



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA
(ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

**EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA
Agave Sisalana Perrine (EHAAS) EM LINHAGENS DE CÉLULAS
NÃO PEQUENAS DE CÂNCER DE PULMÃO**

MICHELLI RAMIRES TEIXEIRA

Foz do Iguaçu

2020

**EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA
Agave sisalana Perrine (EHAAS) EM LINHAGENS DE CÉLULAS
NÃO PEQUENAS DE CÂNCER DE PULMÃO**

MICHELLI RAMIRES TEIXEIRA

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado ao Instituto Latino-
Americano de Ciências da Vida e da
Natureza da Universidade Federal da
Integração Latino-Americana como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Pinheiro
Araldi

MICHELLI RAMIRES TEIXEIRA

**EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA
Agave sisalana Perrine (EHAAS) EM LINHAGENS DE CÉLULAS
NÃO PEQUENAS DE CÂNCER DE PULMÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso II
apresentado ao Instituto Latino-
Americano de Ciências da Vida e da
Natureza da Universidade Federal da
Integração Latino-Americana como
requisito parcial à obtenção do título de
Bacharel em Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA



Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Pinheiro Araldi
UNILA



Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas
UNILA



Profa. Dra. Edislaine Barreiros de Souza
UNESP

Foz do Iguaçu, 18 de Dezembro de 2020

TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Michelli Ramires Teixeira

Curso: Biotecnologia

	Tipo de Documento
(....) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(X) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Efeitos tóxicos do extrato de hidrólise ácida da *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) em linhagens de células não pequenas de câncer de pulmão

Nome do orientador(a): Rodrigo Pinheiro Araldi

Data da Defesa: 18/12/2020

Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons Licença 3.0 Unported*.

Foz do Iguaçu, 18 de Dezembro de 2020.

Michelli Ramires Teixeira

Assinatura do Responsável

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer aos meus orientadores Prof. Dr. Rodrigo e Profa. Dra. Thatiana, sem os quais este trabalho não seria possível. Por todo o conhecimento partilhado nestes últimos dois anos, novas experiências e oportunidades. Sou grata pelo entusiasmo contagiante pela ciência que vocês carregam. Agradeço pela paciência, compreensão e por terem depositado em mim a confiança para a execução desta pesquisa.

A Profa. Dra. Edislaine, agradeço por possibilitar este projeto, por ter cedido gentilmente o extrato utilizado e pela também confiança depositada em nossa pesquisa.

A minha parceira da bancada Rafaela Favato, por todo o suporte em todos os processos de execução deste trabalho, pelas trocas de conhecimento e pelos momentos compartilhados, tanto os bons quanto os difíceis.

Aos professores que se dedicam diariamente, enfrentando inúmeras adversidades, para garantir um ensino de qualidade e plural, expresso minha mais sincera admiração e gratidão. Ao Prof. Dr. Cristian, expresso minha admiração pela dedicação à pesquisa, engajamento em projetos de extensão e por apoiar seus alunos, mesmo nas ideias mais mirabolantes.

A Profa. Dra. Janete Cerutti e ao “Laboratório Bases Genéticas dos Tumores da Tireoide” da Universidade de São Paulo (UNIFESP), por nos acolher tão gentilmente em seu local de trabalho, compartilhando sua estrutura, conhecimentos e se adaptando frente a nossa pesquisa. Meu muito obrigada por nos possibilitar a realização deste estudo e pela experiência tão rica e agregadora.

Agradeço ao laboratório G004 da UNILA, por propiciar o suporte para a realização desta pesquisa e, em especial, ao Prof. Dr. Jorge Ruiz, pelos ensinamentos dentro e fora de sala de aula e pela disposição em nos auxiliar e nos incentivar a crescer academicamente.

Agradeço ao DELABEN, pelos esforços feitos para garantir o ensino e a pesquisa na UNILA e pela solicitude sempre apresentada em nos ajudar e ensinar quando necessitamos. Em especial, agradeço a todo o esforço, disposição e apoio da

Dra. Giseli Traesel, elementos essenciais para a harmonia e funcionamento dos laboratórios de pesquisa do Jardim Universidade - JU.

Agradeço imensamente aos meus pais, que sempre incentivaram minha curiosidade e vontade pelo conhecimento. Pelo amor e apoio incondicionais, que foram meus alicerces em todos os momentos da minha vida. Agradeço por nunca me deixarem desistir e sempre acreditarem em mim. Sempre serei grata pelos princípios que me ensinaram e pela luta diária para nos possibilitar uma educação melhor. Ao meu irmão Mateus, agradeço por toda a disponibilidade em me ajudar e por todas as conversas e desabafos neste ano tão nebuloso.

Ao meu leal companheiro Anderson, por estar ao meu lado em todas as etapas da execução deste trabalho, tanto de forma profissional, quanto pessoal. Agradeço por sempre acreditar no meu potencial e por me incentivar a melhorar constantemente. Pelas noites adentro de estudos e por ter deixado todos os momentos da minha graduação mais leve. Obrigada por ter me presenteado com sua amizade, amor, dedicação e companheirismo.

Aos meus amigos Andrey, Bruna, Écheley, Jeziel e Oriana, agradeço por fazerem parte da minha vida a tantos anos, por sempre me apoiarem, incentivarem e me rodearem de tanto carinho e boas risadas. Agradeço pelo crescimento que tivemos juntos e pela contribuição de cada um de vocês na pessoa que sou hoje.

Por fim, agradeço à Universidade Federal da Integração Latino-Americana, por ter me propiciado um ensino público de qualidade e ter me possibilitado conhecer pessoas admiráveis de singularidades fantásticas.

TEIXEIRA, Michelli Ramires. **EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) EM LINHAGENS DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS DE CÂNCER DE PULMÃO**. 96 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESUMO

O câncer de pulmão é o câncer que mais mata no Brasil e no mundo. O subtipo mais prevalente do câncer de pulmão é o de células não pequenas (CPCNP), correspondendo a 85% dos casos. A elevada mortalidade do CPCNP se dá principalmente pelos diferentes perfis genéticos das células e resistência às terapias convencionais. Neste sentido, emerge a necessidade da prospecção de novas substâncias de interesse terapêutico. Frente a isso, a *Agave sisalana* Perrine (sisal) tem se mostrado um importante alvo de prospecção de novas moléculas, devido aos seus efeitos citotóxicos e antineoplásicos. Assim, avaliamos os efeitos citotóxicos, antioxidantes e genotóxicos do extrato de hidrólise ácida da *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) nas linhagens de CPCNP A549 e NCI-H460 (ambas mutantes para *KRAS*) e também na linhagem saudável MRC-5 (controle). Nossos resultados demonstraram efeitos citotóxicos do EHAAS nas linhagens MRC-5 ($p < 0,0001$; $F = 130,6$) e A549 ($p < 0,001$; $F = 1019$), as quais apresentaram elevados percentuais de necrose. A linhagem NCI-H460 ($p < 0,0001$; $F = 97,06$), no entanto, se mostrou altamente quimiorresistente ao EHAAS. A atividade mitocondrial das linhagens A549 foi alterada em tratamentos com EHAAS na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,0028$), não sendo observada a depleção do potencial mitocondrial em nenhum outro tratamento nas demais linhagens (MRC-5: $p = 0,0951$; NCI-H460: $p = 0,0806$). A ação antioxidante do extrato foi observada nas linhagens MRC-5 ($p < 0,0001$; $F = 84,45$) e A549 ($p < 0,0001$; $F = 1,786$) diminuindo significativamente os níveis de ROS das células tratadas nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$. Para a linhagem NCI-H460, não foram observadas alterações significativas no estresse oxidativo ($p = 0,2659$; $F = 1,416$). Análises de genotoxicidade, por meio do ensaio de histona γ -H2AX, identificaram baixos efeitos genotóxicos do EHAAS e CP 100 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem controle (MRC-5). Os demais efeitos genotóxicos foram observados na linhagem A549, onde o tratamento com EHAAS a 50 $\mu\text{g/mL}$ apresentou elevada genotoxicidade, e na linhagem NCI-H460, em que as células apresentaram alta sensibilidade ao tratamento com CP a 100 $\mu\text{g/mL}$. Nossos resultados sugerem que o EHAAS pode ter um papel importante na indução de vias programadas da necrose, *i.e.* necroptose, nas linhagens MRC-5 e A549 e que os efeitos antioxidantes do extrato nestas linhagens são responsáveis pela manutenção do equilíbrio do estresse oxidativo durante o processo de morte celular. Considerando os efeitos citotóxicos e presente genotoxicidade em células MRC-5 (controle), sugere-se uma administração do EHAAS ou seus componentes de forma direcionada a célula alvo. Mais investigações acerca das propriedades químicas e moleculares do EHAAS se mostram importantes, a fim de explorar suas propriedades terapêuticas em diferentes tipos de câncer e elucidar os efeitos do extrato *in vitro*.

