR, tais como alguns coativadores incluindo antígeno do melanoma da família A11 (MAGE-A11 - *melanoma antigen family A - 11*) e SRC/p160, reforçam que o desenvolvimento do câncer de próstata está diretamente relacionado à ativação do AR (CHERIAN, *et al*, 2012).

Um dos mecanismos também discutidos com relação a câncer, devido sua importância na regulação da divisão celular, e que também está correlacionado a proliferação descontrolada, é o ciclo celular. Que devido alteração em proteínas chave para ativação ou bloqueio da progressão do ciclo, como quinases dependentes de ciclinas (CDK), p53, ciclinas alteram o controle da divisão celular, se tornam alvos para opções terapêuticas para o tratamento de câncer (VERMEULEN, BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2003).

O melhor entendimento das vias envolvidas na tumorigênese e surgimento de resistência, a identificação de novos biomarcadores sobre o comportamento biológico desses tumores e o desenvolvimento de novos fármacos mais efetivos para o tratamento da doença em diferentes estágios poderia otimizar as estratégias terapêuticas atuais, reduzindo assim os efeitos adversos prolongados e a mortalidade relacionada à doença.

1.6 Informações etnofarmacológicas

A tabela 1 apresenta uma relação de plantas a partir das quais foram obtidos os extratos utilizados no presente estudo, bem como um resumo dos principais trabalhos disponíveis na literatura que tenham investigado o potencial terapêutico das mesmas.

Tabela 1 - Informações etnofarmacológicas, atividade farmacológica e compostos já identificados nas plantas incluídas no estudo.

Espécie	Informação etnofarmacológica e parte da planta comumente utilizada	Atividade farmacológica e compostos identificados
<i>Allamanda blanchetti</i> A.DC.	Laxativo; Latex ¹	- Atividade antiproliferativa: Plumericina, isoplumericina ² . -5,6-dimetoxi-7-cumarina ² - Atividade antimicrobiana, antiangiogênica e antifúngica. Quercetina, ácido ursólico, terpenos, plumerideo, estigmasterol/ β -sitosterol, estão presentes em todos os órgãos da planta adulta ³ .
<i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud.	Hipoglicemiante, anti-hiperlipidêmica e anorexígena (folha), diurética, adstringente e na obsidade (toda a planta) ^{4, 5} .	- Inibidor de calicreína recombinante: efeito antitumoral e antiangiogênico em células de câncer de próstata ^{6a} - Óleo volátil: sesquiterpenos e monoterpenos, como espatulenol que possui atividade citotóxica ⁷ .
<i>Bauhinia variegata</i>	Adstringente, escrófula, doenças da pele, úlceras, dispepsia, doenças inflamatórias e antídoto contra picada de cobra, diarreia e diabetes (infusão e decócto, folhas) ^{8, 9, 10} .	- Óleo volátil: sesquiterpenos e monoterpenos, como espatulenol que possui atividade citotóxica ⁷ . - Flavona e dihidrodibenzopirone: (2S)-5,7-dimetoxi-3',4'-metilenodioxiflavanone e 5,6-dihidro-1,7-dihidroxi-3,4-dimetoxi-2-metildibenz [b,f]oxepin ⁹ - Atividade antibacteriana (flavonoides, alcalóides, taninos e terpenóides), antioxidante (flavonóides) e antiproliferativa (flavonóides, antraquinonas e saponinas) ⁸ . - Extrato etanólico do caule: atividade antiproliferativa no linfoma ascítico de Dalton ¹¹ .
<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess	Asma, bronquite, coqueluche (óleo da castanha e caroços), resfriados, tônico e afrodisíaco (caroços) ⁵ .	- Extrato etanólico da casca: atividade tripanocida ¹² - Extrato das folhas hidroetanólico: atividade leishmanicida, antibacteriana e antioxidante ¹³
<i>Erythroxylum suberosum</i> A.St.-Hil.	Processo inflamatório e abortivo ¹⁴	- Extrato bruto: atividade antibacteriana e antifúngica ¹⁴ - Letal para larvas de <i>Artemia salina</i> : diterpenos, rutina (um flavonóide glicosídeo) ¹⁶
Sapotaceae <i>Pouteria caimito</i> (Ruiz & Pav.) Radlk.	Dor de estômago, hemorroidas, doenças hepáticas, diarreia infecciosa, constipação intestinal, vermes intestinais ¹⁷ . Tosse, bronquite e diarreia (folhas e frutos) ¹⁸ .	- Extrato aquoso: Atividade inibitória da tirosinase ¹⁹ - Compostos fenólicos: atividade antioxidante ²⁰
<i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.	Uso de frutos e raízes contra vermes, disenteria, dor e inflamação. Anti-hiperlipidêmica e anorexígena ^{21, 4}	- Extrato etanólico: Atividade inibitória da tirosinase ¹⁹ , anti-inflamatória e antinociceptiva ²¹ - Extrato aquoso: inibição da atividade da alfa-amilase salivar e redução da glicemia ²²
<i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk.	Usa casca da árvore contra disenteria ²³	- Ácido gálico, catequinas (epicatequina, miricitrina, rutina e isoquercitrina), flavonóides: Atividade inibitória da tirosinase ¹⁹ - Extrato aquoso: inibição da atividade da alfa-amilase salivar ²² - Triterpenos: Acetato β -amirina, acetato de α -amirina, ácido betulínico e ácido ursólico ²⁴ - Acetato de lupeol ²³ - Pouterina: atividade antifúngica e inseticida ²⁵ - Atividade antioxidante (rutina, miricetina e derivados da catequina) e antitumoral em células de carcinoma de boca e de mama ²⁶ - Extrato etanólico da raiz: apresentou atividade

citotóxica para 4 linhagens tumorais, HCT-8 carcinoma de cólon humano, HL-60 leucemia, SF-295 câncer de mama e MDA-MB-435 melanoma²⁷

***Sapindus saponaria* L.**

Combate a úlceras, feridas na pele e inflamações²⁸

- Extrato das folhas: tannis e cumarina; Extrato dos frutos: tannins e saponinas; Extrato hidroalcolico de folhas e frutos: atividade antiulcerativa²⁸
 - Extratos hidroalcolico e n-butanólico: atividade fungicida. Encontrado duas saponinas triterpênicas acetiladas²⁹
 - Saponinas triterpênicas acetiladas [3-O-(4-acetil-β-D-xilopiranosil) - (1→3)-α-L-ramnopiranosil- (1→2)-α-L-arabinopiranosil -hederagenina e
 - 3-O-(3,4-diacetil- β- D-xilopiranosil)- (1→3)-α-L-ramnopiranosil-(1→2)- α-L-arabinopiranosil – hederagenina]: atividade antifúngica em *Candida* ssp³⁰
 - Extrato hidroalcolico e butanólico: atividade espermicida e antifúngica (*Trichomonas vaginalis*)²⁹
 - Extrato hidrometanólico: atividade antibacteriana, antifúngica, antitumoral (carcinoma de cólon, colo de útero, de mama e de pulmão)³¹
 - estigmasterol, ácido oleanólico, luteolina, 8-C-β-glucoside (orientina), luteolina 6-C-β-glucoside (isorientina), luteolina 7-O-β-glucuronide e andrutina³¹

***Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville**

anti-séptico, adstringente e anti-inflamatório³²
 Leucorréia, diarreia e anti-inflamatório³³

- Extratos aquoso e etanólico da casca do caule: Atividade inibitória da tirosinase¹⁹, tripanomicida e inibição fraca do crescimento *Leishmania amazonensis*^{12, 33}
 - Extrato bruto da casca do caule e as frações aquosas e de acetato de etila apresentam atividade antinociceptiva³⁴
 - Extrato hexânico da folha: atividade antifúngica³⁵

1 MOURA; AGRA, 1989; 2 BHATTACHARYY; MORAIS, 1986; 3 NAVARRO, 2005, 2006; 4 SILVA *et al.*, 2010; 5 RODRIGUES; CARVALHO, 2007; 6a FERREIRA *et al.*, 2013a; 7 DUARTE-ALMEIDA; NEGRI; SALATINO, 2004; 8 MISHRA *et al.*, 2013; 9 REDDY *et al.*, 2003; 10 AHMED *et al.*, 2012; 11 RAJKAPOOR; JAYAKAR; MURUGESH, 2003; 12 HERZOG-SOARES; *et al.*, 2002); 13 PAULA-JUNIOR; *et al.*, 2006; 14 VIOLANTE; *et al.*, 2012; 16 NASCIMENTO *et al.*, 2012; 17 SANTOS *et al.*, 2012; 18 BOSCOLO; VALLE, 2008; 19 SOUZA *et al.*, 2012; 20 CONTRERAS-CALDERÓN *et al.*, 2011; 21 FONTES JÚNIOR; *et al.*, 2009; 22 GOUVEIA *et al.*, 2013; 23 PERFEITO; *et al.*, 2005; 24 CHE *et al.*, 1980; 25 BOLETI *et al.*, 2007; 26 ELIAS *et al.*, 2013; 27 MESQUITA, *et al.*, 2009; 28 ALBIEIRO; BACCHI; MOURÃO, 2001; 29 DAMKE *et al.*, 2011; 30 TSUZUKI *et al.*, 2007; 31 RASHED *et al.*, 2013; 32 SOUZA; FELFILI, 2006; 33 LUIZE *et al.*, 2005; 34 MELO *et al.*, 2007; 35 SILVA; PAULA; ESPINDOLA, 2009

1.7 Produtos naturais e câncer

Os produtos naturais têm um papel importante como fonte na busca de novos agentes antitumorais. A aplicação terapêutica já amplamente conhecida de antineoplásicos derivados de produtos naturais, tais como o paclitaxel, alcaloides da vinca e o etoposide, em diversos tipos de câncer, reforça a busca por novos agentes, a partir dos recursos da biodiversidade (YOUNES; VARELLA; SUFFREDINI, 2007).

Uma revisão com uma série de estudos relatou o uso de medicamentos alternativos por pacientes com câncer de próstata e sugeriram possível efeito antiproliferativo de compostos

naturais em linhagem celular de câncer de próstata. Relataram também alguns estudos em modelos de câncer em camundongos, em que houve redução da proliferação celular e tamanho tumoral. Os principais produtos naturais com possível atividade antineoplásica foram as substâncias isoladas, pomegranato (*Punica granatum*), curcumina (*Curcuma longa*), resveratrol, e silibina (*Silybum marianum*) e extratos de *Camellia sinensis* (chá verde) e *Vitis rotundifolia* (KLEMPNER; BUBLEY, 2012).

Além da busca por produtos naturais em plantas, há também a opção dos fungos. Os fungos endofíticos apresentam potencial em sintetizar compostos que podem ser bioativos e que de forma direta ou indireta são usados como agentes terapêuticos. (DEBBAB; ALY; PROKSCH, 2013) A exemplo do paclitaxel, inicialmente descoberto em planta, atualmente é produzido por meio de cultivo em larga escala de fungos endofíticos (KUSARI; SINGH; JAYABASKARAN, 2014).

Nesse contexto, a identificação de novos agentes com atividade antineoplásica é importante. A biodiversidade brasileira, por sua enorme variedade de espécies, vem se tornando alvo importante na busca de novas biomoléculas com potencial terapêutico. Na região Centro-Oeste, o Cerrado representa um bioma com grande abundância de plantas. Assim, o propósito desse estudo é agregar informações à busca da identificação de plantas principalmente do bioma cerrado, mas também de outros biomas que apresentem potencial atividade terapêutica.

Por meio de um rastreamento de atividade citotóxica em extratos de fluido de cultivo de fungos e plantas em duas linhagens de células de carcinoma de próstata, espera-se contribuir com a descoberta de novas fontes para a busca de substâncias com potencial terapêutico para o tratamento de câncer de próstata.

2 OBJETIVOS

GERAL

- Investigar a existência de atividade citotóxica de extratos de fluido de cultivo de fungos e extratos de plantas em linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano.

Específicos

_ Identificar a concentração necessária dos extratos de fluido de cultivo de fungos e extratos de plantas capaz de induzir 50% de inibição da viabilidade celular em linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano;

_ Investigar alterações no ciclo celular induzidas pelo tratamento com os extratos em linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano;

_ Investigar o perfil de morte celular induzido pelo tratamento com os extratos em linhagens de células de adenocarcinoma de próstata humano.

_ Identificar compostos presentes nos extratos com base na comparação com padrões de substâncias disponíveis no laboratório para à cromatografia de camada delgada.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 31 extratos obtidos de plantas e 11 extratos de fluido de cultivo de fungos. Todos os extratos analisados foram fornecidos pelos laboratórios da Universidade de Brasília participantes do projeto intitulado “Bioprospecção de plantas do Cerrado e Pantanal para o desenvolvimento de novos biofármacos para o tratamento do câncer”, o qual foi contemplado pelo edital MCT/CNPq/FNDCT/FAPs/MEC/CAPES/Pro-Centro-Oeste 31/2010.

Os diferentes extratos em diferentes concentrações foram utilizados como tratamento e foram adicionados ao meio de cultura celular (linhagens de adenocarcinoma de próstata humano) para realização de todos os experimentos desse trabalho, como detalhado a seguir.

3.1 Obtenção dos extratos

3.1.1 Obtenção dos extratos de plantas

Todos os extratos de plantas foram cedidos e pertencem ao grupo de pesquisa “Desenvolvimento e Controle da Qualidade de Fármacos e Medicamentos”, coordenado pelas professoras Dâmaris Silveira e Pérola Oliveira Magalhães, da Universidade de Brasília (UnB). Uma exsicata testemunha de todas as plantas cujos extratos foram investigados nesse estudo encontra-se depositada no Herbário da Universidade de Brasília (Herbário UB), apenas uma se encontra no Herbário da Unicamp (UEC) sob os números apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Informações sobre as exsicatas depositadas em herbário das plantas estudadas.

Planta	Exsicata
<i>Allamanda blanchetii</i>	UEC 142021
<i>Bauhinia rufa</i>	-
<i>Bauhinia variegata</i>	UB 8749
<i>Caryocar cf villosum</i>	UB 907
<i>Erythroxylum subrotundum</i>	UB 2194
<i>Erythroxylum suberosum</i>	Fagg CW2192
<i>Pouteria caimito</i>	UB 27284
<i>Pouteria ramiflora</i>	UB 3671
<i>Pouteria torta</i>	UB 3674
<i>Sthryphnodendron adstringens</i>	UB 911
<i>Sapindus saponaria variedade inaequalis</i>	UB 916

UEC: Herbário da Unicamp

UB: Herbário da Universidade de Brasília

Para a obtenção dos extratos, o material botânico foi coletado e foram utilizadas diferentes partes da planta: folhas, caule e frutos. Inicialmente, o material foi pulverizado e submetido à extração por maceração a frio, por quatro vezes, durante sete dias cada, utilizando hexano como solvente, obtendo assim o extrato bruto hexânico. Após decantação, as soluções extrativas foram concentradas à secura, sob vácuo, a uma temperatura de aproximadamente 40 °C. Com o material botânico restante, o mesmo processo foi realizado utilizando etanol 95% como solvente, para obtenção do extrato bruto etanólico. O solvente foi eliminado por evaporação, sob vácuo, à temperatura inferior a 40 °C.

Para obtenção do extrato aquoso bruto, a técnica de extração utilizada foi a infusão. O material botânico foi pulverizado e adicionado água destilada submetida previamente à ebulição e posterior arrefecimento até 70 °C. A mistura foi mantida em contato até arrefecimento a 50 °C e filtrada a quente. A solução extrativa obtida foi mantida a -30 °C e posteriormente foi submetida a liofilização.

3.1.1 Obtenção dos extratos de fluido de cultivo de fungos

Os extratos de fluido de cultivo dos fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* foram cedidos e pertencem ao grupo de pesquisa da professora Maria de Fátima Borin, da UnB.

Os extratos de fluido de cultivo dos fungos isolados do solo do Cerrado na região Centro-Oeste foram cedidos e pertencem ao grupo de pesquisa “Desenvolvimento e Controle da Qualidade de Fármacos e Medicamentos”, coordenado pelas professoras Pérola Oliveira e Dâmaris Silveira, da UnB.

Os extratos foram obtidos do fluido de cultivo dos fungos após fermentação e extração líquida-líquida com solvente acetato de etila.

A descrição dos métodos utilizados para obtenção dos extratos, tanto de plantas como de fluido de cultivo de fungos, foi obtida junto aos grupos que cederam os extratos.

3.2 Ensaios de citotoxicidade e avaliação do padrão de morte celular em culturas imortalizadas de células humanas de adenocarcinoma de próstata (LNCaP clone FGC e PC3) e em uma linhagem de células humanas de queratinócitos de pele (HaCat)

3.2.1 Culturas de Células

Foram utilizadas duas linhagens de adenocarcinoma de próstata humano: uma sensível a androgênios, LNCaP clone FGC, e outra resistente a androgênios, PC3. Além disso, linhagem de células de queratinócitos humano de pele, HaCat, foram utilizadas como controle nos experimentos (células não neoplásicas). Para cultivo das células LNCaP foi utilizado o meio RPMI-1640 (sigma) acrescido de bicarbonato de sódio, piruvato de sódio, HEPES, soro fetal bovino a 10% e estreptomicina + ampicilina a 1%. Para as células PC3, o DMEM F12K (sigma), e o DMEM, para as células HaCat, ambos acrescidos de bicarbonato de sódio, soro fetal bovino a 10% e estreptomicina+ampicilina a 1%.

3.2.2 Teste de citotoxicidade celular ou viabilidade celular

O percentual de células viáveis antes e após tratamento com os extratos foi aferido pelo teste colorimétrico de citotoxicidade, utilizando-se o WST – Ensaio de Atividade Mitocondrial. Esse teste consiste na conversão de um sal tetrazólico brometo azul de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan por uma enzima mitocondrial, a succinato redutase.

A citotoxicidade celular foi calculada comparando-se a absorbância obtida após tratamentos com extratos de fungos e plantas com a absorbância do controle não tratado, isto é, as células plaqueadas com o veículo em que eram dissolvidos os extratos. A citotoxicidade foi expressa em termos de percentual de células viáveis após tratamento em relação ao controle.

Em placas de 96 poços foram dispostas 5×10^3 células por poço em meio de cultura, e, após 24 horas, foi aspirado o meio e adicionado 100 μ L de cada extrato. Para tratamento, os extratos foram pesados e diluídos em PBS, para os extratos aquosos, e em DMSO/Etanol (2:3), para os etanólicos, hexânicos e para os extratos dos fungos. Assim, foi obtido uma solução mãe, a partir da qual eram preparadas as soluções de tratamento a, no máximo, 1% do veículo. Os extratos de plantas foram preparados na concentração de 500 μ g/mL e os de fungos, a 100 μ g/mL. Após 24 e 48 horas de tratamento, o meio contendo os extratos foi aspirado e substituído por 100 μ L de meio de cultura sem tratamento com 10 μ L de MTT (5mg/mL). As células foram então incubadas por 4h para conversão do MTT em cristais de formazan, os quais foram posteriormente solubilizados com isopropanol acidificado (25mL de isopropanol + 104 μ L de HCl PA). A absorbância foi medida em uma leitora de microplaca a 450nm.

Todos os testes foram realizados em triplicata, com no mínimo 3 experimentos independentes.

3.2.3 Curvas dose-resposta

A fim de determinar se a resposta citotóxica observada em determinados extratos era dose-dependente, foram feitas curvas dose-resposta de citotoxicidade de células tratadas com concentrações decrescentes dos extratos. As concentrações utilizadas dependeram da resposta

dos extratos em que foi identificada citotoxicidade consistente, isto é, acima de 50% de morte celular. Após 24h e 48h de tratamento foi feito o ensaio de citotoxicidade como já descrito.

A concentração que inibiu 50% da proliferação celular (IC50) foi calculada, bem como o índice de seletividade (IS). O IS dos extratos foi estimado através da razão entre as IC50 obtidas para a célula controle HaCat sobre aquelas obtidas para as células cancerígenas, LNCaP e PC3. O índice de seletividade foi considerado significativo quando igual ou superior a 2,0, o que significa que a concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular da célula cancerígena é pelo menos 2 vezes menor que a concentração necessária para inibir 50% da proliferação da célula controle. (SUFFNESS; PEZZUTO, 1991)

Horii e colaboradores (2012) consideraram altos índices de seletividade tumoral (TS também conhecido como IS) de 3,3, seguido de 2,8 e 2,3 (HORII *et al.*, 2012).

3.3 Citometria de Fluxo

As células não tratadas foram inicialmente padronizadas no citômetro para obtenção dos parâmetros basais, isto é, seu tamanho e granulosidade, os quais foram utilizados nas análises. Em seguida, procedeu-se aos experimentos, foi utilizado a concentração de 500µg/mL para os extratos de plantas, 100µg/mL para o extrato de fluido de cultivo do fungo VII e de 200µg/mL para o extrato de fluido de cultivo do fungo IX.

3.3.1 Análise do ciclo celular

A análise dos efeitos dos extratos sobre o ciclo celular foi realizada pela técnica de citometria de fluxo utilizando o iodeto de propídeo (IP) para marcar os diferentes tamanhos de DNA e assim identificar em qual fase do ciclo celular as células se encontram. Realizado em triplicata.

Foram dispostas entre 5×10^5 e 1×10^6 células por poço, dependendo da quantidade de células disponível, em placas de 6 poços. Após 24 horas foi realizado o tratamento e, 6 horas após o tratamento, foi realizado o processamento das amostras. As células foram fixadas em etanol 70%, e assim foram armazenadas até 2 semanas para leitura. No momento da leitura, as células foram incubadas por 30 min à temperatura ambiente com 100µL de RNase A

250µg/mL. Em seguida, foram adicionados 100µL de iodeto de propídeo 50µg/mL e incubado por mais 10 minutos no escuro. A leitura foi realizada em citômetro de fluxo.

3.3.2 Avaliação do padrão de morte celular (apoptose e necrose)

Foi realizada pela técnica de citometria de fluxo. Consiste na detecção de apoptose pela dosagem de fosfatidilserina (PS) através da Anexina V que é uma proteína que se liga a fosfolipídeos e possui alta afinidade por PS. A PS na célula viável em estado normal é predominantemente observada na superfície interna da membrana plasmática, voltada para o citosol. Nas células em início de apoptose, a membrana sofre um processo de desorganização mesmo ainda estando intacta e a PS é translocada para a superfície exterior da bicamada. Já necrose é observada por meio do iodeto de propídeo, o qual se intercala no DNA fragmentado e assim não é capaz de ser absorvido, marcando assim somente as células que estão em processo de necrose. O experimento foi feito uma única vez.

Foram dispostas entre 5×10^5 e 1×10^6 células por poço, dependendo da quantidade de células disponível em placas de 6 poços. Após 24 horas foi realizado o tratamento e, 6h após, foi realizado o processamento das amostras conforme descrito pelo fabricante do Kit Alexa Fluor 488® (Invitrogen). No momento da leitura em citômetro de fluxo, as amostras foram distribuídas em 3 tubos: o primeiro, sem adição dos reagentes, foi o controle negativo, para determinação da fluorescência basal; no segundo tubo foi adicionado 5µL de anexina feita a leitura após 15 minutos, seguida da adição de 1µL de iodeto de propídeo a 100µg/mL e nova leitura após 5 minutos; no terceiro tubo foi adicionado iodeto de propídeo a 1mg/mL e feita leitura após 5 minutos.

3.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Foram dispostas entre 5×10^5 e 1×10^6 células por poço, dependendo da quantidade de células disponível, em placas de 6 poços. Após 24 horas foi realizado o tratamento, e, 6h após, foi realizado o processamento das amostras que consistiu na fixação, emblocamento e cortes para visualização em microscópio eletrônico de transmissão.

