

SARAH CAIXÊTA CARDOSO

ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE EXTRATO HEXÂNICO DO CAULE DE
Pouteria ramiflora (Mart.) Radlk. PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS COM
EFEITO CITOTÓXICO EM LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA
HUMANO

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção de título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Lofrano Alves Porto
Coorientadora: Profa. Dra. Dâmaris Silveira

BRASÍLIA
2018

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 a fonte.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CSA243e CAIXETA CARDOSO, SARAH
ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE EXTRATO HEXÂNICO DO
CAULE DE *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. PARA
IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS COM EFEITO CITOTÓXICO EM LINHAGEM
DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA HUMANO / SARAH CAIXETA
CARDOSO; orientador ADRIANA LOFRANO ALVES PORTO; co
orientador DÂMARIS SILVEIRA. -- Brasília, 2018.
80 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade de Brasília, 2018.

1. CÂNCER DE PRÓSTATA. 2. FITOQUÍMICA. 3. EXTRATO
HEXÂNICO DO CAULE DE *POUTERIA RAMIFLORA*. 4. CITOTOXICIDADE.
I. LOFRANO ALVES PORTO, ADRIANA, orient. II. SILVEIRA,
DÂMARIS, co-orient. III. Título.

SARAH CAIXÊTA CARDOSO

ESTUDO QUÍMICO BIOMONITORADO DE EXTRATO HEXÂNICO DO CAULE DE *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. PARA IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS COM EFEITO CITOTÓXICO EM LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA HUMANO

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção de título de doutor em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade de Brasília.

Aprovada em 20 de Novembro de 2018.

Banca Examinadora

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

Dra. Cinthia Gabriel Meireles
Ministério da Saúde

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

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dr. Luiz Alberto Simeoni
Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (UnB)

Dedico este trabalho a Deus, a toda
minha família e meu esposo, vocês
são meu alicerce.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois é Ele quem nos dá a vida, foi Ele que colocou situações e pessoas tão especiais para que hoje este trabalho fosse possível. Muitas vezes pensei em desistir, que não seria capaz e no outro dia acordei com forças para continuar, obrigada Senhor por me dar essa força.

A toda minha família, irmãos, avós, tios, madrinhas e padrinhos, primos, afilhadas, em especial minha mãe Telma, pai Nelson, vovó Fátima e vovô Valdir, não tenho palavras que são suficientes para expressar minha gratidão e meu amor por vocês, essa conquista também é de vocês.

À professora Adriana Lofrano, minha orientadora e amiga, você abriu as portas da UnB, sem me conhecer, me deu uma chance, sempre me incentivou, orientou a cerca dos aspectos científicos e também pessoais, muitas vezes acolheu minhas lágrimas, eu não tenho palavras que expressão minha gratidão.

À professora Dâmaris Silveira, minha coorientadora e amiga, por disponibilizar o espaço do laboratório de produtos naturais e principalmente por ter acreditado em mim, mesmo sem eu ter experiência em fitoquímica.

Ao professor Luiz Alberto Simeoni, que muitas vezes se disponibilizou a me ajudar, tendo sempre ótimos conselhos a dar.

À professora Eliete Neves da Silva Guerra, que cedeu o espaço do laboratório de Histopatologia Bucal.

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

Aos amigos e companheiros de laboratório que de uma forma ou outra contribuíram com o estudo e com meu crescimento profissional e pessoal.

Ao CNPq, CAPES E FAP-DF, pelo apoio financeiro disponibilizado para realização deste trabalho e participações em eventos científicos.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e todos os professores.

Todos vocês fazem parte desta história e sem vocês este trabalho não seria possível.

“O que ninguém nunca viu nem
ouviu, e o que jamais alguém
pensou que podia acontecer, foi
isso o que Deus preparou para
aqueles que o amam.”

1Corintias 2:9

RESUMO

CARDOSO, Sarah Caixêta. **Estudo químico biomonitorado de extrato hexânico do caule de *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. para identificação de compostos com efeito citotóxico em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano.** Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

O câncer de próstata é um problema de saúde pública em todo o mundo. As alternativas terapêuticas ainda são limitadas. A biodiversidade brasileira representa uma importante fonte de potencial descoberta de novos fármacos derivados de plantas. O objetivo desse estudo foi realizar um estudo químico biomonitorado de extratos vegetais de *Pouteria ramiflora*, devido ao seu potencial citotóxico em linhagens celulares de câncer da próstata humano sensíveis a andrógenos (LNCaP), demonstrado em estudo anterior. O extrato bruto de caule de *P. ramiflora* foi fracionado e a citotoxicidade das frações foi avaliada por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio). A expressão de AR e mTOR total e fosforilado foi realizada por meio de western blot, para avaliação de vias relacionadas a carcinogênese. A fração hexano:acetato de etila foi submetida a cromatografia em coluna, sendo obtidos 46 grupos de frações agrupadas de acordo com o perfil em cromatografia em camada delgada. Os grupos de frações foram testados (MTT). Dois dos grupos que apresentaram atividade citotóxica foram submetidos ao estudo químico. Entre as 5 frações oriundas de extrato hexânico do caule de *P. ramiflora*, a fração hexano:acetato de etila foi a que apresentou maior rendimento e melhor resposta citotóxica. Com a separação desta fração foram obtidos 46 grupos de frações sendo que os grupos 4 e 8 foram selecionados para purificação. PR01, oriundo do grupo 4, continha β -amirina, acetato de β -amirina, lupeol, acetato de lupeol e friedelina. Desses, acetato de β -amirina foi isolado. A análise da expressão de proteínas mostrou que o grupo 4 é ativo devido à diminuição de expressão do AR e mTOR. O grupo 8 foi purificado e o composto epifriedelanol foi isolado, no entanto, não mostrou atividade citotóxica. O estudo biomonitorado de *Pouteria ramiflora* levou à identificação e isolamento de compostos com potencial citotóxico para linhagem de células de adenocarcinoma de próstata humano.

Palavras-chave: Câncer de próstata, citotoxicidade, extratos de plantas, *Pouteria ramiflora*.

ABSTRACT

CARDOSO, Sarah Caixêta. **Biomonitoring chemical study of hexane extract of the stem of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. for identification of compounds with cytotoxic effect in human prostate adenocarcinoma.** Tese de Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

Prostate cancer is a public health problem worldwide. Therapeutic alternatives are still limited. The Brazilian biodiversity represents an important source for discovery of new drugs derived from plants. We aimed to conduct a biomonitoring chemical study of plant extracts from *Pouteria ramiflora*, previously shown to be cytotoxic in androgen-sensitive human prostate cancer cell lines (LNCaP). The raw stem extract of *P. ramiflora* was fractionated and the cytotoxicity of the fractions were evaluated by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide). The expression of total and phosphorylated mTOR and AR was assessed by western blot, for evaluation of pathways related to carcinogenesis. The hexane:ethyl acetate fraction was fractionated by column chromatography, result in 46 groups, according to the thin layer chromatography profile. These groups were evaluated by MTT. Two groups that showed cytotoxic activity were submitted to the chemical study. Among 5 fractions from the hexane extract of the stem of *Pouteria ramiflora*, the hexane:ethyl acetate fraction presented higher yield and better cytotoxic response. This fraction was separated into 46 groups, and the fractions 4 and 8 were selected for purification. PR01, from group "4", was composed of β -amirin, β -amyrin acetate, lupeol, lupeol acetate and friedelin, and β -amirin acetate was isolated. Protein expression analysis showed that group 4 is active due to decreased expression of the AR and mTOR. Group "8" was purified and the epifriedelanol compound was isolated, but, it did not demonstrate cytotoxic activity. The biomonitoring study of *Pouteria ramiflora* led to the identification of compounds with cytotoxic potential in human prostate adenocarcinoma cell line.

Keywords: Prostate Cancer, cytotoxicity, plant extracts, *Pouteria ramiflora*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento, progressão e resistência à terapêutica do câncer de próstata.

Figura 2 – Árvore e frutos de *Pouteria ramiflora* (Mart.)Raldk.

Figura 3 – Representação esquemática das etapas e métodos empregados no estudo químico biomonitorado de extrato hexânico de caule de *Pouteria ramiflora*.

Figura 4 - Curvas dose-resposta das frações oriundas do extrato hexânico de *Pouteria ramiflora* em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).

Figura 5 – Grupos de frações 4 e 8, obtidos por cromatografia em coluna da fração hex-AcOEt do extrato hexânico de caule de *Pouteria ramiflora*.

Figura 6 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (150 MHz, CDCl_3)

Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (150 MHz, CDCl_3). Ampliação da região 12-34 ppm.

Figura 8 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (150 MHz, CDCl_3). Ampliação da região 34-55 ppm.

Figura 9 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (150 MHz, CDCl_3). Ampliação da região 64-178 ppm.

Figura 10 - Espectro de RMN de ^1H da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (600 MHz, CDCl_3)

Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (150 MHz, CDCl_3). Ampliação.

Figura 12 - Cromatograma obtido por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de PR01 (IE, 70eV)

Figura 13 - Espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 49,01 min. obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PR01 (IE, 70eV)

Figura 14 - Espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 50,49 min. obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PR01 (IE, 70eV)

Figura 15 - Espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 49,51 min. obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PR01 (IE, 70eV)

Figura 16 - Espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 51,01 min. obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PR01 (IE, 70eV)

Figura 17 - Espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 51,65 min. obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PR01 (IE, 70eV)

Figura 18 – Estrutura molecular dos compostos identificados no grupo **PR01**.

Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C de PR02 (125 MHz, CDCl_3)

Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C de PR02 (DEPT-135, 125 MHz, CDCl_3)

Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H de PR02 (600 MHz, CDCl_3)

Figura 22 - Quantificação da expressão do AR em células LnCAP por *western blot* após 48h de tratamento com o grupo 4.

Figura 23 - Quantificação da ativação de mTOR em células LnCAP por *western blot* após 48h de tratamento com o grupo 4.

Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C de PR03 (125 MHz, CDCl_3)

Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C de PR03 (DEPT-135, 125 MHz, CDCl_3)

Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H de PR03 (600 MHz, CDCl_3).

Figura 27 – Representação esquemática do estudo químico biomonitorado com resultados encontrados.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Rendimentos das frações do extrato hexânico de caule de *Pouteria ramiflora* obtidas por meio de filtração em sílica.

Tabela 2 - Frações obtidas da fração hex:AcOEt por Cromatografia em Coluna.

Tabela 3 – IC₅₀ obtido por meio de curva de dose-resposta em linhagem de células de adenocarcinoma de próstata humano.

Tabela 4 – Porcentagem de viabilidade celular após tratamento com as frações obtidas por CC em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano.

Tabela 5 - Dados de RMN de ¹³C do PR01 (grupo 4) em comparação com os dados reportados na literatura.

Tabela 6 - Resultados encontrados na análise por CG-EM do PR01.

Tabela 7 - Dados de RMN de ¹H, RMN de ¹³C do PR02 em comparação com os dados reportados na literatura.

Tabela 8 - Dados de RMN de ¹H, RMN de ¹³C e DEPT do PR03 (epifriedelanol) em comparação com os dados reportados na literatura.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

δ : deslocamento químico

%: porcentagem

°C: graus celsius

A431: linhagem celular de carcinoma epidermóide de pele

A549: linhagem celular de câncer de pulmão

AANS: antiandrógenos esteroidais

AcOEt: acetato de etila

ADT: privação de andrógeno

AKR1C3: aldoceto-redutase 1C3

ANOVA: análise de variância

AR: receptor de andrógenos

ARA 70: proteína associada à ativação do receptor de andrógenos

ARE: elementos responsivos a andrógenos

ATCC: *American Type Culture Collection*

B16-F10: linhagem celular de mieloma

Bax: proteína X associada a Bcl-2

Bcl-2: célula-B de linfoma 2

BCR: recorrência bioquímica

BSA: albumina sérica bovina

C: carbono

Caco-2: linhagem celular de adenocarcinoma de colorretal

CC: coluna cromatográfica

CCD: Cromatografia em camada delgada

CCDP: Cromatografia em camada delgada preparativa

CDCl_3 : clorofórmio deuterado

CEM: leucemia linfoblástica-T

CG-EM: Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CRL2120: linhagem celular de fibroblasto de pele normal humano

CRPC: câncer de próstata castração-resistente

CYP17A1: 17 α -hidroxilase/17,20-liase

DBD: domínio de ligação ao DNA

DEPT – *distortionless enhancement by polarization transfer*

DHT: hidrotosterona

DLD-1: células de adenocarcinoma colorretal Dukes tipo C

DMSO: dimetilsulfóxido

EtOH: etanol

FSH: hormônio folículo-estimulante

GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

GnRH: hormônio liberador de gonodotrofinas

GR: receptor de glicocorticoide

GSTP-1: silenciamento por metilação da glutatona s-transferase

H: hidrogênio

HaCat: linhagem controle provenientes de queratinócitos normais

HEK293: células embrionárias de rim humano

HeLa: linhagens de câncer cervical

HepG2: hepatocarcinoma

HL-60: linhagem celular de leucemia

HT-29: linhagem celular de câncer de cólon

Hex: hexano

IC₅₀: concentração inibitória de 50% da viabilidade celular

IL-6: interleucina-6

INCA: Instituto Nacional de Câncer José de Alencar

J: constantes de acoplamento

LBD: domínio de ligação ao ligante

LH: hormônio luteinizante

LNCaP: linhagem de adenocarcinoma de próstata humano sensível a andrógenos

M⁺: íon molecular

MCF7: células de adenocarcinoma de mama humano

MeOH: metanol

MHz: mega hertz

mpMRI: ressonância magnética multiparamétrica

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

mTOR: alvo de rapamicina em mamíferos

m/z: massa/carga

NFκB: fator nuclear kappa B

NIST: *National Institute of Standards and Technology*

NTUB1: linhagem de células de câncer de bexiga

OMS: Organização Mundial de Saúde

P-388: linhagem celular de leucemia linfocítica

PCa: câncer de próstata

PC3: linhagem de células adenocarcinoma de próstata humano resistente a andrógenos

PI3K : fosfoinositídeo-3-quinase

pH – potencial hidrogeniônico

PKB/AKT: proteína quinase B

PR: receptor de progesterona

PR: produto

PSA: antígeno prostático específico

PTEN: homólogo da fosfatase e tensina

TP53: proteína tumoral 53

PPM: parte por milhão

PVDF: fluoreto de polivinilideno

RB: proteína de retinoblastoma

RMN: Ressonância magnética nuclear

ROS: elementos reativos do oxigênio

RP: prostatectomia radical

RTOG: *Radiation Therapy Oncology Group*

SDS: dodecil sulfato de sódio

SGK: serina/treonina-proteína quinase

SK-OV-3: linhagem celular de câncer de ovário

SRC-1: coativador 1 de receptor nuclear

SRD5A: 5 α -esteroide redutase

T: tesla

TBST: tampão tris – twen 20

TIPARP: *aryl hydrocarbon receptor target*

TMS: tetrametilsilano

tR: tempo de retenção

UB: Universidade de Brasília

V: volts

3 β HSD: 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase

17 β HSD: 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Câncer de Próstata.....	17
1.2 Mecanismos Moleculares.....	18
1.3 Tratamento.....	21
1.4 Plantas e Cerrado.....	24
1.4.1 <i>Pouteria</i>	25
1.4.1.1 <i>Pouteria ramiflora</i> (Mart.) Radlk.....	26
2 OBJETIVOS.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
3.1 MÉTODOS GERAIS PARA TESTES BIOLÓGICOS.....	31
3.1.1 Culturas de Células.....	31
3.1.2 Ensaio de citotoxicidade celular (MTT).....	31
3.1.3 Expressão de proteínas por western blot.....	32
3.1.4 Análise Estatística.....	33
3.2 MÉTODOS GERAIS PARA ESTUDO QUÍMICO.....	34
3.2.1 Cromatografia em camada delgada.....	34
3.2.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).....	34
3.2.3 Ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹ H e de ¹³ C.....	35
3.2.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	35
3.2.5 Lavagem de amostras com solvente (tentativa de purificação).....	35
3.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	36
3.3.1 Obtenção do extrato bruto da <i>Pouteria ramiflora</i>	36
3.3.2 Filtração em sílica.....	36
3.3.3 Cromatografia em coluna (CC).....	37
3.3.4 Isolamento e identificação de compostos.....	39
3.3.4.1 Grupo 4.....	39
3.3.4.2 Grupo 8.....	39
3.3.4.3 Precipitado entre as sub-frações (57-59) 47 e (64-65) 48.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Biomonitoramento das frações oriundas do extrato bruto hexânico de caule e galhos de <i>Pouteria ramiflora</i>	41

4.2 Atividade biológica das frações oriundas da fração hexano:acetato de etila obtidas por coluna cromatográfica.....	42
4.3 Estudo químico biomonitorado da fração insolúvel em metanol do grupo de frações 4 (PR01).....	44
4.3.1 Análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio de carbono (RMN de ¹ H e ¹³ C).....	44
4.3.2. Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).....	48
4.3.2.1. Análise da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de PR01 (tempo de retenção 49,01 min e 50,49 min).....	49
4.3.2.2 Análise da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de PR01 (tempo de retenção 49,41 min e 51,03 min).....	51
4.3.2.3 Análise da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de PR01 (tempo de retenção 51,65 min).....	52
4.3.3 Isolamento de acetato de β-amirina (PR02).....	56
4.3 Western blot grupo 4.....	59
4.4 Caracterização do composto isolado da fração 8 (PR03).....	60
4.5 Caracterização do composto precipitado (PR04).....	63
5 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer de Próstata

O câncer de próstata (PCa) é um problema de saúde pública em todo o mundo. Assim, são inúmeras as pesquisas que abrangem o assunto, a respeito de técnicas para um diagnóstico precoce, mecanismos moleculares envolvidos para o início e progressão da doença, bem como novas aplicações terapêuticas.

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a estimativa para novos casos de câncer no mundo em 2018 é de 18,1 milhões e 9,6 milhões de mortes, sendo que, destes, 1,3 milhão será câncer de próstata, ficando atrás apenas dos cânceres de pulmão, mama e colorretal. Em 2010 o câncer gerou um custo de aproximadamente 1,16 trilhão de dólares. Segundo as evidências atuais, entre 30% e 50% das mortes por câncer poderiam ser evitadas modificando ou evitando os principais fatores de risco, tais como evitando produtos do tabaco, reduzindo o consumo de álcool, mantendo um peso saudável, fazendo exercícios regularmente e abordando fatores de risco relacionados à infecção (OMS, 2018).

No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), a estimativa para 2018 foi de aproximadamente 600 mil novos casos de câncer. O câncer de próstata é o que apresenta a maior prevalência entre os cânceres em homens, exceto o câncer de pele não-melanoma, e a estimativa para novos casos em 2018 é de 68.220, o que representa 66,12 casos a cada 100.000 homens. Apenas em 2014, no Brasil ocorreram aproximadamente 14 mil mortes (INCA, 2018). Mais que 95% dos cânceres de próstata são classificados como adenocarcinoma. 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 receptor de andrógenos (AR) e de antígeno prostático específico (PSA) (CHEN et al., 2012; SHEN; ABATE-SHEN, 2010).

O antígeno prostático específico (PSA), é uma serina protease relacionada à calicreína, produzida pela próstata em condições normais, e seu valor aumentado indica distorções no tecido prostático. Apesar de não ser específico para detecção de câncer, pois pode estar alterado em outras condições, como por exemplo, nas prostatites, é utilizado como principal biomarcador na prática clínica para detecção precoce de câncer de próstata, podendo também ser utilizado no acompanhamento do tratamento, na forma de vigilância ativa em pacientes com câncer de próstata. O diagnóstico é realizado por meio de biópsia da próstata seguida da classificação histopatológica (OTERO et al., 2014).

O fator de risco mais relacionado ao desenvolvimento do câncer de próstata é a idade, pois a maioria dos casos ocorre em homens com 65 anos ou mais, apenas 1% ocorre em homens com menos de 50 anos, e é raro ser diagnosticado em homens antes do 40 anos. Outros fatores que também podem ser citados são a história familiar, raça, dieta, obesidade, doenças sexualmente transmissíveis, ocupação e fumo (BASHIR, 2015).

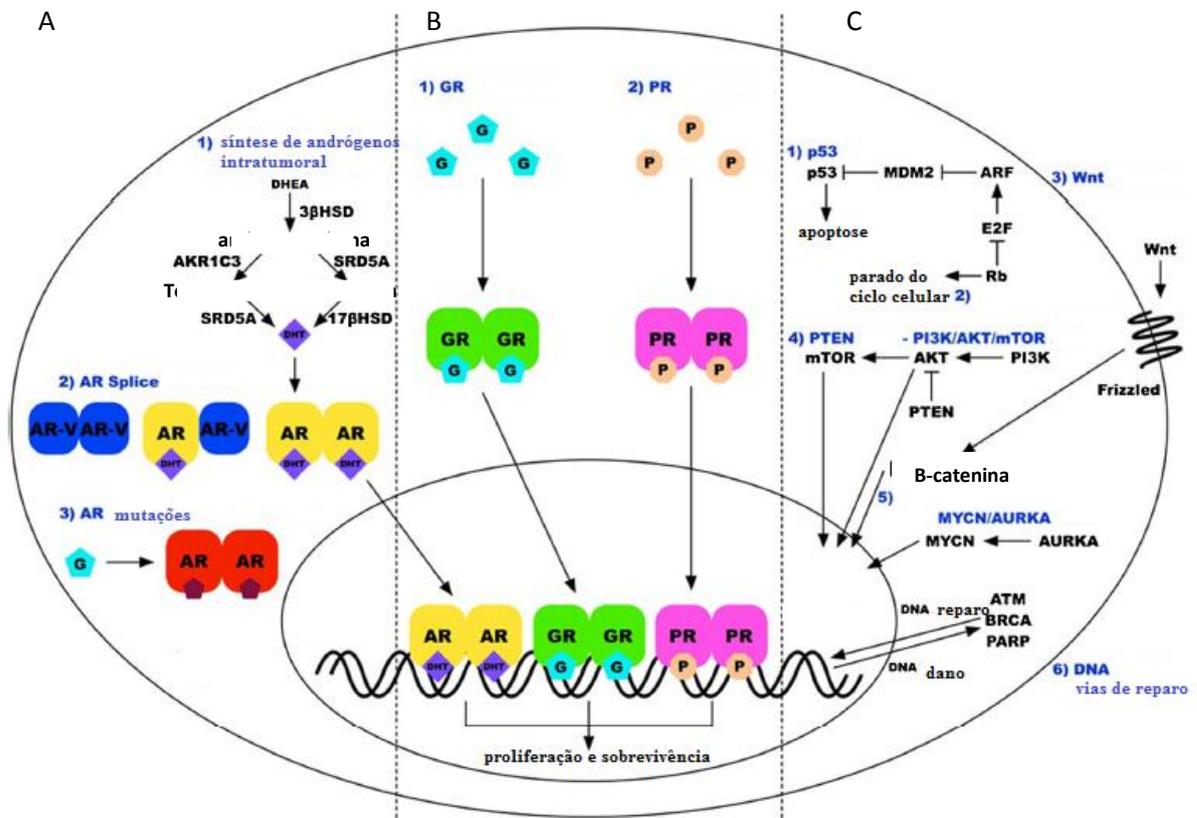
1.2 Mecanismos Moleculares

Inúmeros mecanismos têm sido estudados e propostos para o desenvolvimento e progressão do câncer de próstata. O mecanismo principal para desenvolvimento do câncer de próstata (PCa) é a sinalização via receptor de andrógenos (AR), pois a interação andrógeno-receptor tem papel transcricional crucial tanto na próstata normal quanto no câncer de próstata. Além dos mecanismos relacionados aos andrógenos também são descritos mecanismos independentes relacionados à progressão do câncer andrógeno-sensível para um câncer andrógeno-resistente também denominado de castração resistente. Os mecanismos relacionados ao desenvolvimento, à progressão e resistência a fármacos podem ser divididos em 3 classes: sinalização via andrógeno-AR, sinalização via receptor de glicocorticoides (GR) GR-AR e receptor de progesterona (PR) PR-AR, mecanismos independentes da via andrógeno-AR, demonstrados na Figura 1 (SILBERSTEIN, TAYLOR, ANTONARAKIS, 2016).