Palavras-chave: CPCNP, câncer de pulmão, *Agave sisalana* Perrine, sisal, EHAAS.

TEIXEIRA, Michelli Ramires. **EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) EM LINHAGENS DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS DE CÂNCER DE PULMÃO.** 96 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

ABSTRACT

Lung cancer is the leading cause of cancer death in Brazil and worldwide. The non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most prevalent subtype, accounting for 85% of cases. The high mortality of NSCLC is mainly due to the different genetic profiles of the cells and resistance to conventional therapies. In this sense, there is an emergin need for the prospect of new substances of therapeutic interest. In view of this, *Agave sisalana* Perrine (Sisal) has proved to be an important target for prospecting new molecules, due to its cytotoxic and antineoplastic effects. Thus, we evaluated the cytotoxic, antioxidant and genotoxic effects of the acid hydrolysis extract of *Agave sisalana* Perrine (AHEAS) in the cell lines of NSCLC A549 and NCI-H460 (both mutants for *KRAS*) and also in the healthy cell line MRC-5 (control). Our results demonstrated cytotoxic effects of AHEAS in the MRC-5 ($p < 0.0001$; $F = 130.6$) and A549 ($p < 0.0001$; $F = 1019$) lines, which showed high percentages of necrosis. The NCI-H460 ($p < 0.0001$; $F = 97.06$), however, proved to be highly chemoresistant to AHEAS. The mitochondrial activity of A549 cells was altered in treatments with AHEAS at a concentration of 400 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.0028$), with no depletion of mitochondrial potential in any other treatment in the other cell lines (MRC-5: $p = 0.0951$; NCI-H460: $p = 0.0806$). The antioxidant activity of the extract was observed in the cell lines MRC-5 ($p < 0.0001$; $F = 84.45$) and A549 ($p < 0.0001$; $F = 1.786$) significantly decreasing ROS levels in the cells treated at concentrations of 200 and 400 $\mu\text{g/mL}$. In the NCI-H460 cells, no significant changes in oxidative stress were observed ($p = 0.2659$; $F = 1.416$). Genotoxicity analyzes, using histone γ -H2AX, identified low genotoxic effects of AHEAS and drug CP 100 $\mu\text{g/mL}$ in controls (MRC-5). The other genotoxic effects were observed in the A549 cells, where the treatment with AHEAS at 50 $\mu\text{g/mL}$ showed high genotoxicity, and in the NCI-H460 cell line, in which the cells showed high sensitivity to treatment with CP at 100 $\mu\text{g/mL}$. Our results suggest that AHEAS may play an important role in the induction of programmed necrosis pathways, *i.e.* necroptosis, in the MRC-5 and A549 cell lines and that the antioxidant effects of the extract in these cells are responsible for maintaining the balance of oxidative stress during cell death process. Considering the cytotoxic effects and present genotoxicity in MRC-5 cells (control), an administration of AHEAS, or its components, in a targeted way to the neoplastic cells is suggested. Further investigation into the chemical and molecular properties of AHEAS are important in order to explore its therapeutic properties in different types of cancer and to elucidate the effects of the extract, *in vitro*.

Key-words: NSCLC, lung cancer, *Agave sisalana* Perrine, sisal, AHEAS.

TEIXEIRA, Michelli Ramires. **EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DA *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) EM LINHAGENS DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS DE CÂNCER DE PULMÃO.** 96 Páginas. Trabalho de Conclusão de Curso II (Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

RESÚMEN

El cáncer de pulmón es el cáncer que más mata en Brasil y en el mundo. El más prevalente de cáncer de pulmón es el de células no pequeñas (CPCNP), que corresponde al 85% de los casos. La alta mortalidad de CPCNP se debe principalmente a los diferentes perfiles genéticos de las células y la resistencia a las terapias convencionales. En este sentido, surge la necesidad de prospeccionar nuevas sustancias de interés terapéutico. En vista de esto, *Agave sisalana* Perrine (sisal) ha demostrado ser un objetivo importante para la prospección de nuevas moléculas, debido a sus efectos citotóxicos y antineoplásicos. Así, evaluamos los efectos citotóxicos, antioxidantes y genotóxicos del extracto de hidrólisis ácida de *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) en las líneas celulares de CPCNP A549 y NCI-H460 (ambas mutantes para KRAS) y también en la línea celular sana MRC-5 (control) Nuestros resultados demostraron efectos citotóxicos de EHAAS en las líneas MRC-5 ($p < 0.0001$; $F = 130.6$) y A549 ($p < 0.001$; $F = 1019$), que mostraron altos porcentajes de necrosis. El NCI-H460 ($p < 0.0001$; $F = 97.06$), sin embargo, demostró ser altamente quimiorresistente a EHAAS. La actividad mitocondrial de la línea celular A549 se alteró en tratamientos con EHAAS a una concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0.0028$), sin variaciones significativas del potencial mitocondrial en ningún otro tratamiento en las otras líneas celulares (MRC-5: $p = 0.0951$; NCI-H460: $p = 0.0806$). La acción antioxidante del extracto se observó en las líneas MRC-5 ($p < 0.0001$; $F = 84.45$) y A549 ($p < 0.0001$; $F = 1.786$) disminuyendo significativamente los niveles de ROS en las células tratadas a concentraciones de 200 y 400 $\mu\text{g/mL}$. Para la línea NCI-H460, no se observaron cambios significativos en el estrés oxidativo ($p = 0.2659$; $F = 1.416$). Los análisis de genotoxicidad, utilizando histona γ -H2AX, identificaron efectos genotóxicos bajos de EHAAS y CP 100 $\mu\text{g/mL}$ en células control (MRC-5). Los demás efectos genotóxicos se observaron en las células A549, donde el tratamiento con EHAAS a 50 $\mu\text{g/mL}$ mostró alta genotoxicidad, y en la línea celular NCI-H460, en la que las células mostraron alta sensibilidad al tratamiento con CP a 100 $\mu\text{g/mL}$. Nuestros resultados sugieren que EHAAS puede desempeñar un papel importante en la inducción de vías de necrosis programadas, es decir necroptosis, en las cepas MRC-5 y A549 y que los efectos antioxidantes del extracto en estas cepas son responsables por mantener el equilibrio del estrés oxidativo durante el proceso de muerte celular. Teniendo en cuenta los efectos citotóxicos y la genotoxicidad presente en las células MRC-5 (control), se sugiere una administración de EHAAS, o sus componentes, de forma dirigida a las células tumorales. Es importante seguir investigando las propiedades químicas y moleculares de EHAAS para explorar sus propiedades terapéuticas en diferentes tipos de cáncer y dilucidar los efectos del extracto *in vitro*.

Palabras clave: CPCNP, cáncer de pulmón, *Agave sisalana* Perrine, sisal, EHAAS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Número estimado de casos de câncer no mundo em 2018	20
Figura 2 - Número estimado de mortes por câncer no mundo em 2018	20
Figura 3 – Estimativos de câncer no Brasil em 2018.....	21
Figura 4 – Frequência de mutações em oncogenes condutores (<i>driver</i>) em adenocarcinomas de pulmão	25
Figura 5 – Divisão assimétrica das células-tronco cancerígenas	28
Figura 6 - Transição epitélio mesênquima e metástase	31
Figura 7 – Estrutura típica dos transportadores ABC	33
Figura 8 - Estutura básica das saponinas	38
Figura 9 – Cálculo de número de células em câmara de Neubauer.....	46
Figura 10 – Sobreposição espectral dos fluorocromos FITC e IP	48
Figura 11 - Gráficos Dotplot e histograma do ensaio de Anexina V/IP da linhagem MRC-5.....	56
Figura 12 – Gráficos Dotplot e histograma do ensaio de Anexina V/IP da linhagem A549.....	58
Figura 13 – Gráficos Dotplot e histograma do ensaio de Anexina V/IP da linhagem NCI-H460	60
Figura 14 - Histogramas do ensaio de Anexina V/IP das três linhagens de pulmão..	61
Figura 15 – Histogramas do ensaio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) da linhagem MRC-5	63
Figura 16 – Histogramas do ensaio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) da linhagem NCI-H460.....	64
Figura 17 – Histogramas do ensaio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) da linhagem A549	66
Figura 18 – Histogramas do ensaio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das três linhagens de pulmão.....	67
Figura 19 – Histogramas do ensaio de ROS da linhagem MRC-5	69
Figura 20 – Histogramas do ensaio de ROS da linhagem A549	71
Figura 21 – Histogramas do ensaio de ROS da linhagem NCI-H460.....	73
Figura 22 - Histogramas do ensaio de ROS das três linhagens de pulmão	74