3.5 Cromatografia em Camada Delgada

Utilizou-se uma placa de sílica para aplicar as amostras e os padrões disponíveis no laboratório de produtos naturais. Em seguida as amostras e padrões foram eluídos com diferentes solventes, nas seguintes proporções: hexano e etanol (9:1 e 6:4), hexano e acetato de etila (9:1; 8:2 e 6:4) e clorofórmio. Esse método tem por objetivo a identificação de compostos ou grupos de compostos presentes nas amostras de extratos.

3.6 Análise estatística

O teste estatístico empregado para viabilidade celular, análise do ciclo celular e perfil de morte celular foi a análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de comparação múltipla de Turkey. Para as curvas dose-resposta foi feita regressão não linear, com variável *slope* da dose de inibição *versus* resposta e cálculo da IC50. Para todas as análises, foi empregado o programa *GraphPadPrism*® versão 5.0 para Windows. O critério de significância para todas as análises foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Dentre as 11 plantas cujos extratos foram disponibilizados para esse estudo, a maioria, isto é, 8 plantas eram nativas do bioma cerrado brasileiro, e apenas 3 plantas eram nativas de outros biomas, porém encontradas em abundância no Cerrado. A partir dessas 11 plantas, foram disponibilizados 31 extratos para análise, sendo que 23 extratos provinham das 8 plantas nativas do Cerrado, e os demais 8 extratos provinham de plantas nativas de outros biomas. As informações sobre origem e domínio fitogeográfico das plantas encontram-se na tabela 3.

Tabela 3 - Identificação, origem e domínio fitogeográfico das plantas utilizadas no estudo.

Família da planta e espécie	Origem (nativa); Domínios fitogeográficos; Distribuição geográfica
Apocynaceae <i>Allamanda blanchetti</i> A.DC.	Brasil ¹ ; Caatinga ¹ ;
Fabaceae <i>Bauhinia rufa</i> (Bong.) Steud.	Brasil ² ; Cerrado ² ;
Fabaceae <i>Bauhinia variegata</i> L.	Índia, Burma e China ³
Caryocaraceae <i>Caryocar cf villosum</i> (Aubl.) Pers.	Brasil ⁴ ; Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica ⁴ ;
Erythroxylaceae <i>Erythroxylum suberosum</i> A.St.-Hil.	Brasil ⁵ Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica ⁵ ;
Erythroxylaceae <i>Erythroxylum subrotundum</i> A.St.-Hil.	Brasil ⁵ Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica ⁵
Sapotaceae <i>Pouteria caimito</i> (Ruiz & Pav.) Radlk.	Brasil ⁶ ; Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica ⁶
Sapotaceae <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.	Brasil ⁷ ; Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica ⁷
Sapotaceae <i>Pouteria torta</i> (Mart.) Radlk.	Brasil ⁸ ; Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica ⁸
Sapindaceae <i>Sapindus saponaria</i> L.	Brasil ⁹ ; Amazônia, Mata Atlântica, Pantanal ⁹
Fabaceae <i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	Brasil ¹⁰ ; Caatinga e Cerrado ¹⁰

1 KOCH, *et al.* 2014; 2 VAZ, 2014; 3 RANK, 2014; 4 PRANCE; MEDEIROS; AMORIM, 2014; 5 LOIOLA; COSTA-LIMA, 2014; 6 ALVES-ARAÚJO, 2014a; 7 ALVES-ARAÚJO, 2014b; 8 ALVES-ARAÚJO, 2014c; 9 SOMNER; FERRUCCI; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, 2014; 10 SCALON, 2014

Dentre os 31 extratos de plantas investigados, 10 apresentaram resposta citotóxica maior que 50% em ambas linhagens de células de adenocarcinoma de próstata estudadas, LNCaP e PC3, 2 extratos apresentaram resposta apenas na linhagem LNCaP, sensível a androgênios, e um extrato apresentou resposta apenas na linhagem PC3, resistente a androgênios, totalizando 13 extratos com atividade citotóxica (Tabela 4).

Observa-se que a maioria dos extratos de plantas que apresentaram atividade citotóxica eram etanólicos e hexânicos, com apenas um extrato aquoso. Na tabela 4 encontram-se informações referentes às plantas e respectivos extratos investigados, bem como sua citotoxicidade.

Tabela 4 - Citotoxicidade induzida por 13 extratos de plantas em duas linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata humano, dentre 31 extratos de plantas investigados.

Planta	Parte da planta	Solvente	Citotoxicidade¹/ linhagem celular	%³ LNCaP 24/48h	% PC3 24/48h
<i>Allamanda blanchetii</i>	Caule ²	E	LNCaP	73,72/51,23	-
	Folha	E	LNCaP e PC3	47,95/7,23	36,33/14,76
		H	LNCaP e PC3	25,71/19,31	32,65/14,13
<i>Bauhinia rufa</i>	Folha	E	LNCaP e PC3	45,86/9,36	60,72/23,63
		A	-	63,24/47,51	109,07/80,64
		E	LNCaP e PC3	31,73/23,94	51,18/32,36
<i>Bauhinia variegata</i>	Folha	H	LNCaP e PC3	31,69/14,78	35,52/15,69
		A	-	86/86,97	106,35/107,5
		E	-	103,32/54,5	105,67/76,82
<i>Caryocar cf villosum</i>	Casca do fruto	H	-	71,63/64,93	72,72/68,47
		E	PC3	88,31/87,25	60,66/31,91
		A	LNCaP	73,02/32,23	89,14/82,49
<i>Erythroxylum subrotundum</i>	Folha	A	-	85,07/65,44	83,46/43,36
		E	-	51,33/52,91	78,02/43,91
		H	PC3	61,87/59,45	51,52/30,22
<i>Pouteria caimito</i>	Folha	A	-	93,95/43,2	102,04/57,4
		E	LNCaP e PC3	48,91/33,99	43,34/25,75
		H	-	81,18/62,28	69,64/67,02
<i>Pouteria ramiflora</i>	Caule	H	LNCaP e PC3	48,13/41,9	57,35/36,54
	Folha	E	-	104,11/34,13	110,14/85,31
		H	LNCaP e PC3	54,61/17,73	42,24/31,17
<i>Pouteria torta</i>	Folha	A	-	169,69/96,75	160,61/119,01
		E	-	78,2/89,52	256,79/160,3
		H	-	88,22/60,72	47,26/47,44
	Fruto	E	LNCaP	57,39/14,28	77,98/93
		A	-	177,53/93,41	160,27/83,47
<i>Sthryphnodendron adstringens</i>	Folha	E	-	64,19/66,23	122,12/84,94
		H	-	146,45/92,38	248,98/204,2
		E	-	57,17/51,37	148,42/91,73
	Casca do caule	H	-	157,38/100,6	158,59/91,6
		E	LNCaP e PC3	15,53/13,82	23,44/10,1

1 Atividade citotóxica maior que 50% em pelo menos uma das linhagens celulares: LNCaP (sensível a androgênios) e PC3 (resistente a androgênios)

2 Não analisado na linhagem PC3 por quantidade insuficiente de extrato disponível.

Concentração dos extratos utilizada para o tratamento: 500µg/mL

3 Porcentagem de células viáveis

Além dos extratos de plantas, foram investigados 11 extratos de fluido de cultivo de fungos. Dentre eles, 7 extratos foram provenientes de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata*, neste trabalho denominados I, II, III, V, VII, VIII, IX, cujas espécies ainda não foram identificadas. Os outros quatro foram provenientes de fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado da região Centro-Oeste, já identificados.

Os fungos III e VII isolados da *Bauhinia variegata* apresentaram atividade citotóxica maior que 50% na linhagem LNCaP, embora a própria planta da qual foram obtidos não tenha apresentado atividade. Já na linhagem PC3, apenas o extrato de fluido de cultivo do fungo II apresentou resposta citotóxica em aproximadamente 50%.

Entre os fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado apenas o *Phaecilomyces lilacinus* apresentou resposta citotóxica maior que 50%, também na linhagem LNCaP. Na tabela 5 está listada a identificação dos fungos e resultados do teste de citotoxicidade de seus respectivos extratos.

Tabela 5 - Citotoxicidade induzida por extratos de fluido de cultivo de 7 fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* e de 4 fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado na região Centro-Oeste do Brasil, em 2 linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata humano.

Origem dos fungos	Identificação do extrato	Citotoxicidade ¹ / linhagem celular	% ³ Citotoxicidade 24/48h
Fungos endofíticos da <i>Bauhinia variegata</i>	I	-	
	II	PC3	68,26/51,8
	III	LNCaP	60,38/52,64
	V	-	
	VII	LNCaP	59,57/26,92
	VIII	-	
	IX	-	
Fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado da região Centro-Oeste	<i>Phaecilomyces lilacinus</i> ²	LNCaP	71,16/53,78
	<i>Mucor</i> sp.	-	
	<i>Penicillium rugulosum</i>	-	
	<i>Trichoderma</i> sp.	-	

1 Atividade citotóxica maior ou próxima a 50% em pelo menos uma das linhagens celulares: LNCaP (sensível a androgênios) e PC3 (resistente a androgênios)

2 Não analisado na linhagem PC3 por quantidade insuficiente de extrato disponível.

Concentração utilizada para o tratamento: 100µg/mL

3 % de células viáveis

Dentre os extratos testados, foram selecionados para a etapa seguinte aqueles que apresentaram resposta citotóxica maior ou igual a aproximadamente 50%, e cuja atividade em 24 horas de tratamento tenha se mantido estável ou maior em 48 horas de tratamento, com significância estatística.

As exceções foram:

a) O extrato aquoso de *Erythroxylum subrotundum*, o qual, embora tenha se mostrado citotóxico em células LNCaP (tabela 2), foi excluído das etapas seguintes de análise devido a sua pouca disponibilidade decorrente de uma queimada na região de sua coleta durante o período de desenvolvimento desse trabalho.

b) O extrato do fluido de cultivo do fungo IX, o qual, embora tenha apresentado citotoxicidade um pouco inferior a 50% no rastreamento inicial, foi incluído nas etapas seguintes devido à boa reprodutibilidade dos dados obtidos.

c) O extrato do fungo II, o qual apresentou atividade citotóxica próxima a 50% apenas na linhagem PC3 e apenas após 48h de tratamento. Optou-se por excluí-lo diante do grande número de extratos com atividade citotóxica superior para realização dos experimentos. Entretanto, destaca-se que este extrato poderá ser melhor analisado em estudos futuros nessa linhagem resistente a androgênios.

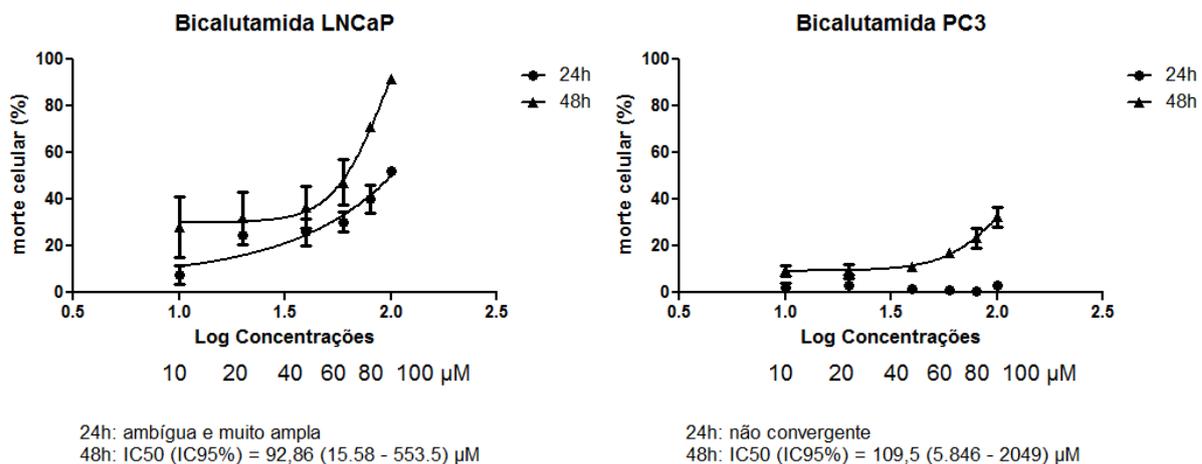
Assim, os extratos citotóxicos que foram selecionados para as etapas seguintes do estudo, a começar pelas curvas dose-resposta, totalizaram 12 extratos de plantas e 4 extratos de fluido de cultivo de fungos. Os gráficos que representam os resultados do teste inicial de citotoxicidade de todos os extratos rastreados encontram-se no apêndice.

Para melhor visualização dos efeitos, os resultados de todos os experimentos realizados para cada extrato selecionado, isto é, que atenderam aos critérios de citotoxicidade (efeito $\geq 50\%$ e em 24h \geq em 48 h), serão apresentados conjuntamente a seguir. Os mesmos encontram-se ordenados conforme a espécie da planta originária (item 4.1) e do fluido de cultivo de fungo (item 4.2).

4.1 Análise das curvas dose-reposta, efeitos sobre o ciclo celular e padrão de morte celular induzidos pelos extratos de plantas selecionados

Para padronização da determinação da curva dose-resposta dos extratos e avaliação qualitativa (subjetiva) de seus efeitos, foi realizada a curva dose-resposta de um fármaco padrão, antagonista do AR, e amplamente utilizado na prática clínica para tratamento do câncer de próstata avançado: a bicalutamida. Esse experimento foi realizado para que houvesse um controle positivo para os testes de citotoxicidade, uma vez que seu efeito citotóxico para as linhagens celulares utilizadas nesse estudo já está bem definido. Os resultados da curva dose-resposta da bicalutamida nas duas linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata e respectivos IC50 obtidos encontram-se apresentados na figura 1.

Figura 1 - Curvas dose-resposta da bicalutamida em linhagens de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP e PC3).



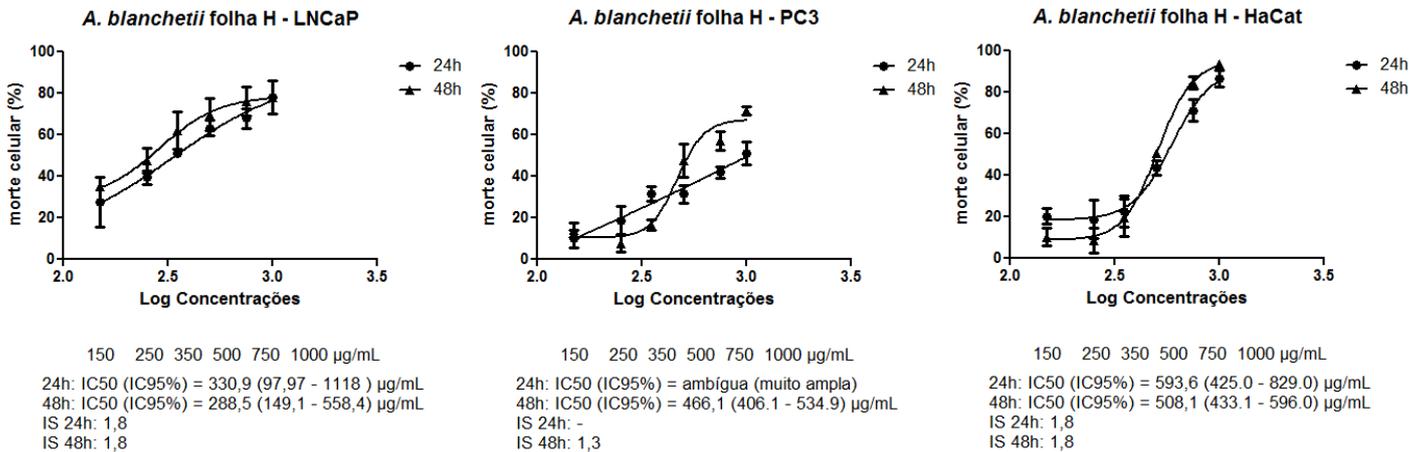
CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em µM (intervalo de confiança de 95%).
IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

4.1.1 *Allamanda blanchetii*

a) *Allamanda blanchetii* extrato hexânico da folha

O efeito citotóxico desse extrato mostrou-se dose dependente nos tempos de 24 e 48h em ambas linhagens celulares. A concentração desse extrato que inibiu 50% da proliferação celular (IC50) foi calculada e está apresentada na figura 2. A razão da IC50 obtida nas células controle (HaCat, queratinócitos) e nas células de câncer (IS) revelou que o efeito citotóxico desse extrato seja 1,8 vezes mais seletivo para a célula LNCaP do que para a célula controle.

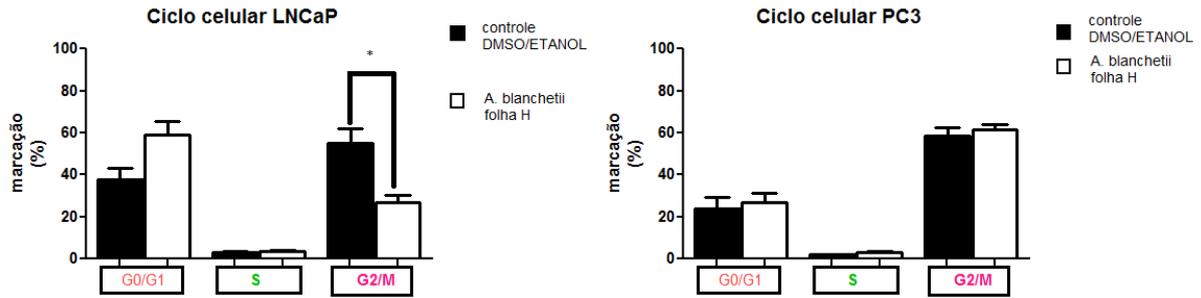
Figura 2 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato hexânico (H) da folha da *Allamanda blanchetii* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.



CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em µg/mL (intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

Na análise do ciclo celular, o extrato na linhagem LNCaP induziu um aumento de células marcadas em G0/G1 e diminuição significativa de células marcadas em G2/M ($p < 0,05$). Para a linhagem PC3, não houve diferença em relação ao controle (figura 3).

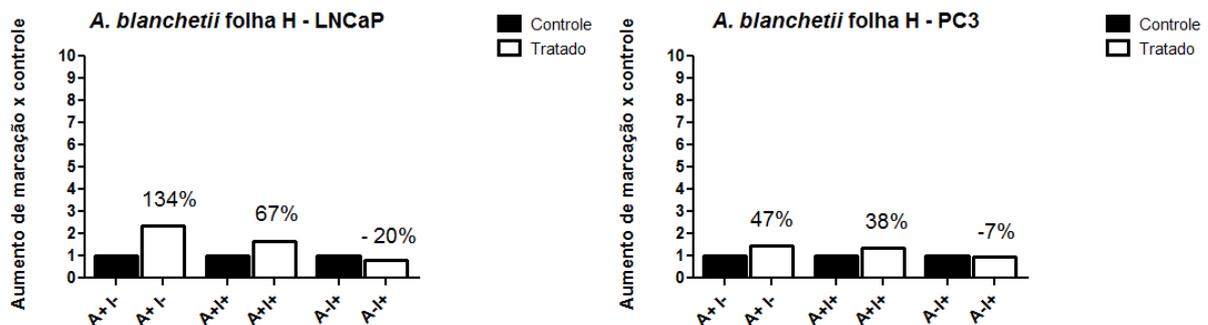
Figura 3 - Efeito do extrato hexânico (H) da folha da *Allamanda blanchetii* sobre o ciclo celular em linhagens de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP e PC3)



* $P < 0,05$, calculado por ANOVA com teste *post-hoc* Turkey. G0/G1, S, G2/M: fases do ciclo celular.

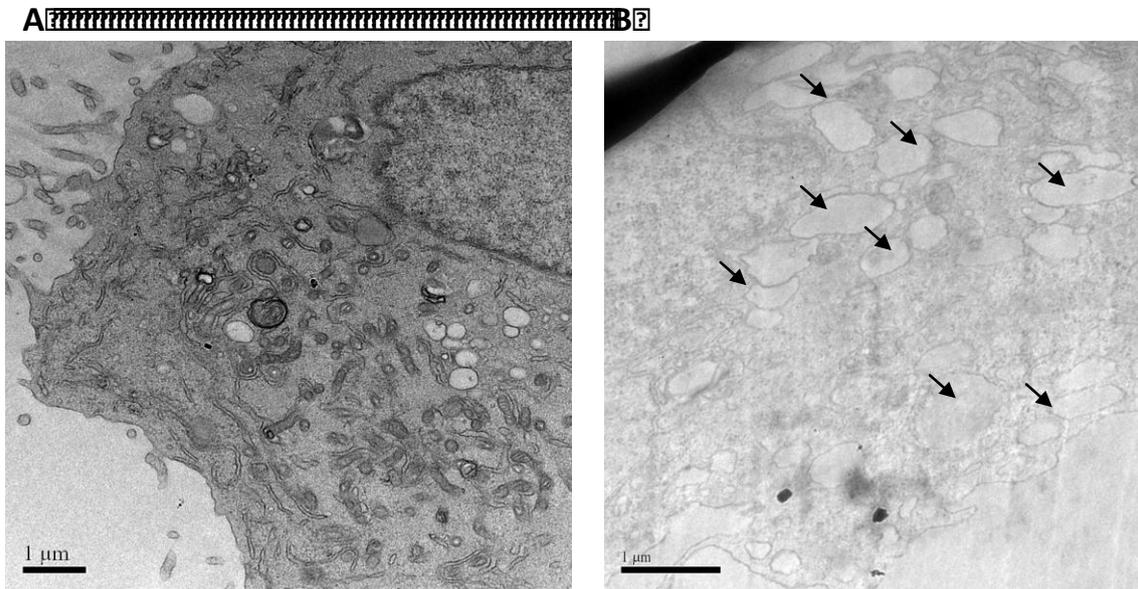
Na análise do perfil de morte celular por citometria de fluxo, o tratamento com esse extrato resultou em aumento da marcação com anexina em relação ao controle (aumento de 134 % em LNCaP e de 47% em PC3) e também da na marcação com anexina+iodeto (de 67% em LNCaP e 38% em PC3), o que sugere tendência a aumento de apoptose inicial e tardia, respectivamente (figura 4).

Figura 4 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato hexânico da *Allamanda blanchetii* em linhagens de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP e PC3)



Em complementação aos resultados da citometria de fluxo, foram verificadas à microscopia eletrônica alterações morfológicas nas células PC3 tratadas com esse extrato, sugestivas de processo apoptótico, como o aumento da vacuolização do citoplasma e redução do número de organelas. (Figura 5)

Figura 5 - Aspecto de células da linhagem PC3 (adenocarcinoma de próstata humano resistente a androgênios) à microscopia eletrônica de transmissão antes (A) e após 6 horas de tratamento com extrato hexânico da folha da *Allamanda blanchetii* (B).