A sinalização via andrógeno-receptor ocorre por meio dos andrógenos masculinos, que são sintetizados pelas gônadas, extragonadal pelas glândulas suprarrenais, bem como intratumoral. A testosterona e diidrotestosterona (DHT) são os dois andrógenos principais que agem como fatores de crescimento das células prostáticas, sendo que a DHT está presente na próstata em concentrações superiores a testosterona, até seis vezes maiores, e possui uma maior afinidade pelo receptor de andrógenos (GELMANN, 2002; EGAN et al., 2014; GORDON et al., 2010).

O receptor de andrógenos é um receptor nuclear, codificado pelo gene AR localizado no cromossomo X, que contém 8 éxons. Ele possui uma região amino terminal (-NH₂) codificada pelo éxon 1, os éxons 2 e 3 codificam o domínio de ligação ao DNA (DBD), uma região carboxi terminal (-COOH) formada por 12 hélices, o sítio de ligação de ligantes (LBD), codificado pelos éxons 4 a 8 (GELMANN, 2002; EGAN et al., 2014; GORDON et al., 2010).

Figura 1 – Mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento, progressão e resistência à terapêutica do câncer de próstata.



A) Mecanismos relacionados à sinalização de andrógenos-AR. B) Mecanismo relacionados a interações dos elementos responsivos aos andrógenos (AREs) com os receptores de glicocorticóides e progesterona (GR e PR, respectivamente) C) Mecanismos independentes ao AR (Adaptado de SILBERSTEIN, TAYLOR, ANTONARAKIS, 2016).

O AR livre está localizado no citoplasma ligado a chaperonas (HSP); quando ativado por meio da ligação com os andrógenos, o AR sofre uma mudança conformacional na hélice 12 e libera as chaperonas. Subsequentemente, o AR-andrógeno forma um homodímero e se transloca para o núcleo. O AR dimerizado se liga na região do promotor dos elementos responsivos a andrógenos (ARE) de genes alvo regulando sua transcrição. Um dos genes mais conhecidos regulado pelo AR é o PSA.

Na presença de andrógenos, os genes responsivos estimulam crescimento, sobrevivência, e diferenciação das células da próstata. Na ausência de andrógenos, as células entram em apoptose. Interações adicionais com coativadores e correpressores facilitam ou inibem a transcrição de genes alvo. A ligação com o agonista recruta coativadores que amplificam o sinal de transcrição quando o AR liga ao DNA; os antagonistas recrutam um complexo de correpressores que atenuam o sinal (GELMANN, 2002; GAO et al., 2005; EGAN et al., 2014; GORDON et al., 2010).

As células responsivas sensíveis a andrógenos dependem da sinalização do eixo andrógeno-receptor para proliferação e sobrevivência. Entretanto, na progressão da doença é observada a proliferação e sobrevivência mesmo na ausência de andrógenos, pela terapia de privação de andrógenos; assim, há adaptações na sinalização do AR. Uma dessas adaptações é a amplificação do AR, o tornando superexpresso, aumentando a sensibilidade para os andrógenos intratumorais (GELMANN, 2002).

Estudos têm mostrado que a regulação positiva de enzimas da via de síntese de andrógenos, como a 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase (3 β HSD), 5 α -esteroide redutase (SRD5A), e 17 β -hidroxiesteroide desidrogenase (17 β HSD), 17 α -hidroxilase/17,20-liase (CYP17A1), aldoceto redutase 1C3 (AKR1C3) contribuem para o desenvolvimento do câncer castração resistente e para a resistência a fármacos, como abiraterona e enzalutamida. Esta regulação possibilita uma maior quantidade de andrógenos para interagirem com o AR (LIN et al., 1997; LI Z et al., 2015; LI R et al., 2012; CHANG et al., 2013).

Outra alteração na via de sinalização do eixo andrógeno-AR se dá por meio de mutações pontuais no LBD; essas mutações alteram o sítio de ligação com o ligante, conferindo atividade agonista ao AR (GELMANN, 2002; ZHAO et al., 2000; STEKETEE et al., 2002). Também podem ocorrer variantes do AR por meio de *splice* alternativo fazendo com que o receptor se torne constitutivamente ativo (HU et al., 2009).

Há também várias alterações genéticas que têm sido correlacionadas com o desencadeamento, progressão e resistência do câncer de próstata. Entre elas estão as mutações em coativadores que participam da ativação do AR, dos quais os principais são o ARA 70 beta e o SRC-1. O ARA70 beta é um oncogene que se encontra superexpresso no PCa. O SRC-1 é um coativador que está relacionado à progressão do PCa, pois potencializa a estimulação do AR mesmo em baixas concentrações de andrógenos (CULING; SANTER, 2014).

Outro mecanismo proposto está relacionado à homologia de outros receptores com o AR, como ocorre com o receptor de glicorticoides (GR) e da progesterona (PR) que apresentam mais de 80% de homologia com o AR principalmente no DBD, sítio de ligação ao DNA; assim, o GR e o PR podem ligar-se aos ARE e elementos promotores e induzir a expressão de genes regulados pelo AR, sustentando a sobrevivência celular mesmo na ausência de andrógenos durante a terapia de privação de andrógenos. Outra hipótese é que o GR é negativamente regulado pelo AR; assim, quando o AR é inibido, o GR é superexpresso

(ARORA et al., 2013; XIE et al., 2015; MIYAHIRA; SIMONS; SOULE, 2014; GRINDSTAD et al., 2015).

Além dos mecanismos relacionados à sinalização andrógeno-AR estão os mecanismos que levam a progressão e resistência à terapêutica do PCa que são independente desta sinalização. Com grande importância está a alteração da sinalização na via da fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K)-proteína quinase B (PKB/AKT)-alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), que apresenta alterada em todos os cânceres de próstata avançado. O papel do mTOR está relacionado à integração de sinais de crescimento celular, da síntese proteica, proliferação, metabolismo, diferenciação e sobrevivência celular. Sua função dá-se por meio de fosforilação de vários mediadores, como a PI3K e a AKT (TAYLOR et al., 2010; SILBERSTEIN, TAYLOR, ANTONARAKIS, 2016).

Um dos mecanismos responsáveis pela alteração da sinalização da via do mTOR em PCa é a mutação no gene homólogo da fosfatase e tensina (PTEN). Ele é um gene supressor tumoral, em que até 60% dos casos de câncer de próstata encontra-se mutado ou deletado. Ele codifica uma enzima fosfatase essencial responsável por desfosforilação de PIP3; quando a PIP3 está fosforilada ela é responsável por recrutar PI3K, que por sua vez ativa AKT, desencadeando a ativação da via do mTOR (TAYLOR et al., 2010).

Outras alterações incluem: a deleção ou mutação na proteína retinoblastoma (Rb), que participa da regulação do ciclo celular; sinalização pela via Wnt por meio de beta-catenina (CTNNB1), proteína relacionada a junção celular e interação do núcleo com fatores de transcrição; diferenciação neuroendócrina; vias de reparo de DNA; mutações no TP53, o gene supressor tumoral mais mutado em cânceres, que codifica a proteína p53 essencial para o ciclo celular, pois controla a transição da fase G1 para S, e em condições de lesão ao DNA ela induz a parada do ciclo celular e apoptose. Em 90% dos casos de câncer de próstata está presente o silenciamento por metilação da glutathione s-transferase (GSTP-1), que codifica enzimas desintoxicantes que catalisam a conjugação de glutathione em moléculas tóxicas a serem eliminadas; em até 80% dos casos ocorre a perda da expressão de NKX3.1, um gene do homeobox, que está relacionado ao câncer de próstata andrógeno-resistente e metastático (PORKKA; VISAKORP, 2004; SILBERSTEIN, TAYLOR, ANTONARAKIS, 2016).

1.3 Tratamento

O tratamento do câncer de próstata deve ser individualizado, levando em conta principalmente o risco de progressão para um estágio agressivo, sendo classificados em baixo,

intermediário e alto risco. Também é considerado o estadiamento, grau histopatológico, idade e comorbidades do paciente. Para doença com baixo risco de progressão (restrita a próstata) o tratamento inclui a cirurgia (prostatectomia radical), a radioterapia e a observação vigilante. Para o tratamento do câncer com risco intermediário, alto e localmente avançado, além dos tratamentos citados anteriormente, é incluído o bloqueio hormonal. Entretanto, no caso de câncer recorrente e na presença de metástases, o tratamento é realizado com quimioterápicos, como o docetaxel e abiraterona, combinados a ADT. Em câncer resistente à terapia hormonal, também chamado de câncer castração resistente (CRPC), as opções dependem se a doença é sintomática ou não e são limitadas (KACHUR, 2018).

A observação vigilante, ou vigilância ativa, inclui a dosagem de PSA a cada 3 a 6 meses, o exame retal digital anual, ultrassom transretal com biópsia entre 6 a 12 meses e repetição da biópsia de 3 a 5 anos. A imagem de ressonância magnética multiparamétrica (mpMRI) pode ser incluída para reclassificar a doença (MORASH et al., 2015).

Também tem sido utilizada a terapia focal para pacientes com câncer de próstata de risco baixo a intermediário. Na prática clínica atual, a terapia focal representa o meio termo entre vigilância ativa e medidas de tratamento definitivo, como a radioterapia e a prostatectomia radical. A terapia focal deve ser definida como a ablação do dominante ou lesão índice, incluindo crioterapia, laser, ablação, a terapia fotodinâmica, ultrassom de alta intensidade focalizado, eletroporação irreversível, a ablação por radiofrequência, braquiterapia focal e radiação estereotáxica (PERERA et al., 2016).

A progressão do câncer é demonstrada pela recorrência bioquímica (BCR), que é definida por duas medidas de PSA crescente consecutivo, valores $> 0,2$ ng/mL após prostatectomia radical (RP) (AMLING et al., 2001). Após a terapia de radiação primária (RT), o *Radiation Therapy Oncology Group* (RTOG) e a *American Society for Radiation Oncology Phoenix* definiram como falha quando o PSA for maior que 2 ng/mL (ROACH et al., 2006). Neste caso, é necessária a adição de terapia de privação de andrógeno (ADT), podendo ser por castração cirúrgica ou uso de agonista ou antagonista do hormônio relacionado do hormônio liberador de gonodotrofinas (GnRH/LHRH), antiandrógenos e quimioterapia, conforme a progressão. A castração cirúrgica é considerada o padrão ouro para ADT, entretanto, os agonistas e antagonistas do LHRH substituíram a castração cirúrgica como o padrão em terapia hormonal, porque esses agentes têm potencial para reversibilidade, e evitam o desconforto físico e psicológico associado com orquiectomia. Eles se ligam imediatamente e de forma competitiva aos receptores de LHRH, levando a uma diminuição rápida do

hormônio luteinizante (LH), hormônio folículo-estimulante (FSH) e testosterona (SEIDENFELD et al., 2000; CRAWFORD et al., 2014).

Os antiandrógenos esteroidais (AANS), também podem ser utilizados; eles não suprimem a secreção de testosterona, mas são geralmente usados para melhorar os efeitos clínicos do surto inicial de testosterona associada com agonistas de LHRH (TSUSHIMA et al., 2001). Dentre eles, encontram-se a bicalutamida, que vem mostrando uma segurança mais favorável e perfil de tolerabilidade do que flutamida e nilutamida (IVERSEN, 2002). No entanto, revisões sistemáticas de antiandrógenos em combinação com agonistas de LHRH têm mostrado que antiandrógeno combinado com bloqueio usando uma NSAA parece proporcionar uma pequena vantagem à sobrevivência (<5%) versus monoterapia (castração cirúrgica ou agonistas de LHRH) (PROSTATE CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP, 2000; SCHMITT et al., 2000 ; AKAZA et al., 2009).

O câncer de próstata castração-resistente (CRPC) é definido quando o nível de testosterona após castração é menor que 50 ng/dL ou 1,7 nmol/L e há um dos seguintes tipos de progressão: progressão bioquímica, que se caracteriza por três aumentos consecutivos no PSA com uma semana de intervalo, resultando em dois aumentos de 50% sobre o nadir, e PSA > 2ng/mL; progressão radiológica, com o aparecimento de novas lesões, duas ou mais novas lesões ósseas na varredura do osso ou uma lesão do tecido mole utilizando os Critérios de Avaliação de Resposta em Tumores Sólidos (TROCK et al., 2008; EISENHAUER et al., 2009).

Reis e colaboradores (2018) mostraram, por meio de uma revisão sistemática da literatura, que o uso da terapia de radiação estereotáxica pode ser uma opção de tratamento seguro em caso de câncer de próstata com metástase óssea. (REIS et al., 2018)

No caso de CRPC assintomático, o tratamento é mudar o antiandrógeno para os tratamentos de segunda linha, como o cetocozol, estrógenos ou progesteronas, e adicionar abiraterona ou enzalutamida. Ou também podem ser utilizados sipuleucel-T ou pembrolizumabe. Para CRPC sintomático, é utilizado docetaxel com corticosteroide; para pacientes com metástase óssea é utilizado radium-223. Em casos de progressão após docetaxel, pode ser utilizado cabazitaxel combinado com esteroide, entretanto os efeitos adversos graves podem surgir, como neutropenia. A cura é improvável e atualmente não há terapias que mostram aumento na sobrevida após cabazitaxel, apenas medicamentos paliativos (KACHUR, 2018).

É importante ressaltar que muitos dos fármacos utilizados no tratamento de câncer, nos últimos 40 anos, têm sua origem ou usam como modelo para a síntese, produtos naturais. E produtos naturais com atividade antitumoral podem ser encontrados em diversas fontes, tais como vegetais, microrganismos, organismos marinhos. Da mesma forma, plantas sob a forma de extratos, bem como compostos isolados têm apresentado evidências quanto ao potencial de prevenção de PCa (KALLIFATIDIS; HOY; LOKESHWAR, 2016).

Embora muitos pacientes se beneficiem dos medicamentos disponíveis, alguns homens apresentam resistência primária e quase todos eventualmente desenvolvem resistência secundária, com poucas opções (SILBERSTEIN; TAYLOR; ANTONARAKIS, 2016). Dessa forma, buscar novas fontes para inserção no arsenal terapêutico e para a prevenção de câncer de próstata é imperativo para oferecer alternativas viáveis para esses pacientes.

1.4 PLANTAS E CERRADO

Até o presente momento, são reconhecidas 46188 espécies da flora brasileira, sendo 32868 angiospermas, 1527 briófitas, 30 gimnospermas e 1294 samambaias e licófitas, além de 5720 fungos e 4749 algas. Estas estão dispostas em biomas com características distintas, sendo eles, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO, 2018).

O bioma Cerrado ocupa 23,92% de todo território brasileiro, é detentor de 5% da biodiversidade do planeta e reconhecido como a savana mais rica do mundo. O Cerrado é composto por um conjunto de diferentes formas de vegetação que incluem fitofisionomias florestais (cerradão), savânicas (cerrado **stricto sensu**), campestres (campo sujo). Com 12.070 espécies de plantas terrestres descritas, é uma importante fonte para descoberta de novos fármacos para o tratamento de diferentes patologias (FORZZA, 2010; BRASIL, 2016).

Segundo Bresolin e Cechinel Filho (2010), cerca de 40% dos medicamentos comercializados foram obtidos direta ou indiretamente de fontes naturais, e 20% das plantas com propriedades medicinais conhecidas estão no Brasil (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

As substâncias obtidas de plantas medicinais podem ser usadas em diversos casos, sejam elas mesmas utilizadas como fármacos ou como precursoras para novos fármacos. Dentre os agentes anticancerígenos derivados de plantas podemos citar os alcaloides vimblastina e vincristina (*Catharanthus roseus* (L.) Don); o diterpeno taxol ou paclitaxel (*Taxus* sp); a camptotecina (*Camptotheca accuminata* Decne.), que deu origem ao topotecano

e iritecano; podofilotoxina (*Podophyllum peltatum* L.) que deu origem ao etoposídeo e o tenoposídeo, plipartina (*Piper tuberculatum* Jacq.) e biflorina (*Capraria biflorina* L.) (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

Levando em conta o potencial de descoberta de novos fármacos oriundos de plantas, a grande biodiversidade brasileira, o potencial a ser explorado do bioma cerrado, nosso grupo desenvolveu um estudo de rastreamento de atividade citotóxica em 31 extratos de plantas, a maioria do Cerrado, em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata (CARDOSO, 2014). Destes, foi selecionado um, pertencente ao gênero *Pouteria* com potencial de isolamento de compostos ativos.

1.4.1 POUTERIA

As espécies do gênero *Pouteria* pertencem ao grupo das angiospermas que são plantas com flores e frutos. É um dos mais diversificados gêneros de plantas, com cerca de 250.000 espécies, no Brasil sendo 125 espécies, das quais 53 são endêmicas, além de subespécies e variedades (*POUTERIA IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO*, 2018).

Muitas espécies desse gênero são utilizadas como alimento, bem como para fins medicinais. Em trabalhos anteriores, espécies desse gênero apresentaram potencial como agente citotóxico: extratos hexânico, etanólico e aquoso da folha de *Pouteria torta* apresentaram atividade citotóxica em células de carcinoma de boca e mama (ELIAS et al., 2013); 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 melanoma (MESQUITA et al., 2009).

Em estudo anterior do nosso grupo de pesquisa foi mostrado que o extrato etanólico de folhas da *Pouteria caimito* apresentou atividade citotóxica em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano resistente a andrógenos (PC3); o extrato etanólico de frutos de *Pouteria torta* apresentou atividade citotóxica em linhagem de adenocarcinoma de próstata sensível a andrógenos (LNCaP); o extrato hexânico do caule de *Pouteria ramiflora* destacou-se dentre outros extratos estudados, por sua atividade em uma linhagem de adenocarcinoma de próstata sensível a andrógenos, LNCaP. O extrato mostrou um efeito citotóxico dose-dependente, com o maior índice de seletividade para a linhagem cancerígena, tanto em 24h quanto em 48h de tratamento (7,7 e 5,5 respectivamente). Também mostrou tendência a estacionar o ciclo celular na fase G0/G1, porém sem significância estatística (CARDOSO, 2014).

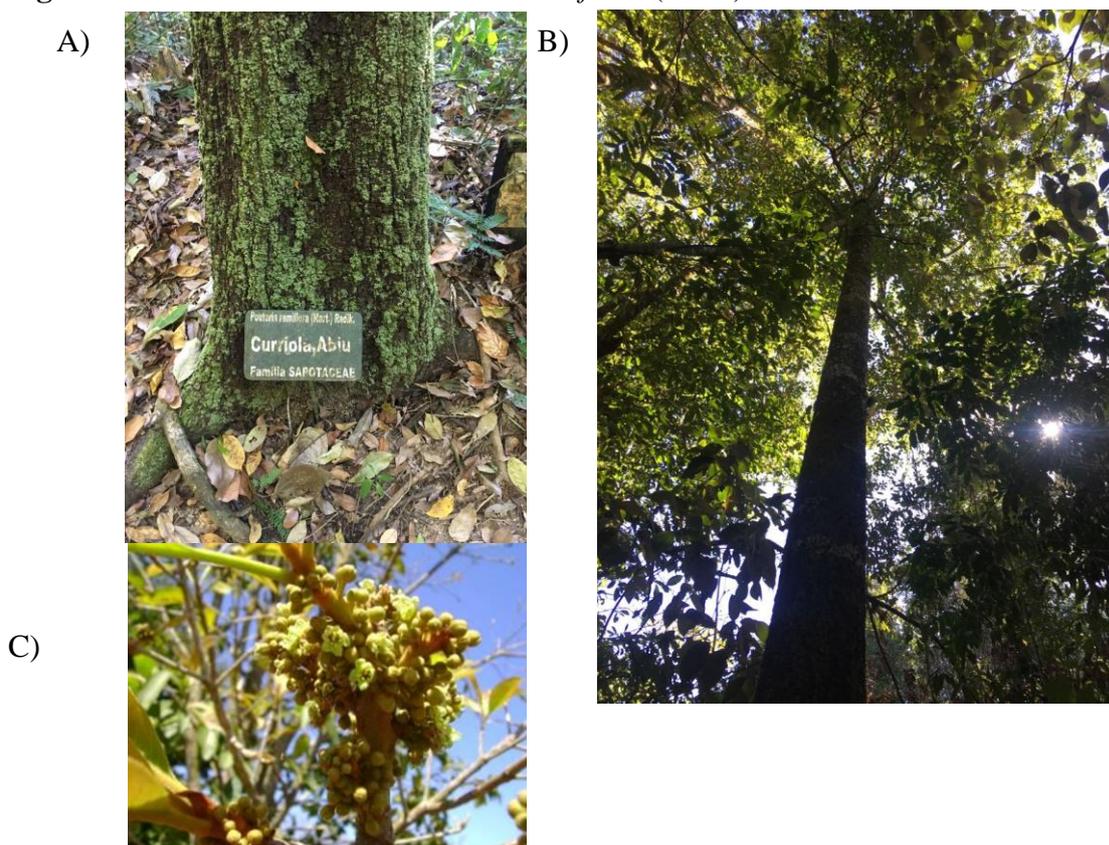
Dessa forma, essa espécie foi selecionada para estudo químico biomonitorado para isolamento e identificação de compostos ativos.

1.4.1.1 *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk.

Pouteria ramiflora, conhecida popularmente como fruta-do-veado, louco e massaranduba, pessegueiro-do-cerrado, pitomba-de-leite, abiu-cutite, é nativa do Brasil, sendo encontrada na Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (*POUTERIA IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO*, 2018).

É uma planta de porte arbóreo que pode atingir até 6 metros de altura por 4 a 6 metros de diâmetro de copa. Os frutos são em forma de bagas (ALMEIDA et al., 1998). E suas características estão apresentadas na Figura 2.

Figura 2 – Árvore e frutos de *Pouteria ramiflora* (Mart.)Raldk.



A e B: mostram a característica da árvore de *Pouteria ramiflora*. C: fruto de *Pouteria ramiflora*.

É utilizada com finalidade madeireira e como alimento. Na medicina popular é usada para diferentes finalidades, tais como: o látex, na forma de emplastro, sobre machucados que não “abriram a pele”, as raízes agem contra vermes e disenteria (GAMA et al., 2007).

Devido seu uso na medicina popular, foram realizados estudos para avaliar as diferentes atividades biológicas desta espécie, tais como inibição de atividade enzimática, no qual os extratos aquoso e etanólico da folha de *P. ramiflora* apresentaram atividade inibitória das enzimas alfa-amilase e alfa-glicosidase, com potencial para tratamento de hiperglicemia (SOUZA et al., 2012).

Em ensaio em camundongos, a administração diária do extrato aquoso de *P. ramiflora* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg, por oito dias, foi capaz de reduzir o peso corporal e o nível glicêmico nos animais (GOUVEIA et al., 2013). Em outro estudo com extrato aquoso das folhas de *Pouteria ramiflora* reduziu a glicemia em ratos, bem como a atividade enzimática antioxidativa, TAS e produtos de peroxidação lipídica (MDA). Apresentou ainda, efeito neuroprotetivo de danos oxidativos (COSTA et al., 2013).

Segundo Castro e colaboradores (2007), o extrato etanólico das folhas de *P. ramiflora* apresentou atividade antioxidante superior àquela apresentada pelo composto BHT usado como controle (CASTRO et al., 2007). O extrato etanólico de raízes de *Pouteria ramiflora* apresentou atividade antinoceptiva e anti-inflamatória (FONTES JUNIOR et al., 2009).

Um estudo com extrato hidroalcoólico (70%) das folhas de *Pouteria ramiflora* mostrou atividade citotóxica com concentrações superiores a 2 µg/mL em linhagem de hepatocarcinoma (HepG2) (TUTTIS et al., 2018).