Figura 23 – Histogramas do ensaio de histona γ -H2AX da linhagem MRC-5	76
Figura 24 – Histogramas do ensaio de histona γ -H2AX da linhagem A549.....	77
Figura 25 – Histogramas do ensaio de histona γ -H2AX da linhagem NCI-H460.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Efeitos biológicos das saponinas	36
Tabela 2 - Linhagens de pulmão, suas origens e mutações frequentes	42
Tabela 3 - Linhagens de pulmão e suas respectivas condições de crescimento	43
Tabela 4 – Composição PBS 1x feito <i>in house</i>	45

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ALK	<i>Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase</i>
BCL-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CAFs	<i>Cancer-associated fibroblast</i>
CP	Ciclofosfamida
CPCNP	Câncer de pulmão de células não pequenas
CPCP	Câncer de pulmão de células pequenas
CTC	Células-tronco cancerígenas
DCFH-DA	<i>2',7'-Dichlorofluorescein diacetate</i>
EE	Extrato etanólico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EH	Extrato hexânico
EHAAS	Extrato de hidrólise ácida da <i>Agave sisalana</i> Perrine
EPS	Extrato de precipitado a seco
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
HIF	<i>Hypoxia-Inducible factor</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MDR	<i>Multi-drug resistance</i>
MIF	Mediana de intensidade de fluorescência
MRP	<i>Multidrug resistance-associated protein</i>

MS	<i>Mass spectrometry</i>
NF- κ B	<i>Factor nuclear kappa B</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
RIP	<i>Receptor-interacting serine/threonine kinase</i>
ROS	<i>Reactive oxygen species</i>
SFB	Soro fetal bovino
TEM	Transição epitélio mesênquima
TKI	<i>Tyrosine kinase inhibitors</i>
TNF	<i>Tumor necrosis fator</i>
TNFR1	<i>Tumor necrosis fator receptor 1</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Câncer: uma visão geral	19
2.2 Câncer de pulmão: estatísticas e estimativas	19
2.4 Aspectos genéticos e epigenéticos do câncer de pulmão	23
2.5 Células-tronco cancerígenas (CTCs) e Heterogeneidade neoplásica	28
2.6 Microambiente Tumoral e Metabolismo Energético	29
2.7 Transportadores ABC na quimiorresistência	32
2.8 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e drogas antioxidantes	33
2.9 Agave sisalana Perrine	35
3 JUSTIFICATIVA	39
4 OBJETIVOS	40
4.1 Objetivo geral	40
4.2 Objetivos específicos	40
5 MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 Aspectos éticos	41
5.2 Obtenção do extrato de Agave sisalana Perrine	41
5.3 Cultura de células e aplicação da droga	42
5.3.1. <i>Sobre as linhagens celulares utilizadas</i>	42
5.3.2. <i>Cultura celular</i>	43
5.3.3. <i>Desagregação da monocamada e plaqueamento</i>	44
5.3.4. <i>Aplicação do EHAAS e determinação dos controles</i>	46
5.4 Avaliação da citotoxicidade celular	47
5.4.1. <i>Ensaio de anexina V/IP</i>	47
5.5 Avaliação do estresse metabólico celular	49
5.5.1. <i>Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)</i>	49
5.5.2. <i>Análise de produção de ROS por meio da sonda DCFH-DA</i>	50
5.6 Avaliação do potencial genotóxico do extrato	52
5.6.1. <i>Ensaio de histona γ-H2AX</i>	52
6 RESULTADOS	55
6.1 Avaliação de citotoxicidade pelo ensaio de Anexina V-FITC/IP	55
6.2 Ensaio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	62

6.3 Avaliação da produção de ROS através da sonda DFCH-DA.....	68
6.4 Avaliação de genotoxicidade por meio do ensaio de histona γ-H2AX..	75
7 DISCUSSÃO	79
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
REFERÊNCIAS	88
ANEXO A	96

1 INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte por doenças não infecciosas no mundo, atrás apenas das doenças cardiovasculares (ALLEN, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 9,6 milhões de pessoas vieram a óbito pela doença no ano de 2018 (BRAY *et al.*, 2018). Dentre estas mortes, 18,4% foram causadas pelo câncer de pulmão, despontando como o câncer com maiores índices de mortalidade no Brasil e no mundo (BRAY *et al.*, 2018). Entre os histiótipo do câncer de pulmão, o câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) se destaca por sua alta prevalência, correspondendo a 85% dos casos de câncer de pulmão (HERBST *et al.*, 2018; ZÖCHBAUER-MÜLLER; GAZDAR; MINNA, 2002).

A alta mortalidade do CPCNP é resultante principal do perfil altamente mutado das células e sua elevada resistência às terapias convencionais (GRIDELLI *et al.*, 2015; HIRSCH *et al.*, 2017). Entre os diferentes perfis genéticos das células não pequenas de câncer de pulmão, as mutações para o gene *KRAS* destacam-se pela alta ocorrência (25% dos casos) e falha no desenvolvimento de terapias direcionadas eficientes (HIRSCH *et al.*, 2017; MASSARELLI *et al.*, 2007; RE *et al.*, 2017).

Deste modo, emerge a necessidade da investigação de novos métodos terapêuticos e da prospecção de moléculas com potencial no tratamento do câncer. Neste sentido, considerando que cerca de 60% dos quimioterápicos disponíveis no mercado são derivados de moléculas extraídas de plantas, a bioprospecção de novas moléculas em espécies vegetais se mostra de grande importância (DUTRA *et al.*, 2016).

Entre a vasta biodiversidade de espécies vegetais presente no Brasil, destaca-se a *Agave sisinala* Perrine, cujos extratos têm demonstrado interessantes efeitos terapêuticos, incluindo efeitos anti-inflamatórios, citotóxicos e antineoplásicos (ARALDI *et al.*, 2018; DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; DUNDER *et al.*, 2010). Estes efeitos, por sua vez, são relacionados a elevadas concentrações de saponinas esteroidais e inúmeros outros compostos, como flavonas, flavonoides e polissacarídeos variados

(DE OLIVEIRA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2015).

Em estudo prévio, Araldi e colaboradores (2018) demonstraram que o extrato de hidrólise ácida da *Agave sisalana* (EHAAS) possui significantes efeitos citotóxicos e antioxidantes em células Vero (rim de macaco verde africano) (ARALDI *et al.*, 2018), sugerindo uma interessante aplicação em células neoplásicas. Desta forma, este estudo investigou os efeitos tóxicos e antineoplásicos do EHAAS nas linhagens de CPCNP A549 e NCI-H460 (com mutações no gene *KRAS*) e linhagem MRC-5 (fibroblasto saudável de pulmão).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer: uma visão geral

O câncer representa um conjunto de mais de 270 doenças de caráter multifatorial (SAITO *et al.*, 2015; HASSANPOUR; DEGHANI, 2017). Tais doenças são caracterizadas pelo acúmulo de mutações que levam à hiperproliferação de células transformadas (SAITO *et al.*, 2015).

Embora os primeiros relatos de câncer datem de 2.500 anos atrás, estudos epidemiológicos têm mostrado um drástico aumento na taxa de incidência global da doença nas últimas três décadas (SAITO *et al.*, 2015).

O aumento da incidência global do câncer pode ser justificado por diferentes fatores, como: (1) o aumento da expectativa de vida, (2) o aumento da exposição a diversos mutágenos e/ou carcinógenos e (3) o aumento da sensibilidade dos métodos diagnósticos (SAITO *et al.*, 2015; RECK; RABE, 2017).