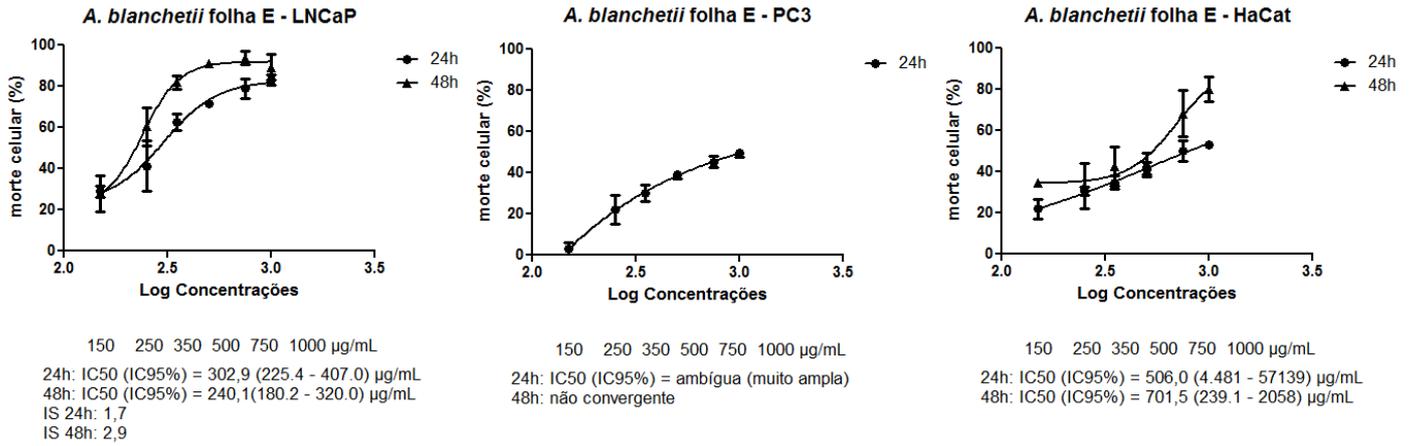


A: morfologia celular normal (PC3 - aumento 10K), evidenciando núcleo, mitocôndria, retículo e alguns vacúolos); **B:** aspecto celular após tratamento. Observa-se aumento da vacuolização do citoplasma. Núcleo não visualizado. (PC3 - Aumento 25K).

b) *Allamanda blanchetii* extrato etanólico da folha

Esse extrato, nas concentrações de 150 a 1000µg/mL mostrou resposta citotóxica dose dependente nos tempos de 24 e 48h nas células LNCaP, porém apenas em 24h nas células PC3, e, portanto, foi excluída nos experimentos seguintes para esta linhagem celular. Foi possível o cálculo da IC₅₀, e, considerando o IC₅₀ da célula controle (HaCat, queratinócitos) foi calculado o IS. Esse extrato também se mostrou mais seletivo para as células LNCaP do que para a célula controle (figura 6).

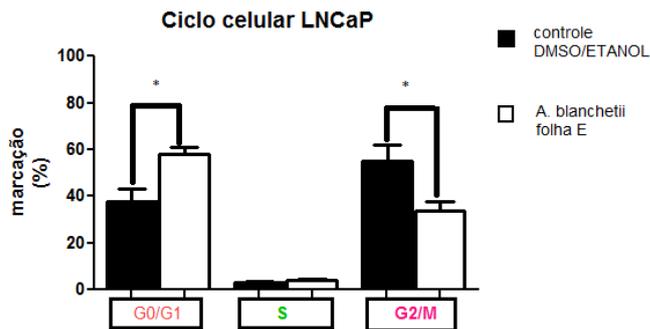
Figura 6 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) da folha da *Allamanda blanchetii* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.



CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em µg/mL(intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

Na análise do efeito sobre o ciclo celular, na linhagem LNCaP o tratamento resultou em aumento estatisticamente significativo de células marcadas em G0/G1 ($p < 0,05$) e diminuição de células marcadas em G2/M ($p < 0,05$), o que sugere tendência a estacionar o ciclo celular na fase de G0/G1 (figura 7)

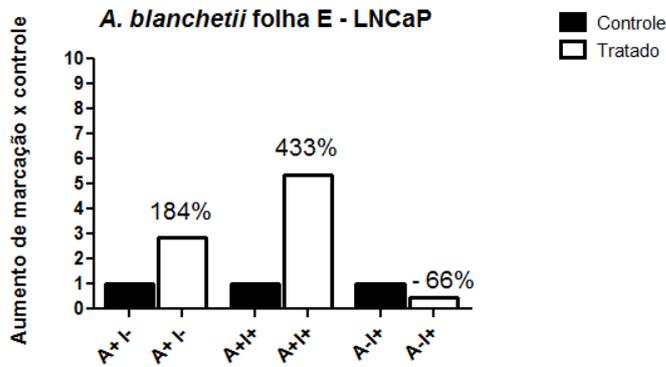
Figura 7 - Efeito do extrato etanólico (E) da folha da *Allamanda blanchetii* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



* $P < 0,05$, calculado por ANOVA com teste *post-hoc* Turkey. G0/G1, S, G2/M: fases do ciclo celular.

No perfil de morte celular realizado apenas nas células LNCaP, este extrato resultou em aumento importante da marcação com anexina em relação ao controle (184%) também da marcação com anexina+iodeto (433% em LNCaP), mostrando indução de apoptose inicial e tardia (figura 8).

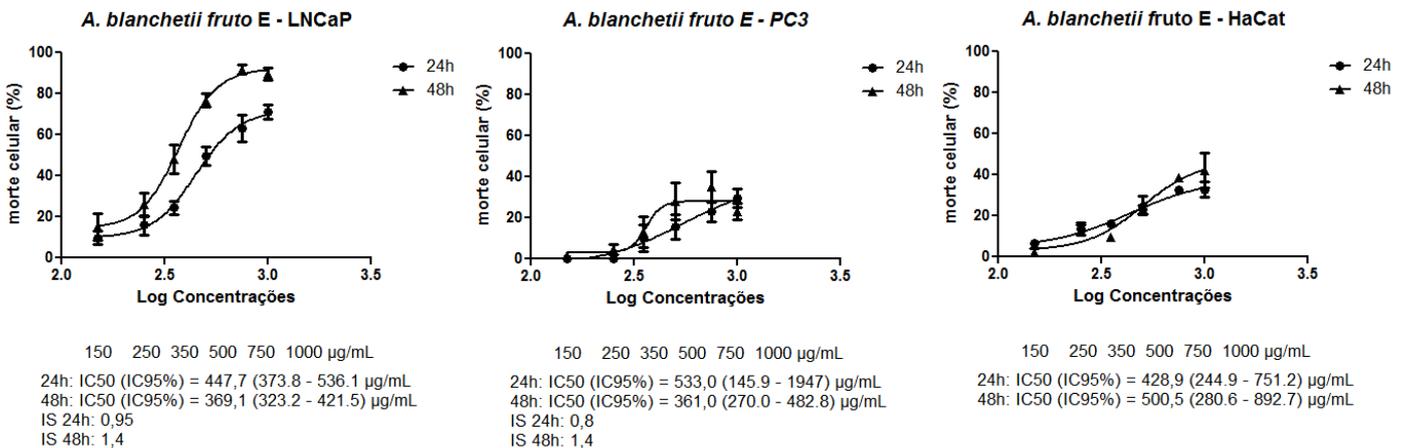
Figura 8 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico (E) da folha da *Allamanda blanchetii* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



c) *Allamanda blanchetii* extrato etanólico do fruto

Nas concentrações de 150 a 1000µg/mL, esse extrato também mostrou resposta citotóxica dose dependente nos tempos de 24 e 48h para a LNCaP, sem resposta significativa para a PC3, portanto, esse extrato foi excluído dos experimentos seguintes para esta linhagem. A estimativa dos IC50 e IS encontram-se apresentadas na figura 9, tendo evidenciado também maior seletividade para as células cancerígenas.

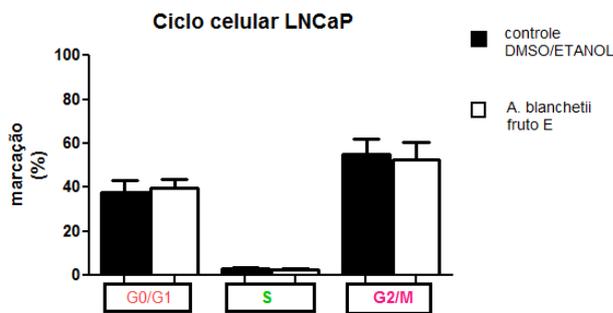
Figura 9 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) do fruto da *Allamanda blanchetii* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.



CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

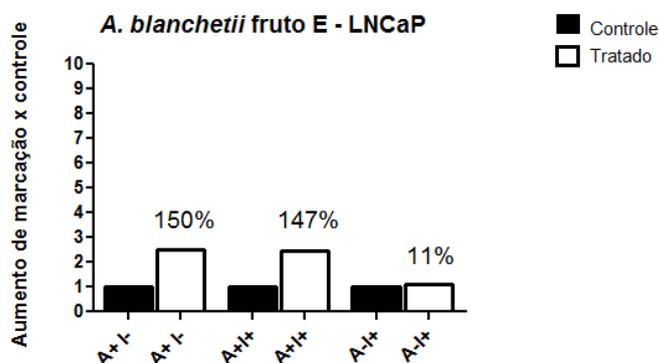
Esse extrato não induziu diferença no ciclo celular das células LNCaP (figura 10), porém induziu aumento da apoptose inicial (anexina 150%) e tardia (anexina+ iodeto 147%) nessas células (figura 11).

Figura 10 - Efeito do extrato etanólico (E) do fruto da *Allamanda blanchetii* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



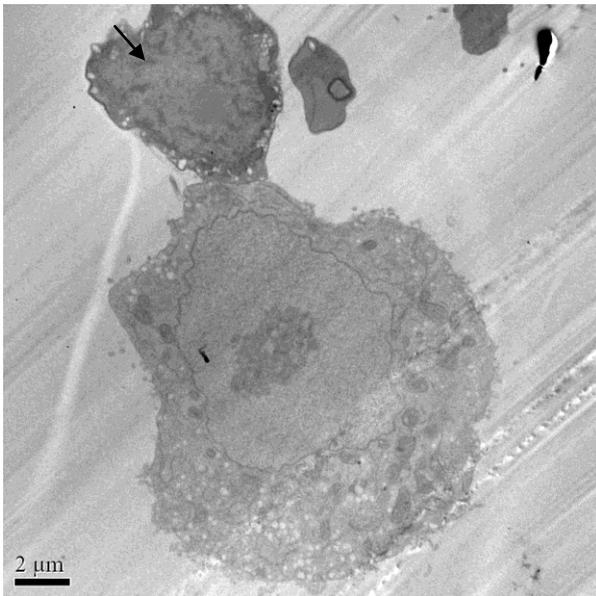
* $P < 0,05$, calculado por ANOVA com teste *post-hoc* Turkey. G0/G1, S, G2/M: fases do ciclo celular.

Figura 11 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico do fruto da *Allamanda blanchetii* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



Complementando esses achados, por meio de microscopia eletrônica de transmissão foram identificadas alterações morfológicas nas células LNCaP após 6 horas de tratamento com o extrato etanólico do fruto da *A. Blanchetii*, conforme apresentado na figura 12.

Figura 12 - Aspecto de células da linhagem LNCaP (adenocarcinoma de próstata humano sensível a andrógenos) à microscopia eletrônica de transmissão após 6 horas de tratamento com extrato etanólico do fruto da *Allamanda blanchetii* (B).

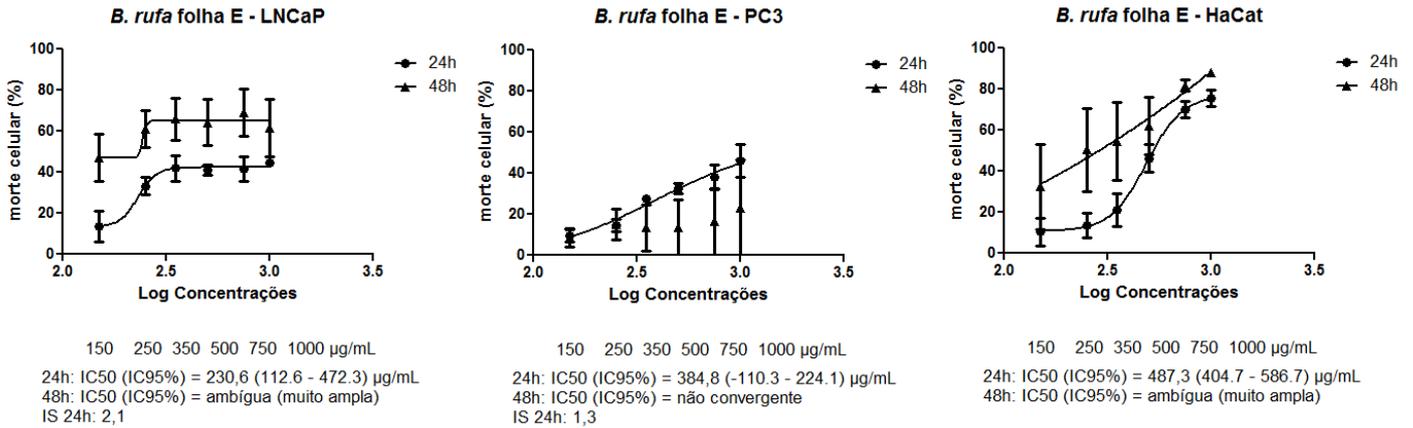


Na parte inferior da imagem, observa-se uma célula com aparência normal, porém apresentando grau de vacuolização do citoplasma aparentemente maior do que o normal. Na parte superior, há uma célula com aspecto francamente compatível com estágios finais de apoptose, com núcleo apresentando regiões de cromatina condensada, citoplasma bastante eletrodense e com muitos vacúolos. (LNCaP - Aumento a imagem 6K).

4.1.2 *Bauhinia rufa*

O extrato etanólico da folha da *Bauhinia rufa* também apresentou resposta citotóxica dose dependente nos tempos de 24 e 48h em ambas linhagens celulares, com definição das IC50 e maior seletividade para as células cancerígenas do que para a célula controle (figura 13).

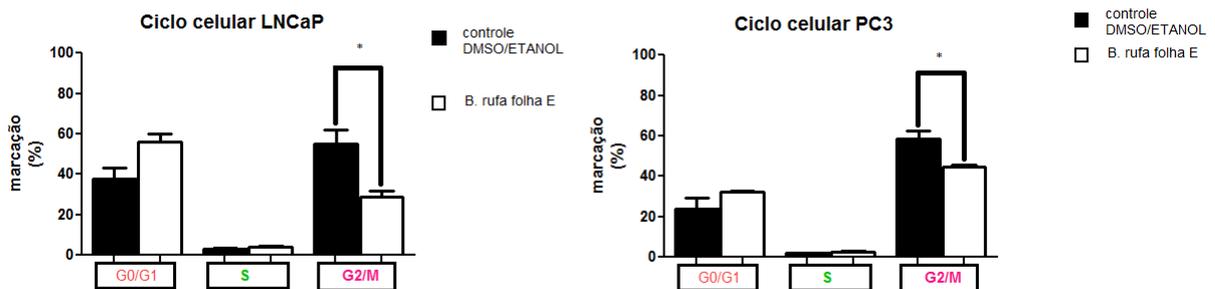
Figura 13 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) da folha da *Bauhinia rufa* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.



CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em µg/mL (intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

Em ambas linhagens, houve tendência a aumento de células marcadas em G0/G1 e diminuição significativa de células marcadas em G2/M, tendendo a estacionar o ciclo celular na fase de G0/G1 (figura 14).

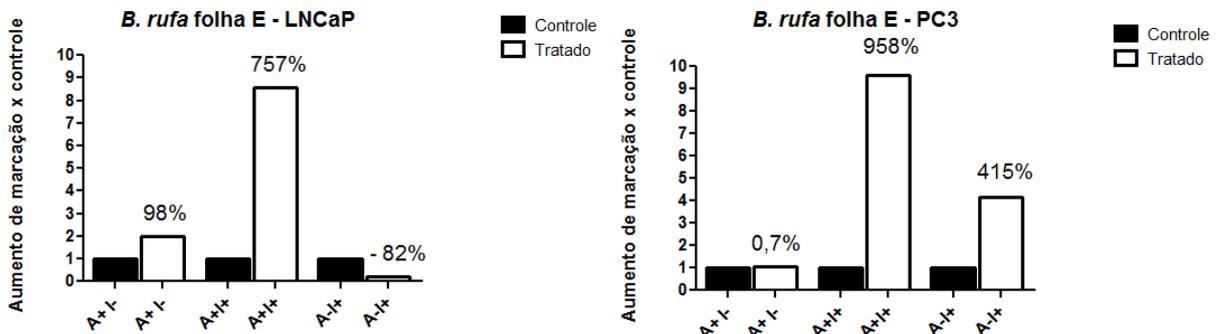
Figura 14 - Efeito do extrato etanólico (E) da folha da *Bauhinia rufa* sobre o ciclo celular em linhagens de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP e PC3)



* $P < 0,05$, calculado por ANOVA com teste *post-hoc* Turkey. G0/G1, S, G2/M: fases do ciclo celular.

A análise do perfil de morte celular mostrou que esse extrato induziu tendência a aumento discreto da apoptose inicial e grande aumento da apoptose tardia em células LNCaP (aumento da marcação com anexina de 98% e anexina+iodeto de 757%, respectivamente). Nas células PC3, observou-se aumento de apoptose tardia (anexina+ iodeto 958%) e necrose (415% na marcação com iodeto) (figura 15).

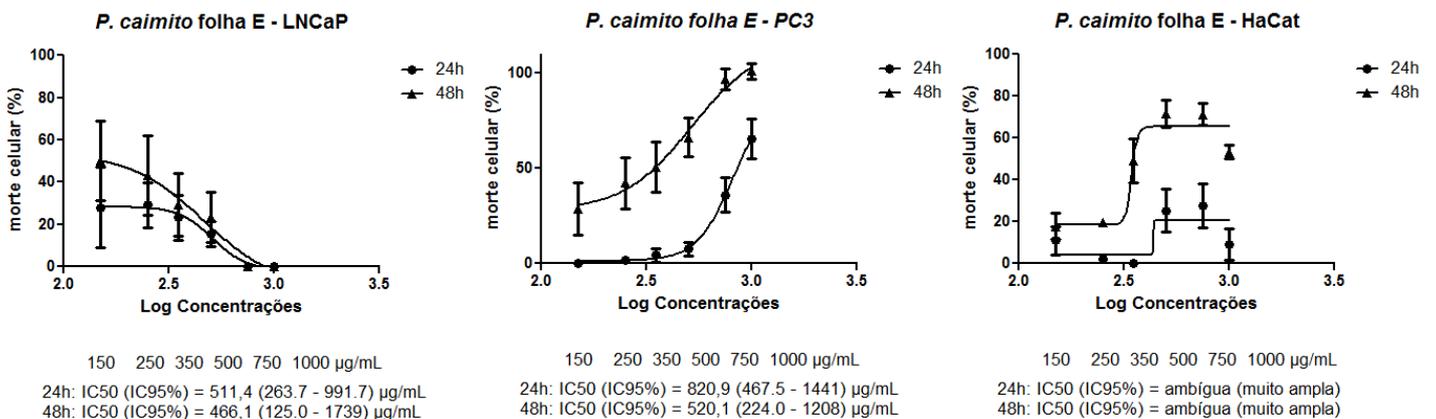
Figura 15 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico da folha da *Bauhinia rufa* em linhagens de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP e PC3)



4.1.3 *Pouteria caimito*

O extrato etanólico da folha da *Pouteria caimito*, embora tenha preenchido inicialmente os critérios de citotoxicidade, curiosamente, apresentou resposta inversa, com diminuição do percentual de células inviáveis com o aumento da concentração de extrato nas células LNCaP. Por esse motivo, esse extrato foi excluído dos experimentos seguintes para esta linhagem. Para as células PC3, entretanto, foi observado resposta dose dependente em 24h e 48 h, com determinação do IC50 e IS. O efeito mostrou-se mais seletivo para essa linhagem celular cancerígena do que para a célula controle (figura 16)

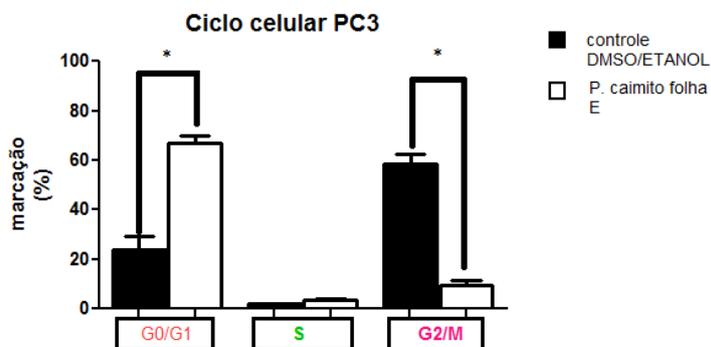
Figura 16 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) da folha da *Pouteria caimito* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.



CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

O tratamento nas células PC3 resultou em aumento de células marcadas em G0/G1 e diminuição de células marcadas em G2/M, tendendo a estacionar o ciclo celular na fase de G0/G1 (figura 17)

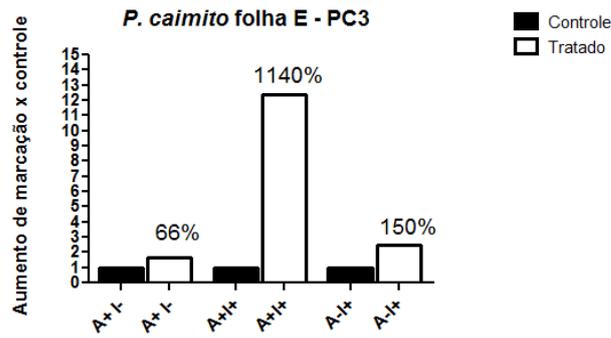
Figura 17 - Efeito do extrato etanólico (E) da folha da *Pouteria caimito* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (PC3)



* $P < 0,05$, calculado por ANOVA com teste *post-hoc* Turkey. G0/G1, S, G2/M: fases do ciclo celular.

Observou-se também nessa linhagem, aumento mais expressivo da marcação com anexina+iodeto (1140%), sugerindo tendência a aumento de apoptose tardia. (figura 18)

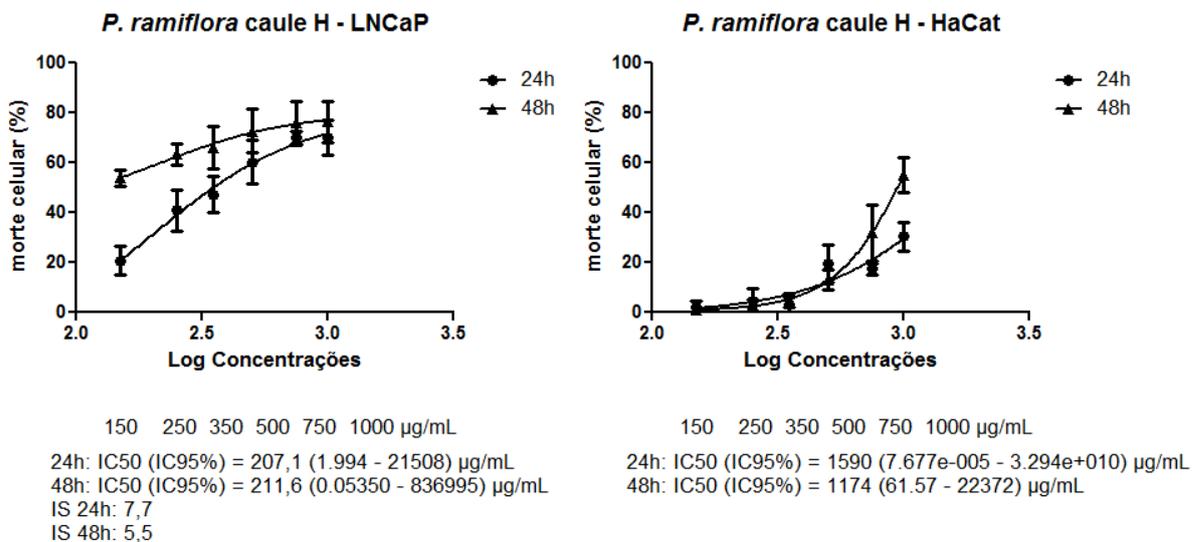
Figura 18 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico (E) da folha da *Pouteria caimito* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (PC3)



4.1.4 *Pouteria ramiflora*

O extrato hexânico do caule da *Pouteria ramiflora* demonstrou efeito citotóxico dose dependente nos tempos de 24 e 48h para a LNCaP, porém não apresentou efeito para as células PC3, sendo assim excluído dos experimentos seguintes com essa linhagem. O cálculo dos IC50 e do IS estão apresentados na figura 19.