Em busca dos compostos responsáveis pelas atividades biológicas, diferentes grupos de metabólitos secundários vêm sendo descritos em extratos de *Pouteria ramiflora*, tais como, flavonoides, taninos e saponinas (extratos etanólicos da casca da raiz), taninos (extrato etanólico da madeira e casca da raiz) (GOUVEIA et al., 2013). Em extratos aquosos e etanólicos das cascas internas e externas do caule dessa espécie, foram identificados compostos fenólicos, taninos e cumarinas também foram identificadas (exceto no extrato etanólico das cascas internas), antraquinonas livres, esteroides e triterpenos foram identificados nos extratos etanólicos e hexânicos, e nos extratos aquosos foi confirmada a presença de saponinas, glicosídeos cardiotônicos, alcaloides, flavonoides e glicosídeos cianogênicos (OLIVEIRA et al., 2014).

Dos compostos responsáveis pelas ações biológicas, os triterpenos e os flavonoides são os mais comuns encontrados no gênero *Pouteria* (SILVA et al., 2009).

Apesar de vários estudos caracterizarem o grupo dos metabólitos secundários mais prevalentes em determinados extratos, poucas substâncias foram isoladas e identificadas. Além do marcador do gênero, o flavonoide miricetina-3-O- α -L-rhamnopiranosídeo, foram

encontrados, miricetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo e miricetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo, treze substâncias derivadas da miricetina, quercetina, apigenina além do ácido gálico e do ácido quínico, no extrato hidro-alcoólico (etanol a 70%) (COSTA et al., 2014). Em estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas, foram isolados e identificados três triterpenos: friedelina, *epi*-friedelanol e taraxerol (RODRIGUES et al., 2017).

JUSTIFICATIVA

O potencial terapêutico de compostos provenientes de plantas da flora brasileira ainda é relativamente pouco explorado, com crescente interesse nos últimos anos. Diante da limitação terapêutica que ainda há para o tratamento do câncer de próstata avançado e do grande potencial de descoberta de novos agentes terapêuticos provenientes de plantas, foi realizado estudo prévio de rastreamento (*screening*) com 31 extratos de 11 plantas do Cerrado com potencial citotóxico em linhagens celulares de câncer de próstata humano, o qual resultou em dissertação de mestrado (CARDOSO, 2014). Nesse estudo, o extrato hexânico do caule de *Pouteria ramiflora* mostrou significativa atividade citotóxica *in vitro* com elevado índice de seletividade e, portanto, foi selecionado para o presente estudo químico biomonitorado com a finalidade de investigar, identificar e isolar compostos presentes nesse extrato desta espécie de planta com potencial atividade terapêutica no câncer de próstata. A busca pela identificação de compostos com ação terapêutica derivados de plantas de biomas brasileiros é crescente e este estudo vem somar-se a esse conjunto.

2 OBJETIVOS

GERAL

- Isolar e caracterizar compostos e frações ativas a partir de extrato hexânico do caule de *Pouteria ramiflora*, que apresentou atividade citotóxica em linhagem de células de adenocarcinoma de próstata humano.

Específicos

Avaliar a atividade citotóxica das frações obtidas do extrato bruto hexânico de caule de *Pouteria ramiflora* em linhagem de células de adenocarcinoma de próstata humano.

Isolar e identificar compostos obtidos de frações ativas, por meio de um estudo químico biomonitorado por atividade biológica.

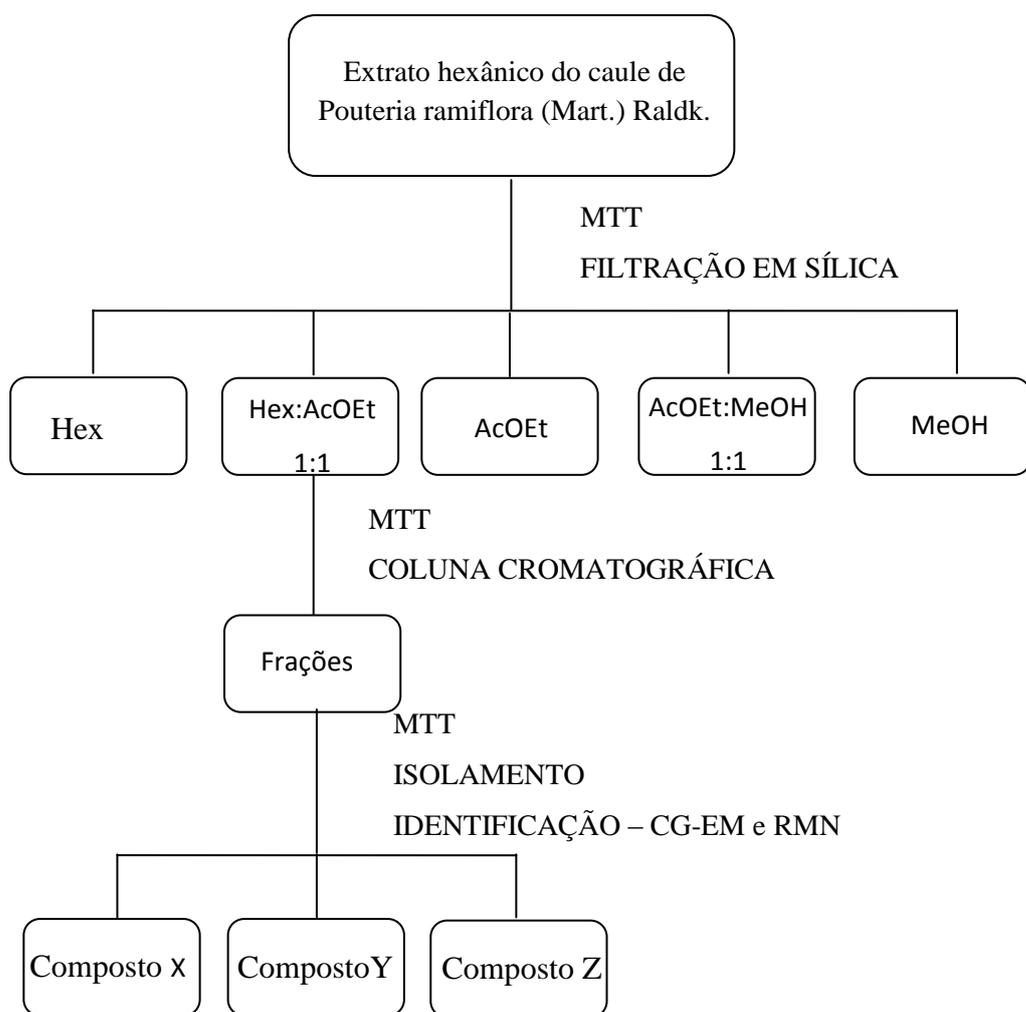
Avaliar atividade citotóxica dos compostos isolados em linhagem de adenocarcinoma de próstata humano.

Avaliar alterações nas vias, andrógeno-AR e mTOR, relacionadas ao desenvolvimento e progressão do câncer de próstata após tratamento com fração ativa.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo químico biomonitorado foi executado como apresentado na Figura 3. Foi utilizado testes para separação, isolamento e identificação e a cada etapa foi monitorada por meio de teste biológico. Todos os métodos são descritos posteriormente.

Figura 3 – Representação esquemática das etapas e métodos empregados no estudo químico biomonitorado de extrato hexânico de caule de *Pouteria ramiflora*.



ATIVIDADE BIOLÓGICA DOS COMPOSTOS - MTT

Hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol

3.1 MÉTODOS GERAIS PARA TESTES BIOLÓGICOS

3.1.1 Culturas de Células:

Foi utilizada uma linhagem de células de adenocarcinoma de próstata humano, especificamente LNCaP clone FGC (ATCC). Essa linhagem celular é andrógeno-sensível, expressa o receptor de andrógenos e produz o antígeno prostático específico. É derivada de sítio metastático do linfonodo supraclavicular esquerdo. Para o cultivo celular, foi utilizado o meio RPMI-1640 (ATCC), Sigma, acrescido com bicarbonato de sódio (2,2 g/L), Hepes (2,0 g/L), 10 mL de piruvato de sódio, soro fetal bovino a 10 % e 1 % de penicilina + estreptomicina.

3.1.2 Ensaio de citotoxicidade celular (MTT):

Para monitorar a atividade biológica a cada etapa do fracionamento do extrato hexânico do caule de *Pouteria ramiflora*, foi utilizado o ensaio de citotoxicidade por meio de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) que consiste na conversão de um sal tetrazólico em cristais de formazan por uma enzima mitocondrial, a succinato redutase, por células viáveis. A citotoxicidade celular foi calculada por comparação entre a absorbância obtida após tratamentos com frações com a absorbância do controle não tratado, isto é, as células cultivadas com o veículo em que eram dissolvidas as frações. 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; após 24 horas, o meio foi aspirado e adicionados 100 μ L de cada solução de tratamento e controles. Para tratamento, as frações foram pesadas e diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO)/etanol (2:3). Foi preparada uma solução-mãe, a partir da qual foram preparadas as soluções de tratamento a, no máximo, 1% do veículo. As soluções-mãe foram diluídas em meio de cultura nas concentrações previamente estabelecidas. Após 24 e 48 horas de tratamento, o meio contendo o tratamento foi aspirado e substituído por 100 μ L de meio de cultura sem tratamento com 10 μ L de MTT (5 mg/mL). As células foram então incubadas por 4h para conversão do MTT em cristais de formazan, os quais foram posteriormente solubilizados com isopropanol acidificado (25 mL de isopropanol + 104 μ L de ácido clorídrico (HCl) PA). A absorbância foi medida em uma leitora de microplaca a 450 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata, com experimentos independentes.

3.1.3 Expressão de proteínas por western blot

Para investigar a expressão de proteínas relacionadas a vias de carcinogênese, foi selecionado o anticorpo anti-AR (Santa Cruz) que compõe a principal via relacionada ao câncer de próstata. Também foi avaliada a expressão da proteína mTOR total e fosforilada, responsável pela proliferação e sobrevivência celular na maioria dos cânceres castração resistente, por meio de anticorpo anti-mTOR total e fosforilado (Cell signaling). Para o controle interno do experimento foi utilizado, o anticorpo anti-GAPDH (Abcam), gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase, que reconhece as proteínas GAPDH que são constitutivas das células.

Tratamento, coleta e quantificação das proteínas

Para obter as proteínas, foram cultivadas 40×10^4 células em placas de 6 poços; após 24h foi feito o tratamento com a amostra (fração 4) a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e controle DMSO/EtOH (2:3). Após 24h e 48h de tratamento as proteínas foram coletadas. O meio de cultura foi coletado em microtubo de centrífuga 1,5 mL (Eppendorf), adicionado de PBS (solução tampão salina-fosfato) acrescido de inibidores de proteinase e fosfatases (pirofosfato de sódio e ortovanadato de sódio) Sigma, e coletado. Em seguida, foi adicionado tampão de lise (RIPA pH 8,0) e as células foram soltas, utilizando rodo, coletadas e centrifugadas a 2000 rpm por 5 min. As proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951), uma curva padrão foi construída a partir de diferentes concentrações de BSA (albumina sérica bovina). As absorbâncias encontradas das proteínas foram interpoladas com a curva de BSA, determinando assim a concentração das proteínas totais em cada amostra.

Preparo das amostras e eletroforese em gel de acrilamida

Após a determinação da concentração das proteínas, as amostras foram preparadas a 40 μg de proteínas, tampão de amostra com betamercaptoetanol e água ultrapura para completar o volume de 20 μL . As proteínas foram desnaturadas a uma temperatura de 96 °C por 5 min e depois mantidas em gelo por, no mínimo 5 min; em seguida, foram aplicadas em gel de acrilamida 10 % para análise do AR e 7 % para análise do mTOR total e fosforilado. Esse gel foi previamente hidratado com tampão de corrida, submetido a uma corrente de 110 V por 10 min. Em seguida, 20 μL de amostra, e também de marcador de peso molecular, foram aplicados em cada poço e submetidos a uma corrente de 110 V por aproximadamente 2h.

Transferência para membrana de PVDF

Após a eluição do gel de acrilamida, as proteínas foram transferidas para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF), previamente ativada com metanol. Foi montado o que é chamado de “sanduiche” - gel em contato com a membrana. Para que a transferência ocorresse, foi adicionado tampão de transferência e aplicada uma corrente de 30 V *overnight* a 4 °C, utilizando cuba de transferência úmida.

Bloqueio e incubação com anticorpos

A membrana foi submetida a bloqueio em solução bloqueadora 5 % (albumina de leite); após 1h, a membrana foi lavada por 3 vezes - 5 minutos cada - com tampão salina de tris com Tween® 20 (TBST pH 7,6), e foi incubada com anticorpo anti-AR (1:500), anti-mTORt (1:1000) ou anti-mTORp (1:1000) em agitação a 4 °C *overnight*. Em seguida, após 3 lavagens de 5 min com TBST, foi incubada com anticorpo secundário (Abcam) em uma concentração 1:5000, por 1 h. Foi aplicado ECL PRIME (GE) por 5 min (esse reagente contém o substrato para enzima ligada ao anticorpo secundário). A reação de quimioluminescência foi registrada utilizando um fotodocumentador. Esta mesma membrana foi lavada com tampão de *stripping* - glicina, dodecilsulfato de sódio (SDS), Tween 20 (para retirar os anticorpos) pH 2,2 e reincubada com anticorpo primário anti-GAPDH com concentração de 1:1000 *overnight* a 4 °C e o anticorpo secundário anti-goat, com concentração 1:5000 (por 1 h). Foi aplicado o ECL PRIME e revelado. A quantificação das bandas de proteínas foi feita utilizando o software imageJ®.

3.1.4 Análise Estatística

O teste estatístico empregado para citotoxicidade/viabilidade celular e western blotting foi a análise de variância (ANOVA), seguida do teste *post-hoc* de comparações múltiplas de Tukey. 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 $p < 0,05$.

3.2 MÉTODOS GERAIS PARA ESTUDO QUÍMICO

3.2.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A cada fracionamento as frações e subfrações obtidas foram monitoradas por meio de CCD. Foi utilizada placa de sílica gel de 0,2 mm de espessura, DC-Fertigfolien POLYGRAM® SIL G (MACHEREY-NAGEL) na qual as amostras foram aplicadas com uso de capilares. Os pontos de aplicação foram 1 cm acima da parte inferior da placa, a 2,5 mm uns dos outros. Em seguida, as amostras foram eluídas com diferentes solventes, com mistura de hexano e acetato de etila (9:1, 8:2, ou 7:3), bem como clorofórmio. Os cromatogramas foram visualizados em câmara de luz ultravioleta, no comprimento de onda de 365 nm, e posteriormente reveladas com reagente de detecção, anisaldeído/ácido sulfúrico.

O reagente anisaldeído/ácido sulfúrico é utilizado para detecção de terpenos, esteroides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, sapogeninas, antibióticos e micotoxinas. Foram preparadas as soluções estoques denominadas solução A (solução de anisaldeído 2% em ácido acético; solução B (solução etanólica de ácido sulfúrico 20%). A placa cromatográfica foi borrifada com as soluções A e B respectivamente e em seguida foi aquecida com auxílio de secador serigráfico até o surgimento das bandas. (RODRIGUES, 2015)

3.2.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

A fim de identificar os compostos presentes em uma fração, essa foi submetida à cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, por meio de Cromatógrafo a Gás acoplado a Espectrômetro de Massas da marca Agilent®, cromatógrafo 6890N Network GC System, analisador SIMDIS D7169 AC, Analytical Controls. As análises foram realizadas no Laboratório de Cromatografia, no Núcleo de Competências em Química do Petróleo (NCQP), da Universidade Federal do Espírito Santo.

O método de análise seguiu as seguintes condições: temperatura do forno da coluna: 40 °C; temperatura de injeção: 290 °C; modo de injeção: split 50; tempo de espera: 1 min; modo linear de controle de fluxo de gás; pressão 12,435 psi; fluxo na coluna: 1,0 mL/min; purga: 3,0 mL/min. A análise iniciou a 40 °C, com aumento linear de 5 °C/min, até atingir 240 °C. Imediatamente, aumento linear de 30 °C/min, até atingir 310 °C, mantendo nesta última temperatura por 20 min. Tempo final de corrida: 63,3 min. Faixa de massas do detector: 50-500 (m/z).

Os sinais identificados foram comparados com a biblioteca disponível no programa AMDIS/NIST MS[®], 11^a edição, e atribuídos a compostos conhecidos, de acordo com o perfil de fragmentação.

3.2.3 Ressonância magnética nuclear (RMN) de ¹H e de ¹³C

Para identificar os compostos, as frações ou compostos isolados foram submetidos à RMN. Os espectros de RMN foram obtidos no Instituto de Química da Universidade de Brasília, usando um equipamento a 600 MHz da marca Bruker, modelo magneto ascend 600, console avance III HD, operando a um campo magnético de 14 T. Foram obtidos espectros de RMN de ¹H e de ¹³C, bem como foram feitos experimentos DEPT-135. As amostras foram diluídas em clorofórmio deuterado (CDCl₃, Sigma Aldrich). Como padrão interno foi usado tetrametilsilano (TMS).

Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento foram expressos em ppm e Hz, respectivamente. DEPT 135 foi gerado para a identificação de carbonos metínicos (-CH); metilênicos (-CH₂) e metílicos (-CH₃); os carbonos quaternários não estão ligados a hidrogênio e, portanto, não aparecem nesse espectro.

3.2.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

A cromatografia preparativa foi utilizada para separação de compostos presentes em determinada fração. Foram preparadas placas de sílica gel 60G (F254 -Fluka) fixada em suporte de vidro de 10 cm por 7 cm, com 0,5 mm de espessura, e ativadas a 110 °C por 1 hora. As amostras foram aplicadas com uso de capilares e eluídas com mistura hexano e acetato de etila na proporção 8:2. Os cromatogramas foram visualizados em câmara de luz ultravioleta, no comprimento de onda de 365 nm e posteriormente apenas o primeiro ponto foi revelado com reagente de detecção anisaldeído/ácido sulfúrico, para uma referência.. As bandas das amostras foram raspadas, suspendidas em clorofórmio e filtradas para retirada da sílica. As amostras foram monitoradas por meio de CCD para avaliar a pureza e enviadas para análise por RMN.

3.2.5 Lavagem de amostras com solvente (tentativa de purificação)

Para purificação, as amostras foram solubilizadas com metanol. Assim foram obtidas 2 fases, solúvel em metanol e insolúvel em metanol, separadas por decantação.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Obtenção do extrato bruto da *Pouteria ramiflora*

Para a obtenção do extrato bruto da *Pouteria ramiflora*, o material botânico, galhos e caule foram coletados em junho de 2015, de indivíduos localizados no campus Darcy Ribeiro da Universidade de Brasília, Distrito Federal, Brasil. A espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Christopher W. Fagg e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade de Brasília (UB) sob o número UB 3671. Inicialmente, os galhos foram reduzidos a tamanhos adequados à posterior pulverização e o material foi mantido à temperatura ambiente até umidade residual de 7,63%. O teor de umidade foi determinado utilizando uma balança determinadora de umidade por infravermelho (modelo IV2000-Gehaka).

O material foi pulverizado em moinho de facas e o pó foi submetido a tamiz nº 0,01. O material botânico pulverizado (2250 g) foi submetido à extração por maceração, por duas vezes, durante nove dias, utilizando hexano como solvente. Após decantação, as soluções extrativas foram concentradas sob vácuo em rotoevaporador (Heidolph - Hei-VAP Advantage, ML, G1), sob temperatura de aproximadamente 40 °C a 50 rpm. O extrato concentrado foi transferido para um frasco previamente pesado e mantido em banho-maria para eliminação de qualquer resquício de solvente, resultando em extrato bruto hexânico (34 g, rendimento 1,5%).

3.3.2 Filtração em sílica

Para separação preliminar do extrato bruto, foi feita uma filtração em sílica utilizando funil sinterizado de diâmetro 9,70 cm e altura 4 cm. Sobre papel filtro e algodão, foi adicionada sílica gel 60 (Merck), em uma camada de 6 cm de altura, sobre a qual 30,4 g da amostra (extrato hexânico bruto) previamente incorporada à sílica, foi agregada. A amostra foi submetida a eluição, utilizando solventes de polaridade crescente a saber: hexano 1 L, hexano:acetato de etila (1:1) 3 L, acetato de etila 0,5 L, acetato de etila:metanol (1:1) 1 L, metanol 1 L. Após eliminação do solvente em rotoevaporador, foram obtidas 5 frações, conforme apresentado na Tabela 1.

Cada fração foi submetida a teste de citotoxicidade conforme descrito no item 3.1.2. Para cada uma das frações foi obtida uma curva dose-resposta, utilizando as seguintes concentrações 1000, 750, 500, 300, 100, 50 µg/mL.

Tabela 1 - Rendimentos das frações do extrato hexânico de caule de *Pouteria ramiflora* obtidas por meio de filtração em sílica.

Fração	Solvente Utilizado	massa (g)	Rendimento* (%)
Fhex	hexano	0,75	2,5
Fhex:AcOEt	hexano:acetato de etila 1:1	26,97	88,8
FAcOEt	acetato de etila	0,14	0,5
FAcOEt:MeOH	acetato de etila:metanol 1:1	0,4	1,3
FMeOH	metanol	0,96	3,2

*rendimento em relação à quantidade de extrato bruto utilizado (30,4g). 3,7% foi retido na sílica. F: fração; hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol

3.3.3 Cromatografia em coluna (CC)

A fração Fhex:AcOEt foi submetida a separação por cromatografia em coluna. Foi preparada uma coluna com altura de 51,2 cm e 5 cm de diâmetro, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 (0,063-0,2 mm) (Merck). A amostra foi constituída de 20 g da fração definida para o estudo químico, incorporados à sílica gel 60. O início da eluição deu-se com a adição de hexano, com coleta das frações em volumes de 250 mL, a um fluxo de 250 mL a cada 30 min, totalizando 649 frações. As frações coletadas foram concentradas em rotoevaporador e monitoradas por meio de CCD, como descrito no item 3.2.1. Frações com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas, totalizando 46 grupos de frações. Durante o processo de separação por CC, entre as frações 57-59 e 64-65 houve a precipitação de um sólido branco que foi coletado e separado para análise posterior. As informações referentes às frações estão apresentadas na Tabela 2.

Todos os grupos de frações foram submetidos a ensaio de citotoxicidade, conforme descrito no item 3.1.2.

Tabela 2 - Frações obtidas da fração hex:AcOEt por Cromatografia em Coluna.

Grupo	Sub-frações	Eluente	Massa (g)	Rendimento (%)
1	1-35	hex	0,0822	0,41
2	36		0,0416	0,21
3	37		0,9159	4,58
4	38-41		5,0741	25,37
5	42-46		0,1825	0,91
6	47-49		0,0434	0,22
7	50-54.1		0,0594	0,30
8	52.2-56		0,0812	0,41
9	57-63		0,0937	0,47
10	64-68		0,0756	0,38
11	69-81	hex:AcOEt (9,5:0,5)	0,1147	0,57
12	82-106		2,5448	12,72
13	107-118		1,1935	5,97
14	119-125		0,9554	4,78
15	126-130		0,5789	2,89
16	131-135		0,2293	1,15
17	136-147		0,5796	2,90
18	148-159		0,3476	1,74
19	160-182		0,9475	4,74
20	183-276		2,8433	14,22
21	277-317	hex:AcOEt (9,5:0,5)/303 (9:1)	0,5029	2,51
22	318-340		0,8608	4,30
23	341-357		0,5501	2,75
24	358-391	hex:AcOEt (9:1)	0,5175	2,59
25	392-398		0,0453	0,23
26	399-405		0,0788	0,39
27	406-411		0,0601	0,30
28	412-419		0,3681	1,84
29	413.2-417.2		0,1056	0,53
30	420-428	hex:AcOEt (8:2)	0,2296	1,15
31	429-436		0,1516	0,76
32	437-444		0,1081	0,54
33	445-452		0,0539	0,27
34	453-484	hex:AcOEt (8:2)/ 472 (7:3)	0,5304	2,65
35	485-512	hex:AcOEt (7:3)/ 506 (6:4)	0,2318	1,16
36	513		0,0282	0,14
37	514-516	hex:AcOEt (6:4)	0,0489	0,24
38	517-540	hex:AcOEt (6:4)/ 539 (5:5)	0,2365	1,18
39	541-574	564 hex:AcOEt (5:5)	0,2292	1,15
40	575-589	hex:AcOEt (3:7)	0,3665	1,83
41	590-613	hex:AcOEt (2:8)	0,2243	1,12
42	614-643	AcOEt/ (AcOEt:MeOH)	0,2126	1,06
43	645		0,4888	2,44
44	646.2-648.2		0,0564	0,28
45	646-649	MeOH	0,3862	1,93
46	648		0,1844	0,92
47	57-59		0,0213	0,1065
48	64-65	hex:AcOEt (9,5:0,5)	0,0099	0,0495

*rendimento em relação à quantidade de fração utilizada (20 g); hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol.