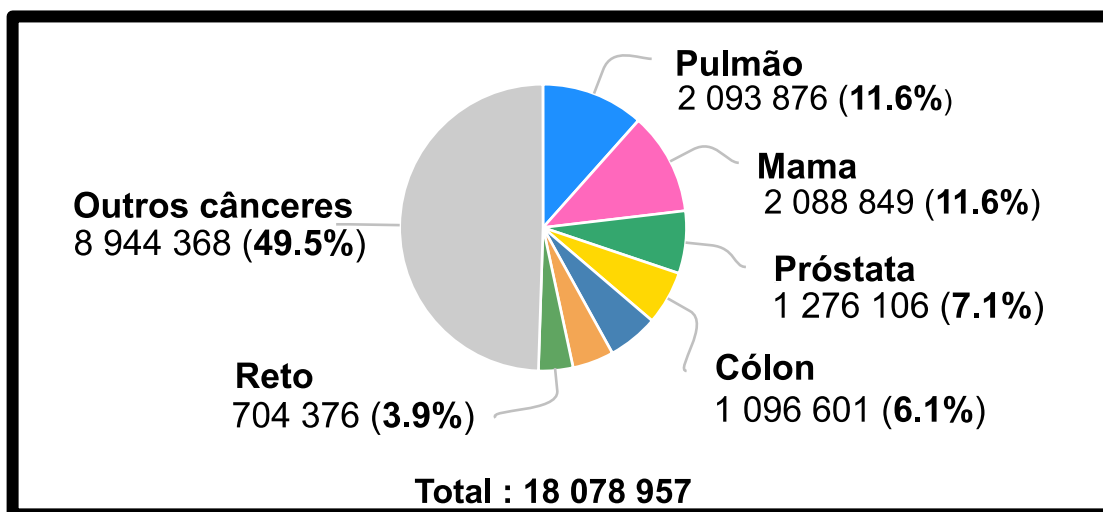
Apesar dos relevantes avanços tanto na medicina diagnóstica, como na terapêutica, as taxas de letalidade do câncer ainda permanecem altas (SAITO *et al.*, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2018, foram registrados 9,6 milhões de óbitos por câncer em todo o mundo, fazendo do câncer a segunda principal causa de morte por doenças não infecciosas, sendo superada apenas pelas doenças cardiovasculares (ALLEN, 2017). Entretanto, esse cenário deve mudar nos próximos anos, já que, de acordo com modelos estatísticos, é esperado que até 2050 o câncer se torne a principal *causa mortis* no mundo (BRAY *et al.*, 2018)

2.2 Câncer de pulmão: estatísticas e estimativas

Dentre os diferentes tipos histológicos, o câncer de pulmão se destaca por ser a segunda malignidade mais prevalente no mundo para ambos os sexos (**Figura 1**). Somente em 2018, o câncer de pulmão foi responsável por 11,6% (2.093.876 casos) de todos os casos de câncer no mundo, seguido pelo câncer de mama, com 11,6% (2.088.849 casos) (BRAY *et al.*, 2018).

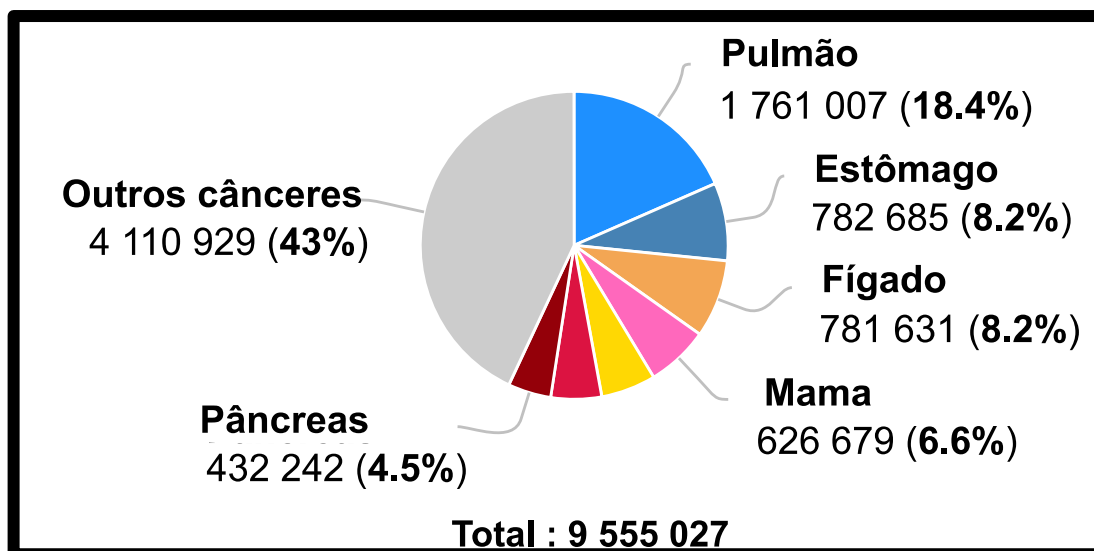
Figura 1 - Número estimado de casos de câncer no mundo em 2018



FONTE: GLOBOCAN, 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>

Além de sua elevada prevalência, o câncer de pulmão também lidera o número de óbitos por câncer em todo o mundo (**Figura 2**), tendo sido responsável por 18,4% (1.761.007 casos) de todas as mortes por câncer em 2018, seguido por 9,2% (880.792 casos) do câncer de cólon (BRAY *et al.*, 2018).

Figura 2 - Número estimado de mortes por câncer no mundo em 2018

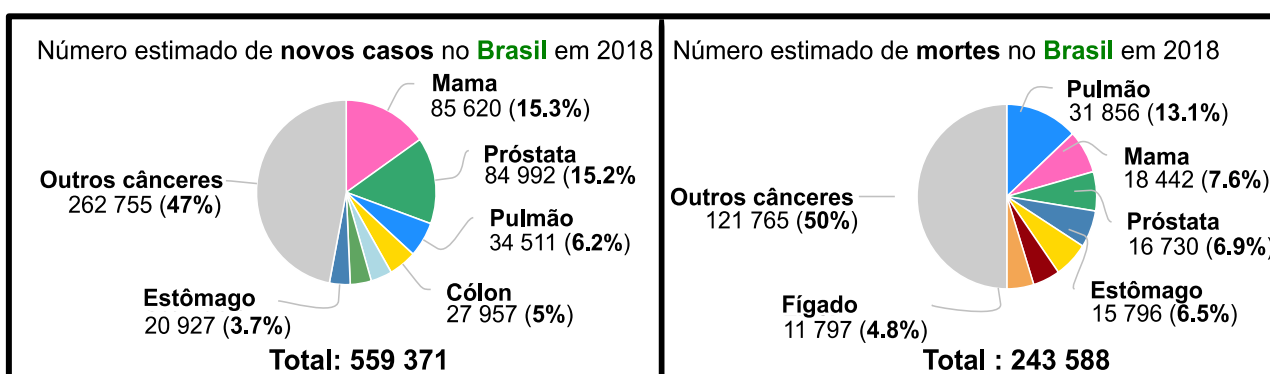


FONTE: GLOBOCAN, 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>

De acordo com dados epidemiológicos de 2018, o câncer de pulmão ocupou a terceira colocação entre os cânceres de maior incidência no Brasil (6,2% ou 34.511 casos), tendo sido superado pelo câncer de próstata (15,2% ou 84.992 casos)

e câncer de mama (15,3% ou 85.620 casos) (**Figura 3**). Entretanto, seguindo o comportamento mundial, o câncer de pulmão liderou o número de óbitos por câncer para ambos os sexos no Brasil em 2018 (**Figura 3**), sendo responsável por 13,1% (31.856 casos) de todos os óbitos pela doença (GLOBOCAN, 2018).

Figura 3 – Estimativos de câncer no Brasil em 2018



FONTE: GLOBOCAN, 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>

As projeções para o câncer de pulmão, tanto no cenário nacional, como mundial, também não são animadoras. Em 2030, espera-se que a incidência do câncer de pulmão cresça em 38,1% no mundo e 50,1% no Brasil, enquanto a mortalidade deve aumentar em 39,4% no mundo e 50,8% no Brasil, comparados aos valores obtidos no ano de 2018 (GLOBOCAN, 2018).