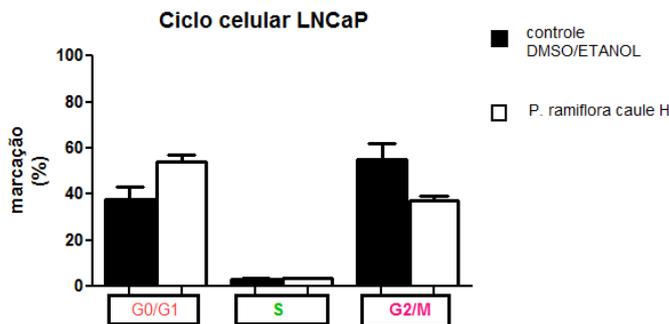
Figura 19 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato hexânico (H) do caule da *Pouteria ramiflora* em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.



CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em µg/mL (intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

Na linhagem LNCaP, houve aumento de células marcadas em G0/G1 e diminuição de células marcadas em G2/M, tendendo a estacionar o ciclo celular na fase de G0/G1 (figura 20).

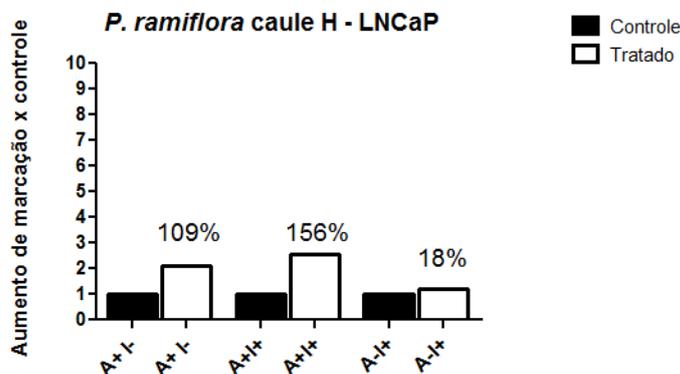
Figura 20 - Efeito do extrato hexânico (H) do caule da *Pouteria ramiflora* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



*P<0,05, calculado por ANOVA com teste *post-hoc* Turkey. G0/G1, S, G2/M: fases do ciclo celular.

Observou-se ainda que este extrato induziu aparente aumento da marcação com anexina em relação ao controle (109 %) e com anexina+iodeto (156%), sugerindo tendência a aumento da apoptose inicial e tardia em LNCaP (figura 21)

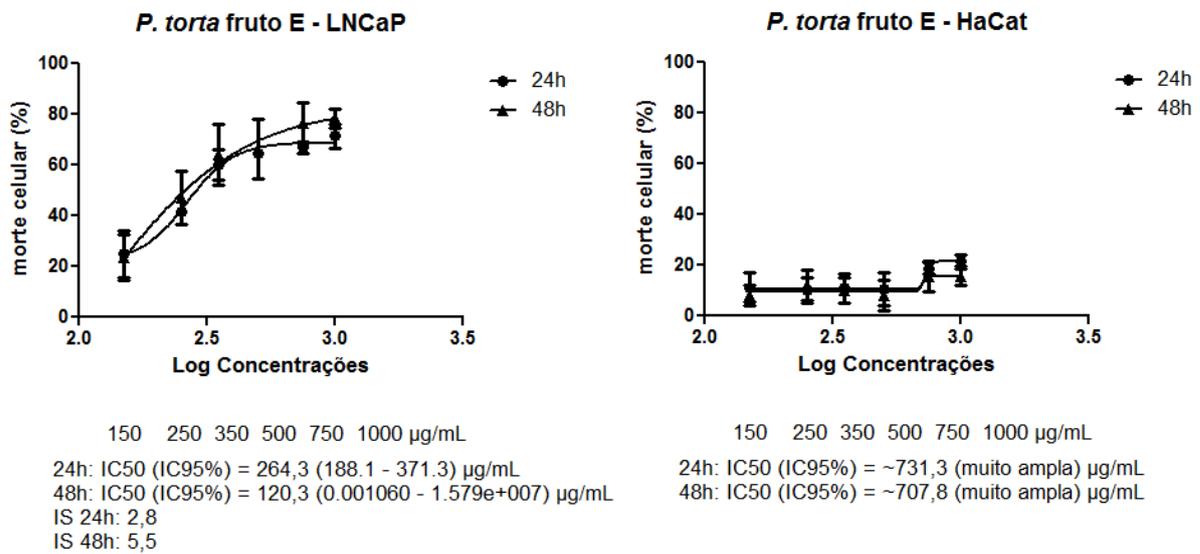
Figura 21 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato hexânico (H) do caule da *Pouteria ramiflora* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



4.1.5 *Pouteria torta*

O extrato etanólico do fruto da *Pouteria torta* apresentou resposta citotóxica dose dependente nos tempos de 24 e 48h para a LNCaP, tendo definidos as IC50 e IS (figura 22).

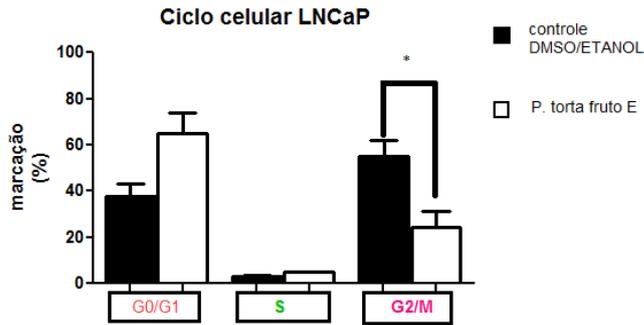
Figura 22 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) do fruto da *Pouteria torta* em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.



CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em µg/mL (intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

Houve aumento de células marcadas em G0/G1 e diminuição estatisticamente significativa de células marcadas em G2/M, tendendo a estacionar o ciclo celular na fase de G0/G1 (figura 23).

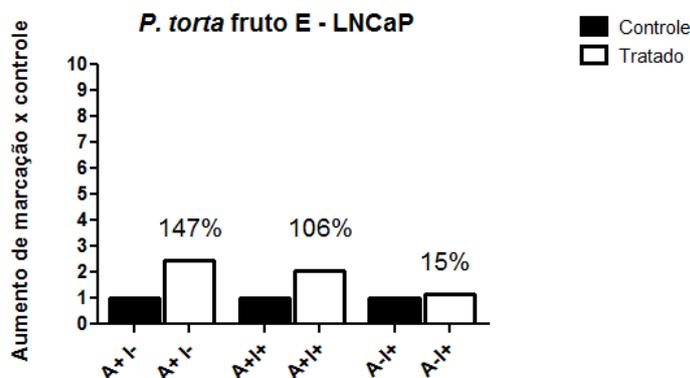
Figura 23 - Efeito do extrato etanólico (E) do fruto da *Pouteria torta* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



* $P < 0,05$, calculado por ANOVA com teste *post-hoc* Turkey. G0/G1, S, G2/M: fases do ciclo celular.

Houve aumento da marcação com anexina (147%) e anexina+iodeto (106%), sugerindo tendência a apoptose inicial e tardia (figura 24)

Figura 24 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico (E) do fruto da *Pouteria torta* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)

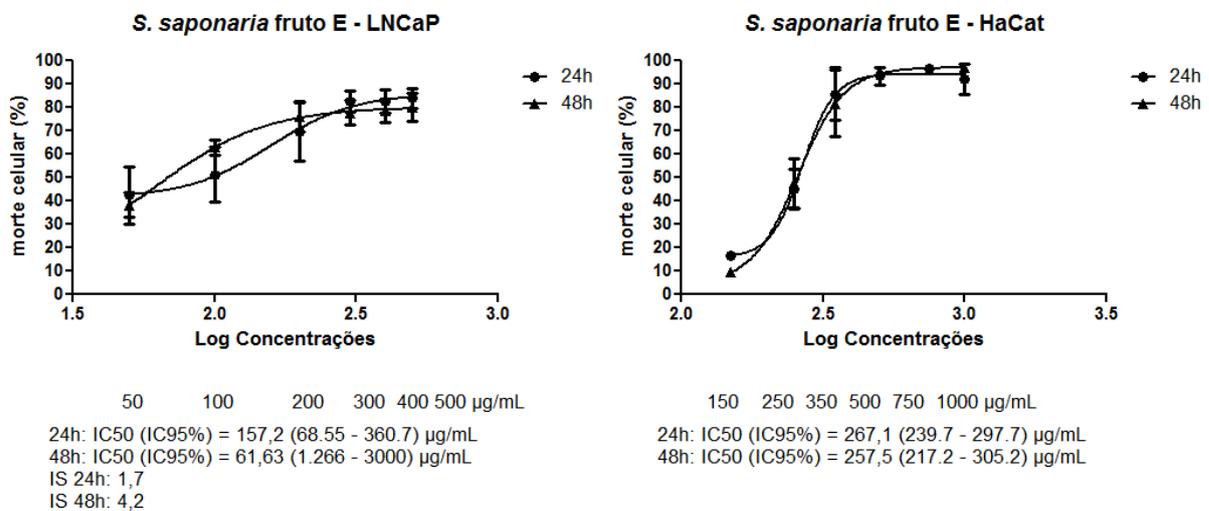


4.1.6 *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis*

O extrato etanólico do fruto da *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis* apresentou inicialmente intenso efeito citotóxico (próximo de 100%) no tratamento das duas linhagens celulares cancerígenas, em 24h e 48h, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ (apêndice). Devido a esse efeito inicial, a curva dose-resposta na linhagem LNCaP foi realizada com o extrato nas concentrações de 50 a 500 $\mu\text{g/mL}$ e evidenciou efeito dose dependente nos tempos de 24 e 48h, com cálculo de IC50 e IS (figura 25). Entretanto, para as células PC3, a curva foi

realizada com o extrato nas concentrações habituais, isto é, 150 a 1000µg/mL. Uma vez que não foi possível repetir esse experimento e que a diferença nas concentrações de extrato utilizadas nas duas linhagens celulares pode comprometer a interpretação dos resultados, a linhagem PC3 foi excluída dos os experimentos seguintes.

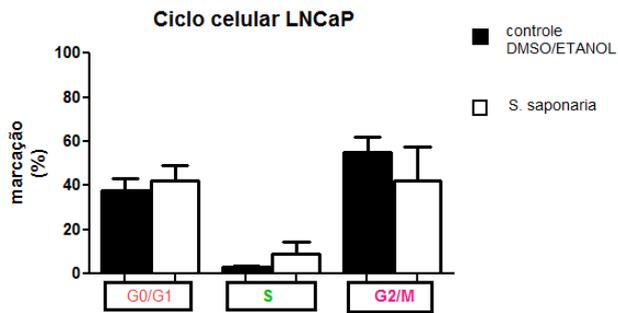
Figura 25 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato etanólico (E) do fruto da *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis* em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (LNCaP e PC3) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.



CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em µg/mL(intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

Não houve mudança no perfil do ciclo celular das células LNCaP após tratamento (figura 26).

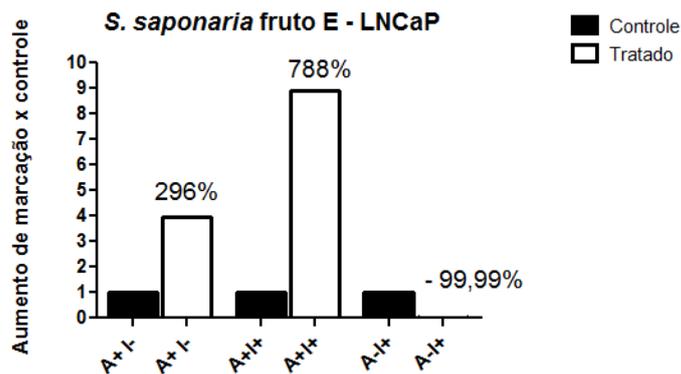
Figura 26 - Efeito do extrato etanólico (E) do fruto da *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis* sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



* $P < 0,05$, calculado por ANOVA com teste *post-hoc* Turkey. G0/G1, S, G2/M: fases do ciclo celular.

Na análise do perfil de morte celular o tratamento com esse extrato aumentou a marcação com anexina (296 %) e também com anexina+iodeto (788%), sugerindo tendência a aumento de apoptose inicial e tardia (figura 27)

Figura 27 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato etanólico (E) do fruto da *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis* em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



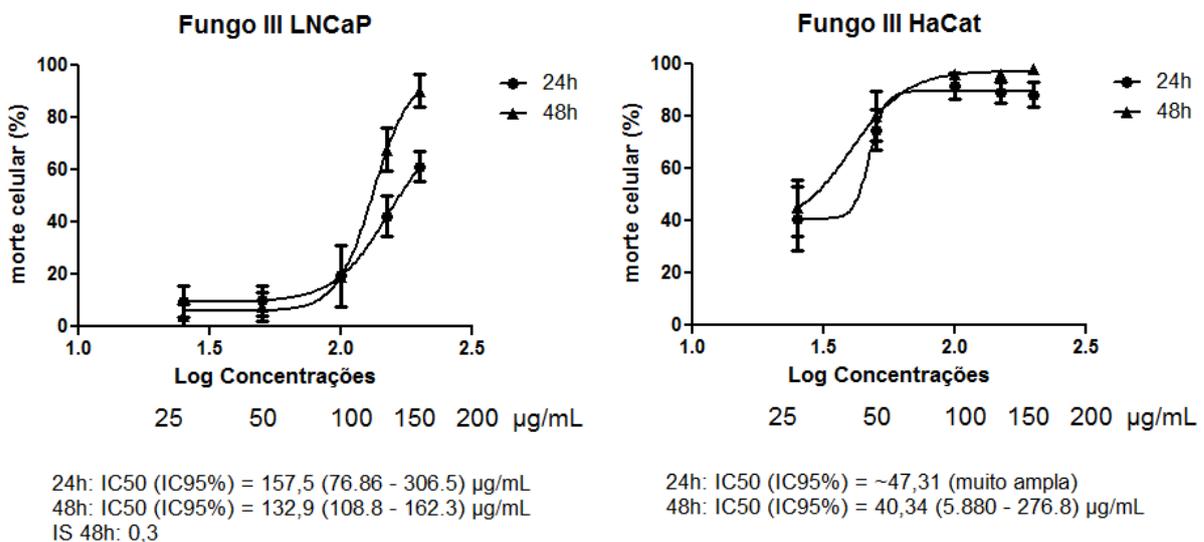
4.2 Análise das curvas dose-reposta, efeitos sobre o ciclo celular e padrão de morte celular induzidos pelos extratos de fluido de cultivo de fungos endofíticos da *Bauhinia variegata*

No teste de citotoxicidade inicial, dentre os extratos de 11 fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* e de 4 fungos filamentosos isolados do solo do Cerrado na região Centro-Oeste do Brasil investigados, apenas 4 apresentaram efeito citotóxico maior que 50% e sustentado em 24 e 48 horas (tabela 3) (apêndice). Os resultados dos demais experimentos realizados em 3 desses 4 extratos selecionados (fungos endofíticos III, VII e IX) estão apresentados a seguir. O extrato do fungo isolado do solo do Cerrado *Phaecilomyces lilacinus* não foi submetido às análises de curva dose-resposta, do ciclo celular e padrão de morte celular pois a quantidade de extrato disponível era insuficiente.

4.2.1 Fungo III

O tratamento com extrato do fluido de cultivo do fungo III em células LNCaP resultou em efeito dose dependente, após 24 e 48 h de tratamento, nas concentrações de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$ e foi calculado o IC50 do mesmo. Entretanto, observou-se que citototoxicidade era maior nas células controle (HaCat, queratinócitos) do que nas células cancerígenas, configurando assim seletividade inversa, o que levou à exclusão desse extrato dos experimentos seguintes (figura 28).

Figura 28 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato do fluido de cultivo do fungo III em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.

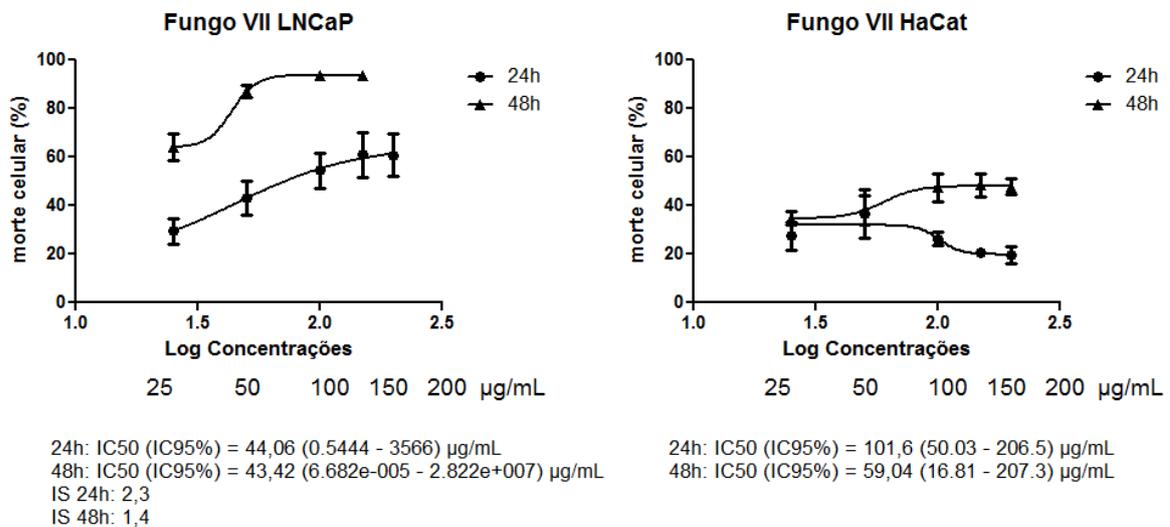


CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

4.2.2 Fungo VII

O extrato do fluido de cultivo do fungo VII mostrou efeito citotóxico dose dependente em 24 e 48h, nas concentrações de 25 a 200 $\mu\text{g/mL}$ mostrou resposta dose dependente nos tempos de 24 e 48h, com determinação das IC50 e IS, porém observou-se pouca diferença na seletividade do efeito sobre as células cancerígenas e controle. (figura 29)

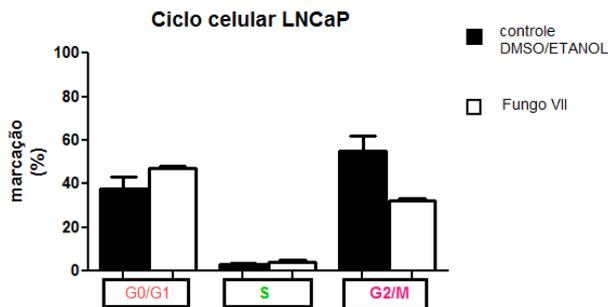
Figura 29 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato do fluido de cultivo do fungo VII em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.



CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

Houve tendência a aumento de células marcadas em G0/G1 e diminuição de células marcadas em G2/M, após tratamento com esse extrato, porém sem significância estatística (figura 30).

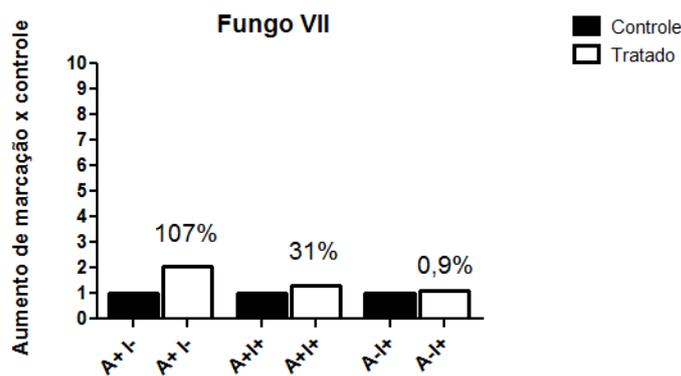
Figura 30 - Efeito do extrato do fluido de cultivo do fungo VII sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



*P<0,05, calculado por ANOVA com teste *post-hoc* Turkey. G0/G1, S, G2/M: fases do ciclo celular.

Houve aumento discreto da marcação com anexina (107 %) em LNCaP, sugerindo possível apoptose inicial, porém sem modificação importante que sugerisse apoptose tardia (anexina+iodeto 31%; iodeto 0,9%) (figura 31).

Figura 31 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato do fluido de cultivo do fungo VII em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)

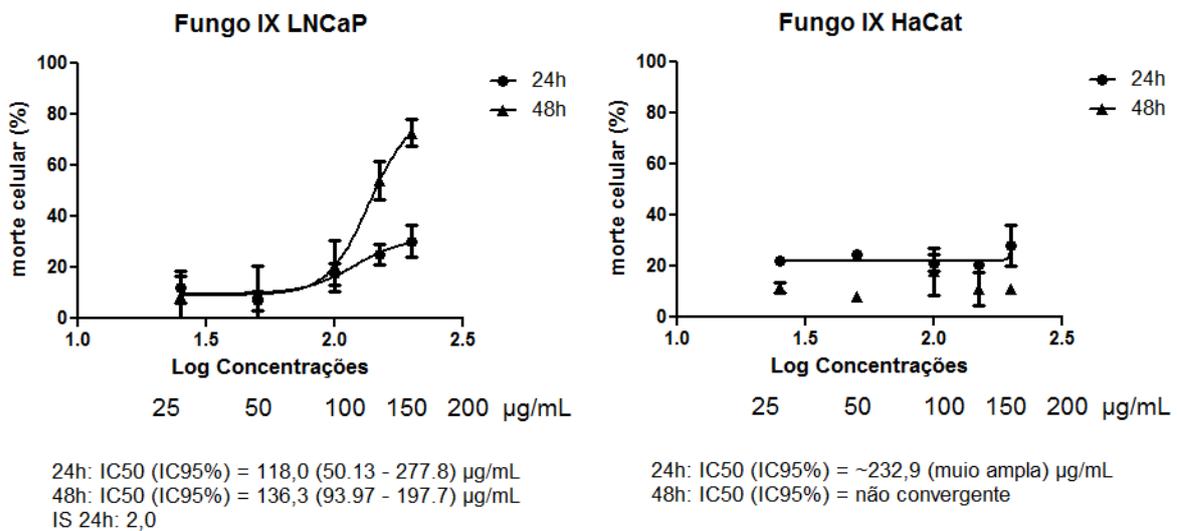


4.2.3 Fungo IX

O extrato do fluido de cultivo do fungo IX demonstrou resposta citotóxica dose dependente, nos tempos de 24 e 48h, nas concentrações de 25 a 200µg/mL, com cálculo de IC50 na linhagem LNCaP. Verificou-se também que o efeito citotóxico do extrato na

linhagem controle (HaCat) foi mais discreto e independente da concentração do extrato, com seletividade maior para a linhagem cancerígena (figura 32).