3.3.4 Isolamento e identificação de compostos

3.3.4.1 Grupo 4

Por meio do perfil em CCD, conforme item 3.2.1, foram observadas várias manchas com colorações diferentes, roxas, azuis e esverdeadas, mostrando que essa fração apresentava grande complexidade. Na tentativa de purificação e isolamento de compostos, esta fração foi submetida a lavagem com metanol (conforme item 3.2.5); assim foram obtidas 2 partes, uma fração insolúvel em metanol denominada 4a (42,7 mg) e outra solúvel em metanol, denominada 4b (4,5 mg).

A análise por CCD mostrou que a fração 4a apresentava-se menos complexa, em comparação à fração 4b e, devido à pequena quantidade de 4b, apenas 4a foi enviada para análise em CG-EM e RMN, denominada **PR01**. Em seguida, a fração 4a foi submetida à cromatografia preparativa, conforme descrito no item 3.2.1, por meio da qual foi obtido 42,7 mg de um composto purificado, denominado **PR02**.

3.3.4.2 Grupo 8

Na tentativa de purificação e isolamento de compostos, o grupo 8 foi submetido à lavagem com metanol (conforme item 3.2.5), sendo obtidas 2 frações, uma insolúvel em metanol, 8a (34,4 mg) e outra solúvel em metanol, 8b (10 mg). Por meio de análise em CCD, conforme item 3.2.1, foi observado que a fração 8a apresentava uma única mancha, de cor arroxeadada. Essa fração então recebeu a denominação de **PR03** e foi enviada para análise por CG-EM e RMN.

3.3.4.3 Precipitado entre as subfrações 47 (57-59) e 48 (64-65)

O sólido branco precipitado durante a eluição das subfrações 57-59 (21,3 mg) e 64-65 (9,9 mg), mostrou, por CCD, apenas uma mancha de cor arroxeadada, e foi denominada **PR04**. A amostra foi enviada para análise por RMN.

Os compostos purificados foram submetidos à avaliação da atividade citotóxica por MTT, como descrito no item 3.1.2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O câncer de próstata é um problema de saúde pública em todo o mundo, considerando sua alta prevalência. A terapêutica disponível pode apresentar diversos efeitos colaterais e ainda ser insuficiente. Assim, grande é o número de estudos que buscam novos agentes terapêuticos, e as plantas são uma rica fonte de compostos com potenciais atividades antitumorais.

Em estudo anterior realizado pelo nosso grupo, utilizando extrato hexânico bruto de caule e galhos de *Pouteria ramiflora* foi demonstrada a atividade citotóxica de forma seletiva para a linhagem de adenocarcinoma de próstata humano sensível a andrógenos (LNCaP) quando comparada à linhagem controle provenientes de queratinócitos normais (HaCat) (CARDOSO, 2014). O tipo de solvente utilizado (de baixa polaridade) levou à extração de terpenoides, esteroides e outros compostos de baixa polaridade.

Os terpenos são uma extensa classe de compostos que podem ser classificados em grupos, a saber, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, triterpenos, entre outros, de acordo com a quantidade de unidades de isoprenos (C_5H_8) acopladas, geralmente em cabeça-cauda. Os triterpenos são compostos de seis unidades de isopreno com fórmula molecular base de $C_{30}H_{48}$, e estão largamente distribuídos no reino vegetal (BRESOLIN; CECHINEL-FILHO, 2010).

Os triterpenos apresentam diversas atividades biológicas já descritas, tais como anticancerígena e anti-inflamatória. Em 1976, foi descrito o primeiro triterpeno com atividade anticâncer, o ácido betulínico, que causava inibição do crescimento da linhagem celular de leucemia linfocítica P-388 (TRUMBULL et al., 1976).

Desde então cresceu o número de pesquisas a respeito dos triterpenos devido seu potencial citotóxico mostrado em diferentes tipos de linhagens celulares tumorais, incluindo linhagens de adenocarcinoma de próstata. Uma série de estudos mostrou que certos triterpenos são capazes de prevenir a tumorigênese, inibir a proliferação de células cancerosas *in vitro e in vivo*, inibir a progressão, metástase e angiogênese, induzir apoptose, induzir a autofagia e parada do ciclo celular e promover alterações em diversas vias de sinalização antitumorais (SALVADOR et al., 2017).

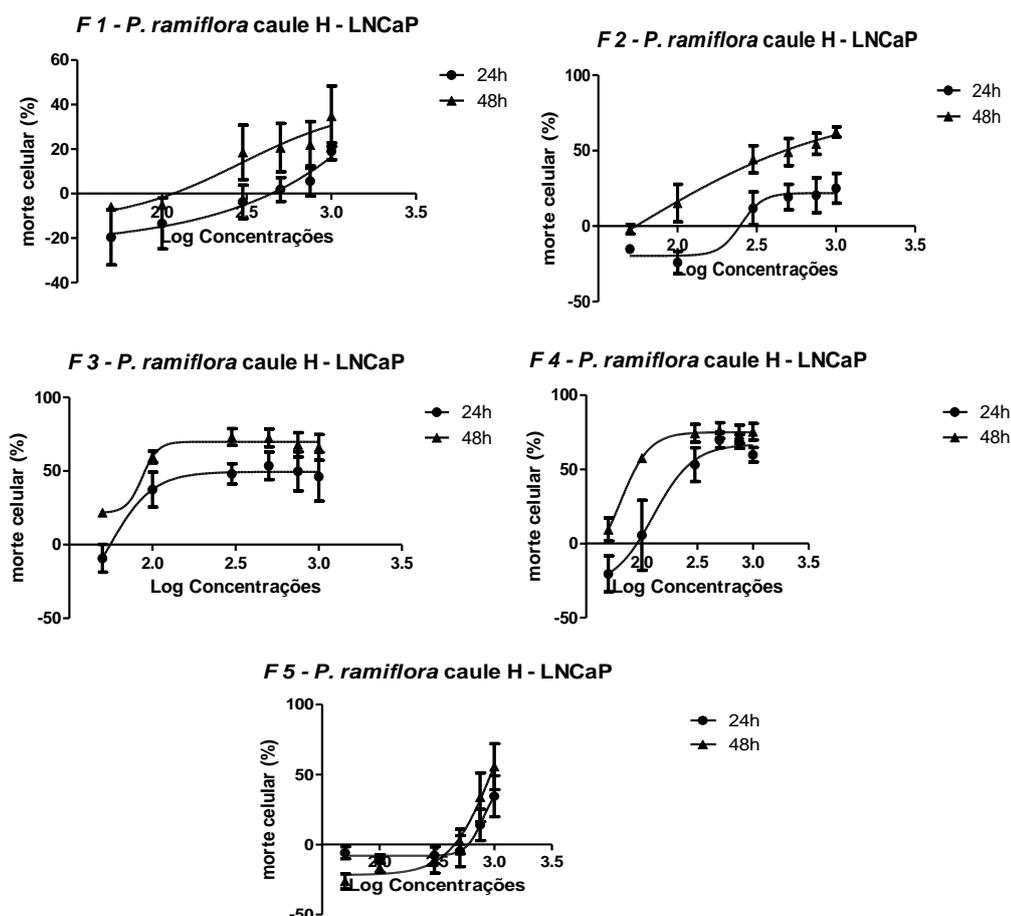
Alguns triterpenos como o licopeno, celastrol, ácido betulínico, ácido ursólico, ácido 3-oxotirucálico, ácido 3 α -acetoxitirucálico e ácido 3 β -acetoxitirucálico, apresentaram atividade citotóxica em linhagens celulares de câncer de próstata, mostrando o potencial para

descoberta de novos agentes terapêuticos para o câncer de próstata por meio de compostos da classe dos triterpenos (MATUS; ROMAN; ZINIGA-HERNADEZ, 2011).

4.1 Biomonitoramento das frações oriundas do extrato bruto hexânico de caule e galhos de *Pouteria ramiflora*

Por meio de filtração em sílica do extrato bruto de caule e galhos da *Pouteria ramiflora* (item 3.3.2), foram obtidas 5 frações (Tabela 1). O extrato bruto e as frações foram submetidos à avaliação da atividade citotóxica, conforme o item 3.1.2. Dentre as 5 frações obtidas as frações 2 (hex:AcOEt), 3 (AcOEt), 4 (AcOEt:MeOH), mostraram-se citotóxicas em linhagem de células de adenocarcinoma de próstata, conforme apresentado na Figura 4 e na Tabela 3.

Figura 4 - Curvas dose-resposta das frações oriundas do extrato hexânico de *Pouteria ramiflora* em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano (LNCaP).



O percentual de morte celular (%) foi calculado em relação ao controle DMSO/Etanol 2:3, utilizado como solvente. F1 (hex), F2 (hex:AcOEt), F3 (AcOEt), F4 (AcOEt:MeOH), F5 (MeOH). Concentrações utilizadas foram 50, 100, 300, 500, 750, 1000 $\mu\text{g/mL}$, 24 e 48h. H: hexânico. Hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol.

Tabela 3 – IC₅₀ obtido por meio de curva de dose-resposta em linhagem de células de adenocarcinoma de próstata humano.

Fração	IC ₅₀ -24h	IC ₅₀ -48h	Rendimento* (%)
Fhex	NC	289,4	2,5
Fhex:AcOEt	251,8	49,5	88,8
FAcOEt	~54,7	~86,9	0,5
FacOEt:MeOH	127,4	64,3	1,3
FMe	802,7	974,2	3,2

IC₅₀: concentração inibitória de 50% da viabilidade celular em µg/mL (intervalo de confiança de 95%); ~:aproximadamente; em vermelho fração selecionada para separação em coluna cromatográfica. F: fração; Hex: hexano; AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol. NC: não calculado. *rendimento em relação à quantidade de extrato bruto utilizado (30,39g).

A fração 2 (Fhex:AcOEt) mostrou atividade dose-dependente nos tempos 24 e 48h em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano sensível a andrógenos (LNCaP), com menor concentração necessária para inibir 50% da viabilidade celular (IC₅₀ = 49,5 µg/mL em 48h, Tabela 3). E maior rendimento conforme mostrado na Tabela 1. Assim, foi selecionada para dar continuidade ao estudo químico biomonitorado.

4.2 Atividade biológica das frações oriundas da fração hexano:acetato de etila obtidas por coluna cromatográfica

Parte da fração 2 (Fhex:AcOEt, 20 g) foi submetida à separação por coluna cromatográfica, por meio da qual foram obtidos 46 grupos de frações e dois precipitados (47 e 48). Todas as frações foram submetidas a teste de atividade citotóxica e, dentre elas, 12 grupos apresentaram resposta citotóxica maior que 70% em 48h de tratamento, estatisticamente significativas (Tabela 4 e Figura 5A),

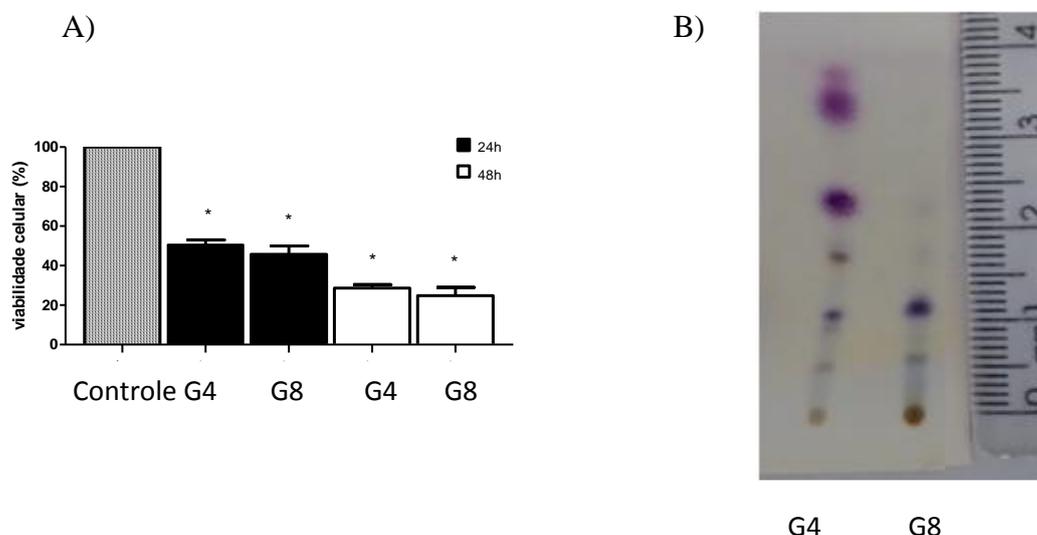
Dessa forma, para dar continuidade ao estudo químico biomonitorado por atividade biológica, foram selecionados 2 grupos de frações – Grupo 4 e Grupo 8- considerando a citotoxicidade apresentada e o rendimento obtido (Tabela 2). O grupo 4 foi selecionado devido à sua atividade citotóxica ser superior a 70% em 48h, bem como ter o mais alto rendimento, viabilizando, assim, a continuidade do estudo. A fração 8 foi selecionada por, além de sua resposta ao ensaio biológico mostrar atividade citotóxica superior a 70 %, apresentar um perfil cromatográfico, por CCD, aparentemente de baixa complexidade, com potencial de obtenção de compostos isolados (Tabela 4 e Figura 5B).

Tabela 4 – Porcentagem de viabilidade celular após tratamento com as frações obtidas por CC em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano.

Grupo	% 24h	% 48h	Grupo	% 24h	% 48h
1	85,36	61,84	24	40,63	35,30
2	38,75	32,41	25	52,39	46,95
3	39,29	22,39	26	61,12	48,28
4	50,59	28,59	27	60,91	58,60
5	38,88	21,72	28	56,59	44,02
6	42,97	25,87	29	56,28	33,39
7	53,94	33,95	30	44,89	35,80
8	45,71	24,81	31	52,45	83,09
9	40,25	30,39	32	65,69	66,15
10	44,82	27,99	33	31,36	37,08
11	61,87	48,75	34	38,22	38,61
12	41,17	28,69	35	44,96	40,86
13	43,04	29,77	36	31,97	21,13
14	44,21	41,15	37	38,26	29,11
15	110,66	51,30	38	28,82	32,41
16	114,46	43,01	39	33,75	33,80
17	53,67	65,85	40	26,38	35,34
18	37,77	22,66	41	35,89	38,33
19	34,31	28,45	42	35,89	33,88
20	37,83	30,84	43	55,24	36,10
21	53,66	30,88	44	48,12	44,55
22	49,29	40,36	45	54,62	32,57
23	49,39	36,56	46	39,66	33,60

%; Porcentagem de células viáveis em 24 e 48h; concentração das frações utilizada para o tratamento: 500µg/mL; as frações com a viabilidade celular menor que 30% estão identificadas em vermelho. O grupo 4 e 8 foram selecionados para análises posteriores.

Figura 5 – Grupos de frações 4 e 8, obtidos por cromatografia em coluna da fração hex-AcOEt do extrato hexânico de caule de *Pouteria ramiflora*.



A) A viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle DMSO/Etanol 2:3 (solvente); A concentração das frações utilizada para o tratamento: 500 μ g/mL em 24 e 48h. Os experimentos foram realizados em triplicata; * Valor de $P < 0,05$ calculado por meio de Prisma® 5.0 utilizando análise de variância One-Way Anova com pós-teste de Tukey. B) CCD das frações 4 e 8, eluente: hex: AcOEt 9:1; revelador: reagente anisaldeído/ ácido sulfúrico/aquecimento. hex: hexano; AcOEt: acetato de etila. G4: grupo 4 e G8: grupo 8.

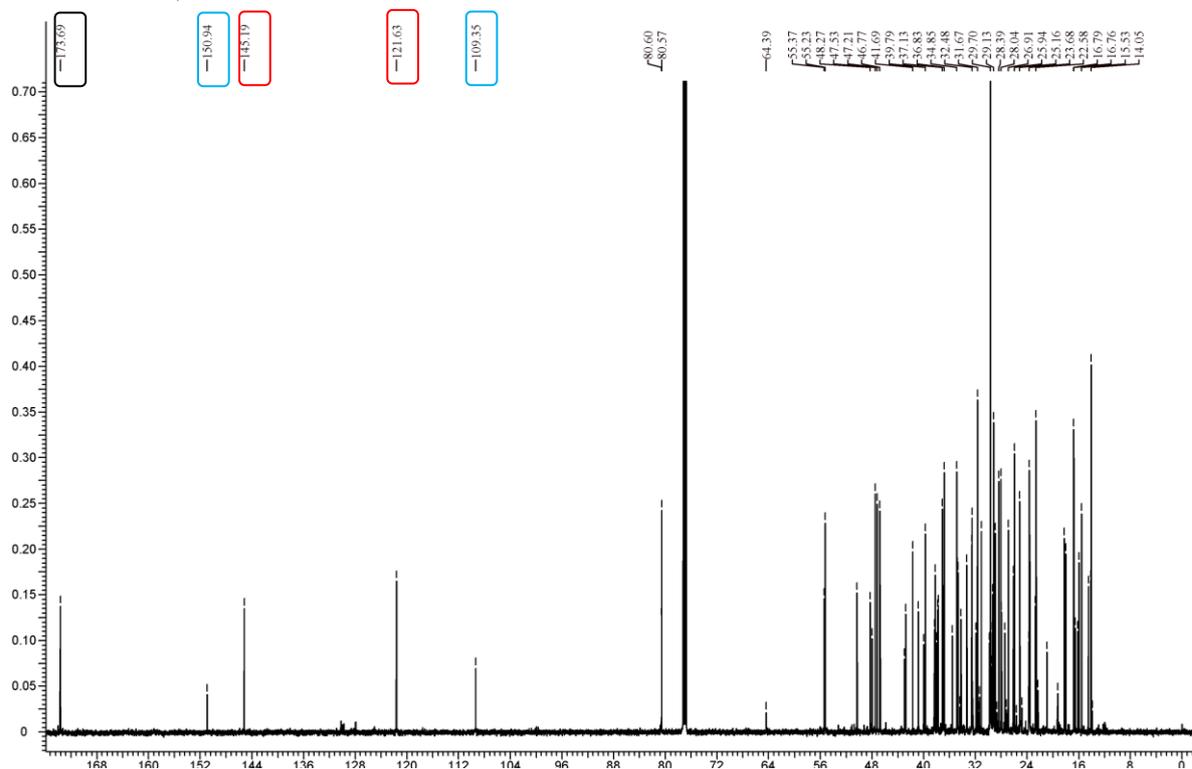
4.3 Estudo químico biomonitorado da fração insolúvel em metanol do grupo 4 (PR01)

O **PR01**, obtido por lavagem com metanol (item 3.2.5) do grupo 4 (item 3.3.4.1), apresentou-se como um sólido esbranquiçado, solúvel em clorofórmio e foi submetido a análise por CG-EM e RMN para identificação de compostos.

4.3.1. Análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN de ^1H e ^{13}C)

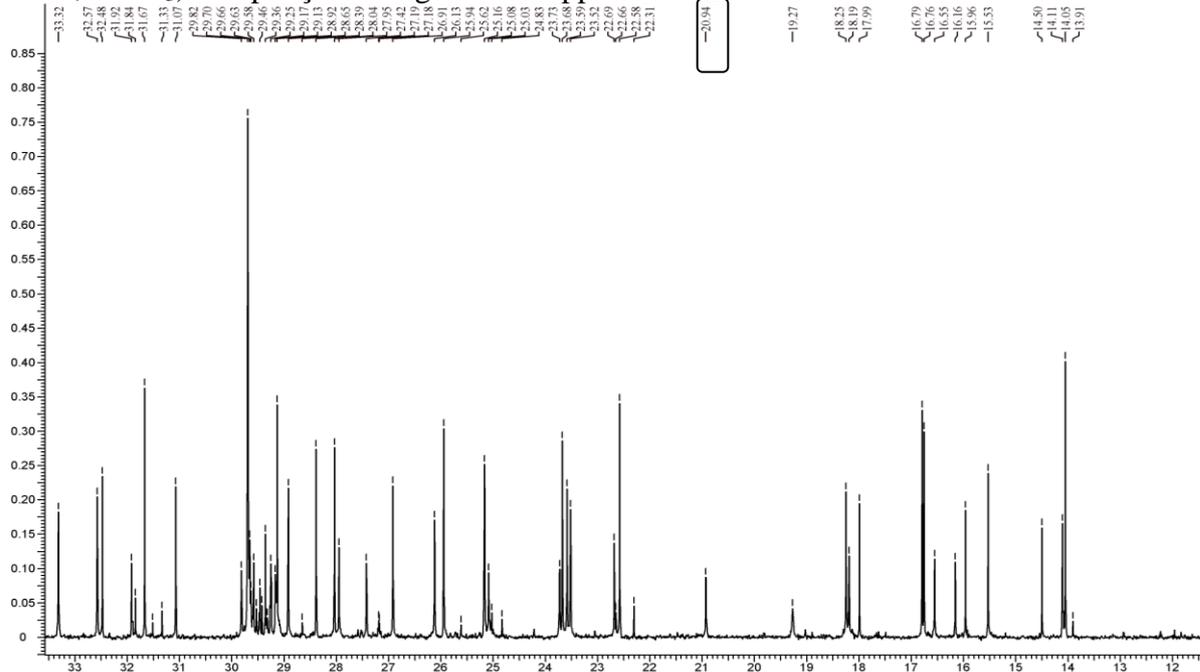
O **PR01** foi submetido à análise por RMN de ^1H e ^{13}C . Considerando o número de sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 6 e Tabela 5), o **PR01** corresponde a uma mistura. Contudo, foi possível observar a presença de deslocamentos químicos característicos de triterpenos do tipo oleano ($\delta 121,6$ e $\delta 145,2$ respectivamente, Figuras 6 e 9) e lupano ($\delta 150,9$ e $\delta 109,3$, respectivamente, Figuras 6 e 9) (MAHATO; KUNDU, 1994). Ainda, foi possível observar sinais referentes a um grupo acetila ($\delta 173,9$, Figuras 6 e 9 e $\delta 20,9$ - Figura 7), sugerindo que ao menos um dos triterpenos estivesse na forma de acetato. Os espectros foram ampliados para melhor identificação dos sinais presentes (Figuras 7, 8 e 9).