2.3 Características do câncer de pulmão e fatores de risco

O termo “câncer de pulmão” é utilizado genericamente para descrever patologias com origem em tipos celulares e regiões distintas do pulmão. Apesar de diferentes classificações serem discutidas, a mais utilizada é a separação por tipos histológicos da doença. Neste caso, ocorre a divisão em dois principais histiótipos: (1) câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) (NSCLC, do inglês, *non-small-cell lung cancer*) e (2) câncer de pulmão de células pequenas (CPCP) (SCLC, do inglês *small cell lung cancer*) (ZÖCHBAUER-MÜLLER; GAZDAR; MINNA, 2002). Dentre estes tipos, o CPCNP corresponde à forma mais prevalente da doença entre fumantes e não fumantes, chegando a representar 85% de todos os casos de câncer de pulmão (HERBST *et al.*, 2018).

O CPCNP é ainda classificado nos subtipos: carcinoma de células

escamosas, adenocarcinomas, carcinoma de células grandes e carcinoma de tipos mistos (ZÖCHBAUER-MÜLLER; GAZDAR; MINNA, 2002), sendo os dois primeiros os subtipos mais prevalentes (HERBST; MORGENSZTERN; BOSHOFF, 2018).

O principal fator de risco para o câncer de pulmão é o tabagismo, já que cerca de 90% dos casos reportados da doença ocorrem em fumantes. Entretanto, outros fatores ambientais também podem aumentar os riscos para o desenvolvimento da doença (DE GROOT; MUNDEN, 2012; SHOPLAND; EYRE; PEACHACEK, 1991). A exemplo disso, tem-se a exposição ao gás radônio e aos produtos de seu decaimento radioativo, os quais representam o segundo principal fator de risco para doença (MALHOTRA *et al.*, 2016).

O gás radônio é um gás incolor e inodoro, presente em regiões ricas em minérios (especialmente urânio) que se acumula em elevados níveis no interior de casas devido à baixa circulação de ar, resultando em uma exposição intradomiciliar (MALHOTRA *et al.*, 2016; SAMET, 1989).

Além da exposição ao gás radônio, outros fatores de risco para o câncer de pulmão também são conhecidos, como: o fumo passivo, a exposição a amianto, sílica, escape de diesel, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e demais poluentes do ar (MALHOTRA *et al.*, 2016).

A forma com que o tabaco e seus derivados induzem o desenvolvimento neoplásico é bastante complexa, já que sua combustão leva à liberação de inúmeros compostos carcinogênicos, os quais são formados a partir de duas fases da fumaça: a gasosa e a particulada (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2010).

Na fase gasosa são encontrados compostos como CO₂, CO, metanol, acetona, sulfeto de hidrogênio (H₂S) e diversos compostos nitrogenados (cianeto, ácido nítrico, amônia, nitrosaminas). Na fase particulada, estão presentes ácidos carboxílicos, nicotina, fenóis (U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2010) e outros hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre eles o benzopireno (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012).

O benzopireno é um hidrocarboneto aromático policíclico, oriundo da combustão incompleta da matéria orgânica. Por esta razão, o benzopireno é considerado um poluente atmosférico e é capaz de induzir danos no DNA. Isto porque, quando internalizado, o benzopireno é hidroxilado, resultando na formação de epóxidos super reativos que interagem com purinas, podendo causar mutações (COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2012).

Apesar do tabagismo ser um importante fator de risco para o câncer de pulmão, apenas 15% de todos os indivíduos fumantes tendem a desenvolver a doença (DE GROOT; MUNDEN, 2012). Tal dado indica que, além de fatores ambientais, fatores genéticos também contribuem com a iniciação da doença. Neste sentido, estudos têm mostrado que variantes de genes responsáveis pela metabolização da nicotina (*CYP1A1*, *GSTM1* e *GSTT1*) e reparo do DNA (*TP53*, *XRCC1*, *XPA* e *XPC*), assim como polimorfismos em *loci* das regiões cromossômicas 15q25, 5p15 e 6p21 tendem a aumentar o risco do desenvolvimento de câncer de pulmão em fumantes e não fumantes (DE GROOT; MUNDEN, 2012; MALHOTRA *et al.*, 2016).

Independente do hábito tabagista, os pacientes com CPCNP em geral apresentam apenas 5 anos de sobrevida (ALTORKI *et al.*, 2019). Este prognóstico pode ser associado a diversos fatores, como: (1) o diagnóstico tardio da doença, (2) a heterogeneidade dos subtipos da doença e (3) a baixa resposta a diferentes estratégias terapêuticas (ALTORKI *et al.*, 2019).

2.4 Aspectos genéticos e epigenéticos do câncer de pulmão

O processo neoplásico tem início a partir do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em genes que regulam o ciclo celular. Estas alterações podem afetar uma a poucas bases nitrogenadas (mutações gênicas) ou regiões cromossômicas inteiras (mutações genômicas), podendo se dar através da interação do DNA com agentes físicos, químicos e biológicos (COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2014).

As mutações gênicas geralmente resultam de erros durante a replicação ou do reparo de lesões genéticas, afetando apenas uma base, ou levando a inserção ou

deleção de nucleotídeos (*indels*) (COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2014). Todavia, mutações podem envolver grandes modificações na sequência do DNA, comumente provenientes de erros de recombinação cromossômica durante a divisão celular, onde os cromossomos podem sofrer: deleções, inserções, inversões, translocações ou duplicações de grandes porções de seu material genético (COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2014).

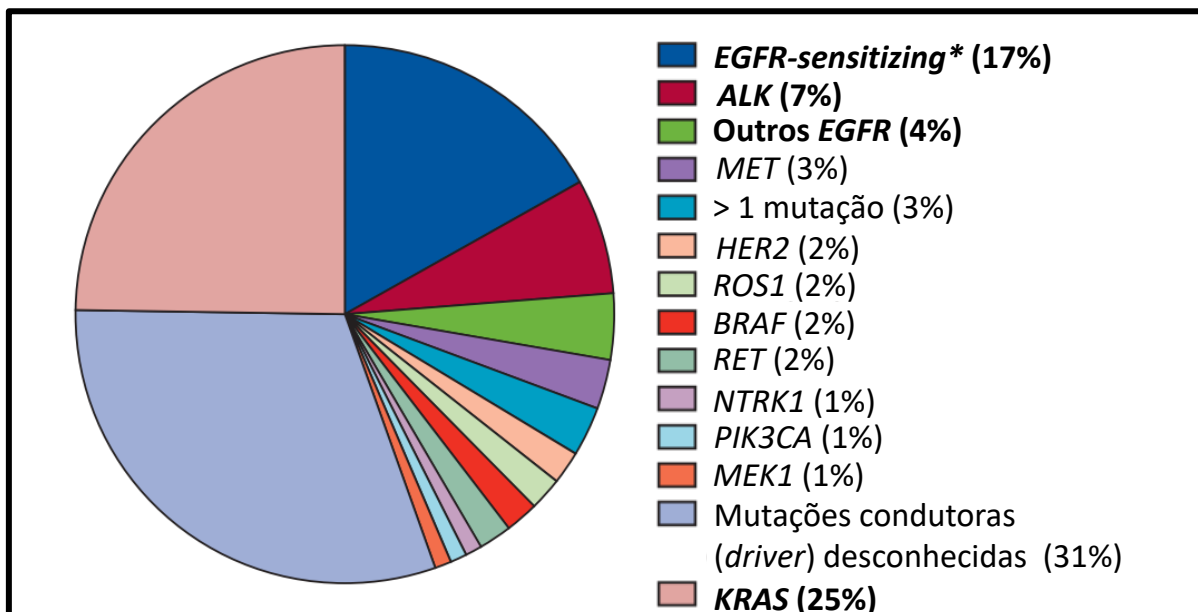
De modo geral, as mutações podem tanto não alterar o(s) gene(s) (mutações silenciosas), quanto causar perda ou ganho de função de genes (mutações *missense* e *nonsense*), sendo geralmente deletérias às células (COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2014).

No câncer, mutações em genes envolvidos no ciclo celular são frequentemente verificadas, sendo categorizados em dois grupos: (1) proto-oncogenes, que regulam positivamente a divisão celular e (2) genes supressores de tumor, que reprimem a divisão celular (COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2014).

Nas neoplasias, é comum observar perda de função de genes supressores de tumor e ganho funcional de proto-oncogenes, que passam então a se chamar oncogenes (COLEMAN; TSONGALIS, 2016). As mutações nestes grupos de genes, por sua vez, desempenham importante papel no aparecimento de mutações subsequentes (*passenger*), as quais aumentam a heterogeneidade genotípica das células cancerígenas (COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2014).