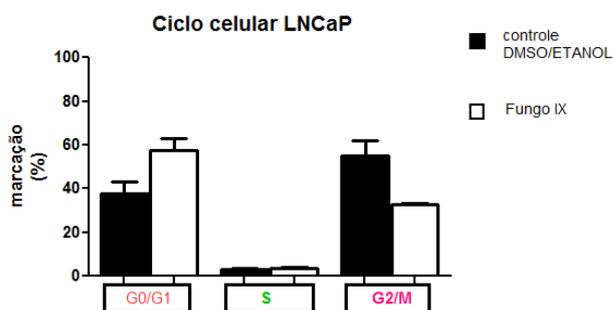
Figura 32 - Curvas dose-resposta do efeito citotóxico do extrato do fluido de cultivo do fungo IX em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata (LNCaP) e queratinócitos humanos (HaCaT) tratadas por 24 e 48 horas.



CI50 (CI95%): concentração inibitória de 50% da proliferação celular em µg/mL (intervalo de confiança de 95%). IS: índice de seletividade. Percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3 utilizado como solvente.

Houve tendência a aumento de células marcadas em G0/G1 e diminuição de células marcadas em G2/M, porém sem significância estatística (figura 33).

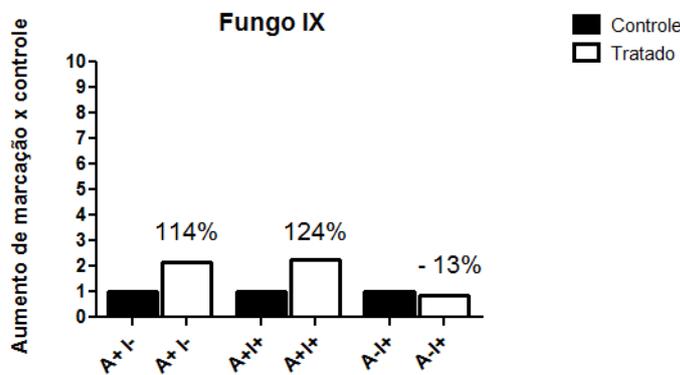
Figura 33 - Efeito do extrato do fluido de cultivo do fungo IX sobre o ciclo celular em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



*P<0,05, calculado por ANOVA com teste *post-hoc* Turkey. G0/G1, S, G2/M: fases do ciclo celular.

Observou-se também aumento da marcação com anexina (114 %) e com anexina+iodeto (124%) em LNCaP, sugerindo aumento de apoptose inicial e tardia (figura 34).

Figura 34 - Perfil de morte celular induzido pelo extrato do fluido de cultivo do fungo IX em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP)



4.3 Resultados das análises de Cromatografia de Camada Delgada de extratos de plantas selecionados

Os extratos selecionados foram submetidos à CCD e comparados aos padrões de compostos disponíveis para esse estudo: acetato de lupeíla, acetato de α amirina, lupeol, friedelenol, ácido oleanóico e a mistura de estigmasterol + sitosterol. Os compostos encontrados a partir da comparação com os padrões foram, acetato de lupeíla e friedelenol **no extrato hexânico do caule da *Pouteria ramiflora*** e acetato de lupeíla e acetato de α amirina **no extrato etanólico do fruto da *Pouteria torta***.

4.3 Sumário dos resultados (Tabelas 6 e 7)

Tabela 6 - Sumário dos principais parâmetros de citotoxicidade observados após tratamento com extratos de plantas e fluidos de cultivo de fungo em células LNCaP

Extrato	IC50 24h ¹ (IC95%)	IC50 48h ¹ (IC95%)	IS ² 24h	IS ² 48h	Repressão do Ciclo celular ³	Morte celular ⁴	Compostos Identificados ⁵
<i>Alamanda blanchetii</i> folha H	330,9 (97,97 – 1118)	288,5 (149,1 – 558,4)	1,8	1,8	G2/M p<0,05	ApI +134% ApT + 67% Nec - 20%	-
<i>Alamanda blanchetii</i> folha E	302,9 (225,4 – 320,0)	240,1 (180,2 – 320,0)	1,7	2,9	G0/G1 e G2/M p<0,05	ApI +184% ApT +433% Nec - 66%	-
<i>Alamanda blanchetii</i> fruto E	447,7 (373,8 – 536,1)	369,1 (323,2 – 421,5)	0,95	1,4	-	ApI +150% ApT +147% Nec +11%	-
<i>Bauhinia rufa</i> folha E	230,6 (112,6 – 472,3)	-	2,1	-	G2/M p<0,05	ApI +98% ApT +757% Nec -82%	-
<i>Pouteria ramiflora</i> caule H	207,1 (1,994 – 21508)	211,6 (0,05350 – 836995)	7,7	5,5	-	ApI +109% ApT +156% Nec +18%	acetato de lupeíla e friedelenol
<i>Pouteria torta</i> fruto E	264,3 (188,1 – 371,3)	120,3 (0,001060 – 1,579e+007)	2,8	5,5	G2/M p<0,05	ApI +147% ApT +106% Nec +15%	acetato de lupeíla e α amirina
<i>Sapindus saponaria</i> variedade <i>inaequalis</i> fruto E	157,2 (68,55 – 360,7)	61,63 (1,266 – 3000)	1,7	4,2	-	ApI +296% ApT +788% Nec -99,99%	-
Fungo III	153,5 (76,86 – 306,5)	132,9 (108,8 – 162,3)	-	0,3	-	-	-
Fungo VII	44,06 (0,5444 – 3566)	43,42 (6,682e-005 – 2,822e+007)	2,3	1,4	-	ApI +107% ApT +31% Nec +0,9%	-
Fungo IX	118,0 (50,13 – 277,8)	136,3 (93,97 – 197,7)	2,0	-	-	ApI +114% ApT +124% Nec -13%	-

1 Valores de IC50 (IC95%) expressos em $\mu\text{g/mL}$.

2 IS: Índice de seletividade.

3 Repressão da ativação do ciclo celular, expressa pelo aumento da proporção de células tratadas na fase G0/G1 e redução em G2/M, em relação às células não tratadas. P<0.05 determinado por ANOVA com teste post-hoc de Newman-Keuls.

4 Padrão de morte celular induzido pelos extratos, avaliados pela proporção de células marcadas com anexina (ApI: apoptose inicial), anexina+iodeto (ApT: apoptose tardia) ou iodeto (Nec: necrose), antes e após tratamento com os extratos, expressa em termos de incremento (+) ou redução (-) percentual.

5 Compostos identificados nos extratos por cromatografia de camada delgada (CCD).

Tabela 7 - Sumário dos principais parâmetros de citotoxicidade observados após tratamento com extratos de plantas em células PC3

Extrato	IC50 24h¹ (IC95%)	IC50 48h¹ (IC95%)	IS² 24h	IS²48h	Repressão do Ciclo celular³	Morte celular⁴	Compostos Identificados⁵
<i>Alamanda blanchetii</i> folha H	ambígua (muito ampla)	466,1 (406,1 – 534,9)	-	1,3	-	ApI +47% ApT + 38% Nec -7%	-
<i>Bauhinia rufa</i> folha E	384,8 (-110,3 – 224,1)	-	1,3	-	G2/M p<0,05	ApI +0,7% ApT +958% Nec +415%	-
<i>Pouteria caimito</i> folha E	820,9 (467,5 - 1441)	520,1 (224,0 - 1208)	-	-	G0/G1 e G2/M p<0,05	ApI +66% ApT +1140% Nec +150%	-

1 Valores de IC50 (IC95%) expressos em µg/mL.

2 IS: Índice de seletividade.

3 Repressão da ativação do ciclo celular, expressa pelo aumento da proporção de células tratadas na fase G0/G1 e redução em G2/M, em relação às células não tratadas. P<0.05 determinado por ANOVA com teste post-hoc de Newman-Keuls.

4 Padrão de morte celular induzido pelos extratos, avaliados pela proporção de células marcadas com anexina (ApI: apoptose inicial), anexina+iodeto (ApT: apoptose tardia) ou iodeto (Nec: necrose), antes e após tratamento com os extratos, expressa em termos de incremento (+) ou redução (-) percentual.

5 Compostos identificados nos extratos por cromatografia de camada delgada (CCD).

5 DISCUSSÃO

O câncer de próstata é um problema de saúde pública importante, devido à sua alta prevalência. Apesar da terapêutica disponível, ainda existem os casos em que o câncer progride a despeito do tratamento e se torna resistente à terapia considerada de primeira linha, baseada na privação de androgênios. Nos casos de câncer de próstata metastático, são poucas as opções terapêuticas e de alto custo, com poucas possibilidades de cura e alta taxa de mortalidade.

O conhecimento crescente sobre a fisiopatologia do câncer implica na busca de novos medicamentos e maior eficácia terapêutica com menor toxicidade. Nesse sentido, vem crescendo o número de estudos que buscam matéria-prima natural, tais como plantas e fungos presentes no meio ambiente, como fonte de novos compostos com potencial terapêutico.

O Brasil é o país que possui a flora mais diversa do mundo, considerada a mais rica, com mais de 55 mil espécies de plantas, totalizando 22% do total mundial. Foram catalogadas 44149 espécies para a flora brasileira, sendo 4382 algas, 32276 angiospermas, 1528 de briófitas, 4704 de fungos, 30 gimnospermas e 1229 samambaias e licófitas. Essas espécies são encontradas em biomas com características distintas, sendo eles, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (BRASIL, 2014b).

O cerrado possui enorme área ocupando 23,9% do território brasileiro, com grande biodiversidade e ainda pouco explorada (BRASIL, 2014b).

Ainda são escassos os estudos que avaliaram de maneira consistente o efeito de derivados vegetais *in vitro*, em linhagens de células de câncer prostático. O impacto científico e aplicação clínica da maioria desses estudos ainda é limitado. Entretanto, tem se observado um aumento crescente do número de estudos em diversas outras linhagens celulares de câncer, e ainda, de estudos sobre o efeito de alguns compostos encontrados em drogas vegetais sobre o câncer. Mais evidente ainda é a escassez de estudos que tenham avaliado efeitos de extratos de plantas e derivados de fungos provenientes do bioma Cerrado, da região central do Brasil.

No presente estudo foram analisadas plantas do tipo angiospermas, que são aquelas que possuem flores e frutos, a maioria do bioma cerrado, totalizando 31 extratos.

A seguir, estão apresentados os achados mais importantes do presente trabalho e discutidos baseados no conhecimento científico previamente existente.

Extrato hexânico do caule da *Pouteria ramiflora*

Dentre os extratos estudados para a linhagem de adenocarcinoma de próstata sensível a androgênios, LNCaP, o que mais se destacou foi o extrato hexânico do caule da *Pouteria ramiflora*. Esse extrato apresentou efeito citotóxico dose dependente, com o maior índice de seletividade para a linhagem LNCaP, tanto em 24h quanto em 48h de tratamento (7,7 e 5,5 respectivamente). Além disso, a análise do padrão de morte celular induzido por esse extrato mostrou aumento das células marcadas com anexina e anexina+IP, sugerindo que o extrato induz apoptose inicial e tardia. Entretanto, para confirmação da capacidade de induzir apoptose, outros experimentos podem ser realizados, como, por exemplo, um ensaio de caspases. Infelizmente, não foi possível obter imagens de microscopia de transmissão das células após tratamento com esse extrato, o que, contudo, não é absolutamente indispensável para confirmação. As células LNCaP tratadas com extrato hexânico do caule da *P. ramiflora* também mostraram tendência a estacionarem o ciclo na fase G0/G1, porém sem significância estatística. Outros estudos para verificar o efeito desse extrato sobre o ciclo celular são necessários para confirmação.

Outro aspecto que merece destaque é que nesse mesmo extrato hexânico do caule da *Pouteria ramiflora* foram identificados dois compostos: acetato de lupeíla e friedelenol. Chaturvedula e colaboradores (2004) também identificaram a presença de acetato de lupeíla em um extrato da planta *Solidago canadensis* L (*Asteraceae*) e verificaram que esse composto inibe a atividade liase da DNA polimerase beta (CHATURVEDULA *et al.*, 2004). A polimerase beta tem sido considerada um alvo terapêutico promissor no tratamento do câncer. Essa enzima facilita a sobrevivência das células do câncer diante de lesão ao seu DNA, agindo como um fator importante na resistência das células cancerígenas aos agentes antineoplásicos e à radioterapia, que causam lesão ao DNA. Assim, inibidores da polimerase beta tem sido estudados como agentes pró-apoptóticos para as células cancerígenas, que então tornam-se mais sensíveis a lesões irreversíveis ao seu DNA induzidos pela terapia antineoplásica tradicional (BARAKAT, GAJEWSKI, TUSZYNSKI, 2012).

Segundo Chaturvedula e colaboradores (2004), o acetato de lupeíla apresentou citotoxicidade em linhagem celular de câncer ovariano A2728, apresentando um IC50 de 22,6µg/mL (CHATURVEDULA *et al.*, 2004).

Um estudo prévio mostrou um efeito citotóxico do friedelenol isolado da planta *P. bistorta* em linhagem de câncer de próstata resistente PC3 e U251 glioblastoma neuronal humano. Entretanto, no presente estudo o extrato da *P. ramiflora* em que foi evidenciado o friedelenol não apresentou boa resposta para a linhagem PC3 (MANOHARAN *et al.*, 2007).

Segundo Castro e colaboradores (2007), os extratos brutos das folhas etanólico e aquoso de *P. torta* e o etanólica da *P. ramiflora* apresentaram atividade antioxidante maior do que o composto BHT que usado como controle (CASTRO *et al.*, 2007).

Extratos etanólicos do fruto da *P. torta* e da folha da *B. Rufa*

Os extratos etanólicos do fruto da *P. torta* e da folha da *B. rufa* também apresentaram efeito citotóxico mais de 2 vezes mais seletivo para a linhagem LNCaP em comparação à linhagem de queratinócitos normais. Esses extratos também resultaram em repressão significativa do ciclo celular na linhagem LNCaP e indução importante de apoptose. Interessantemente, também foi identificado acetato de lupeíla no extrato da *P. torta*, o mesmo composto com potencial inibidor da polimerase beta encontrado no extrato da *P. ramiflora*. O achado desse composto em dois dos extratos cujos efeitos citotóxicos foram dos mais significativos identificados no presente estudo torna-os excelentes candidatos a estudos subsequentes, por exemplo, para verificação de possível atividade inibidora da DNA polimerase beta. Em hipótese, esse seria um mecanismo possível do efeito citotóxico e pró-apoptótico dos extratos isolados dessas plantas, a ser melhor investigado.

Em um estudo anterior, Elias e colaboradores (2014) já haviam identificado potencial atividade anticancerígena de extratos da *P. torta*. Nesse trabalho, extratos da folha, aquosos, etanólicos e hexânicos apresentaram atividade citotóxica em linhagens de câncer oral e de mama. O extrato hexânico mostrou resposta dose dependente em ambas linhagens. Os extratos aquoso e etanólico induziram apoptose para a linhagem de adenocarcinoma de mama e o extrato hexânico, para a linhagem de carcinoma de células escamosas oral (ELIAS, *et al.*, 2014). Os achados aqui descritos corroboraram o potencial anticancerígeno da planta, uma vez que houve evidência sustentada de efeito citotóxica do extrato E do fruto da *P. torta* para as células LNCaP. Esse efeito foi tempo e dose dependente, com elevado índice de seletividade para essas células (IC 24horas = 2,7 e 48h = 5,5) e associou-se a repressão da

ativação do ciclo celular estatisticamente significativa e indução de apoptose inicial e tardia (figuras 22 a 24). Interessantemente, esse efeito foi demonstrado apenas na linhagem de câncer de próstata sensível a androgênios, mas não na linhagem resistente. Esse achado aponta também para a possibilidade de que outros mecanismos envolvidos na atividade citotóxica desse extrato possam se relacionar às vias de ativação do AR, porém outros experimentos seriam necessários para confirmar ou afastar esse efeito.

Ainda sobre o extrato E da *P. torta*, foi evidenciado que o mesmo apresenta os compostos acetato de lupeíla e acetato de α amirina. O acetato de lupeíla também foi evidenciado no extrato H do caule da *P. ramiflora* assim como o friedenelol.

Em 2013, Ferreira e colaboradores (2013) demonstraram diminuição da viabilidade de duas linhagens de câncer de próstata resistente a androgênios, a DU145 e a PC3, após tratamento com a proteína Crata BL, isolada da casca da *Crataeva tapia* (casca). Trata-se de uma planta nativa do Brasil, encontrada no nordeste, e pertencente ao domínios fitogeográficos Cerrado, Amazônia, Mata Atlântica e Caatinga. Para avaliar o tipo de morte celular, foi utilizado anexina V e iodeto de propídeo, e ambas linhagens mostraram morte por apoptose de forma significativa. A proteína isolada tem estrutura similar a inibidores de protease tipo Kunitz, que inibem serina proteases. Esse achado é de grande relevância uma vez que foi observado aumento de expressão de proteases no câncer de próstata. Além disso, o PSA, principal marcador sérico que está aumentado no câncer de próstata, é uma serina protease (FERREIRA et al., 2013b; CORNEJO, 2014).

Um inibidor de calicreínas provindo da *Bauhinia rufa* foi estudado pelo mesmo grupo de pesquisa, nas mesmas linhagens de câncer de próstata DU145 e PC3. Os autores observaram redução da viabilidade celular, além de inibição da angiogênese. Por meio da marcação com iodeto de propídeo, demonstraram também que o tratamento com o inibidor resultou em alteração no ciclo celular das células PC3, com aumento do percentual de células na fase G0/G1. Contudo, não alterou o ciclo na linhagem DU 145. Curiosamente, na análise do padrão de morte celular, os autores verificaram indução de apoptose em ambas linhagens celulares, inicialmente pela análise em citômetro de fluxo com anexina V e iodeto de propídeo, e posteriormente confirmada por meio de ensaio de caspases (FERREIRA et al., 2013a).

Assim como os achados de Ferreira e colaboradores (2013), no presente estudo foi observada modificação significativa no ciclo celular em células PC3 após tratamento com o

extrato etanólico da folha da *B. rufa*, com redução significativa da proporção de células em G2/M e tendência a aumento de G0/G1. Padrão semelhante também foi observado para as células LNCaP (figura 14). O tratamento com o mesmo extrato também induziu intensa apoptose tardia (aumento em torno de 9,5 vezes o número de células apoptóticas em relação ao controle não tratado) e necrose na linhagem PC3 (figura 15), semelhante aos achados do estudo anterior, que avaliou o efeito de um composto inibidor de caliceínas isolado da mesma planta (FERREIRA et al., 2013a). Outras análises seriam necessárias na tentativa de avaliar possível atividade inibitória de caliceínas a partir do extrato aqui estudado, o qual manteve a capacidade de induzir apoptose em ambas as linhagens celulares. Na presente análise, ainda não foi possível identificar compostos presentes nesse extrato (*E bauhinia rufa*) pela CCD.

Além disso, sesquiterpenos já foram encontrados em óleo volátil da *B. rufa* e também da *B. variegata* (DUARTE-ALMEIDA et al., 2004). É interessante apontar que Wang e colaboradores (2011), demonstraram que dois sesquiterpenos identificados como ST1 e o ST2, possuem atividade modulatória sobre o receptor androgênico, contribuindo para a diminuição da sua expressão diminuição da ativação transcricional e alteração na interação do AR com coativadores, em células LNCaP (WANG et al., 2011). Assim, um possível efeito do extrato da *B. Rufa* sobre a modulação do AR nas duas linhagens de células de câncer de próstata, sensível ou resistente a androgênios, deve ser investigado futuramente, diante de sua atividade citotóxica significativa em ambas as linhagens observada no presente estudo.

Sapindus saponaria* variedade *inaequalis

Rashed e colaboradores (2013), descreveram atividade citotóxica de um extrato de *Sapindus saponaria* em diferentes linhagens de células de diferentes tipos de carcinomas, como o de colón (HCT-15), cervical (HeLa), mama (MCF-7) e de pulmão (NCI- H460), corroborando nossos achados em câncer de próstata, os quais também foram bastante relevantes. O IS em 48h do extrato etanólico do fruto da *S. saponaria* variedade *inaequalis* foi de 4,2, com percentual de indução de apoptose de 788% (tabela 5). Os mesmos autores destacaram a presença de estigmasterol e ácido oleanóico na *S. saponaria*, porém, no presente estudo, quando foram comparados esses compostos com o extrato etanólico do fruto da *S. saponaria* variedade *inaequalis*, os mesmos não foram detectados. Ainda assim, esses achados em conjunto reforçam um efeito citotóxico dessa planta em diferentes células

tumorais, que também merece maior detalhamento em estudos futuros (RASHED *et al.*, 2013).

Pouteria caimito

Destaca-se ainda o efeito do extrato da folha da *P. caimito* na linhagem resistente a androgênios, PC3. Nessa linhagem, que consiste em células imortalizadas de um câncer de próstata metastático, em estágio avançado, esse extrato apresentou os melhores resultados, mostrando efeito citotóxico dose dependente. Embora não tenha sido possível o cálculo do IC50 para a célula controle para o cálculo do IS, a curva dose resposta em queratinócitos mostra resultados ambíguos, com menor percentual de células inviáveis do que para a célula cancerígena. Além disso, o extrato induziu repressão estatisticamente significativo do ciclo celular em PC3 e indução em mais de 10 vezes de apoptose tardia.

Allamanda blanchetii

Os extratos hexânico e etanólico da folha e o extrato etanólico do fruto da *Allamanda blanchetii* também apresentaram resultados que se destacaram, apesar de não terem demonstrado valores de IS altos, os extratos da folha reprimiram as células na fase G0/G1 do ciclo celular de forma estatisticamente significativa, e todos apresentaram aumento da marcação com anexina e anexina+IP mostrando a tendência a apoptose. Navarro e colaboradores (2006) demonstraram atividade citotóxica da *A. blanchetii* em linhagem de célula de câncer (leucemia) o que corrobora com os achados do estudo em questão que mostrou atividade citotóxica em células cancerígenas de adenocarcinoma de próstata (NAVARRO *et al.*, 2006).

Considerações adicionais e extratos de fungos

Outros extratos de plantas também apresentaram efeito citotóxico interessante, porém com índices de seletividade inferiores e/ou efeitos discretos no ciclo celular, os quais estão apresentados nas tabelas 5 e 6.

Além dos estudos citados na tabela 7, dentre os principais que analisaram plantas do Cerrado como fonte de derivados vegetais com efeito citotóxico para o câncer, destaca-se o trabalho de Mesquita e colaboradores (2009). Os autores avaliaram a citotoxicidade de plantas do Cerrado utilizadas na medicina popular, por meio do MTT, em 4 linhagens de câncer, HCT-8 carcinoma de cólon humano, HL-60 leucemia, SF-295 câncer de mama e MDA-MB-435 melanoma. De 412 extratos testados 12 apresentaram efeito antiproliferativo, inclusive um deles foi a *Pouteria torta* (MESQUITA *et al.*, 2009). No presente trabalho foram analisados 31 extratos de plantas nativas ou presentes em abundância no Cerrado, dos quais pelo menos 12 apresentaram alguma evidência de atividade citotóxica sobre linhagens de adenocarcinoma de próstata. E ainda, dentre 11 extratos de fluidos de cultivo de fungos analisados, 3 apresentaram atividade citotóxica, porém esta foi menos seletiva para as células cancerígenas (tabelas 5 e 6).