Figura 6 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (150 MHz, CDCl_3)



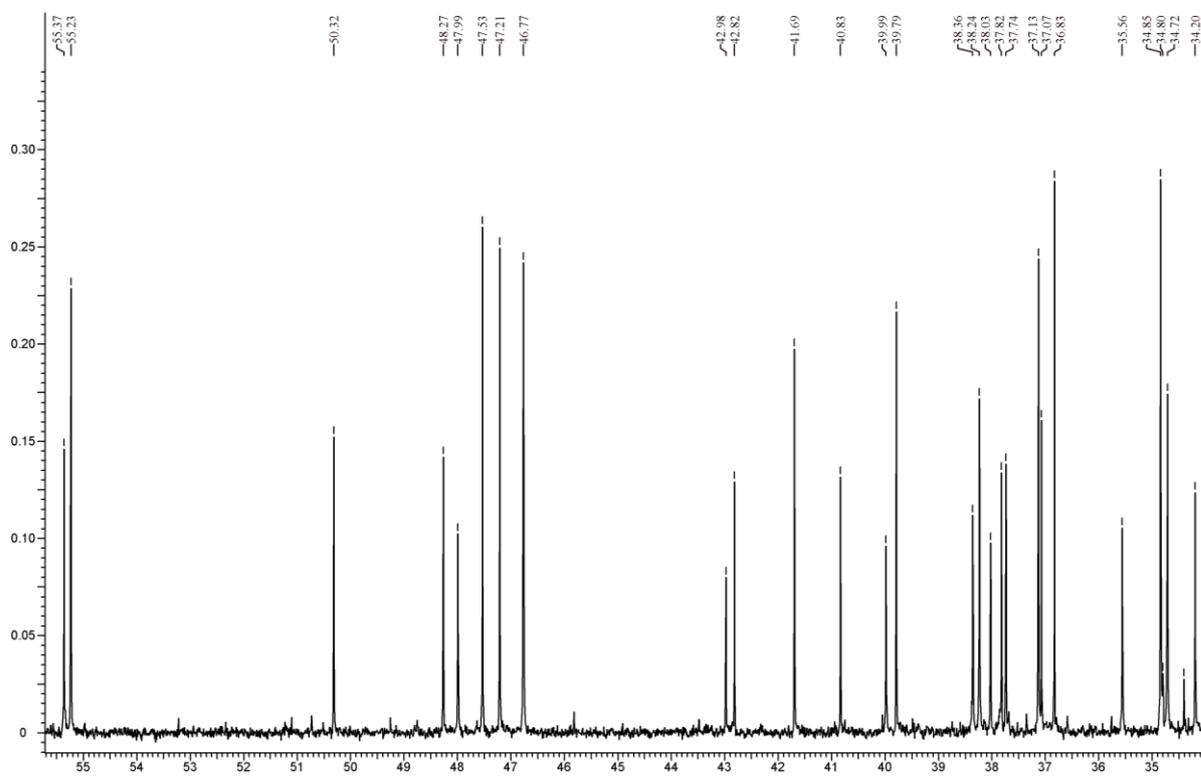
Eixo X: deslocamentos químicos em ppm; eixo Y: intensidade normalizada. Deslocamentos químicos marcados em vermelho são característicos de triterpenos do tipo oleano; marcados em azul são característicos de lupano e em preto é característico do grupamento acetato.

Figura 7 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (150 MHz, CDCl_3). Ampliação da região 12-34 ppm.



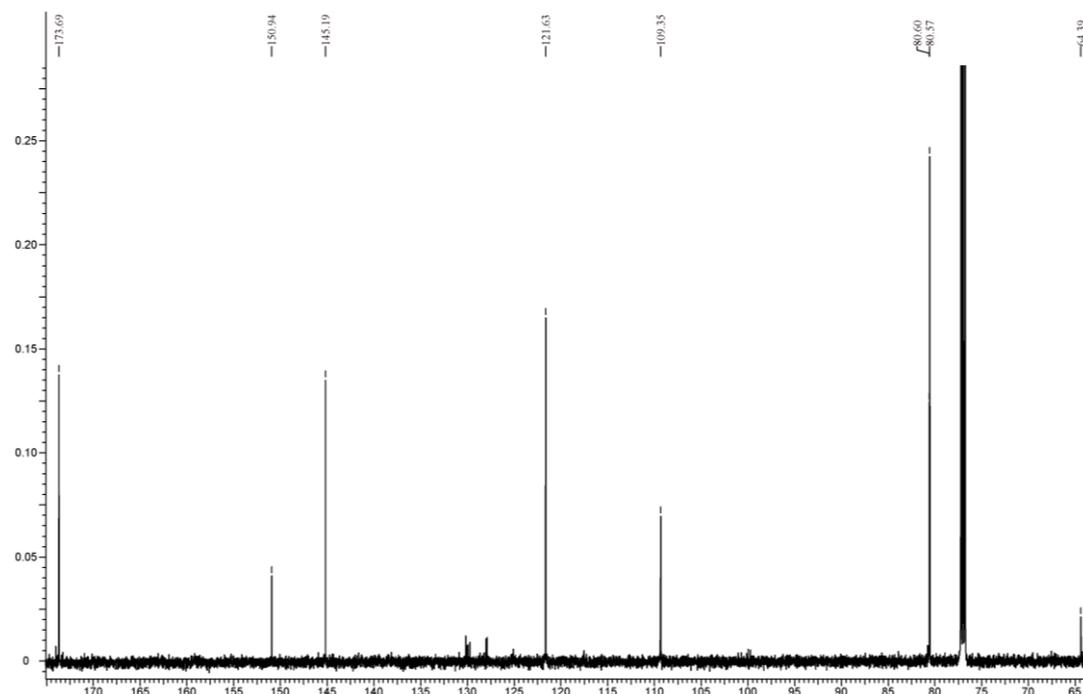
Eixo X: deslocamentos químicos em ppm; eixo Y: intensidade normalizada. Deslocamentos químicos marcado em preto é característico do grupamento acetato.

Figura 8 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (150 MHz, CDCl_3). Ampliação da região 34-55 ppm.



Eixo X: deslocamentos químicos em ppm; eixo Y: intensidade normalizada.

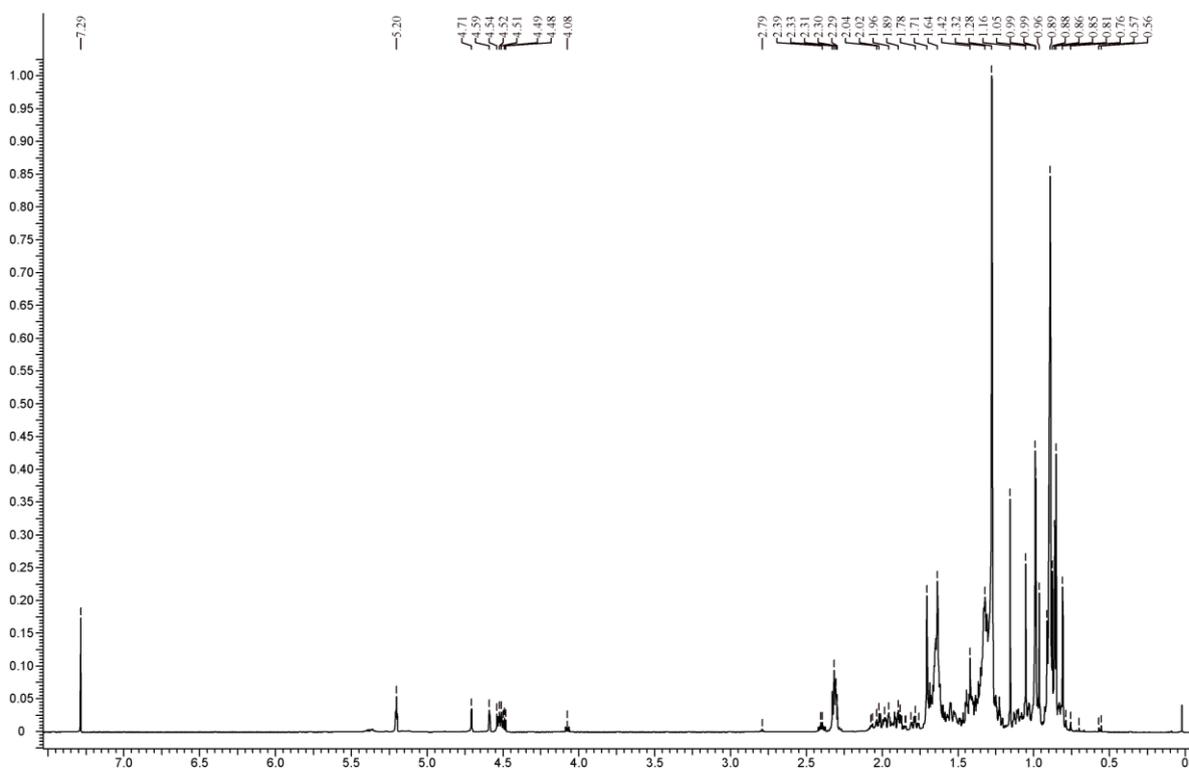
Figura 9 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (150 MHz, CDCl_3). Ampliação da região 64-178 ppm.



Eixo X: deslocamentos químicos em ppm; eixo Y: intensidade normalizada.

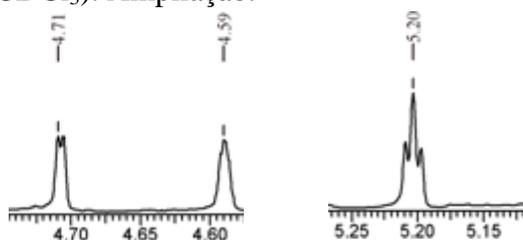
A análise do espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 600 MHz, Figuras 10 e 11) mostrou, na região entre $\delta 0,8$ e $\delta 2,6$, um perfil característico de compostos triterpênicos. Na expansão da região entre $\delta 0,78$ e $\delta 1,55$ podem ser observados sinais correspondentes a hidrogênios metílicos e metilênicos dos esqueletos citados. Em $\delta 1,71$ foi observado um simpleto, atribuído aos hidrogênios do grupo metila em C30 do esqueleto lupano; além disso, foram observados sinais em $\delta 4,72$ e em $\delta 4,58$, atribuídos aos hidrogênios olefínicos da dupla terminal do esqueleto lupano, bem como e um tripleto em $\delta 5,20$ foi atribuído ao hidrogênio olefínico em C12 dos ursano (GASCA et al., 2017; SILVA et al., 2016).

Figura 10 - Espectro de RMN de ^1H da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (600 MHz, CDCl_3)



Eixo X: deslocamentos químicos em ppm; eixo Y: intensidade normalizada.

Figura 11 - Espectro de RMN de ^{13}C da fração insolúvel em metanol do grupo 4, PR01 (150 MHz, CDCl_3). Ampliação.



Eixo X: deslocamentos químicos em ppm; eixo Y: intensidade normalizada. Picos característicos de triterpenos.

Tabela 5 - Dados de RMN de ^{13}C do PR01 (grupo 4) em comparação com os dados reportados na literatura.

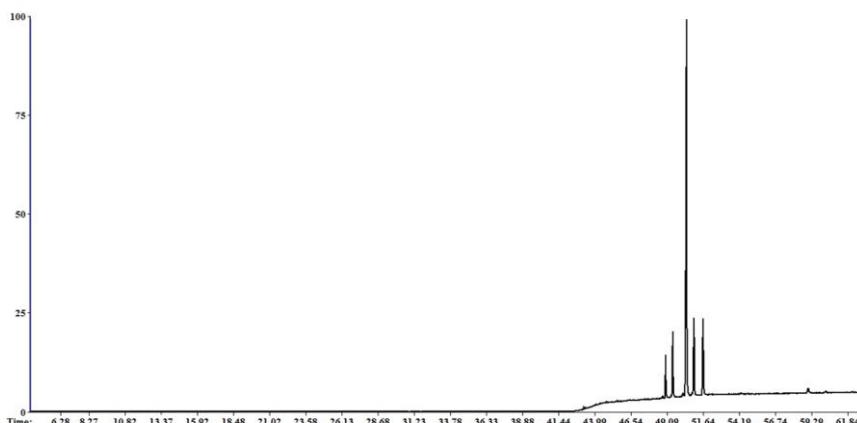
C	PR01	β - amirina ¹	PR01	Acetato de β -amirina ¹	PR01	Lupeol ²	PR01	Acetato de lupeola ³
1	38,3	38,7	38,2	38,2	38,4	38,7	38,4	38,6
2	27,4	27,3	26,9	26,6	27,4	27,4	20,9	21,7
3	80,6	79,0	80,6	80,9	80,6	78,9	80,6	81,2
4	38,4	38,8	37,7	37,7	38,4	38,8	38,0	38,0
5	55,2	55,3	55,2	55,2	55,4	55,3	55,4	55,6
6	18,3	18,5	18,3	18,2	18,3	18,3	18,3	18,4
7	32,6	32,8	32,6	32,6	34,2	34,2	34,2	34,4
8	38,4	38,8	38,4	38,4	40,8	40,8	41,0	41,0
9	47,5	47,7	47,5	47,5	50,3	50,4	50,3	50,5
10	37,7	37,6	36,8	36,8	37,1	37,1	37,2	37,3
11	23,6	23,6	23,6	23,6	20,9	20,9	20,9	21,1
12	121,6	121,8	121,6	121,6	25,1	25,1	23,7	24,0
13	145,2	145,1	145,2	145,2	38,0	38,0	36,8	36,2
14	41,7	41,8	41,7	41,7	42,8	42,8	43,0	43,0
15	26,1	26,2	26,1	26,1	27,4	27,4	25,2	25,3
16	27,2	27,0	26,9	26,9	35,6	35,5	35,7	35,8
17	32,5	32,5	32,6	32,9	43,0	43,0	43,0	43,2
18	47,5	47,4	47,2	47,1	48,3	48,2	48,0	48,5
19	46,8	46,9	46,8	46,8	47,9	47,9	48,3	48,2
20	31,1	31,1	31,1	31,0	150,9	150,9	150,9	151,2
21	34,8	34,8	34,7	34,7	29,8	29,8	29,8	30,0
22	37,1	37,2	37,1	37,1	40,8	40,0	40,8	40,2
23	28,0	28,2	28,0	28,0	28,0	28,0	27,4	27,6
24	15,5	15,5	15,5	15,5	15,5	15,4	16,6	16,7
25	16,6	16,6	15,5	15,7	16,2	16,1	16,0	16,4
26	16,8	16,9	16,8	16,8	15,9	15,9	16,2	16,2
27	25,9	26,0	25,9	25,9	14,5	14,5	14,5	14,7
28	28,4	28,4	28,4	28,3	18,0	18,0	18,2	18,2
29	33,3	33,3	33,3	33,3	109,4	109,3	109,4	109,6
30	23,6	23,6	23,6	23,6	19,3	19,3	19,3	19,5
31			173,69	170,9			173,69	171,3
32			38,4	38,4			28,1	28,2

¹ MAHATO; KUNDU, 1994; ² SOUSA, 2001; ³ JAMAL et al., 2008;

4.3.2 Análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) do PR01

Para determinar a real composição da substância PR01, a mesma foi submetida à análise por CG-EM de acordo com o item 3.2.2. No caso de compostos de natureza triterpênica ou esteroidal, principalmente compostos em misturas que não podem ser isolados de forma apropriada, a interpretação do espectro de massas é muito útil. O cromatograma obtido por CG-EM mostrou a presença de 5 picos (Figura 12), dos quais aquele em tempo de retenção (tR) igual a 50,94 foi o mais proeminente. Os dados obtidos da análise por CG-EM foram comparados com os do banco de dados NIST (National Institute of Standards and Technology), conforme apresentado na Tabela 6.

Figura 12 - Cromatograma obtido por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de PR01 (IE, 70eV)



Eixo X: tempo de retenção; Eixo Y: intensidade dos compostos presente na amostra.

Tabela 6 - Resultados encontrados na análise por CG-EM do PR01.

Tempo de retenção	Composto	M+	Fragmentação	abundância (%)
49,01 min	β -amirina	424	219, 218, 203, 119, 109, 95, 93, 81, 69, 55	7,88
49,51 min	lupeol	424	205, 216, 298, 157, 406, 271, 404, 169, 274, 295	11,14
50,49 min	acetato de β - amirina	468	219, 218, 203, 189, 119, 107, 105, 95, 81, 69	54,96
51,01 min	acetato de lupeíla	468	189, 135, 121, 119, 109, 107, 95, 93, 81, 69	13,03
51,66 min	friedelina	426	125, 123, 109, 107, 96, 95, 81, 69, 67, 55	12,98

M+: íon molecular referente à massa total do composto.

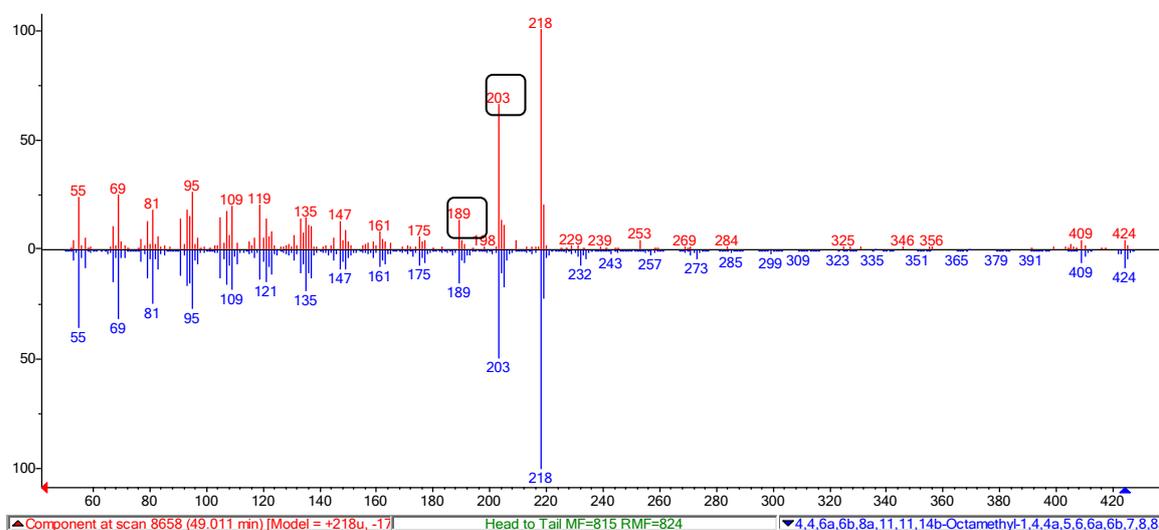
4.3.2.1 Análise da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de PR01 (tempo de retenção 49,01 min e 50,49 min)

A substância com tempo de retenção 49,01 min, de acordo com a biblioteca NIST, foi sugerida como sendo olean-12-en-3-ona (β -amirina), conforme mostrado na Figura 13. O sinal referente ao fragmento da massa molecular (426) não foi observado, sendo observado M^+ 424. Os sinais de fragmentação mais abundantes m/z 218 (pico base 100%), 203, 189,

109 e 95 são compatíveis com aqueles característicos de triterpenos do tipo amirina. A diferença na abundância entre 203 e 189 caracteriza o tipo alfa (ursano) ou beta (oleanano), o sinal 189 menos intenso do que 189 é característico de esqueleto oleanano (BASAR, 2005).

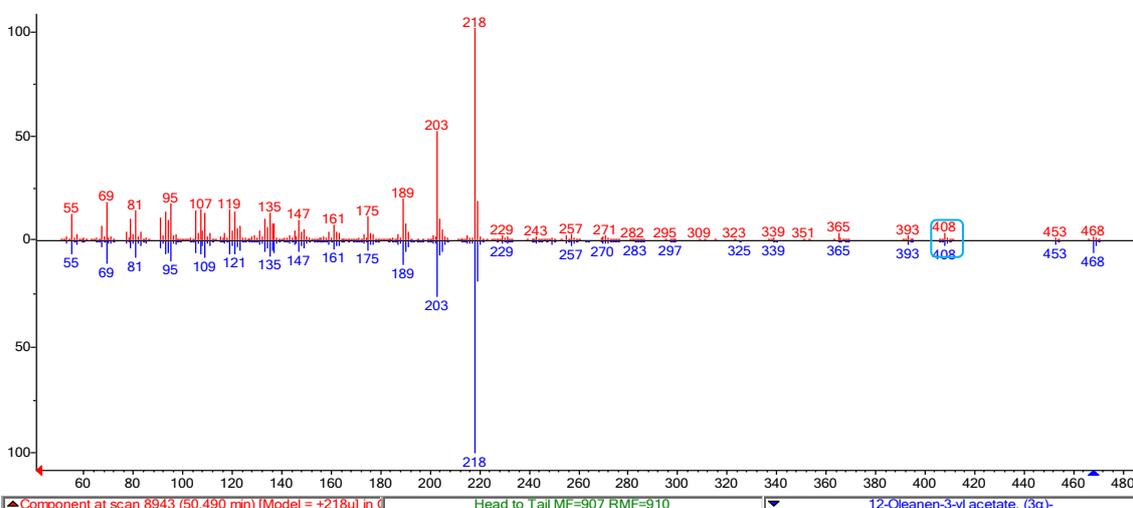
A fragmentação correspondente ao pico em tempo de retenção 50,49 min (Figura 14) mostrou-se muito semelhante àquela referente ao tempo de retenção 49,01 min (Figura 13). O fragmento m/z 408, correspondente à perda do grupo acetila.

Figura 13 - Espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 49,01 min. obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PR01 (IE, 70eV)



Vermelho: perfil de fragmentação do PR01; azul: substância referência do NIST. Quando comparados mostra o perfil de fragmentação da β -amirina. Picos marcados são característicos de esqueleto oleanano.

Figura 14 - Espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 50,49 min. obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PR01 (IE, 70eV)



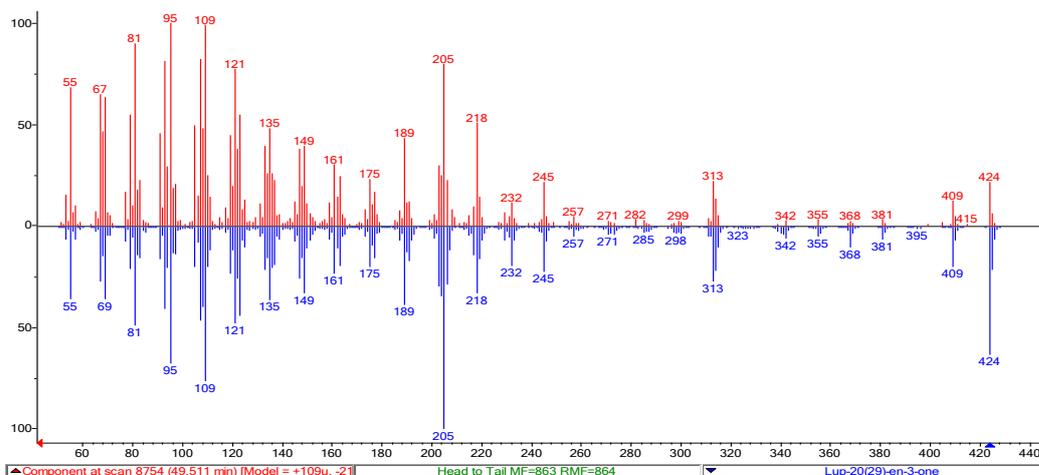
Vermelho: perfil de fragmentação do PR01; azul: substância referência do NIST. Quando comparados mostra o perfil de fragmentação do acetato de β -amirina. Pico marcado é característicos da perda do grupamento acetila.

4.3.2.2 Análise da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de PR01 (tempo de retenção 49,41 min e 51,01 min)

A substância com tempo de retenção 49,51 min, foi sugerida pelo banco de dados NIST, como sendo lupeol. Comparando os dados com a literatura, a presença dos sinais de fragmentação mais abundantes m/z 205, 189, 218, 204, 203, 424, 409, 381 são característicos desse composto (SHIOJIMA, 1992). O pico-base (m/z 218, 100%) corresponde a uma clivagem nos carbonos C-8/C14 e C-9/C11 (SILVA, 2004; VILEGAS et al., 1997). O espectro de massas pode ser observado na Figura 15.