No CPCNP, entre os oncogenes frequentemente mutados estão: *EGFR*, *ALK*, *KRAS*, *MET*, *RET*, *ROS1*, *HER2* e *BRAF* (**Figura 4**). Já entre os genes supressores de tumor comumente encontrados mutados estão: *TP53*, *TP16* e *RB1* (SHOLL, 2016; TERLIZZI *et al.*, 2019).

Figura 4 – Frequência de mutações em oncogenes condutores (*driver*) em adenocarcinomas de pulmão



Diferentes mutações podem levar ao processo de oncogênese. Nos adenocarcinomas de pulmão, as mutações condutoras mais frequentes estão relacionadas aos genes *KRAS* (25%), *EGFR* (21%) e *ALK* (7%). Nota-se um elevado número de *driver mutations* (mutações condutoras) desconhecidas (31%). **EGFR*-sensitizing: gene *EGFR* com mutações nos éxons 18,19 ou 21 do gene *EGFR*, associados à sensibilidade aos medicamentos inibidores de tirosina quinase -TKIs (PAO; CHMIELECKI, 2010). FONTE: HIRSCH *et al.*, 2017.

Entre estas, mutações nos genes *EGFR* e *ALK* têm se mostrado importantes alvos dos inibidores de tirosina quinase (TKI, do inglês *tyrosine kinase inhibitors*), classe de medicamentos amplamente utilizada em pacientes de câncer de pulmão. Apesar da sensibilidade a este grupo de drogas, algumas células se mostram resistentes e evadem aos mecanismos de morte dos TKIs, possibilitando a manutenção da neoplasia (LIU *et al.*, 2017; SHOLL, 2016; TERLIZZI *et al.*, 2019; WOOD *et al.*, 2015). Além do mais, pacientes com outros perfis genéticos (p.ex. mutantes para *KRAS*) geralmente não se beneficiam dos tratamentos com *EGFRs*/TKIs e *ALK*/TKIs (HIRSCH *et al.*, 2017; MASSARELLI *et al.*, 2007; RE *et al.*, 2017).

Outra família de genes frequentemente mutada no câncer é a codificante da família de proteínas BCL-2, composta por membros anti e pró-apoptóticos. Entre os membros da família, os mais clinicamente importantes são as proteínas BCL-2 (anti-apoptótica) e BAX (pró-apoptótica) (SUN; SASANO; GAO,

2017). A proteína BCL-2 desempenha importante papel no câncer, já que sua superexpressão leva à evasão da morte por apoptose, inibindo a ativação de proteínas pró-apoptóticas como as BAX/BAK (SUN; SASANO; GAO, 2017; ZÖCHBAUER-MÜLLER; GAZDAR; MINNA, 2002).

As alterações genéticas no câncer são geralmente acompanhadas por alterações epigenéticas. O termo “epigenética” foi inicialmente introduzido na tentativa de explicar os complexos eventos que determinam o fenótipo durante o desenvolvimento dos organismos (WADDINGTON, 2012). Desde então, o termo “epigenética” foi sendo expandido e utilizado nas mais diversas áreas da biologia e, apesar de contar com diferentes definições (BIRD, 2007), o termo pode ser empregado para se referir a alterações estáveis e herdáveis da expressão gênica ou fenótipo celular, sem modificações na sequência do DNA (BIRD, 2007; GOLDBERG; ALLIS; BERNSTEIN, 2007). As alterações epigenéticas, por sua vez, podem se dar através de mudanças na organização da cromatina nuclear, modificação de histonas e metilação do DNA (COLEMAN; TSONGALIS, 2016; COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2014).

A organização da cromatina ocorre por meio de interações hierárquicas extremamente organizadas, cujas unidades básicas são denominadas nucleossomos: estruturas formadas por sequências de 200 pb e compactadas ao redor de um octâmero proteico, formado por 4 histonas nucleares (H2A, H2B, H3 e H4). Já os nucleossomos são unidos entre si através de DNA não compactado e histona H1, cuja presença limita o acesso de proteínas e fatores de transcrição ao DNA (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2014).

Outro fator organizacional que influi no acesso de diferentes enzimas ao material genético é a interação entre nucleossomos promovida pelas caudas N-terminais das histonas nucleares.

As caudas N-terminais são projeções flexíveis e modificáveis das histonas, estando sujeitas a processos como metilação e fosforilação (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2014). Ademais, outras porções das histonas (p. ex. caudas C-terminais) podem sofrer diferentes modificações, conferindo a este grupo proteico

um dos mais importantes papéis sobre as características epigenéticas (COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2014).

Além das metilações em resíduos de histonas, metilações de nucleotídeos também influenciam na expressão gênica e, conseqüentemente, no fenótipo celular (COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2014).

A metilação do DNA se dá pela adição enzimática de um grupamento metil (-CH₃) a uma base, geralmente uma citosina contida em uma ilha CpG. A metilação cria um impedimento físico a RNA polimerase II, o que inibe a transcrição do gene (COLEMAN; TSONGALIS, 2016; COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2014).

No câncer, é comum observar a metilação e hipermetilação do DNA, sobretudo de genes supressores tumorais, como *APC*, *RARB*, *NEUROD*, *RASSF1*, *MGMT*, *MTHFR* e *CDKN2A* (BALGKOURANIDOU; LILOGLOU; LIANIDOU, 2013; VAISSIÈRE *et al.*, 2009).

No câncer de pulmão, uma das alterações epigenéticas mais precocemente detectada é a metilação da região promotora do gene *INK4a*, que codifica a proteína p16, a qual atua como um regulador negativo da ciclina D1 e da CDK4, levando a inibição do ciclo celular entre as fases G1 e S (KERSTING *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2001; PALMISANO *et al.*, 2000; VAISSIÈRE *et al.*, 2009).

Entretanto a hipometilação também pode afetar o funcionamento comum das células, conferindo ganho de função a proto-oncogenes (COLEMAN; TSONGALIS, 2016; COX; DOUDNA; O'DONNEL, 2014).

Sendo assim, as alterações genéticas (KAN *et al.*, 2010) e epigenéticas comumente descritas no CPCNP (BALGKOURANIDOU; LILOGLOU; LIANIDOU, 2013) conferem uma elevada instabilidade genômica às células neoplásicas, contribuindo com a formação de células-tronco cancerígenas e, portanto, com a heterogeneidade celular e a resistência terapêutica (HEPPNER; MILLER, 1983; UKUMURA; JAIN, 2007).

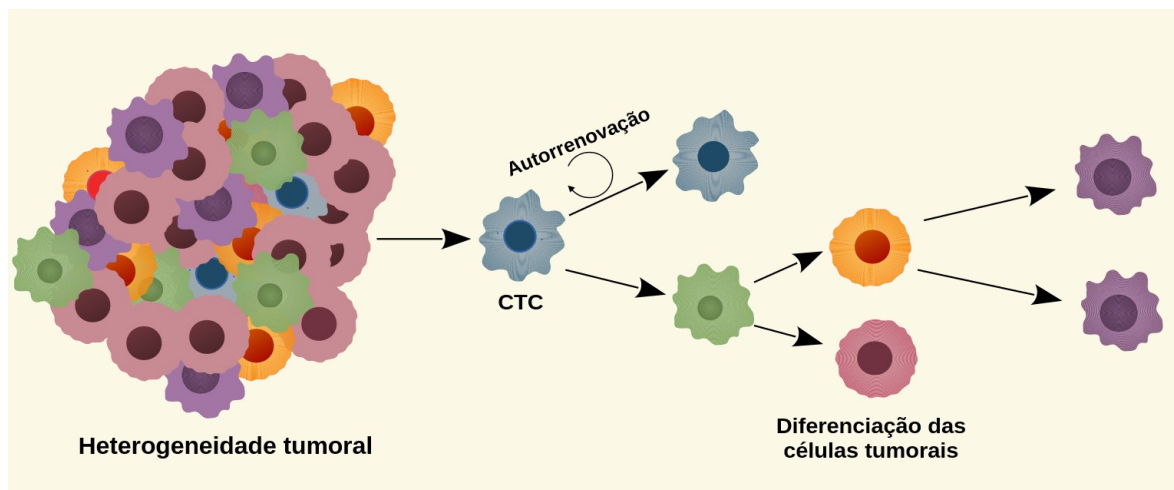
2.5 Células-tronco cancerígenas (CTCs) e Heterogeneidade neoplásica

As recém descobertas a respeito da biologia das células-tronco cancerígenas (CTCs) têm auxiliado na formulação de hipóteses que buscam explicar o processo carcinogênico (DICK, 2008).