Recentemente, Banjerdpongcha e colaboradores (2013) avaliaram a citotoxicidade de extratos obtidos do arroz roxo em linhagem de células tumorais. Esses autores mostraram atividade tempo e dose dependente desses extratos na linhagem de câncer de próstata LNCaP, dentre outras, além de seu efeito apoptótico utilizando o anexina V e iodeto de propídeo (BANJERDPONGCHAI; WUDTIWAI; SRINGARM, 2013).

Shahneh e colaboradores (2013), também utilizaram o MTT para avaliar citotoxicidade em diversas linhagens celulares de câncer, incluindo a linhagem PC3 de próstata. Verificaram que *Chelidonium majus* L apresentou atividade citotóxica para todas as linhagens tumorais, com baixos valores de IC50% (ZARE SHAHNEH *et al.*, 2013).

Adicionalmente, podem-se destacar alguns trabalhos que investigaram os efeitos citotóxicos de outras fontes naturais de diferentes origens sobre diversas células cancerígenas *in vitro*. Na grande maioria desses trabalhos foram utilizados métodos de avaliação inicial da citotoxicidade semelhantes aos usados no presente estudo.

Alguns fungos endofíticos da *B. variegata*, os quais ainda estão sendo identificados pelo grupo de pesquisa que os cedeu para o presente estudo, foram analisados. Os extratos de fluido de cultivo de fungos VII e IX apresentaram resposta dose dependente com IS de 24h pouco maior que 2 para as células LNCaP apenas. Isso significa que a concentração necessária para inibir a proliferação em 50% das células cancerígenas é 2 vezes menor do que a necessária para inibir a mesma proporção de células da linhagem controle. Esses fungos induziram tendência, porém sem significância estatística, para inibição do ciclo celular e um

efeito aparentemente discreto na indução de apoptose (tabela 5). Não foram observados efeitos citotóxicos significativos a partir dos extratos dos fungos isolados do solo do Cerrado. Em conjunto, os presentes achados sugerem efeito citotóxico muito discreto ou ausente dos extratos dos fungos sobre as linhagens de câncer de próstata, até o momento.

Ao contrário, Zhan e colaboradores (2007) mostraram atividade citotóxica de compostos isolados a partir de fungos endofíticos para quatro linhagens de células tumorais. Dentre seus principais achados, os autores verificaram inibição de migração da linhagem de câncer de próstata andrógeno resistente PC3 para sítios de metástases ósseas (ZHAN *et al.*, 2007).

Sobre os estudos com fungos, vale mencionar que a antraquinona SZ-685C isolada de um fungo endofítico mostrou toxicidade através do MTT em linhagens de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-435), glioma (LN-444), hepatoma (Hep-3B e Huh-7) e adenocarcinoma de próstata (PC3). Houve inibição do crescimento em todas as linhagens estudadas e comprovada a indução de apoptose por meio de citometria de fluxo (anexina V e IP) como no presente estudo, a qual foi confirmada pelas técnicas de TUNEL e pela ativação de caspases (XIE *et al.*, 2010).

Por fim, algumas questões metodológicas também devem ser levantadas que adicionam valor à interpretação dos resultados.

A curva dose-resposta da bicalutamida foi realizada como controle positivo, para padronização da curva dose-reposta e para obtenção de um parâmetro de magnitude da resposta citotóxica. A bicalutamida é um fármaco utilizado no tratamento de câncer de próstata na prática clínica e seu efeito foi verificado em linhagens andrógeno sensível e resistente, a despeito de ser um antagonista do AR. Segundo Shi e colaboradores (2013) a concentração de bicalutamida necessária para inibir 50% da proliferação celular em 72h de tratamento em linhagem LNCaP é $74 \pm 5,9$ e em linhagem PC3 é $76,4 \pm 7,2$, μM , determinada pelo teste SRB, que colore as proteínas pela sulforodamina (SHI, 2013).

O MTT é um teste colorimétrico bastante utilizado para avaliar a viabilidade celular. Baseia-se na capacidade das células de reduzir o MTT, gerando cristais de formazan, cuja quantidade pode ser determinada por meio de um ensaio luminométrico. Assim, o valor obtido no teste luminométrico é proporcional ao número de células viáveis, com capacidade de se proliferarem, na amostra (SCIEN CELL RESEARCH). Nesse estudo o MTT foi

inicialmente usado para fazer o rastreamento da atividade citotóxica de todos os extratos que estavam disponíveis. Tem a vantagem de ser um método de baixo custo e de rápida execução. Entretanto, algumas interferências têm sido descritas.

Peng e colaboradores (2005) avaliaram a capacidade de flavonoides reduzirem o MTT, independentemente da presença de células viáveis na amostra. Avaliaram também uma possível interferência do meio RPMI sobre esse ensaio. Considerando que diversos extratos de plantas contêm flavonoides e que o meio utilizado para cultivo das células LNCaP foi o RPMI, foi realizada avaliação preliminar do teste com amostras contendo meio de cultura puro sem células e com células para avaliarmos possível redução do MTT pelo RPMI. Com essa análise, não foram identificadas interferências do meio de cultura na sensibilidade do MTT. Além disso, no estudo de Peng e colaboradores (2005), os testes foram realizados também com dois tipos de flavonoides isolados. Na avaliação realizada para o presente estudo foram utilizados extratos brutos da planta, os quais podem conter quantidades variáveis de flavonoides não concentrados, portanto, com menor possibilidade de interferência no teste. Assim, não foram encontradas variações nos resultados do MTT quando testados com o meio RPMI ou com os extratos brutos (PENG, WANG, REN, 2005).

Os testes utilizando iodeto de propídeo para avaliar o ciclo celular e para avaliar a morte celular a anexina V + iodeto de propídeo são bastante utilizados na literatura para tentar desvendar os possíveis mecanismos que levam a morte celular e o tipo de morte celular. O primeiro indica se há alguma alteração no ciclo celular e o segundo dá o indicativo de indução de apoptose, o qual geralmente é confirmado por outros testes, como os marcadores de caspases 3 e 9, que são efetoras nesse processo. O presente estudo consistiu de um rastreamento da atividade citotóxica dos extratos disponíveis e, portanto, ensaios complementares para confirmação do padrão de morte celular, bem como esclarecimentos dos mecanismos envolvidos nesses processos ainda são necessários.

Em concordância com o presente estudo, vários estudos têm reportado a atividade de extratos de plantas em linhagens de câncer de próstata sensível e resistente. O uso frequente das linhagens usadas neste estudo, LNCaP e PC3 permite analisar dois tipos de comportamento distintos. Com abordagens semelhantes, alguns trabalhos já têm apontado compostos ativos isolados e seus mecanismos de ação propostos. Esse fato aliado à identificação de extratos com efeito promissor provenientes do bioma do Cerrado na região

Centro-Oeste suporta a importância do estudo e a contribuição para futuramente acrescentar melhorias às opções terapêuticas disponíveis.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou extratos de plantas e de fluido de cultivo de fungos com atividade citotóxica em linhagens de adenocarcinoma de próstata sensível (LNCaP) e resistente a androgênios (PC3).

Para a linhagem celular LNCaP:

- Doze extratos de plantas e três extratos de fluido de cultivo de fungos apresentaram atividade citotóxica maior que 50% em linhagem de adenocarcinoma de próstata andrógeno sensível LNCaP no teste de rastreamento de citotoxicidade inicial;

- Sete extratos de plantas e três extratos de fluido de cultivo de fungos apresentaram atividade citotóxica sustentada e dose dependente, a saber: *Alamanda blanchetii* folha H, *Alamanda blanchetii* folha E, *Alamanda blanchetii* fruto E, *Bauhinia rufa* folha E, *Pouteria ramiflora* caule H, *Pouteria torta* fruto E, *Sapindus saponaria* fruto E, e os fungos endofíticos da *Bauhinia variegata* III, VII e IX.

- Para os extratos acima, foi calculado o índice de seletividade a partir da razão entre as IC50 observadas na linhagem celular controle (queratinócitos HaCat) e na linhagem LnCAP. Índice de seletividade maior do que 2 após tratamento de 24 e/ou 48 horas foi observado em cinco dos sete extratos de plantas e em dois dos três extratos de fluido de cultivo de fungos citotóxicos para a linhagem LNCaP;

- A maioria dos sete extratos de plantas citotóxicos apresentou efeitos inibitórios sobre o ciclo celular em células LNCaP, porém apenas para os extratos de *Alamanda blanchetii* folha H, *Alamanda blanchetii* folha E, *Bauhinia rufa* folha E e *Pouteria torta* folha E esse efeito foi estatisticamente significativo. Nenhum extrato de fungo mostrou interferência sobre o ciclo celular nessas células;

- A maioria dos sete extratos de plantas citotóxicos induziu morte celular por apoptose em células LNCaP, em graus variáveis. Dentre os extratos de fluido de cultivo de fungos, apenas o do fungo IX mostrou indução sustentada (inicial e tardia) de apoptose.

- Os seguintes extratos apresentaram efeito citotóxico global em células LNCaP que foram considerados os mais significativos:
 1. *Pouteria ramiflora* caule E: maiores índices de seletividade tanto em 24 quanto em 48h (7,7 e 5,5 respectivamente), com indução de apoptose sustentada (inicial 109% e tardia 156%);

 2. *Pouteria torta* fruto E: alta seletividade em 24 e 48h (2,8 e 5,5 respectivamente), inibição estatisticamente significativa do ciclo celular e indução de apoptose sustentada (inicial 147% e tardia 106%);

 3. *Bauhinia rufa* folha E: índice de seletividade de 2,1 em 24h, com inibição estatisticamente significativa do ciclo celular e indução muito expressiva de apoptose tardia (757%);

 4. *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis* fruto E: índice de seletividade de 4,2 em 48h, com indução muito expressiva de apoptose tardia (788%);

 5. *Alamanda blanchetii* folha E: índice de seletividade de 2,9 em 48 h, com inibição estatisticamente significativa do ciclo celular e indução muito expressiva de apoptose tardia (433%).

- Acetato de lupeíla foi um dos compostos identificado nos extratos *Pouteria ramiflora* caule H e *Pouteria torta* fruto E. Foi descrita recentemente atividade inibidora da DNA polimerase beta desse composto, o que o torna promissor para a atividade citotóxica observada em linhagens de adenocarcinoma de próstata no presente estudo.

- Também foram identificados friedelenol, no extrato da *Pouteria ramiflora* caule H, e α amirina, no extrato da *Pouteria torta* fruto E.

Para a linhagem celular PC3

- Dez extratos de plantas apresentaram resposta citotóxica maior que 50% no teste de rastreamento inicial de citotoxicidade na linhagem de adenocarcinoma de próstata andrógeno resistente PC3. Nenhum extrato de fluido de cultivo de fungos foi citotóxico para essa linhagem celular;
- Três extratos de plantas apresentaram citotoxicidade sustentada e dose dependente na linhagem PC3, a saber: *Alamanda blanchetii* folha H, *Bauhinia rufa* folha E e *Pouteria caimito* folha E. Entretanto, esse efeito não foi seletivo para a linhagem cancerígena em relação às células controle;
- Os extratos da *Bauhinia rufa* folha E e *Pouteria caimito* folha E apresentaram efeito inibitório estatisticamente significativo sobre o ciclo celular;
- Os mesmos extratos da *Bauhinia rufa* folha E e *Pouteria caimito* folha E apresentaram efeito de indução muito expressiva de apoptose tardia (958% e 1140% respectivamente) na linhagem PC3;
- Não foram identificados compostos nos extratos que foram citotóxicos para a linhagem PC3 comparativamente aos padrões analisados na cromatografia de camada delgada no presente estudo.
- Destaca-se o efeito citotóxico do extrato da *Pouteria caimito* folha E, o qual resultou em inibição significativa do ciclo celular e indução expressiva de apoptose na linhagem de câncer resistente a androgênios (PC3), porém sem nenhum efeito citotóxico na linhagem LNCaP sensível a androgênios. Esse achado sugere que o

efeito citotóxico desse extrato seja mais específico para a linhagem de adenocarcinoma metastático, resistente a andrógenos, e requer estudos adicionais.

Conclui-se que o presente estudo trouxe contribuição importante para a busca de compostos que possam ser úteis no tratamento do câncer de próstata. Os extratos citotóxicos identificados possuem potencial como fonte natural de compostos ativos e estudos futuros são necessários para caracterização de sua atividade farmacológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOU-KHEIR, W. G.; HYNES, P. G.; MARTIN, P.I.; PIERCE, R.; KELLY, K., Characterizing the Contribution of Stem/Progenitor Cells to Tumorigenesis in the Pten^{-/-}TP53^{-/-} Prostate Cancer Model, *Stem Cells*, v 28, p.2129–2140, 2010.
- AHMED, A. S. et al. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African Bauhinia species used traditionally to treat diarrhoea. *Journal of ethnopharmacology*, v. 143, n. 3, p. 826–39, 2012.
- ALBIEIRO, A. L. M; BACCHI, E. M.; MOURÃO, K. S. M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). *Acta Scientiarum*, v. 23, n. 2, p. 549-560, 2001.
- ALVES-ARAÚJO, A. *Pouteria* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14499>>. Acesso em: 14 Mai. 2014a.
- ALVES-ARAÚJO, A. *Pouteria* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21020>>. Acesso em: 14 Mai. 2014b.
- ALVES-ARAÚJO, A. *Pouteria* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB14518>>. Acesso em: 14 Mai. 2014c.
- ATTAR, R. M.; TAKIMOTO, C. H.; GOTTARDIS, M. M., Castration-Resistant Prostate Cancer: Locking Up the Molecular Escape Routes, *Clinical Cancer Research*, v.15, p.3251-3255, 2009.
- BANJERDPONGCHAI, R.; WUDTIWAI, B.; SRINGARM, K. Cytotoxic and apoptotic-inducing effects of purple rice extracts and chemotherapeutic drugs on human cancer cell lines. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, v. 14, n. 11, p. 6541–8, 2013.
- BARAKAT, K. H.; GAJEWSKI, M. M.; TUSZYNSKI, J. A. DNA polymerase beta (pol b) inhibitors: A comprehensive overview, *Drug Discovery Today*, V. 17, N. 15/16, 2012.
- BHATTACHARYYA, J; MORAES, M. S. Q. 5,6-Dimethoxy-7-hydroxycoumarin (Umckalin) from *Allamanda blanchetti*: Isolation and ¹³C-Nmr characteristics. *Journal of Natural Products*, V. 49, p. 354-371, 1986.
- BOLETI, A. P. A; et al. Insecticidal and antifungal activity of a protein from *Pouteria torta* seeds with lectin-like properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, n. 7, p. 2653–8, 2007.
- BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. D. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. *IHERINGIA*, v. 63, p. 263–277, 2008.

BRASIL, Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/prostata/definicao>>. Acesso em: 24 julh. 2014a.

BRASIL, Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 24 julh. 2014b.

CAI, C.; BALK, S. P., Intratumoral androgen biosynthesis in prostate cancer pathogenesis and response to therapy, *Endocrine-Related Cancer*, v.18, p. R175–R182, 2011.

CASTRO, C.F.S.; SILVA, C. A. M.; PERFEITO, J. P.; SANTOS, M. L.; RESCK, I. S.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Avaliação da atividade antioxidante de algumas espécies de *Pouteria*. 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2006.

CHATURVEDULA, P.; ZHOU, B. N.; GAO, Z.; THOMAS, S. J.; HECHT, S. M.; KINGSTON, D. G. I. New lupane triterpenoids from *Solidago canadensis* that inhibit the lyase activity of DNA polymerase β , *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v 12, p. 6271–6275, 2004.

CHE, C. T.; KOLHE, K.; CORDEL, G. A.; FORG, H. H. S.; DOBBERSTEIN, R. H. Triterpenes of *Pouteria torta* (sapotaceae). p. 420-421, 1980.

CHEN, H.; SUN, Y.; WU, C.; MAGYAR, C. E.; LI, X.; CHENG, L.; YAO, J. L.; SHEN, S.; OSUNKOYA, A. O.; LIANG, C.; HUANG, J., Pathogenesis of prostatic small cell carcinoma involves the inactivation of the P53 pathway, *Endocrine-Related Cancer*, V. 19, p. 321–331, 2012.

CHERIAN, M. T.; WILSON, E. M.; SHAPIRO, D. J., A Competitive Inhibitor That Reduces Recruitment Of Androgen Receptor To Androgen Responsive Genes, *JBC Papers in Press*, v. 20, p. 1-25, 2012.

CONTRERAS-CALDERÓN, J.; CALDERÓN-JAIMES, L.; GUERRA-HERNÁNDEZ, E.; GARCÍA-VILLANOVA, B. Antioxidant capacity, phenolic content and vitamin C in pulp, peel and seed from 24 exotic fruits from Colombia. *Food Research International*, v. 44, n. 7, p. 2047–2053, 2011.

CORNEJO, X. *Crateva* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22300>>. Acesso em: 11 Jul. 2014.

DAMKE, E.; TSUZUKI, J. K.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, I. C. P.; BERTONI, T. A.; BATISTA, M. R.; DONATI, L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. In vivo activity of *Sapindus saponaria* against azole-susceptible and -resistant human vaginal *Candida* species. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 11, n. 1, p. 35, 2011.

DAMKE, E.; TSUZUKI, J. K.; CHASSOT, F.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, I. C. P.; MESQUITA, C. S. S.; SILVA, V. R. S.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CONSOLARO, M. E. L. Spermicidal and anti-*Trichomonas vaginalis* activity of Brazilian *Sapindus saponaria*. *BMC complementary and alternative medicine*, v. 13, p. 196, jan. 2013.

DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Mangrove derived fungal endophytes – a chemical and biological perception. *Fungal Diversity*, v. 61, n. 1, p. 1–27, 2013.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; NEGRI, G.; SALATINO, A. Volatile oils in leaves of *Bauhinia* (Fabaceae Caesalpinioideae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 32, n. 8, p. 747–753, 2004.

ELIAS, S. T.; SALLES, P. M.; PAULA, J. E.; SIMEONI, L. A.; SILVEIRA, D.; GUERRA, E. N. S.; MOTOYAMA, A. B. Cytotoxic effect of *Pouteria torta* leaf extracts on human oral and breast carcinomas cell lines. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 9, n. 4, p. 601–606, 2013.

FERREIRA, J. G.; DINIZ, P. M. M.; PAULA, C. A. A.; LOBO, Y. A.; PAREDES-GAMERO, E. J.; PASCHOALIN, T.; NOGUEIRA-PEDRO, A.; MAZA, P. K.; TOLEDO, M. S.; SUZUKI, E.; OLIVA, M. L. V. The Impaired Viability of Prostate Cancer Cell Lines by the Recombinant Plant Kallikrein Inhibitor *, *J. Biol. Chem*, v. 288, n. 13, p. 641-654, 2013a.

FERREIRA, R. S.; ZHOU, D.; FERREIRA, J. G.; SILVA, M. C. C.; SILVA-LUCCA, R. A.; MENTELE, R.; PAREDES-GAMERO, E. J.; BERTOLIN, T. C.; CORREIA, M. T. S.; PAIVA, P. M. G.; GUSTCHINA, A.; WLODAWER, A.; OLIVA, M. L. V. Crystal Structure of *Crataeva tapia* Bark Protein (CrataBL) and Its Effect in Human Prostate Cancer Cell Lines. *PloS one*, v. 8, n. 6, p. 1- 14 e64426, 2013b.

FIZAZI, K. The role of Src in prostate cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, v. 18, n. 11, p. 1765–73, 2007.

FONTES JÚNIOR, E. A. F.; SOUZA, P. J. C.; NASCIMENTO, J. L. M. D. O. Antinociceptive and Antiinflammatory Properties of the Ethanolic Extract of *Pouteria ramiflora* Roots. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 28, n. 6, p. 812–818, 2009.

GOUVEIA, N. M.; ALBUQUERQUE, C. L.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 85, n. 3, p. 1141–8, 2013.

HELSEN, C.; THOMAS V. B.; ARNOUT, V.; STEFAN, P.; POPPEL, V.; HENDRIK, V. P.; STEVEN, J.; FRANK, C. Androgen receptor antagonists for prostate cancer therapy, *Endocr Relat Cancer*, v. 21, p. 105-128, 2014.

HERZOG-SOARES, J. D. A.; ALVES, R. K. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). *Revista brasileira de farmacognosia*, v. 12, p. 1–2, 2002.

HOFFMAN, R. M., Screening for Prostate Cancer, *The New England Journal of Medicine*, v. 365, p. 2013-2019, 2011.

HORII, H.; SUSUKI, R.; SAKAGAMI, H.; UMEMURA, N.; UEDA, J. Y.; SHIRATAKI, Y. Induction of Non-apoptotic Cell Death in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Lines by *Rhinacanthus nasutus* Extract, in vivo, v. 26, p. 305-310, 2012.

HU, R.; DUNN, T. A.; WEI, S.; ISHARWAL, S.; VELTRI, R. W.; HUMPHREYS, E.; HAN, M.; PARTIN, A. W.; VESSELLA, R. L.; ISAACS, W. B.; BOVA, G. S.; LUO, J. Ligand-Independent Androgen Receptor Variants Derived from Splicing of Cryptic Exons Signify Hormone-Refractory Prostate Cancer, *Cancer Research*, v. 69, p. 16-22, 2009.

HWANG C.; HEATH E. I. Angiogenesis inhibitors in the treatment of prostate cancer. *J Hematol Oncol* 3,v. 26, 2010.

HWANG, C., Overcoming docetaxel resistance in prostate cancer: a perspective review, *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, v. 4(6), p. 329-340, 2012.

KASINA, S.; MACOSKA, J. A., The CXCL12/CXCR4 axis promotes ligand-independent activation of the androgen receptor, *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 351, p. 249–263, 2012.

KIM, W.; RYAN, C. J. Androgen receptor directed therapies in castration-resistant metastatic prostate cancer. *Current treatment options in oncology*, v. 13, n. 2, p. 189–200, 2012.

KLEMPNER, S. J.; BUBLEY, G. Complementary and Alternative Medicines in Prostate Cancer: From Bench to Bedside? *The Oncologist*, v. 17, p. 830–837, 2012.

KOCH, I.; RAPINI, A.; KINOSHITA, L.S.; SIMÕES, A.O.; SPINA, A.P. *Apocynaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15539>>. Acesso em: 13 Mai. 2014.

KORYAKINA, Y.; TA, H. Q.; GIOELI, D. Androgen Receptor Phosphorylation: biological context and functional consequences, *Endocr Relat Cancer*, v.21(4), p. T131-45, 2014

KUSARI, S.; SINGH, S.; JAYABASKARAN, C. Rethinking production of Taxol(®) (paclitaxel) using endophyte biotechnology. *Trends in biotechnology*, v. 32, n. 6, p. 304–311, 2014.

LOIOLA, M.I.B.; COSTA-LIMA, J.L. *Erythroxylaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17434>>. Acesso em: 14 Mai. 2014.

LUIZE, P. S.; TIUMAN, T. S.; MORELLO, L. G.; MAZA, P. K.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; MELO, J. C. P.; VATARU NAKAMURA, C. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, p. 85-94, 2005.

MANOHARAN, K. P.; YANG, D.; HSU, A.; HUAT, B. T. K. Evaluation of *Polygonum bistorta* for Anticancer Potential Using Selected Cancer Cell Lines, *Medicinal Chemistry*, v. 3, p. 121-126, 2007.

MELO, J. O.; ENDO, T. H.; BERSANI-AMADO, L. E.; SVIDZINSKI, A. E.; BARONI, S.; MELLO, J. C. P.; BERSANI-AMADO, C. A. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) bark on animal models of nociception. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 43, p. 465-469, 2007.

MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNETD, R.; MICHELD, S.; TILLEQUIND, F.; ESPINDOLA, L.S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 123, p. 439–445, 2009.