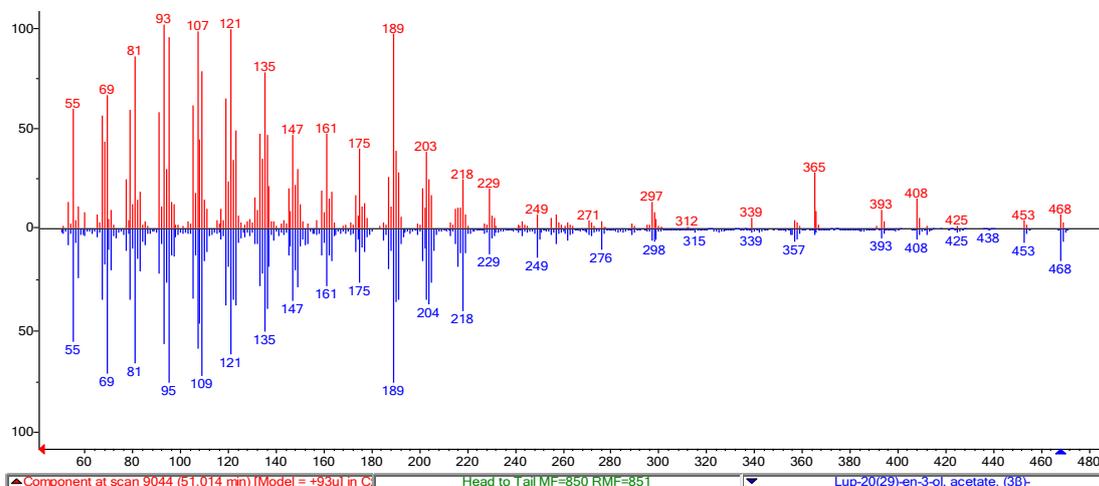
No que se refere ao sinal no tempo de retenção 51,01 min, o mais abundante, o padrão de fragmentação (Figura 16) é muito semelhante àquele apresentado pela substância correspondente ao tempo de retenção 49, 51 min (figura 15). A presença do grupo acetila é evidenciada pelo M^+ 468 e o fragmento m/z 408, correspondente à perda de um grupo acetila.

Figura 15 - Espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 49,51 min. obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PR01 (IE, 70eV)



Vermelho: perfil de fragmentação do PR01; azul: substância referência do NIST. Quando comparados mostra o perfil de fragmentação do lupeol.

Figura 16 - Espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 51,01 min. obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PR01 (IE, 70eV)

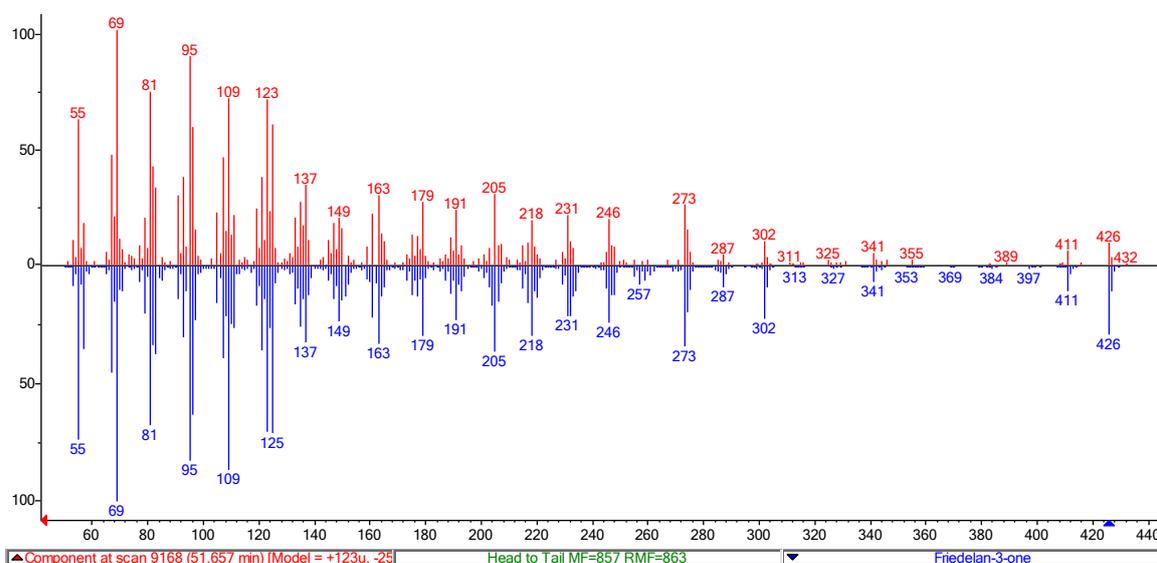


Vermelho: perfil de fragmentação do PR01; azul: substância referência do NIST. Quando comparados mostra o perfil de fragmentação do acetato de luepila.

4.3.2.3 Análise da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas de PR01 (tempo de retenção 51,65 min)

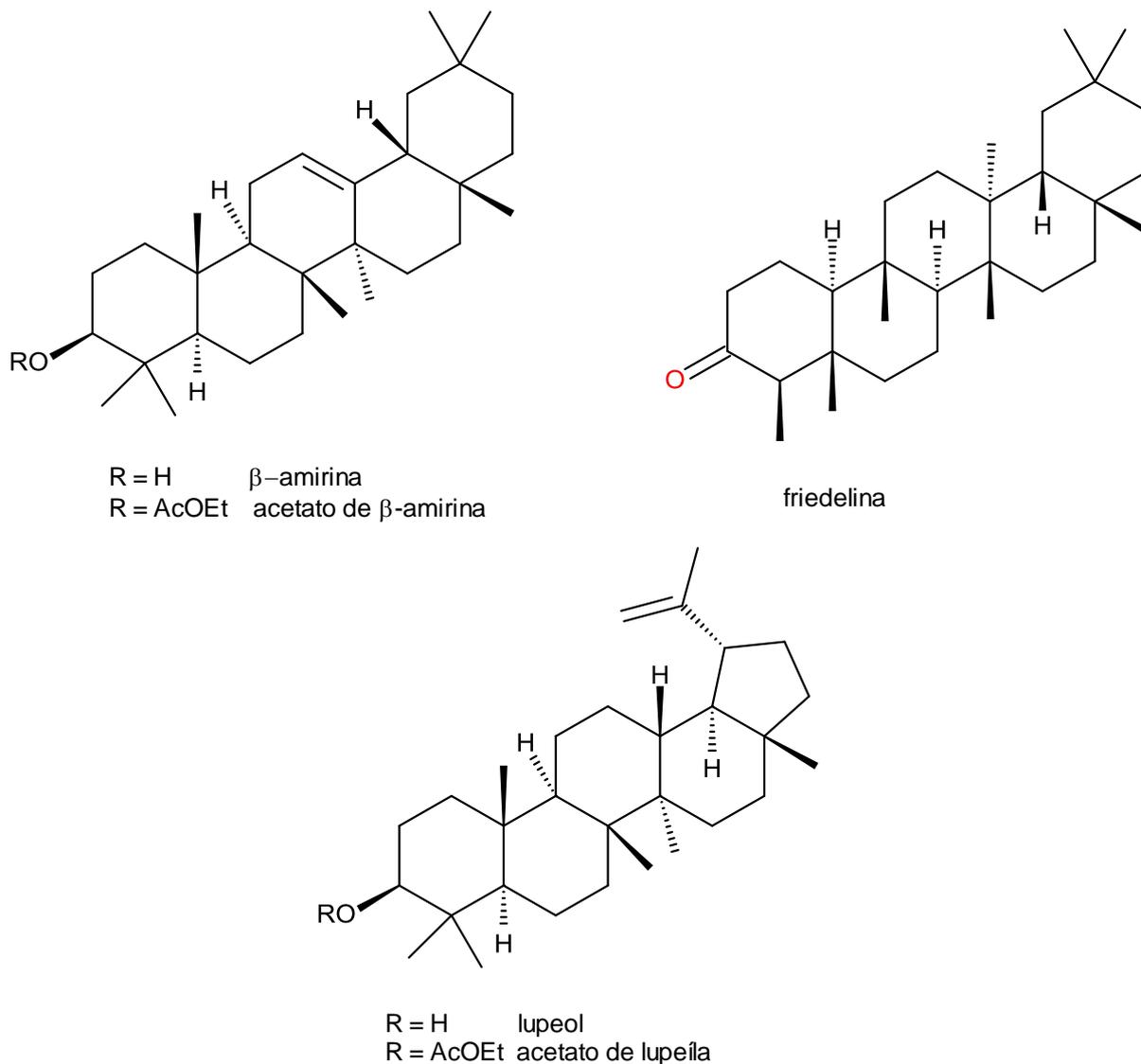
A substância com tempo de retenção 51,65, foi sugerida pelo banco de dados NIST como sendo, friedelina. Comparando os dados com a literatura, a presença de sinais de fragmentação mais abundantes m/z 55, 69, 81, 95, 109, 123, 205, 218, são característicos deste composto (Figura 17) (HIROTA, 1994).

Figura 17 - Espectro de massas referente ao pico no tempo de retenção 51,65 min. obtido por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria massa de PR01 (IE, 70eV)



Vermelho: perfil de fragmentação do PR01; azul: substância referência do NIST. Quando comparados mostra o perfil de fragmentação da friedelina.

Figura 18 – Estrutura molecular dos compostos identificados no grupo **PR01**.



Foram identificados 5 compostos triterpênicos presentes no PR01. Sendo eles, β -amirina, acetato de β -amirina, lupeol, acetato de lupeola e friedelina.

A β -amirina é, portanto, um dos constituintes do PR01 da fração ativa 4. Em estudos anteriores, a β -amirina apresentou atividade citotóxica em algumas linhagens celulares de câncer. Um estudo utilizando uma mistura de β - e α -amirina associada à cisplatina por 24h em linhagem de células de câncer de bexiga (NTUB1) mostrou a redução da viabilidade das células (LIN et al., 2011). Em outro estudo de citotoxicidade com as linhagens de câncer de pulmão A549 e leucemia promielítica aguda HL-60 essas substâncias mostraram fraca atividade com IC_{50} de 46,2 e 38,6 μ M respectivamente. (THAO et al., 2010) Entretanto, quando testadas em linhagens de câncer cervical (HeLa), mama (MCF7) e carcinoma

epidermoide de pele (A431), foram inativas (CSAPI et al 2010), ou contrário de outro estudo, no qual a β -amirina apresentou atividade citotóxica nas células MCF7 com IC_{50} de 10.089 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (EL-HALAWANY; OSMAN; ABDALLAH, 2018). β -Amirina apresentou atividade citotóxica em linhagem CaCo-2, com $IC_{50} = 81 \mu\text{g}/\text{mL}$ por meio da indução a apoptose, e não apresentou atividade contra hepatocarcinoma (HepG2) e células embrionárias de rim humano (HEK293) (MAIYO; MOODLEY; SINGH, 2016).

Em estudos anteriores o lupeol apresentou atividade em linhagens de células de câncer de próstata. Apresentou atividade citotóxica em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata resistente a andrógenos PC3, causando parada do ciclo celular em G2/M, induzindo a apoptose e suprimindo a expressão de uma enzima relacionada ao reparo de DNA, uracil-DNA glicosilase (UNG) (HUANG et al., 2017). O lupeol também apresentou efeito citotóxico em células andrógeno-resistente mesmo em baixas concentrações, 5-50 μM (SALEEM et al., 2009). O fato de sua atividade ocorrer em baixas concentrações explica o fato de essa substância não precisar ser o componente principal da fração ativa em nosso estudo.

Estudos com modelos *in vivo* (modelos de camundongos xenográficos com implantes de tumores humanos) mostraram a especificidade de sua ação para as células cancerígenas quando comparadas com células normais da próstata (SALEEM et al., 2005;2009; PRASAD; KALRA; SHUKLA, 2008). O que corrobora os nossos achados, pois a atividade do extrato de *Pouteria ramiflora* foi 7,7 vezes mais seletiva para a célula de adenocarcinoma de próstata sensível a andrógenos (LNCaP) do que linhagem de células controle queratinócitos normais (HaCat) (CARDOSO, 2014).

Um estudo computacional de interação com proteína demonstrou que o lupeol se liga ao receptor de andrógenos por meio do domínio de ligação com o ligante (SALEEM et al., 2009) Foi demonstrado que o lupeol é um antagonista competitivo pelo AR; se liga ao domínio de ligação ao ligante e bloqueia o receptor, bloqueando também a interação AR-genes responsivos, incluindo PSA, TIPARP, SGK e IL-6 e inibindo o recrutamento da RNA polimerase II. Esses efeitos podem, possivelmente, mediar a diminuição da expressão do receptor de andrógenos observada no presente estudo, considerando que pode ocorrer uma interação direta entre o lupeol e o AR.

Além de sua interação com o AR, o lupeol possui outros mecanismo de ação, inibindo a formação de ROS (PRASAD; KALRA;SHUKLA, 2008), a sinalização da via Wnt/ β -catenina e FAZ, os eixos GSK3 β , MMP-2, ERBB-2 e c-myc (SALEEM et al., 2005;2009) e ainda, é capaz de resultar em parada do ciclo celular em G2/M (SALEEM et al., 2009).

Com base nas atividades do lupeol, inclusive em câncer de próstata, com seu mecanismo via receptor de andrógeno anteriormente descrito, pode ser inferido que o composto lupeol presente em no grupo 4 pode ser responsável, ao menos em parte, pela atividade citotóxica, não descartando a possibilidade de o lupeol estar agindo de forma sinérgica com outros triterpenos, pois os outros triterpenos presentes na fração também apresentaram atividade anticancerígena em outras linhagens de diferentes cânceres.

Vários estudos vêm mostrando a atividade anticancerígena do lupeol e o mecanismo de ação envolvido nessa atividade, em diferentes tipos de linhagens celulares de câncer. No câncer de pele, sua atividade está envolvida com a modulação das vias de sinalização NFκB e PI3K/AKT (SALEEM et al., 2004). O lupeol inibiu crescimento de tumor metastático de melanoma de origem humano via modulação de proteínas Bcl-2 e Bax *in vivo* e *in vitro*, sem causar toxicidade com a dose testada para os melanócitos humanos normais (SALEEM et al., 2008).

O lupeol induziu a apoptose em células de leucemia promielítica HL-60 (ARATANEHEMUGE et al., 2004). Induziu morte de células de leucemia linfoblástica-T CEM ($IC_{50} = 50 \mu M$), câncer de mama MCF-7 ($IC_{50} = 50 \mu M$), câncer de pulmão A-549 ($IC_{50} = 50 \mu M$), mieloma múltiplo RPMI 8226 ($IC_{50} = 50 \mu M$), câncer cervical HeLa ($IC_{50} = 37 \mu M$), melanoma G361 ($IC_{50} = 50 \mu M$) quando tratados por 72h (CMOCH et al., 2008). Também inibiu a proliferação de câncer de mama ERα negativo MDA-MB-231 (LAMBERTINI et al., 2005). Foi citotóxico em células de câncer de pâncreas, inibindo a via de sinalização PI3K/AKT e NFκB (SALEEM, 2005). A alteração da via de sinalização PI3K/AKT justifica os achados do presente trabalho, pois foi observada a diminuição da proteína mTOR total e fosforilada, uma vez que uma modulação ao nível de AKT leva a diminuição da ativação de mTOR.

Em estudo que avaliou a citotoxicidade de triterpenos nas linhagens celulares de câncer de mama MCF7, cólon DLD-1, pulmão A549, ovário SK-OV-3 e cabeça e pescoço FaDu, β-amirina não apresentou resposta citotóxica e o lupeol não foi solúvel em DMSO (MISHRA et al., 2016). Em contraste, lupeol apresentou atividade citotóxica MCF-7 (IC_{50} de $22,6 \mu M$) e Caco-2 (IC_{50} de $10,7 \mu M$), SW620 ($IC_{50} = 1,99 \mu M$) e KATO-III ($IC_{50} = 1,95 \mu M$) sem qualquer atividade contra HEK293 (OGUNLAJA et al., 2018). Corroborando com estes achados, outro estudo com o lupeol apresentou citotoxicidade em MCF-7, BHY, Miapaca-2, Colo-205 abaixo de $50 \mu M$ (ZENG et al., 2015).

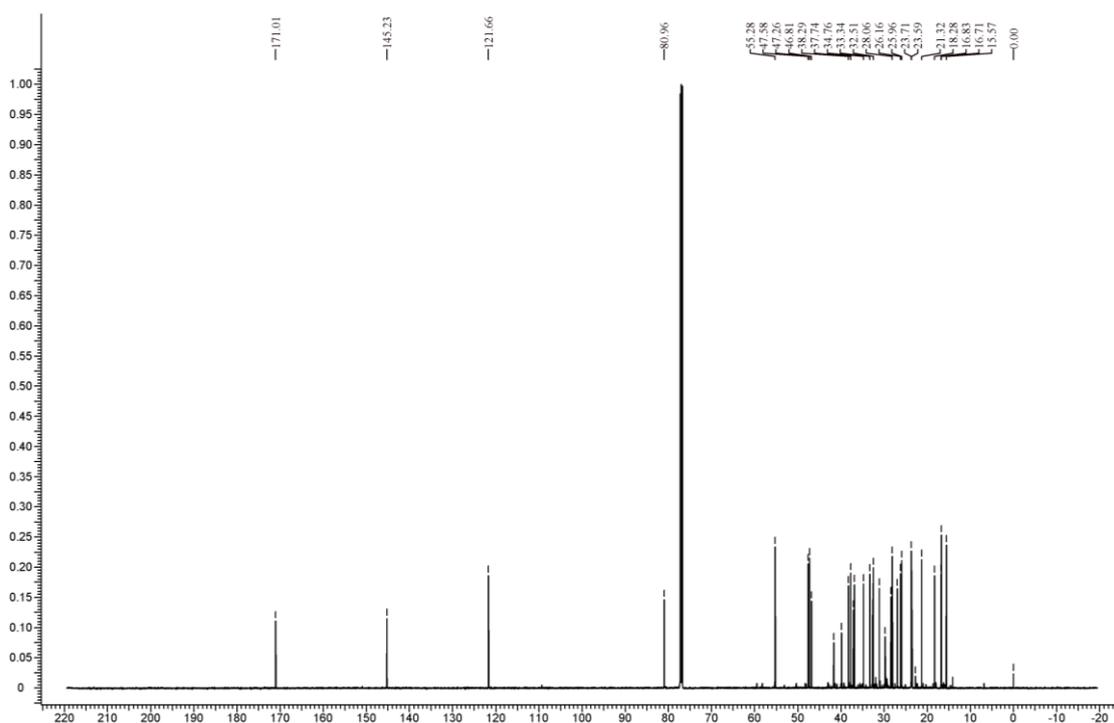
Entretanto, em alguns casos os triterpenos lupeol, acetato de β -amirina, acetato de lupeol e epifriedelanol não apresentaram atividade citotóxica; o valor de IC_{50} foi maior que 70 μM em linhagens DLD-1 e Caco-2, HepG2 (OGUNLAJA et al., 2018). Os compostos acetato de β -amirina, acetato de lupeol e lupeol apresentaram baixa atividade citotóxica em linhagem de câncer de ovário A2780 (CHATURVEDULA et al., 2002).

4.3.3 Isolamento de acetato de β -amirina (PR02)

O PR01 foi submetido à cromatografia preparativa conforme item 3.2.4, dando origem a um composto esbranquiçado (41 mg), que foi submetido à análise por RMN de 1H e ^{13}C .

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 19) mostrou a presença de 32 sinais sendo que $\delta 21,3$ e $\delta 171,0$ foram atribuídos a carbonos de um grupo acetila, além de sinais característicos de carbonos C12 e C13 ($\delta 121$ e $\delta 145$, respectivamente) de compostos com esqueleto oleano.

Figura 19 - Espectro de RMN de ^{13}C de PR02 (125 MHz, $CDCl_3$)

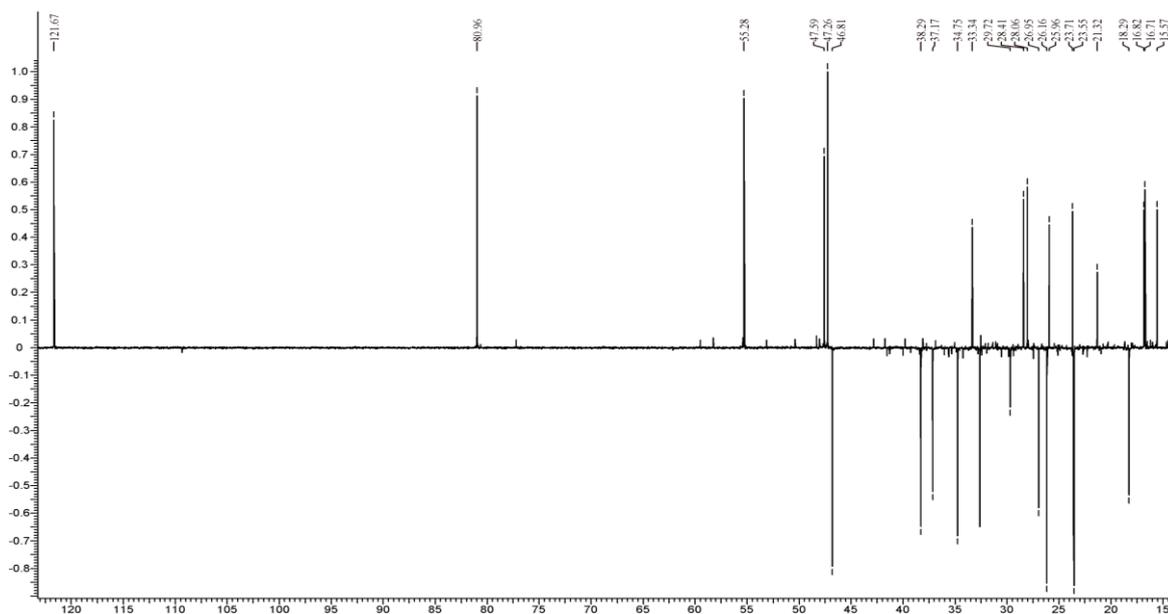


Eixo X: deslocamentos químicos em ppm; eixo Y: intensidade normalizada.

O experimento DEPT-135 (Figura 20) permitiu identificar os sinais de 9 carbonos metílicos, 10 metilênicos e 3 metínicos. Os outros 9 carbonos não aparecem no espectro de DEPT-135 e portanto correspondem a carbonos quaternários.

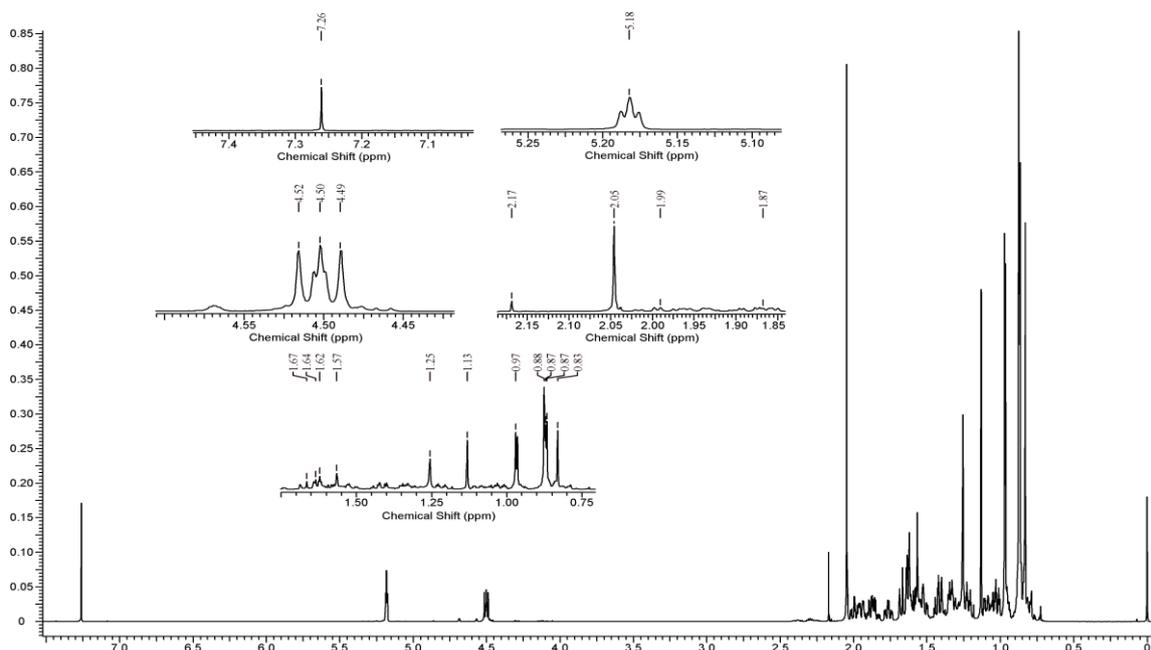
O espectro de RMN de ^1H (Figura 21) mostrou sinal em $\delta 2,07$ (correspondente a três hidrogênios do grupamento acetila), em $\delta 4,52$ (1H, dd, $J= 11,6$ Hz) e $5,18$ (1H, t, $J= 3,5$, H-12), referentes a hidrogênios ligados a carbonos em ligação dupla, além de diversos sinais na região entre $\delta 0,8$ e $\delta 2,0$. A comparação com dados da literatura (Tabela 7) mostrou que PR02 correspondia ao acetato de β -amirina (MAHATO; KUNDU, 1994).