Sugerida a mais de 50 anos como uma possível responsável pela origem das subpopulações dos tumores (TILL McCULLOCH, 1961 *apud* WISHA *et al.*, 2006), apenas nas últimas décadas intensificou-se a busca pelo entendimento e relevância das CTCs (DICK, 2008).

O termo “células-tronco cancerígenas” provém de sua capacidade de autorrenovação e diferenciação, responsável pelo crescimento e heterogeneidade fenotípica dentro do microambiente neoplásico. Esta capacidade se dá porquê, por meio da divisão celular assimétrica, as CTCs geram uma célula que mantém características tronco e outra com fenótipo diferenciado (**Figura 5**) (DICK, 2008).

Figura 5 – Divisão assimétrica das células-tronco cancerígenas



As células-tronco cancerígenas (CTCs) têm capacidade de gerar e manter nichos de células tumorais através de sua divisão assimétrica, onde a cada divisão gera-se uma nova CTC (autorrenovação) e outra célula com características mais determinadas (diferenciadas). Desta forma, diferentes tipos celulares, com distintas funções, podem ser originados a partir das células-tronco, mantendo a heterogeneidade e funcionamento do tumor (DICK, 2008). FONTE: Do Autor.

Além da manutenção do tumor primário, as células-tronco cancerígenas mostram forte relação com a progressão neoplásica e capacidade de repovoamento de outros tecidos e órgãos (pontos chave na metástase), podendo ser

diretamente responsáveis pelo ressurgimento da doença pós-tratamento (recidiva) (STEINBICHLER *et al.*, 2020; WICHA; LIU; DONTU, 2006).

Entretanto, apesar do importante papel das CTCs na manutenção do tumor e na progressão neoplásica, estas células não trabalham sozinhas - necessitando de outros fatores que possibilitam a sobrevivência das células cancerígenas (FUKUMURA; JAIN, 2007; HANAHAN; COUSSENS, 2012).

Entre os fatores determinantes para a sobrevivência do câncer e a manutenção das células em alta proliferação, destaca-se a reprogramação do microambiente neoplásico (FUKUMURA; JAIN, 2007).

2.6 Microambiente Tumoral e Metabolismo Energético

O microambiente neoplásico, também denominado microambiente tumoral, é composto por células cancerígenas, matriz extracelular e células do estroma, as quais podem ser divididas em três grupos gerais: células vasculares angiogênicas (AVCs, do inglês *angiogenic vascular cells*), células fibroblásticas associadas ao câncer (CAFs, do inglês *cancer-associated fibroblastic cells*) e células infiltrantes do sistema imune (IICs, do inglês *infiltrating immune cells*) (HANAHAN; COUSSENS, 2012).

Fisiologicamente, o microambiente neoplásico pode ser considerado ácido e com baixos níveis de oxigênio (estado de hipóxia). A acidificação do microambiente tumoral é resultante principal da alteração do metabolismo energético de suas células (HARRIS, 2002; HASHIM *et al.*, 2011). A descrição deste fenômeno foi proposta pela primeira vez por Otto Warburg em 1931, onde foi demonstrado que células neoplásicas, comparadas com a maioria das células normais, utilizam rotas glicolíticas diferentes para obtenção de energia (principalmente na forma de ATP) (WARBURG, 1931).

Deste modo, ao invés da utilização da rota bioquímica que leva à fosforilação oxidativa, utilizada pela maioria das células normais (com consumo de O₂ e maior saldo energético), as células cancerígenas tendem a realizar a rota glicolítica, seguida da fermentação do piruvato (sem necessidade de O₂, porém com menor saldo

energético), que é transformando em lactato (HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009; NELSON; COX, 2014). O lactato, por outro lado, é liberado para o ambiente extracelular, resultando na acidificação do meio (NELSON; COX, 2014).

A arquitetura histológica da massa de células neoplásicas explica a necessidade de uma mudança do metabolismo oxidativo para a via glicolítica. Isto porque, a proliferação celular leva à privação de oxigênio (hipóxia) de células mais internalizadas, que perdem acesso aos vasos sanguíneos, o que acarreta a necessidade de vias alternativas de obtenção de energia (HARRIS, 2002).

Quando em ambiente hipóxico, as células liberam fatores induzidos por hipóxia, ou HIFs (do inglês, *hipoxy induced factor*), que atuam de forma pleiotrópica na biologia do câncer, induzindo a transcrição de centenas de genes responsáveis pela adaptação celular ao ambiente pouco oxigenado (JUN *et al.*, 2017). Uma destas adaptações é o aumento de transportadores de glicose nas células (GLUT1 e GLUT3), o que garante uma maior captação de glicose pelas células e saldo energético favorável, mesmo por meio da respiração anaeróbia (DENKO, 2008; HARRIS, 2002).

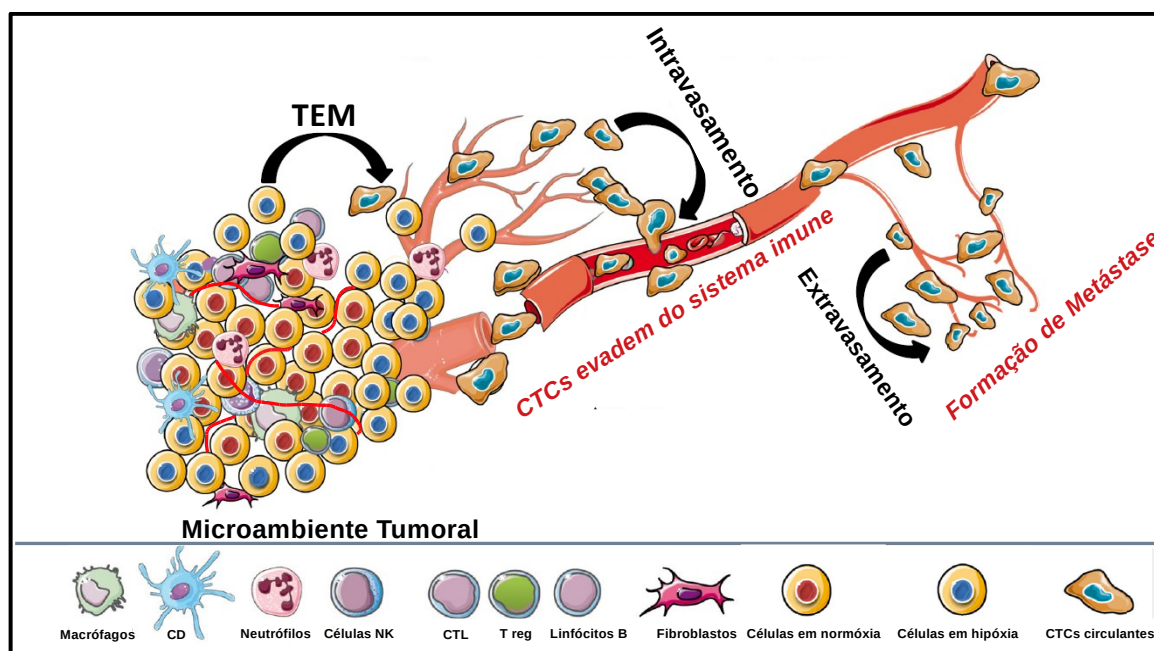
Todavia, mesmo com o restabelecimento da pressão parcial de oxigênio (normóxia), decorrente da angiogênese sustentada, algumas células cancerígenas tendem a manter seu metabolismo glicolítico. Isto ocorre porque alguns intermediários metabólicos do ciclo do ácido cítrico (como o citrato ou mesmo o ATP em altos níveis) podem inibir a entrada de glicose nas células ou etapas até sua transformação em piruvato (ALEXA-STRATULAT *et al.*, 2019; NELSON; COX, 2014). No caso do ATP e do citrato, ocorre uma inibição alostérica por meio da ligação dessas moléculas à enzima PFK-1, a qual é responsável pela transformação de glicose-6-fostato em frutose-6-fostato, etapa importante para a continuidade da glicólise (NELSON; COX, 2014).

Apesar de parecer ilógica a troca de um metabolismo mais rentável energeticamente, que tende a inibir a glicólise apenas em períodos com excesso de energia (ATP), deve-se considerar que os intermediários da glicólise são também cruciais na síntese de ácidos nucleicos, lipídeos, proteínas e demais moléculas

constitucionais, importantes na replicação constante das células neoplásicas (ALEXANDER-STRATULAT *et al.*, 2019).