MISHRA, A.; SHARMA, A. K.; KUMAR, S.; SAXENA, A. K.; PANDEY, A. K. Bauhinia variegata leaf extracts exhibit considerable antibacterial, antioxidant, and anticancer activities. *BioMed research international*, v. 2013, p. 1-10, 2013.

MIYAMOTO, D. T.; LEE, R. J.; STOTT, S. L.; TING, D. T.; WITTNER, B. S.; ULMAN, M.; SMAS, M. E.; LORD, J. B.; BRANNIGAN, B.W.; TRAUTWEIN, J.; BANDER, N. H.; WU, C. L.; SEQUIST, L. V.; SMITH, M.; RAMASWAMY, S.; TONER, M.; MAHESWARAN, S.; HABER, D. A. Androgen Receptor Signaling in Circulating Tumor Cells as a Marker of Hormonally Responsive Prostate Cancer, *Cancer Discovery*, v. 2, p. 995-1003, 2012.

MOURA, M. B. D.; AGRA, M. F. Apocynaceae Tóxicas E Mediciniais Apocynaceae Tóxicas E Mediciniais Ocorrentes Nos Estados De Pernambuco E Paraíba, Brasil. *Acta boto bras*, v. 3, n. 2, 1989.

NASCIMENTO, C. J.; VIOLANTE, I. M. P.; GARCEZ, W. S.; POTT, A.; GARCEZ, F. R. Biologically active abietane and ent-kaurane diterpenoids and other constituents from *Erythroxylum suberosum*. *Phytochemistry Letters*, v. 5, n. 2, p. 401–406, jun. 2012.

NAVARRO SCHMIDT, D. F.; YUNES, R. A.; SCHAAB, E. H.; MALHEIROS, A.; CECHINEL FILHO, V.; FRANCHI JR, G. C.; NOWILL, A. E.; CARDOSO, A. A.; YUNES, J. A. Evaluation of the anti-proliferative effect the extracts of *Allamanda blanchetti* and *A. schottii* on the growth of leukemic and endothelial cells. *Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences*, v. 9, n. 2, p. 200-8, 2006.

NELSON, W. G.; ANGELO M. DE MARZO, A. M. M.; ISAACS, W. B., Mechanisms of disease Prostate Cancer, *New England Journal Of Medicine*, v. 349, p. 366-381, 2003.

OMLIN, A.; PEZARO, C.; GILLESSEN SOMMER, S. Sequential use of novel therapeutics in advanced prostate cancer following docetaxel chemotherapy. *Therapeutic advances in urology*, v. 6, n. 1, p. 3–14, 2014.

ONCOGUIA, Disponível em <<http://www.oncoguia.org.br/conteudo/tratamento-quimioterapico-do-cancer-de-prostata>> Acesso em 15 ago 2014.

OTERO, J. R.; GOMEZ, B. G.; JUANATEY, F. C.; TOUIJER, K. A. Prostate cancer biomarkers: An update. *Urologic oncology*, v. 32, n. 3, p. 252-260, 2014.

OTTLEY, E.; GOLD, E., Insensitivity to the growth inhibitory effects of activin A: An acquired capability in prostate câncer progression, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, p. 1-7, 2012.

PAULA-JUNIOR, W.; ROCHA, F. H.; DONATTI, L.; FADEL-PICHETH, C. M. T.; WEFFORT-SANTOS, A. M. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of

Caryocar brasiliense Cambess leaves hydroethanolic extract. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 625–630, 2006.

PENG, L.; WANG, B.; REN, P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, v. 45, n. 2, p. 108–11, 2005.

PERFEITO; SANTOS, M. L.; LÓPEZ, K. S. E.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 3, p. 183–186, 2005.

PRANCE, G.T.; MEDEIROS, H.; AMORIM, A.M.A. *Caryocaraceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB6688>>. Acesso em: 14 Mai. 2014.

RAJKAPOOR, B.; JAYAKAR, B.; MURUGESH, N. Antitumour activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascitic lymphoma. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, n. 1, p. 107–109, 2003.

RANK, D.: species Herbarium Placement: Lehmann, mid, I, 128. Disponível em : <<http://www.tropicos.org/Name/13027460>> Acesso em 15 de jun 2014.

RASHED, K. N.; CIRIC, A.; GLAMOCLIJ, J.; FERREIRA, I. C. F. R.; SOKOVIC, M. Antimicrobial Activity, Growth Inhibition of Human Tumour Cell Lines, and Phytochemical Characterization of the Hydromethanolic Extract Obtained from *Sapindus saponaria* L. Aerial Parts. *BioMed Research International*, v. 2013, p. 1-9, 2013.

REDDY, M. V.; REDDY, M. K.; GUNASEKAR, D.; CAUX, C.; BODO, B. A flavanone and a dihydrodibenzoxepin from *Bauhinia variegata*. *Phytochemistry*, v. 64, n. 4, p. 879–882, 2003.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Revista Brasileira PI. Med.* p. 17–35, 2007.

SANTOS, J. F. L.; PAGANI, E.; RAMOSC, J.; RODRIGUES, E. Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. *Journal of ethnopharmacology*, v. 142, n. 2, p. 503–15, 13 jul. 2012.

SCALON, V.R. *Stryphnodendron* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB19133>>. Acesso em: 14 Mai. 2014.

SCHUTZMAN, J. L.; MARTIN, G. R. Sprouty genes function in suppression of prostate tumorigenesis, *PNAS*, p. 1-6, 2012.

SCIEN CELL RESEARCH LABORATORIES, WST-1 Cell Viability & Proliferation Assay Cat. No. 8038

SHEN, M. M.; ABATE-SHEN, C., Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges, *Genes & Development*, v. 24, p. 1967–2000, 2010.

SHI, Q.; WADA, K.; OHKOSHI, E.; LIN, L.; HUANG, R.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; GOTO, M.; LEE, K. H. Antitumor agents 290. Design, synthesis, and biological evaluation of new LNCaP and PC-3 cytotoxic curcumin analogs conjugated with anti-androgens, *Bioorg Med Chem*, v. 20, n. 13, p. 4020–4031, 2013.

SILVA, F.; PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses*, v. 52, n. 6, p. 511–7, 2009.

SILVA, M. A. B.; MELO, L. V. L.; RIBEIRO, R. V.; SOUZA, J. P. M.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; SILVA, R. M. Levantamento etnobotânico de plantas utilizadas como anti-hiperlipidêmicas e anorexígenas pela população de Nova Xavantina-MT, Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 549–562, 2010.

SOMNER, G.V.; FERRUCCI, M.S.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P. *Sapindus* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB20934>>. Acesso em: 14 Mai. 2014.

SOUZA, C. D.; FELFILI, M. J. Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta bot. bras.* v. 20, n. 1, p. 135–142, 2006.

SOUZA, P. M. et al. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. *PloS one*, v. 7, n. 11, p. e48589, 2012.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assay related to cancer drug discovery in K. Hostettman (ed) *Methods in Plant Biochemistry*, Vol 6 Assays for Bioactivity, Academic Press, London, 1991.

TSAO, C. K.; GALSKY, M. D.; SMALL, A. C.; YEE, T.; OH, W. K., Targeting the androgen receptor signalling axis in castration-resistant prostate cancer (CRPC), *BJU International*, p. 1-9, 2012.

TSUZUKI, J. K.; SVIDZINSKI, T. I. E.; SHINOBU, C. S.; SILVA, L. F. A.; RODRIGUES-FILHO, E.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, I. C. P. Antifungal activity of the extracts and saponins from *Sapindus saponaria* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 79, n. 4, p. 577–83, 2007.

VAZ, A.M.S.F. *Bauhinia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB82684>>. Access on: 14 Mai. 2014.

VERMEULEN, D. R. K.; BOCKSTAELE, V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer, *Cell Prolif*, v. 36, p. 131–149, 2003.

VIOLANTE, I. M. P.; HAMERSKI, L.; GARCEZ, W. S.; BATISTA, A. L.; CHANG, M. R.; POTT, V. J.; RODRIGUES GARCEZ, F. Antimicrobial Activity Of Some Medicinal Plants From The Cerrado Of The Central-Western Region Of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1302–1308, 2012.

WANG, X.; KONG, F.; SHEN, T.; YOUNG, C. Y. F.; LOU, H.; YUAN, H. Sesquiterpenoids from myrrh inhibit androgen receptor expression and function in human prostate cancer cells. *Acta pharmacologica Sinica*, v. 32, n. 3, p. 338–44, 2011.

XIE, G.; ZHU, X.; LI, Q.; GU, M.; HE, Z.; WU, J.; LI, J.; LI, M.; SHE, Z.; YUAN, J. SZ-685C, a marine anthraquinone, is a potent inducer of apoptosis with anticancer activity by suppression of the Akt/FOXO pathway. *British journal of pharmacology*, v. 159, n. 3, p. 689–97, 2010.

YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI. Review Discovery Of New Antitumoral And Antibacterial Drugs From Brazilian Plant. *Clinics* v. 62, n. 6, p. 763–768, 2007.

ZARE SHAHNEH, F.; BARADARAN, B.; ORANGI, M.; ZAMANI, F. In vitro Cytotoxic Activity of Four Plants Used in Persian Traditional Medicine. *Advanced pharmaceutical bulletin*, v. 3, n. 2, p. 453–5, 2013.

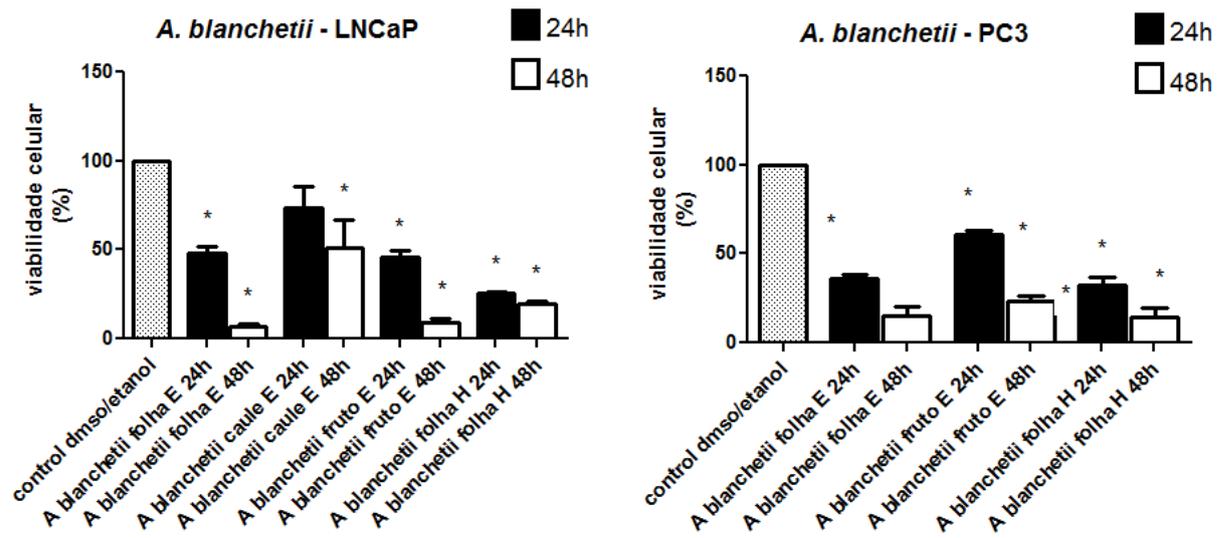
ZHAN, J.; BURNS, A. M.; LIU, M.; FAETH, S. H.; GUNATILAKA, A. A. L. Search for cell motility and angiogenesis inhibitors with potential anticancer activity: beauvericin and other constituents of two endophytic strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of natural products*, v. 70, n. 2, p. 227–32, 2007.

APÊNDICE

1 Resultados dos extratos de plantas

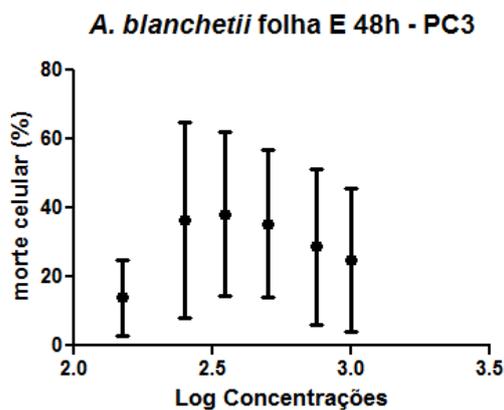
1.1 *Allamanda blanchetii*

APÊNDICE 1 - Citotoxicidade na concentração de 500µg/mL dos extratos da *Allamanda blanchetii*.



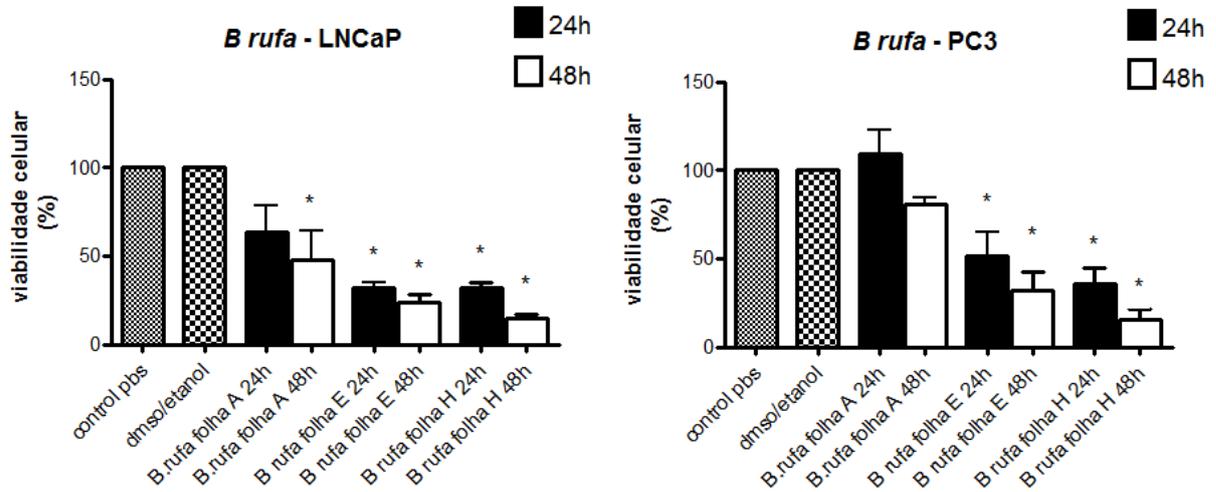
A viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle PBS (solvente dos extratos aquosos) e DMSO/Etanol 2:3 (solvente do extratos etanólicos e hexânicos); Os experimentos foram realizados em triplicata; * Valor de $P < 0,05$ calculado através do Prisma 5.0 utilizando análise de variância One-Way Anova com pós-teste de Turkey.

APÊNDICE 2 - Curva dose-resposta do extrato da *A. blanchetii* que não apresentou resposta dose dependente em linhagem de adenocarcinoma de próstata PC3.



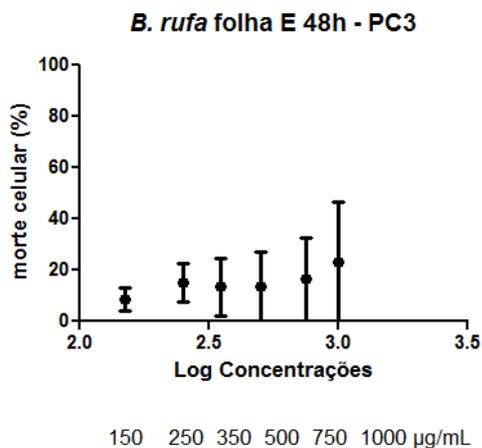
1.2 *Bauhinia rufa*

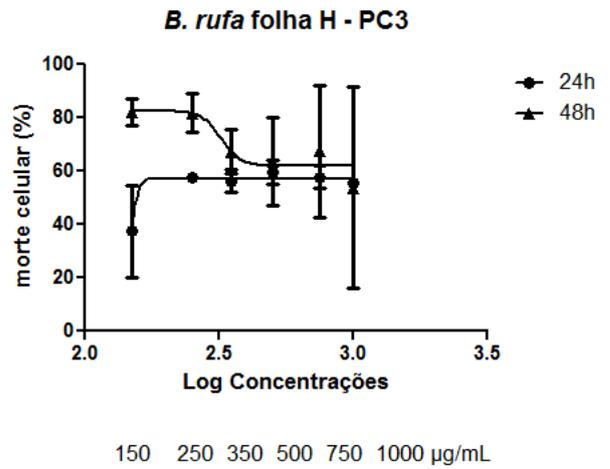
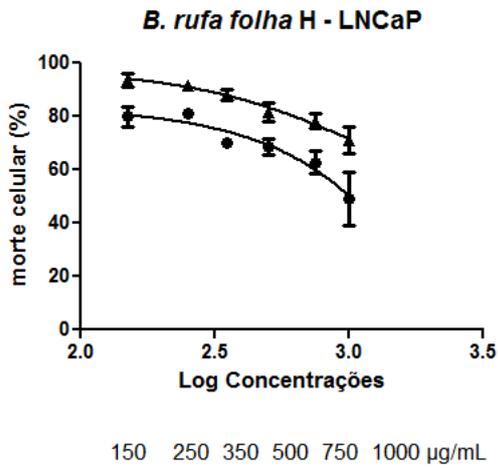
APÊNDICE 3 - Citotoxicidade na concentração de 500µg/mL dos extratos da *Bauhinia rufa*.



A viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle PBS (solvente dos extratos aquosos) e DMSO/Etanol 2:3 (solvente do extratos etanólicos e hexânicos); Os experimentos foram realizados em triplicata; * Valor de $P < 0,05$ calculado através do Prisma 5.0 utilizando análise de variância One-Way Anova com pós-teste de Turkey.

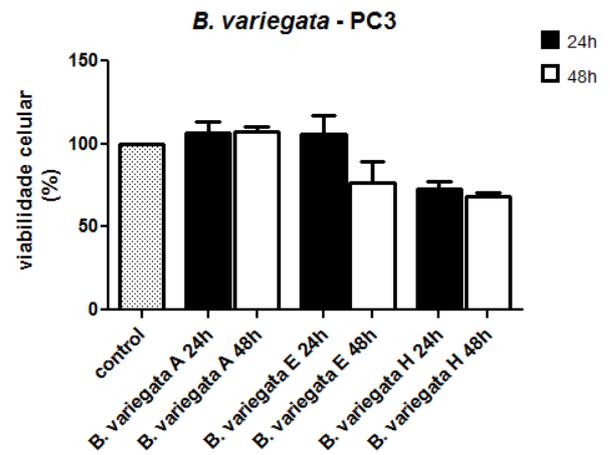
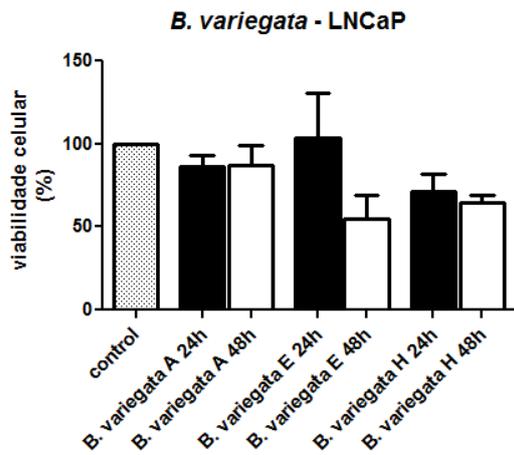
APÊNDICE 4 - Curva dose-resposta dos extratos da *B. rufa* que não apresentaram resposta dose dependente em linhagens de adenocarcinoma de próstata (andrógeno sensível LNCaP e andrógeno resistente PC3).



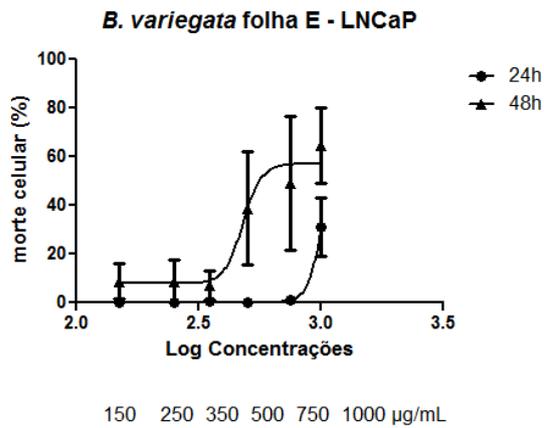


1.3 Bauhinia variegata

APÊNDICE 5 - Citotoxicidade na concentração de 500µg/mL dos extratos da *B. variegata*.

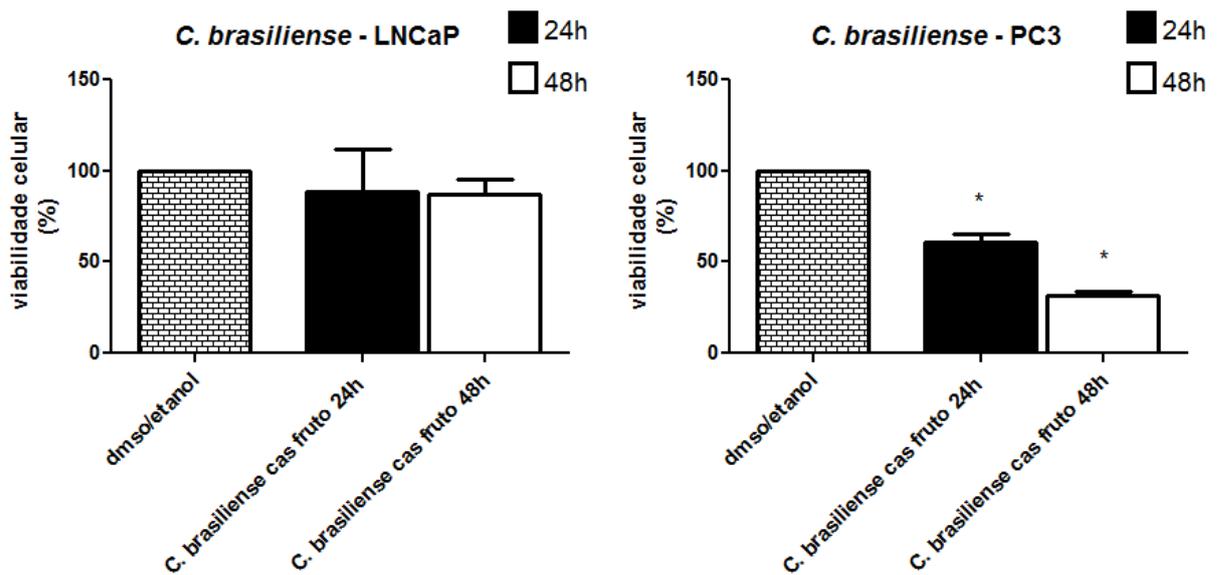


APÊNDICE 6 - Curva dose-resposta dos extratos da *B. variegata* que não apresentou resposta dose dependente em linhagem de adenocarcinoma de próstata andrógênio sensível LNCaP.