Figura 20 - Espectro de RMN de ^{13}C de PR02 (DEPT-135, 125 MHz, CDCl_3)



Sinais Positivos: carbonos CH_3 e CH ; Sinais Negativos: carbonos CH_2 .

Figura 21 - Espectro de RMN de ^1H de PR02 (600 MHz, CDCl_3)



Eixo X: deslocamentos químicos em ppm; eixo Y: intensidade normalizada.

Tabela 7 - Dados de RMN de ^{13}C do PR02 em comparação com os dados reportados na literatura.

C	PR02	acetato de β-amirina¹	C	PR02	acetato de β-amirina¹
1	38,29	38,2	17	32,51	32,9
2	26,95	26,6	18	47,26	47,1
3	80,96	80,9	19	46,81	46,8
4	37,74	37,7	20	31,10	31,0
5	55,28	55,2	21	34,76	34,7
6	18,28	18,2	22	37,16	37,1
7	32,62	32,6	23	28,06	28,0
8	38,29	38,4	24	15,57	15,5
9	47,58	47,5	25	16,71	15,7
10	36,87	36,8	26	16,83	16,8
11	23,59	23,6	27	23,71	25,9
12	121,66	121,6	28	28,41	28,3
13	145,23	145,2	29	33,34	33,3
14	41,73	41,7	30	23,56	23,6
15	25,96	26,1	31	171,01	170,9
16	26,16	26,9	32	39,84	38,4

¹MAHATO; KUNDU, 1994

Estudos anteriores mostraram algumas atividades biológicas do acetato de β -amirina, que apresentou atividade anti-inflamatória e quimiopreventiva (AKIHISA et al., 2010); atividade citotóxica em diferentes linhagens de células cancerígenas com valores de IC_{50} menores do que 45 μM (MCF7, DLD-1, Caco-2, HepG2 CRL2120) e com menor atividade citotóxica em linhagem controle de fibroblastos (KUETE et al., 2018)

Em outro estudo mostrou que este composto apresentou atividade citotóxica significativa, em baixas concentrações de IC_{50} , contra linhagens de células cancerígenas, HL-60 (leucemia) $14,6 \pm 1,3 \mu\text{M}$, SK-OV-3 (ovário) $14,6 \pm 1,3 \mu\text{M}$, A549 (pulmão) $11,4 \pm 0,9 \mu\text{M}$, HT-29 (côlon) $12,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$ (YAN DING et al., 2010). Em um estudo, mostrou

citotoxicidade em linhagem celular de câncer de ovário humano A2780 (CHATURVEDULA et al., 2002). Acetato de β -amirina também foi capaz de inibir a proliferação em linhagem celular de mieloma B16-F0 (CHAABANE et al., 2013).

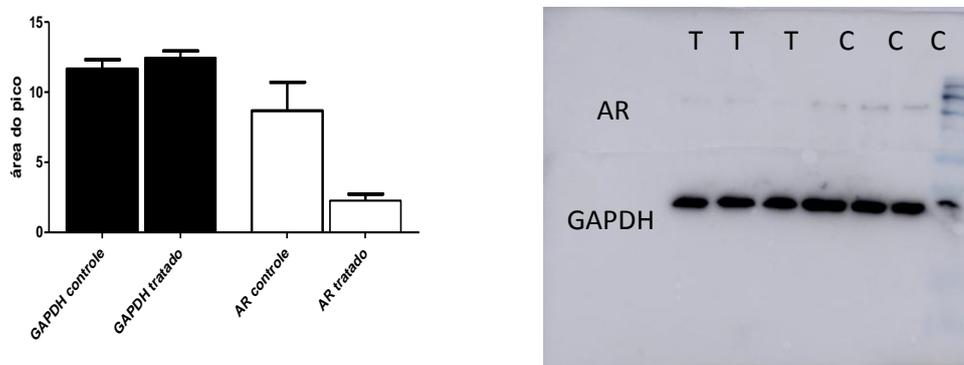
Quando comparada a atividade β -amirina com acetato de β -amirina, o acetato de β -amirina apresentou resposta citotóxica mais potente, com menores valores de IC_{50} em linhagens celulares como a HL-60 e A549; assim, a presença do grupamento acetato parece ter aumentado a atividade (YAN DING et al., 2010).

4.3 Western blot grupo 4.

Considerando o efeito citotóxico de mais de 70%, sustentado e dose-dependente do grupo 4 em células LnCAP; e o fato de que a CCD (Figura 5B) ter indicado a presença de lupeol nessa fração, o qual já foi descrito na literatura apresentando efeito citotóxico em linhagem de cancer de próstata (SALEEM et al., 2009), foi realizado a um ensaio para avaliar se o mecanismo relacionado a esse efeito envolveria alteração na expressão do receptor de andrógenos (AR), principal fator envolvido na progressão do cancer de próstata. E, ainda, se essa fração seria capaz de modificar a expressão da proteína mTOR, relacionada aos cânceres de próstata resistentes.

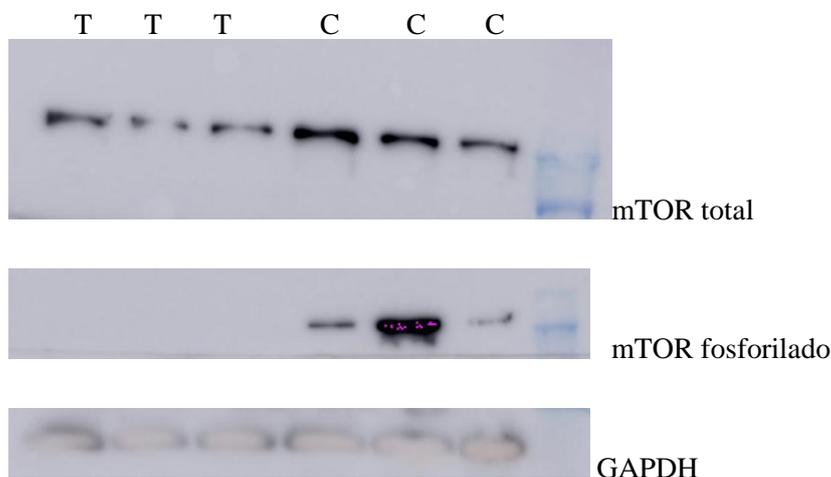
Para tal, foi avaliada a expressão do receptor de andrógenos e da proteína mTOR (total e fosforilada). O tratamento das células com o grupo 4 induziu a diminuição da expressão do AR e da expressão de mTOR (redução da expressão de mTOR fosforilado), as quais são relacionadas à proliferação e sobrevivência celular (Figura 22 e 23).

Figura 22 - Quantificação da expressão do AR em células LnCAP por *western blot* após 48h de tratamento com o grupo 4.



C: controle; T: tratamento 48h; AR: receptor de andrógenos; GAPDH: proteína constitutiva.

Figura 23 - Quantificação da ativação de mTOR em células LnCAP por *western blot* após 48h de tratamento com o grupo 4.



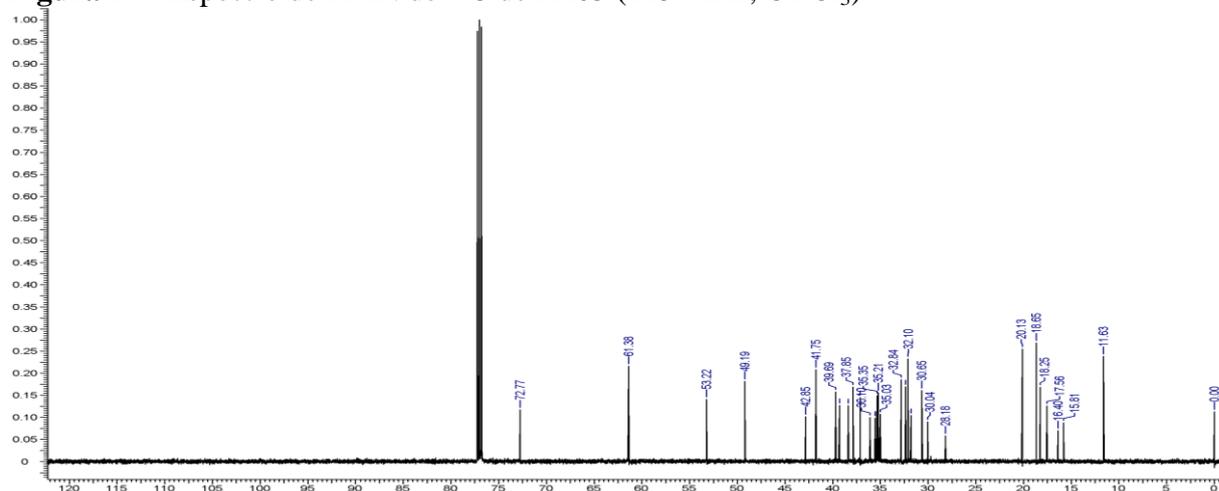
C: controle; T: tratamento 48h; mTOR total: mammalian target of rapamycin total (inativo); mTOR fosforilado (ativo) ; GAPDH: proteína constitutiva.

4.4 Caracterização do composto isolado da fração 8 (PR03)

O espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 24) do composto isolado da fração 8 (**PR03**) mostrou a presença de 30 átomos de carbono na região entre $\delta 10,0$ e $\delta 72,0$ (Tabela 8). O espectro não mostrou sinais em campo baixo, indicando ausência de carbonos sp^2 . O sinal em $\delta 72,0$ é indicativo da presença de grupamento hidroxila.

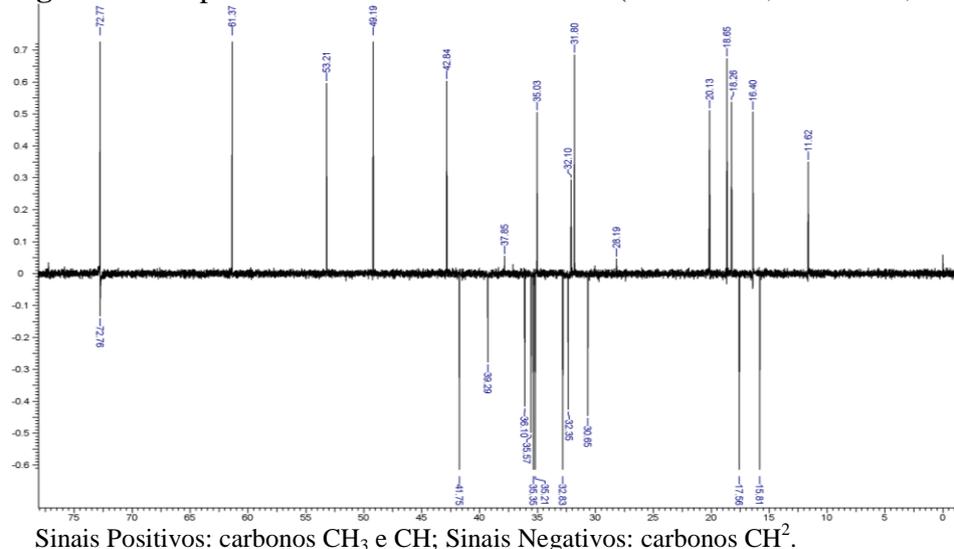
Com o espectro DEPT-135 (Figura 25) foi possível identificar 8 sinais de carbono em grupo metila, 11 sinais de carbono correspondentes a grupos metilênos e 5 sinais correspondentes a carbonos metínicos. Os outros 6 carbonos não aparecem no espectro de DEPT-135 e portanto correspondem a carbonos quaternários (RODRIGUES et al., 2017).

Figura 24 - Espectro de RMN de ^{13}C de PR03 (125 MHz, CDCl_3)



Eixo X: deslocamentos químicos em ppm; eixo Y: intensidade normalizada.

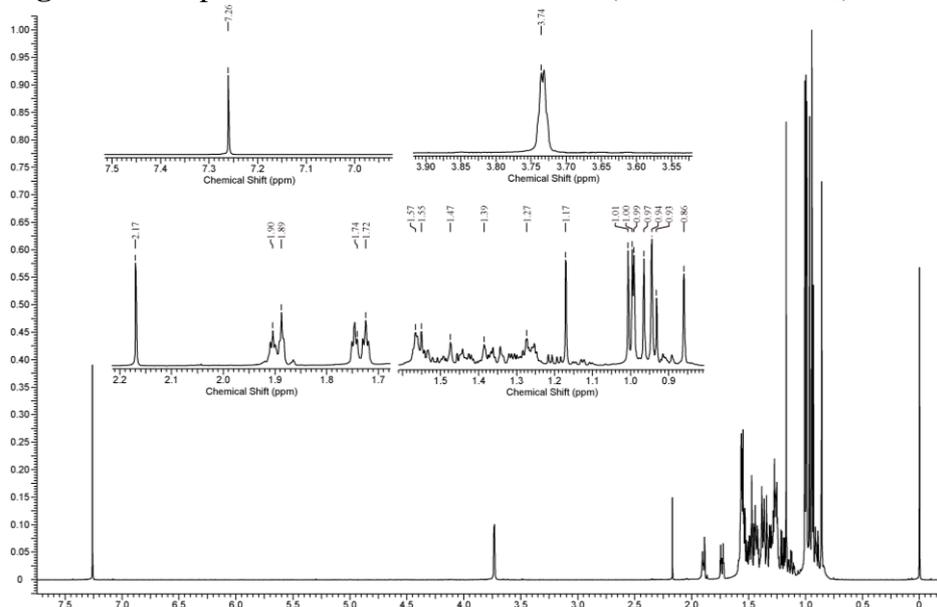
Figura 25 - Espectro de RMN de ^{13}C de PR03 (DEPT-135, 125 MHz, CDCl_3)



O espectro de RMN de ^1H (Figuras 26) mostrou sinal em $\delta 3,74$ ($J= 1,96$ Hz, H-3), correspondente a um hidrogênio carbinólico desblindado devido à eletronegatividade do oxigênio próximo a ele (SILVERSTEIN et al., 1987), e a presença de 8 sinais intensos entre $\delta 1,18$ e $\delta 0,87$, correspondentes a hidrogênios de grupos metila.

A comparação dos deslocamentos químicos apresentados pela amostra com dados da literatura (KUNDU et al., 2000) mostrou sinais idênticos àqueles apresentados pelo triterpeno epifriedelanol já isolado de folhas de *Pouteria ramiflora* (extrato de folhas) (RODRIGUES et al., 2016).

Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H de PR03 (600 MHz, CDCl_3).



Eixo X: deslocamentos químicos em ppm; eixo Y: intensidade normalizada.

O epifriedelanol, em nosso estudo, foi testado em concentrações até 100 μM e não apresentou resposta citotóxica em linhagem de células de adenocarcinoma de próstata humano. Esse resultado corrobora com outros estudos em que esse composto foi testado em cinco linhagens de células tumorais (P-388 leucemia linfocítica, A-549 carcinoma de pulmão humano, MCF-7 adenocarcinoma de mama humano, HT-29 adenocarcinoma de colon humano e KB carcinoma de nasofaringe humano) e nenhuma atividade citotóxica foi observada até a concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ (GUO et al., 2010). Para as linhagens celulares cancerígenas A549, LLC, HL-60, e MCF-7, nenhuma atividade foi encontrada até 150 μM (THAO et al., 2010). Contra as linhagens K562 e K562/Adr foi inativo e apresentou atividade baixa, respectivamente, devido a sua baixa solubilidade (MONKODKAEW et al., 2009).

Em contraste aos estudos anteriores, o epifriedelanol apresentou atividade em duas linhagens celulares de câncer (T4 linfoblastoides humano CEM-SS e câncer cervical HeLa) com valores de IC_{50} entre 3,54 e 11,45 $\mu\text{g/mL}$ (PERUMAL et al., 2016). Em um estudo avaliando a inibição do crescimento tumoral de *Agrobacterium. tumefaciens* usando o modelo de disco de batata, o epifriedelanol apresentou 100% de inibição nas concentrações de 40 e 60 mg/disco, quando comparado à vincristina (KUNDU et al., 2000). Em outro estudo, o epifriedelanol apresentou atividade citotóxica em câncer cervical via indução a apoptose (YANG, FA, LI, 2016). Epifriedelanol isolado do extrato etanólico de *Cayratia trifolia* mostrou ser o composto bioativo, alterando as vias tumorigênicas envolvendo HER2, EGFR e CXCR4, sendo um potente agente anticancerígeno contra o câncer de ovário (PERUMAL et al., 2016).

Figura 27 – Estrutura molecular do composto identificado no grupo 8 (PR03).

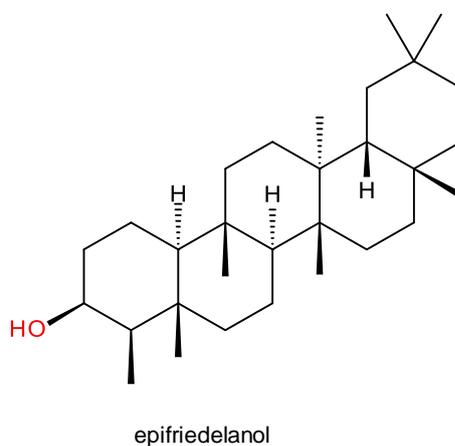


Tabela 8 - Dados de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e DEPT do PR03 em comparação com os dados reportados na literatura.

C	PR03	epifriedelanol¹	C	PR03	epifriedelanol¹
1	15,81	15,8	16	36,10	36,1
2	35,21	35,2	17	30,04	30,0
3	72,78	72,4	18	42,84	42,8
4	49,19	49,2	19	35,57	35,6
5	37,13	37,1	20	28,19	28,2
6	41,75	41,7	21	32,84	32,8
7	17,56	17,6	22	39,29	39,27
8	53,21	53,2	23	11,63	11,6
9	38,39	38,4	24	16,40	16,4
10	61,38	61,4	25	18,26	18,2
11	35,35	35,3	26	18,66	18,6
12	30,65	30,60	27	20,13	20,1
13	37,86	37,8	28	31,80	31,8
14	39,69	39,7	29	35,03	35
15	32,35	32,3	30	32,10	32,1

¹ KUNDU et al., 2000.

4.5 Caracterização do composto precipitado (PR04)

A análise por CCD e RMN de ^{13}C e ^1H mostrou que o composto denominado PR04 era idêntico ao composto PR03.

RESUMO DOS RESULTADOS:

A Figura 28 apresenta um esquema do estudo químico biomonitorado realizado e sumário dos principais resultados (compostos identificados).

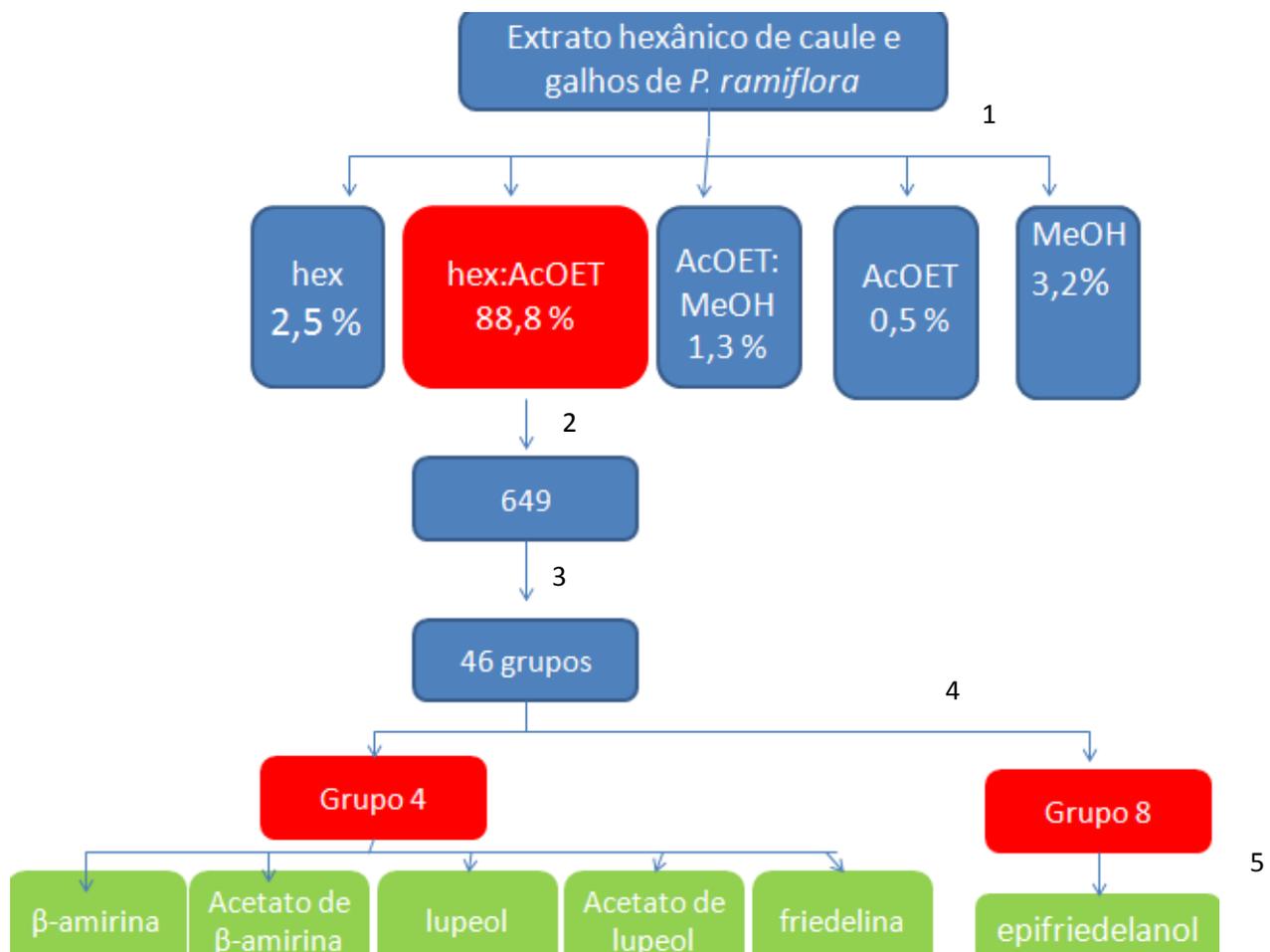
Foi preparado o extrato bruto hexânico do caule de *Pouteria ramiflora*, pré-fracionado por meio de funil sinterizado sendo obtidas 5 frações. O monitoramento da atividade foi realizado utilizando MTT para avaliação de citotoxicidade. A fração hex:AcOEt apresentou maior rendimento (88%) e melhor curva dose dependente com IC₅₀ de 49,5 µg/mL em 48h, assim foi submetida a separação cromatográfica em coluna sendo obtidos 46 grupos de frações .

Dentre os 46 grupos, 12 apresentaram citotoxicidade maior que 70% em 48h. E dois grupos (4 e 8) foram selecionados (devido sua atividade citotóxica, rendimento e perfil em CCD) para isolamento e identificação de compostos. Foi obtido o PR01 que em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas mostrou a presença dos compostos: β-amirina, lupeol, friedelina, acetato de β-amirina e acetato de lupeíla.