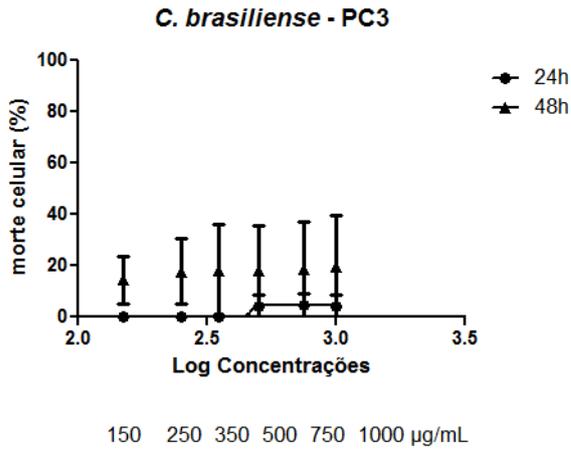


1.4 *Caryocar brasiliense*

APÊNDICE 7 - Citotoxicidade na concentração de 500µg/mL dos extratos do *Caryocar brasiliense*.

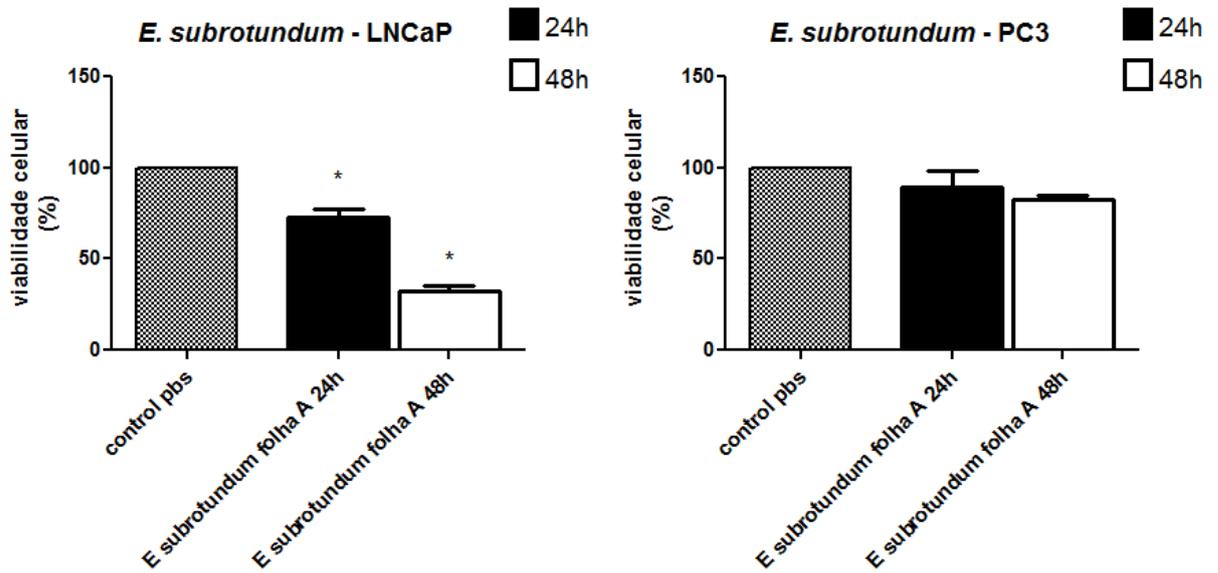


APÊNDICE 8 - Curva dose-resposta do extrato do *C. brasiliense* que não apresentou resposta dose dependente em linhagens de adenocarcinoma de próstata andrógênio resistente PC3.



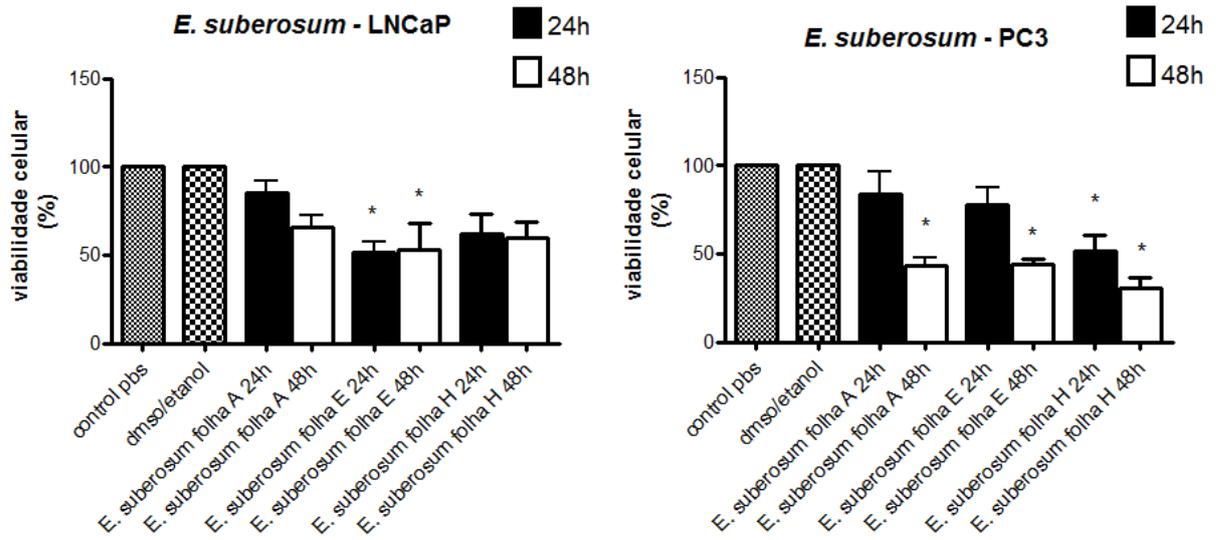
1.5 Erythroxylum subrotundum

APÊNDICE 9 - Citotoxicidade na concentração de 500µg/mL dos extratos do *E. subrotundum*.

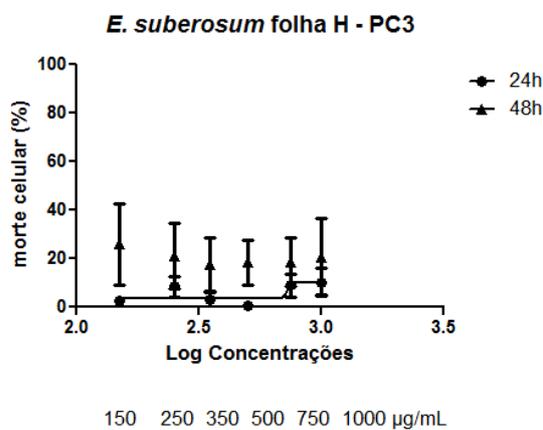


1.6 Erythroxylum suberosum

APÊNDICE 10 - Citotoxicidade na concentração de 500µg/mL dos extratos da *E. suberosum*.

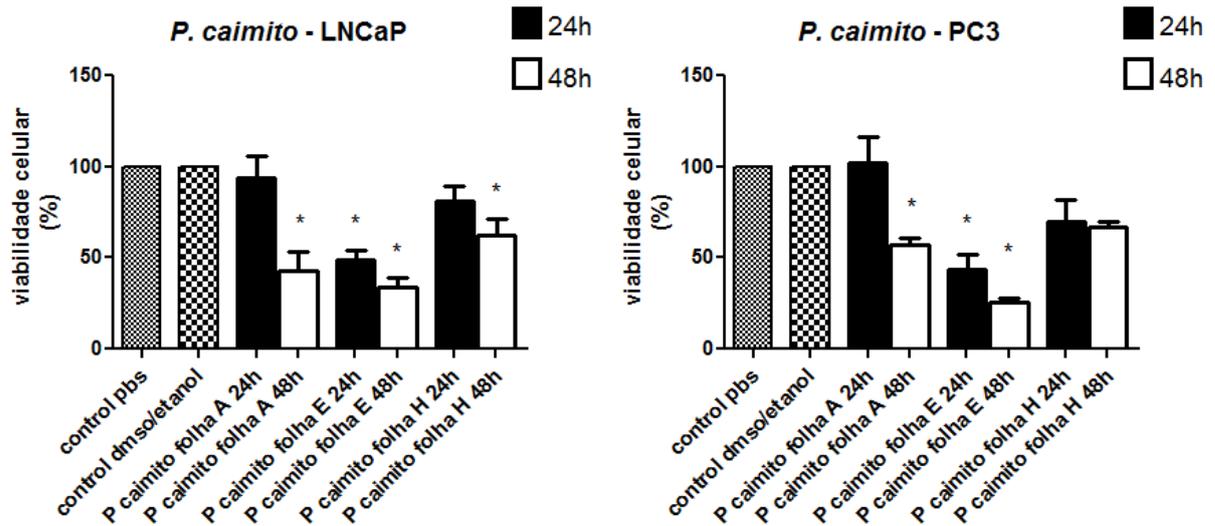


APÊNDICE 11 - Curva dose-resposta dos extratos do *E. suberosum* que não apresentou resposta dose dependente em linhagem de adenocarcinoma de próstata andrógeno resistente PC3.



1.7 *Pouteria caimito*

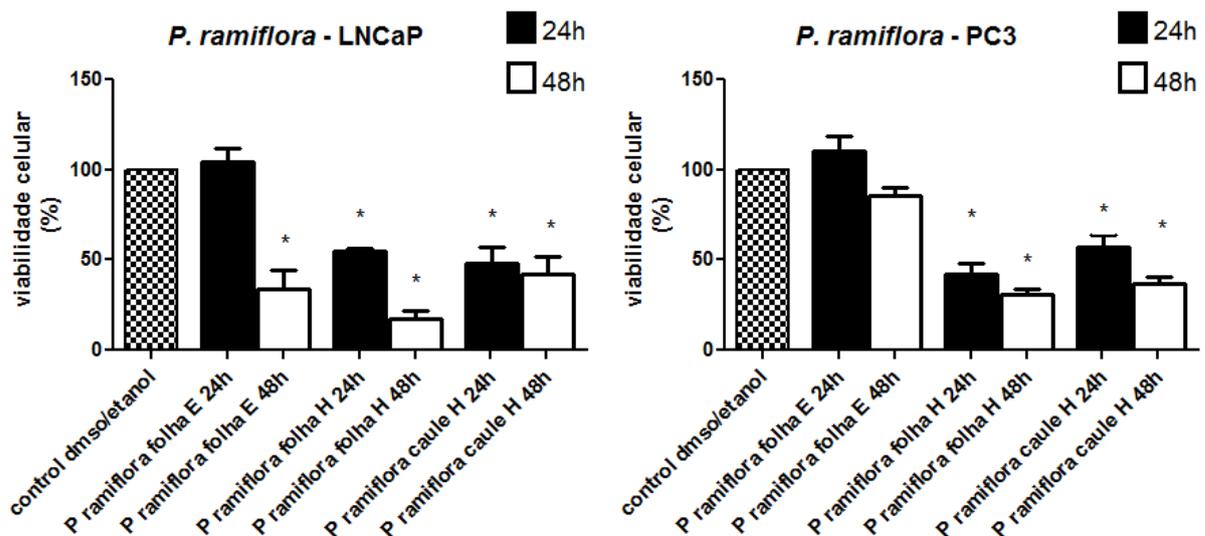
APÊNDICE 12 - Citotoxicidade na concentração de 500µg/mL dos extratos da *Pouteria caimito*.



A viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle PBS (solvente dos extratos aquosos) e DMSO/Etanol 2:3 (solvente do extratos etanólicos e hexânicos); Os experimentos foram realizados em triplicata; * Valor de $P < 0,05$ calculado através do Prisma 5.0 utilizando análise de variância One-Way Anova com pós-teste de Turkey.

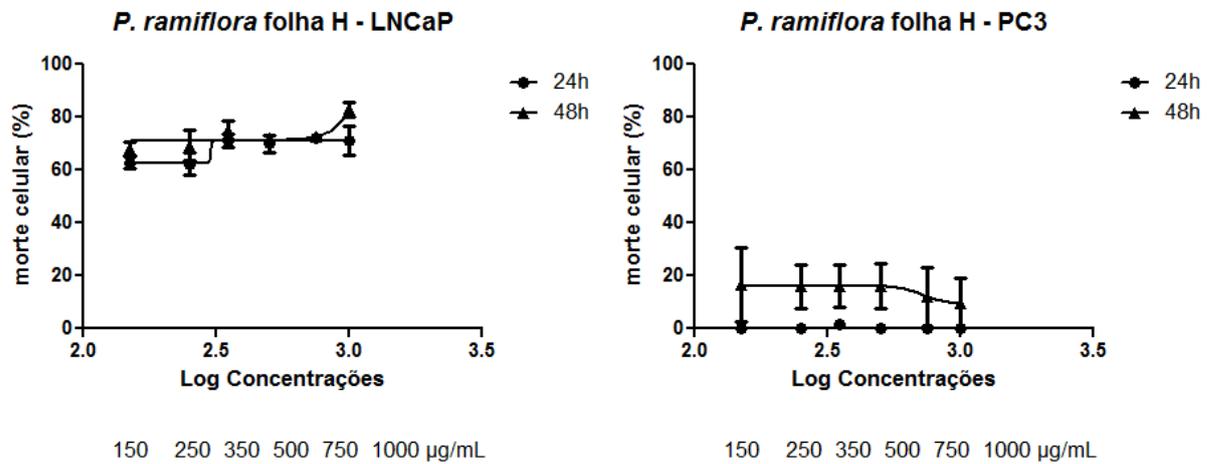
1.8 *Pouteria ramiflora*

APÊNDICE 13 - Citotoxicidade na concentração de 500 μ g/mL dos extratos da *Pouteria ramiflora*.



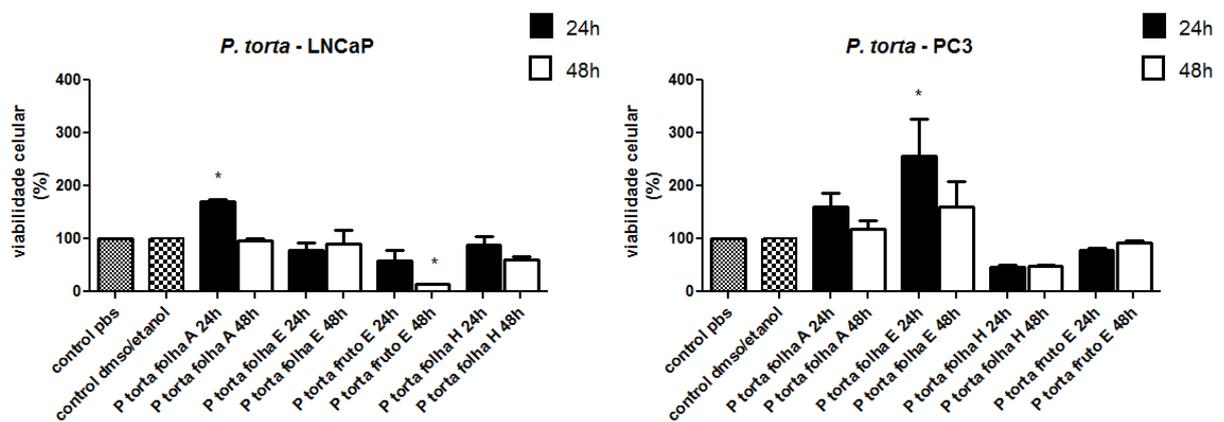
A viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle PBS (solvente dos extratos aquosos) e DMSO/Etanol 2:3 (solvente do extratos etanólicos e hexânicos); Os experimentos foram realizados em triplicata; * Valor de $P < 0,05$ calculado através do Prisma 5.0 utilizando análise de variância One-Way Anova com pós-teste de Turkey.

APÊNDICE 14 - Curva dose-resposta dos extratos da *P. ramiflora* que não apresentou resposta dose dependente em linhagens de adenocarcinoma de próstata (andrógeno sensível LNCaP e andrógeno resistente PC3).



1.9 *Pouteria torta*

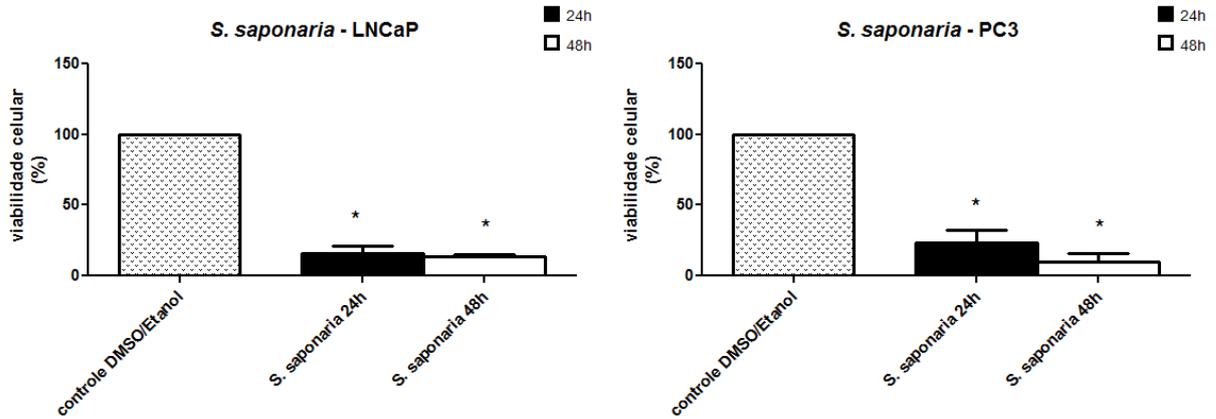
APÊNDICE 15 - Citotoxicidade na concentração de 500µg/mL dos extratos da *Pouteria torta*.



A viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle PBS (solvente dos extratos aquosos) e DMSO/Etanol 2:3 (solvente do extratos etanólicos e hexânicos); Os experimentos foram realizados em triplicata; * Valor de $P < 0,05$ calculado através do Prisma 5.0 utilizando análise de variância One-Way Anova com pós-teste de Turkey.

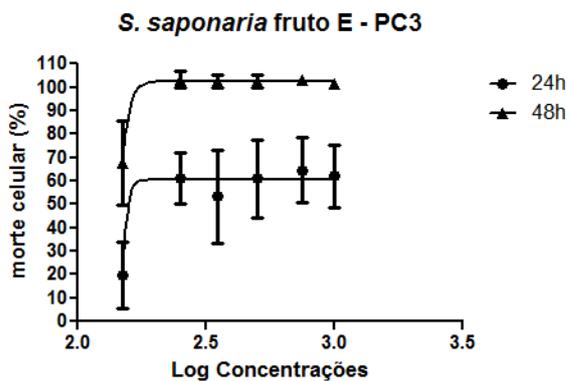
1.10 *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis*

APÊNDICE 16 - Citotoxicidade na concentração de 500µg/mL dos extratos da *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis*.



A viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle PBS (solvente dos extratos aquosos) e DMSO/Etanol 2:3 (solvente do extratos etanólicos e hexânicos); Os experimentos foram realizados em triplicata; * Valor de $P < 0,05$ calculado através do Prisma 5.0 utilizando análise de variância One-Way Anova com pós-teste de Turkey.

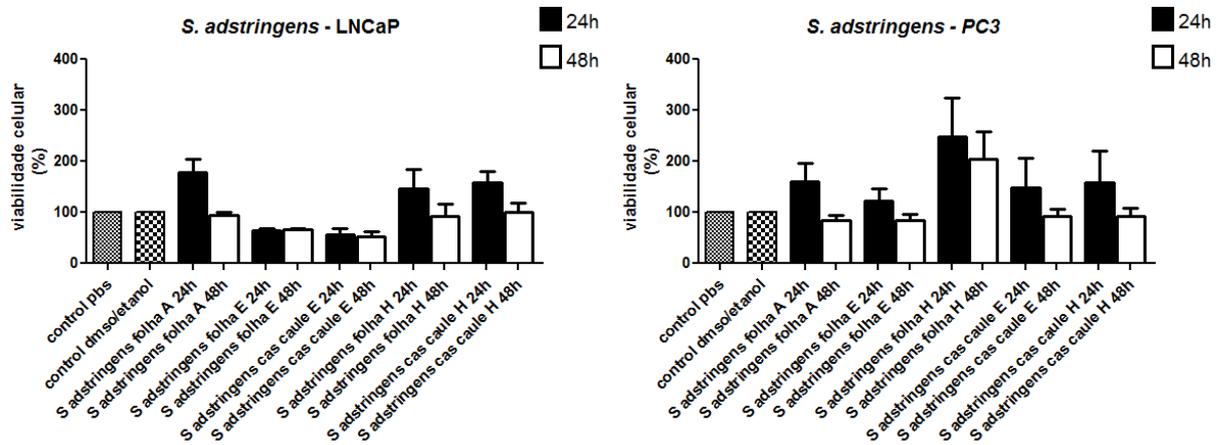
APÊNDICE 17 - Curva dose-resposta dos extratos da *Sapindus saponaria* variedade *inaequalis* que não apresentou resposta dose dependente em linhagem de adenocarcinoma de próstata (andrógeno resistente PC3)..



150 250 350 500 750 1000 µg/mL
 IC50 24h: ~ 146.2µg/mL
 IC50 48h: ~ 106.7µg/mL
 IS 24h: 1,8
 IS 48h: 2,4

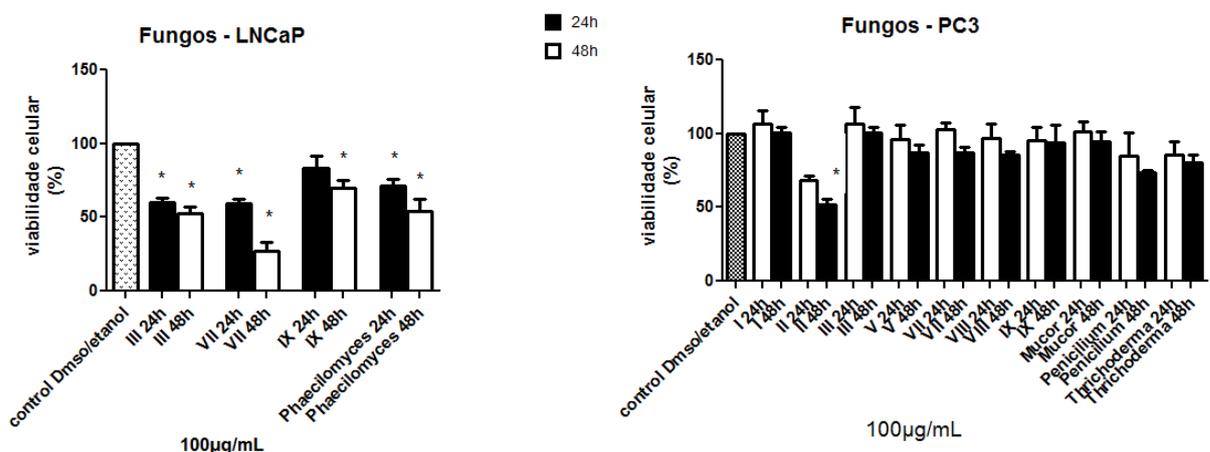
1.11 *Sthryphnodendron adstringens*

APÊNDICE 18 - Citotoxicidade na concentração de 500µg/mL dos extratos da *Sthryphnodendron adstringens*.



2 Resultados dos extratos de fluido de cultivo de fungos endofíticos e de fungos extraídos do solo da região centro-oeste do cerrado

APÊNDICE 19 - Citotoxicidade na concentração de 100µg/mL dos extratos dos fluidos de cultivos dos fungos.



A viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle PBS (solvente dos extratos aquosos) e DMSO/Etanol 2:3 (solvente do extratos etanólicos e hexânicos); Os experimentos foram realizados em triplicata; * Valor de $P < 0,05$ calculado através do Prisma 5.0 utilizando análise de variância One-Way Anova com pós-teste de Turkey.

APÊNDICE 20 - Curva dose-resposta do extrato da *Phaecilomyces lilacinus* que não apresentou resposta dose dependente em linhagem de adenocarcinoma de próstata andrógeno sensível LNCaP.