Em estudo fitoquímico do extrato hexânico das folhas de *Pouteria ramiflora* de Rodrigues e colaboradores (2017) foram isolados e identificados três triterpenos: friedelina, *epi*-friedelanol e taraxerol, corroborando com os achados dos compostos: friedelina e o epifriedelanol nas frações ativas oriundas do extrato hexânico do caule de *Pouteria ramiflora* (RODRIGUES et al., 2017).

O efeito citotóxico do grupo 4 está relacionado com a diminuição da expressão das proteínas AR e mTOR, que são relacionadas a proliferação e sobrevivência celular. Por meio de lavagem do grupo 8 com metanol foi isolado o PR03 sendo identificado como epifriedelanol, que quando avaliado, não apresentou atividade.

Figura 28 – Representação esquemática do estudo químico biomonitorado com resultados encontrados.



O monitoramento da atividade a cada etapa foi realizado por MTT para avaliação de citotoxicidade em linhagem celular de adenocarcinoma de próstata humano, LNCaP

5 CONCLUSÕES

- Foram identificados e isolados 6 compostos a partir de dois grupos de subfrações do extrato hexânico do caule de *Pouteria ramiflora* (denominados grupo 4 e 8) a saber: β -amirina, lupeol, epifriedelanol, friedelina, acetato de β -amirina e acetato de lupeíla. Esse é o primeiro relato de estudo químico de caule da espécie *P. ramiflora*.

- O epifriedelanol foi isolado do grupo 8, porém não apresentou atividade citotóxica *in vitro* em células LNCaP, isoladamente.

- O acetato de β -amirina foi isolado do grupo 4, porém não foi solúvel para utilização nos ensaios de atividade citotóxica (MTT) e, portanto, não pôde ser testado quanto à sua atividade isoladamente.

O efeito citotóxico do grupo 4, o qual contém os compostos β -amirina, lupeol, friedelina, acetato de β -amirina e acetato de lupeíla, foi confirmado em células LNCaP e associa-se à diminuição da expressão do receptor de andrógenos (AR) e da proteína mTOR, ambos relacionados à proliferação e sobrevivência de células cancerígenas, sendo o primeiro especificamente relacionada à patogênese do câncer de próstata.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAZA H, HINOTSU S, USAMI M, et al. Combined androgen blockade with bicalutamide for advanced prostate cancer: long-term follow-up of a phase 3, double-blind, randomized study for survival. *Cancer*, v.115, p.3437–45, 2009.

AKIHISA, T.; KOJIMA, N.; KIKUCHI, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; MASTERS, E. T.; MANOSROI, A.; MANOSROI, J. Anti-Inflammatory and Chemopreventive Effects of Triterpene Cinnamates and Acetates from Shea Fat. *JOS*, v. 280, 2010.

ALMEIDA, S.P.; PROENÇA, C.E.B.; SANO, S.M.; RIBEIRO, J.F. *Cerrado: Espécies Vegetais Úteis*. Embrapa-CPAC, Planaltina, 1998.

AMLING CL, BERGSTRALH EJ, BLUTE ML, SLEZAK JM, ZINCKE H. Defining prostate specific antigen progression after radical prostatectomy: what is the most appropriate cut point. *J. Urol.*, v.165, p.1146–51, 2001.

ARORA VK, SCHENKEIN E, MURALI R, SUBUDHI SK, WONGVIPAT J, BALBAS MD, et al. Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade. *Cell*, v.155, p.1309–22, 2013.

BASHIR, M. N. MINI-REVIEW *Epidemiology of Prostate Cancer*. v. 16, p. 5137–5141, 2015.

BRASIL. MMA MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no cerrado. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/florestas/control-e-preven%C3%A7%C3%A3o-do-desmatamento/plano-de-a%C3%A7%C3%A3o-para-cerrado-%E2%80%93-ppcerrado>> Acesso em: 05 out. 2016.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL-FILHO, V. *Fármacos E Medicamentos: Uma Abordagem Multidisciplinar / Coordenadores Tania Mari Bellé Bresolin, Valdir Cechinel Filho*. SÃO PAULO: SANTOS, 2010.

CARDOSO, S. C. 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 – Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

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.

CHAABANE, F.; PINON, A.; SIMON, A.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Phytochemical potential of *Daphne gnidium* in inhibiting growth of melanoma cells and enhancing melanogenesis of B16-F0 melanoma. *Cell Biochemistry and Function*, v.31, 2013.

CHANG, K. H.; LI, R.; KURI, B.; LOTAN, Y.; ROEHRBORN, C. G.; LIU, J.; et al. A gain-of-function mutation in DHT synthesis in castration-resistant prostate cancer. *Cell*, v.154, p.1074–84, 2013.

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.

CMOCH, P.; PAKULSKI, Z.; SWACZYNOVÁ, J.; STRNAD, M. Synthesis of lupane-type saponins bearing mannosyl and 3,6-branched trimannosyl residues and their evaluation as anticancer agents. *Carbohydr. Res.*, v. 343(6), p. 995-1003, 2008.

CORNFORD, P. et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part II: Treatment of Relapsing, Metastatic, and Castration-Resistant Prostate Cancer. *European Urology*, p. 1–13, 2016.

COSTA, A. V. et al. Neuroprotective effects of *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk (Sapotaceae) extract on the brains of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Metabolic brain disease*, v. 28, n. 3, p. 411–9, set. 2013.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*. 2010.

CRAWFORD ED, SHORE ND, MOUL JW, et al. Long-term tolerability and efficacy of degarelix: 5-year results from a phase III extension trial with a 1-arm crossover from leuprolide to degarelix. *Urology*, v. 83, p. 1122–8, 2014.

CSAPI, B.; ZSUZSANNA, H.; ZUPKÓ, I.; BERÉNYI, A.; FORGO, P.; SZABÓ, P.; HOHMANN, J. Bioactivity-guided isolation of antiproliferative compounds from *Centaurea arenaria*. *Phytotherapia Research*, v. 24, p. 1664-1669, 2010.

CULING, Z.; SANTER, F. R. Androgen receptor signaling in prostate câncer. *Cancer Metastasis Rev.*, v. 33, p. 413-427, 2014.

DING, Y.; LIANG, C.; KIM, J. H.; LEE, Y. M.; HYUN, J. H.; KANG, H. K.; KIM, J. A.; MIN, B. S.; KIM, Y. H. Triterpene compounds isolated from *Acer mandshuricum* and their anti-inflammatory activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, v. 20(5), p. 1528-31, 2010.

EGAN A, DONG Y, ZHANG H, QI Y, BALK SP, SARTOR O. Castration- resistant prostate cancer: adaptive responses in the androgen axis. *Cancer Treat. Re.*, v. 40, p. 426-33, 2014.

EL-HALAWANY, A. M; OSMAN, S. M.; ABDALLAH, H. M. Cytotoxic constituents from *Vicia monantha* subsp. *monantha* seeds. *Nat. Prod. Res.*, 2018.

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.

FONTES JÚNIOR, E. A.; SOUZA, P. J. C.; NASCIMENTO, J. L. M.; SANTOS, S. N.; ESPINDOLA, L. S.; FERREIRA, V. M. M. 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.

FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 28 Set. 2018

FORZZA, 2010. CATÁLOGO DE PLANTAS E FUNGOS DO BRASIL b, volume 1, p. 32. Disponível em: < <http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/vol1.pdf>> Acesso em: 28 Set. 2016.

GAMA, J. R. V.; SOUZA, A. L.; CALEGÁRIO, N.; LANA, G. C. Fitossociologia De Duas Fitocenoses De Floresta Ombrófila Aberta No Município De Codó, Estado Do Maranhão. *Sociedade de Investigações Florestais R. Árvore, Viçosa-MG*, v.31, n.3, p.465-477, 2007.

GASCA CA, CHAVES M, FAGG CW, E MAGALHÃES PDO, FONSECA-BAZZO YM, SILVEIRA D. Pentacyclic triterpenes from leaves of *Cagaita* (*Eugenia dysenterica*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v.7(07), p. 051-4, 2017.

GELMANN EP. Molecular biology of the androgen receptor. *J. Clin. Oncol.*, v. 20, p. 3001-15, 2002.

GIESE, S. K. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS FLORAIS DE *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae) Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná como requisito à obtenção do título de Mestre em Química Orgânica, 2005.

GORDON V, BHADEL S, WUNDERLICH W, ZHANG J, FICARRO SB, MOLLAH SA, et al. CDK9 regulates AR promoter selectivity and cell growth through serine 81 phosphorylation. *Mol. Endocrinol.*, v. 24, p. 2267–80, 2010.

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.

GRINDSTAD, T.; ANDERSEN, S.; AL-SAAD, S.; DONNEM, T.; KISELEV, Y.; NORDAHL, M. High progesterone receptor expression in prostate cancer is associated with clinical failure. *PLoS One*;10:e0116691, 2015.

GUO, Z.; YANG, X.; SUN, F.; JIANG, R.; LINN, D. E.; CHEN, H.; KONG, X.; MELAMED, J.; TEPPER, C. G.; KUNG, H.; BRODIE, M. H.; EDWARDS, J.; QIU, Y. A Novel Androgen Receptor Splice Variant Is Upregulated during Prostate Cancer Progression and Promotes Androgen-depletion-resistant Growth. *NHI*, v. 69, 2010.

HATA, K.; HORI K.; TAKAHASHI S. *J. Nat. Prod.*, v. 65, p. 645–648, 2002.

HE, A.; WANG, M.; HAO, H.; ZHANG, D.; LEE, K.H. Hepatoprotective triterpenes from *Sedum sarmentosum*. *Phytochemistry*, v. 49, n 8, p. 2607-2610, 1998.

HIROTA, H.; MORIYAMA, Y.; TSUYURI, T.; TANAHASHI, Y.; TAKAHASHI, T.; KATO, Y.; SATOH, H. The High Resolution Mass Spectra of Shinane and Friedelane Derivatives, v.48, p. 1884-1888, 1975.

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.

HUANG, S. P.; HO, T. M.; YANG, C. W.; CHANG, Y.J.; CHEN, J. F.; SHAW, N. S.; HORNG, J. C.; HSU, S. L.; LIAO, M. Y.; WU, L. C.; HO, J. A. Chemopreventive Potential of Ethanolic Extracts of Luobuma Leaves (*Apocynum venetum* L.) in Androgen Insensitive Prostate Cancer. *Nutrients*, v.28; p.9, 2017.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/index.asp?ID=2>>. Acesso em: 05 abr. 2018.

IVERSEN P. Antiandrogen monotherapy: indications and results. *Urology*, v.60, p.64–71, 2002.

JAMAL, A., YAACOB, W. AND DIN, L. B. A chemical study on *Phyllanthus reticulatus*. *Journal of Physical Science*, v. 19, p. 45-50, 2008.

KACHUR, E. Prostate Cancer Review. *U. S. Pharmacist*. 2018.

KALLIFATIDIS, G.; HOY J. J.; LOKESHWAR, B. L. Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration-resistant prostate cancer. Elsevier, *Seminars in Cancer Biology*, v. 40–41, p.160-169, 2016.

KIM, D. J.; SHIN, D. H.; AHN, B.; KANG, J. S.; NAM, K. T.; PARK, C. B.; KIM, C. K.; HONG, J. T.; KIM, Y. B.; YUN, Y. W.; JANG, D. D.; YANG, K. H. *Mutat. Res.*, v. 523–524, p. 99–107, 2003.

KUETE, V.; NGNINTEDO, D.; FOTSO, G. W.; KARAOŞMANOĞLU, O.; NGADJUI, B. T.; KEUMEDJIO, F.; YEBOAH, S. O.; ANDRAE-MAROBELA, K.; SIVAS, H. Cytotoxicity of seputhecarpan D, thoningiol and 12 other phytochemicals from African flora towards human carcinoma cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v.18, 2018.

KUNDU J.; ROUF A. S. S.; HOSSAIN N.; HASAN C. M.; RASHID M. A. Antitumor activity of epifriedelanol from *Vitis trifolia*. *Fitoterapia*, v.7, p. 577-79, 2000.

LAMBERTINI, E.; LAMPRONTI, I.; PENOLAZZI, L.; KHAN, M. T.; ATHER, A.; GIORGI, G.; GAMBARI, R.; PIVA, R. Expression of estrogen receptor alpha gene in breast cancer cells treated with transcription factor decoy is modulated by Bangladeshi natural plant extracts. *Oncol. Res.*, v. 15(2), p. 69-79, 2005.

LI, Z.; BISHOP, A. C.; ALYAMANI, M.; GARCIA, J. A.; DREICER, R.; BUNCH, D. et al. Conversion of abiraterone to D4A drives anti-tumour activity in prostate cancer. *Nature*, v. 523, p. 347–51, 2015.

LI, R.; EVAUL, K.; SHARMA, K. K.; CHANG, K. H.; YOSHIMOTO, J.; LIU, J. et al. Abiraterone inhibits 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase: a rationale for increasing drug exposure in castration-resistant prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, v. 18, p. 3571–9, 2012.

LIN HK, JEZ JM, SCHLEGEL BP, PEEHL DM, PACHTER JA, PENNING TM. Expression and characterization of recombinant type 2 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) from human prostate: demonstration of bifunctional 3 alpha/17 beta-HSD activity and cellular distribution. *Mol. Endocrinol.*, v, 11, p. 1971–84, 1997.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. *J. Biol. Chem.*, p. 193-265, 1949.

MAIYO, F.; MOODLEY, R.; SINGH, M. Phytochemistry, cytotoxicity and apoptosis studies of b-sitosterol-3-o-glucoside and β -amyrin from prunus africana. Afr. J. Complement. Altern. Med., v. 3:13(4), p. 105-112, 2016.

MATUS, M. F.; ROMAN, M. J.; ZINIGA-HERNADEZ, J. Anti-proliferative effect of terpenes on human prostate cancer cells: Natural sources and their potential role as chemopreventive agents. Rev. Chil. Nutr., v. 44, N° 4, p. 371-382, 2017.

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.

MISHRA, T.; ARYA, R. K.; MEENA, S.; JOSHI P.; PAL, M.; MEENA, B.; UPRETI, D. K.; RANA, T. S.; DATTA, D. Isolation, Characterization and Anticancer Potential of Cytotoxic Triterpenes from Betula utilis Bark. PLoS One, v. 25, p. 11(7): 2016.

MIYAHIRA, A. K.; SIMONS, J. W.; SOULE, H. R. The 20th Annual Prostate Cancer Foundation Scientific Retreat report. Prostate, v. 74, p. 811–9, 2014.

MONKODKAEW, S.; LOETCHUTINAT, C.; NUNTASAEN, N.; POMPIMON,W. Identification and Antiproliferative Activity Evaluation of a Series of Triterpenoids Isolated from Flueggea virosa (Roxb. ex Willd.). American Journal of Applied Sciences, v. 6 (10), p. 1800-1806, 2009.

MORASH, C.; TEY, R.; AGBASSI,C.; KLOTZ, L.; MCGOWAN, T.; SRIGLEY, J.; EVANS, A. Active surveillance for the management of localized prostate cancer : Guideline recommendations. CUAJ, v. 9, June, 2015.

OGUNLAJA, O. O.; MOODLEY, R.; SINGH, M.; BAIJNATH, H.; JONNALAGADDA, S. B. Cytotoxic activity of the bioactive principles from Ficus burtt-davyi. J. Environ Sci Health B., v. 3;53(4), p. 261-275, 2018.

OLIVEIRA, A. K. M; PEREIRA, K. C. L.; MULLER, J. A. I.; MATIAS, R. Análise fitoquímica e potencial alelopático das cascas de Pouteria ramiflora na germinação de alface. Jornal de Horticultura brasileira, v.32, 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.

PERERA, M. et al. An update on focal therapy for prostate cancer. *Nature Reviews Urology*, 2016.

PERUMAL, P. C.; SOWMYA, S.; VELMURUGAN, D.; SIVARAMAN, T.; GOPALAKRISHNAN, V. K. Assessment of dual inhibitory activity of epifriedelanol isolated from *Cayratia trifolia* against ovarian cancer. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, v.11, 2016.

POUTERIA IN FLORA DO BRASIL 2020 EM CONSTRUÇÃO. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB14492>>. Acesso em: 06 Nov. 2018.

PORKKA, K. P.; VISAKORP, T. Molecular Mechanism of Prostate Cancer. *European Urology*, v.65, 2004.

PRASAD, S.; KALRA, N.; SHUKLA, Y. Induction of apoptosis by lupeol and mango extract in mouse prostate and Incap cells. *Nutr cancer*, v. 60(1), p. 120-30, 2008.

PROSTATE CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP. Maximum androgen blockade in advanced prostate cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*, v. 355, p.1491–8, 2000.

ROACH III M, HANKS G, THAMES JR H, et al. Defining biochemical failure following radiotherapy with or without hormonal therapy in men with clinically localized prostate cancer: recommendations of the RTOG-ASTRO Phoenix Consensus Conference. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, v. 65, p.965–74, 2006.

RODRIGUES, P. M.; DUTRA G. J. V.; JAMAL, C. M.; CUNHA N. A.; SANTOS, M. L.; FAGG, C. W.; FONSECA-BAZZO, Y. M.; MAGALHÃES, P. O.; DE SALES, P. M.; SILVEIRA, D. Triterpenes from *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. Leaves (Sapotaceae). *Food and Chemical Toxicology*, v.109, 2017.

SALVADOR, J. A. R.; LEAL, A. S.; VALDEIRA, A. S.; GONÇALVES, B. M. F.; ALHO, D. P. S.; FIGUEIREDO, S. A.C.; SILVESTRE, S. M.; MENDES, VANESSA I.S. Oleanane, ursane, and quinone methide friedelane-type triterpenoid derivatives: Recent Advances in Cancer Treatment. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017.

SALEEM, M.; MURTAZA, I.; WITKOWSKY, O.; KOHL, A. M.; MADDODI, N. Lupeol triterpene, a novel diet-based microtubule targeting agent: disrupts survivin/cFLIP activation in prostate cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 23, p. 576-82, 2009.

SCHMITT B, BENNETT C, SEIDENFELD J, SAMSON D, WILT T. Maximal androgen blockade for advanced prostate cancer. *Cochrane Data-base Syst. Rev.*, CD001526, 2000.

SEIDENFELD J, SAMSON DJ, HASSELBLAD V, et al. Single-therapy androgen suppression in men with advanced prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Intern. Med.*, v. 132, p. 566–77, 2000.

SHARMA, G.; KAR, S.; PALIT, S.; DAS, P. K. 18 beta-glycyrrhetic acid (concur) induces apoptosis through modulation of Akt/FOXO3a/Bim pathway in human breast cancer MCF-7 cells, *J. Cell Physiol.*, v.227, p. 1923–1931, 2012.

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

SHIOJIMA, K.; ARAI Y.; MASUDA K.; TAKASE, Y.; AGETA, T.; AGETA, H. Mass spectra of pentacyclic triterpenoids. *Chem. Pharm. Bull*, v. 40 (7), p. 1683-1690, 1992.

SILBERSTEIN, J. L.; TAYLOR, M. N.; ANTONARAKIS, E. S. Novel Insights into Molecular Indicators of Response and Resistance to Modern Androgen-Axis Therapies in Prostate Cancer. *Current Urology Reports*, v. 17, n. 4, p. 1–10, 2016.

SILVA, D. A. Estudo químico e avaliação de atividade antifúngica e antiproliferativa da espécie *Luehea candicans* MART. Et ZUCC. (Tiliacea). Maringá, Centro de Ciências exatas, Departamento de química da universidade estadual de Maringá, v. 137, 2004.

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 CAM, MELO RDO, RESCK IS, SILVEIRA D. Triterpenes from *Pouteria gardneri* (Mart. & Miq.) Baehni extracts. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 6(12), p. 197-201, 2016.

SOUZA, A. D. L.; ROCHA, A. F. I.; PINHEIRO, M. L. B.; ANDRADE, C. H. S.; GALOTTA, A. L. A. Q.; SANTOS, M. P. S. Constituintes químicos de *Gustavia augusta* L. (*Lecythidaceae*). *Quim. Nova*, v. 24, n. 4, p. 439-442, 2001.

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.

STEKETEE K, TIMMERMAN L, ZIEL-VAN DER MADE AC, DOESBURG P, BRINKMANN AO, TRAPMAN J. Broadened ligand responsiveness of androgen receptor mutants obtained by random amino acid substitution of H874 and mutation hot spot T877 in prostate cancer. *Int. J. Cancer*, v. 100, p. 309–17, 2002.

TAYLOR BS, SCHULTZ N, HIERONYMUS H, GOPALAN A, XIAO Y, et al. Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell*, v. 18, p. 11–22. 2010.

THAO, N. T. P.; HUNG, T. M.; LEE, M. K.; KIM, J. C.; MIN, B. S.; BAE, K. Triterpenoids from *Camellia japonica* and Their Cytotoxic Activity. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 58(1), p. 121- 124, 2010.

TROCK BJ, HAN M, FREEDLAND SJ, et al. Prostate cancer-specific survival following salvage radiotherapy vs observation in men with biochemical recurrence after radical prostatectomy. *JAMA*, v. 299, p. 2760–9, 2008.

TRUMBULL, E.R.; BIANCHI, E.; ECKERT, D.J.; WIEDHOPF, R.M.; COLE, J.R. Tumor inhibitory agents from *Vauquelinia corymbosa* (rosaceae). *J. Pharm. Sci.*, v. 65, p. 1407–1408, 1976.

TSUSHIMA T, NASU Y, SAIKA T, et al. Optimal starting time for flutamide to prevent disease flare in prostate cancer patients treated with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Urol. Int.*, v. 66, p. 135–9, 2001.

TUTTIS, K.; COSTA, D. L. M. G.; NUNES, H. L.; SPECIAN, A. F. L.; SERPELONI, J. M.; SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A.; VILEGAS, W.; MARTÍNEZ-LOPEZ, W.; CÓLUS, I. M. S. *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. extract: Flavonoids quantification and chemopreventive effect on HepG2 cells. *Journal of toxicology and environmental health*. 2018.

VAN CHAU M, LE MH, PHAN VK. Chemical investigations and biological studies of *Mallotus apelta*. *J. Chem.*, v. 43, p. 5-6, 2005.

VILELA, R. A.; NAVARRO, N. F.; FARIA, E. T.; FERREIRA, E. B.; RUZZA, R. Z.; GADIA, R.; GUERRA, E. N. S.; REIS, P. E. D. Use of stereotactic body radiation therapy for oligometastatic recurrent prostate cancer: A systematic review. *Journal of medical imaging and radiation oncology*. 2018.

VILLEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; BILEGAS, W. POZETTI, G. L. Further triterpenes, steroids and furanocoumarins from brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 8, n. 5, p. 529 -538, 1997.

XIE N, CHENGH, LIN D, LIU L, YANG O, JIA L, et al. The expression of glucocorticoid receptor is negatively regulated by active androgen receptor signaling in prostate tumors. *Int. J. Cancer*, v. 136, p. 27–38, 2015.

YANG, J.; FA, J.; LI, B. Apoptosis induction of epifriedelinol on human cervical cancer cell line. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.*, v. 5;14(4), p. 80-86, 2017.

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.

OMS (World Health Organization). Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: Out. 2018.

YADAV, V.R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; GELOVANI, J.G.; GUHA, S.; KRISHNAN, S.; AGGARWAL, B.B. Boswellic acid inhibits growth and metastasis of human colorectal cancer in orthotopic mouse model by downregulating inflammatory, proliferative, invasive and angiogenic biomarkers. *Int. J. Cancer*, v. 130, p. 2176–2184, 2012.

ZENG, Y. T.; JIANG, J. M.; LAO, H. Y.; GUO, J. W.; LUN, Y. N.; YANG, M. Antitumor and apoptotic activities of the chemical constituents from the ethyl acetate extract of *Artemisia indica*. *Mol. Med. Rep.*, v.11(3), p. 2234-40, 2015.

ZHAO XY, MALLOY PJ, KRISHNAN AV, SWAMI S, NAVONE NM, PEEHL DM, et al. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nat. Med.*, v. 6, p. 703–6, 2000.