Entretanto, a interação com o microambiente tumoral não se embasa apenas nas relações bioquímicas estabelecidas: alguns fatores celulares alteram o comportamento de outras classes celulares, como é o caso do HIF (fatores induzidos por hipóxia) e das células endoteliais, que são induzidas a vascularizarem regiões hipóxicas do câncer (COX; NELSON, 2014). O evento de vascularização, por sua vez, possibilita a invasão de células cancerígenas aos vasos linfáticos e sanguíneos, culminando na metástase (estágio mais avançado e de maior mortalidade do desenvolvimento do câncer) (**Figura 6**) (FIDDLER, 2002; CAVALLARO; CHRISTOFORI, 2004).

Figura 6 - Transição epitélio mesênquima e metástase



CD (Células dendríticas); CTL (Linfócitos T citotóxicos). Microambiente tumoral composto por células tumorais diferenciadas, células-tronco cancerígenas (CTCs), células do sistema imune, fibroblastos, células endoteliais e vasos sanguíneos. A partir da perda de adesão celular (devido à perda de interações célula-célula e célula-matriz), células tumorais sofrem o processo de transição epitélio-mesênquima (TEM), se despreendendo do tumor primário e invadindo vasos sanguíneos adjacentes (intravasamento). CTCs podem evadir do sistema imune e ao processo de *anoikis* (um tipo de morte celular), conseguindo chegar a tecidos distantes e iniciando a formação de um novo tumor (metástase) (NOMAN *et al.*, 2014). FONTE: NOMAN *et al.*, 2014

Observa-se, portanto, a incrível capacidade de adaptação e evolução constante das células cancerígenas, que possibilitam sua sobrevivência frente a condições consideradas inóspitas para células normais (STEEG, 2006). Entretanto, o ambiente de competição entre subclones leva a seleção de clones mais bem adaptados, o que repercute diretamente na resistência à terapia (MOHAMMAD; HE; YIN, 2018).

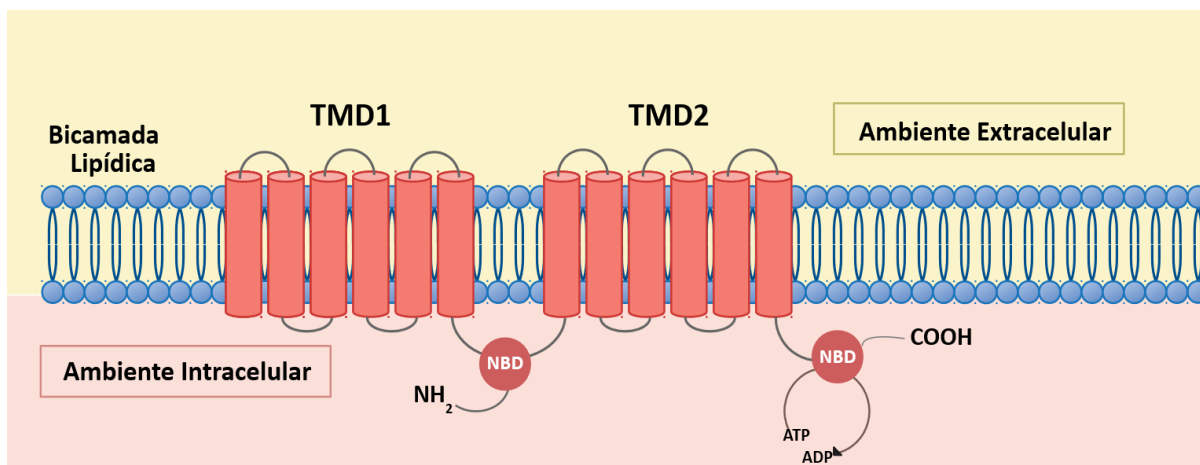
2.7 Transportadores ABC na quimiorresistência

Entre os diversos fatores que levam à resistência a múltiplas drogas (MDR – *multidrug resistance*), a superexpressão dos transportadores ABC (*ATP-binding-cassete*) é um dos mais relevantes e amplamente estudados (MOHAMMAD; HE; YIN, 2018).

Os transportadores ABC são constituintes de uma superfamília de proteínas transmembrana, com mais de 49 membros identificados em humanos. Tais membros são divididos em sete subfamílias, denominadas desde *ABCA* até *ABCG*, onde a *ABCC1/MRP1* se destaca como um dos membros mais relevantes para o estudo de inúmeros cânceres (MOHAMMAD; HE; YIN, 2018).

A superfamília ABC detém estruturas evolutivamente conservadas. Os membros desta superfamília são geralmente constituídos de duas porções transmembrana (com sítios de interação com substrato) e duas porções nucleotídicas, encontradas no citoplasma da célula (com sítio de ligação da ATP) (**Figura 7**) (HIGGINS, 1992; WU; HSIEH; WU, 2011).

Figura 7 – Estrutura típica dos transportadores ABC



Os transportadores ABC são geralmente compostos por dois domínios transmembrana, denominados TMD (domínios transmembrana, do inglês *transmembrane domain*) e dois domínios nucleotídicos, denominados NBD (do inglês, *nucleotide binding domain*). Os TMDs são responsáveis pela interação com diferentes substratos, incluindo drogas. Na maioria dos casos, os domínios TMD são formados por seis alças, que atravessam a membrana celular e se ligam a um domínio NBD, que por sua vez apresenta sítios de ligação a moléculas de ATP, cruciais para o funcionamento dos transportadores (HIGGINS, 1992; WU; HSIEH; WU, 2011; KATHAWALA *et al.*, 2015). FONTE: Do Autor.

A função dos ABC transportadores, está relacionada ao influxo e efluxo de diversos produtos intra e extracelulares, como: aminoácidos, vitaminas, açúcares, proteínas, lipídeos, esteróis e drogas (KATHAWALA *et al.*, 2015; MOHAMMAD; HE; YIN, 2018). Portanto, a superexpressão dos transportadores ABC está relacionada ao aumento do efluxo de drogas em células cancerígenas e, portanto, com a falha terapêutica (MOHAMMAD; HE; YIN, 2018).

Estudos realizados em pacientes portadores de CPCNP mostram uma elevada expressão dos transportadores *ABCC1*/MRP1 (NOOTER *et al.*, 1996; PENG; FENG; ZHANG, 1999) sobretudo em pacientes com fenótipo tumoral mais diferenciado (NOOTER *et al.*, 1996) e adenocarcinoma (SUGAWARA *et al.*, 1995). Outro membro importante no CPCNP são os transportadores *ABCC3*/MRP3, uma das isoformas mais expressas em pacientes quimio-resistentes (ZHAO *et al.*, 2013).

2.8 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e drogas antioxidantes

Um outro aspecto celular importante para as interações no microambiente neoplásico e desenvolvimento de alvos e estratégias terapêuticas são as espécies reativas de oxigênio (EROS), ou ROS (do inglês, *reactive oxygen species*)

(PERILLO *et al.*, 2020).

ROS é a denominação utilizada para descrever uma série de moléculas e radicais livres derivadas do oxigênio (TURRENS, 2003) e naturalmente geradas no metabolismo energético das células (BEDARD; KRAUSE, 2007). Este processo ocorre majoritariamente nas mitocôndrias, principalmente pelas enzimas NADPH oxidase, mais conhecidas como NOX e durante a fosforilação oxidativa (GLASAUER; CHANDIL, 2014).

As ROS mais comuns são os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxil ($\cdot OH$), peroxil (RO_2^{\cdot}), e, o não radical, peróxido de hidrogênio (H_2O_2), os quais podem interagir com inúmeras biomoléculas dentro da célula (BEDARD; KRAUSE, 2007).

A interação das ROS com o DNA pode acarretar no aumento de mutações, bem como alterar seu perfil de metilação (PERILLO *et al.*, 2020; WU; NI, 2015). Além disso, no âmbito pós-traducional, essas moléculas oxidativas podem gerar alterações conformacionais e funcionais de componentes importantes para a homeostasia do ambiente celular (GLASAUER; CHANDIL, 2014; PERILLO *et al.*, 2020).

Atualmente tem sido reportado que as ROS atuam em inúmeras vias de sinalização, contribuindo com todas as etapas da carcinogênese (GLASAUER; CHANDIL, 2014; TONG *et al.*, 2015; PERILLO *et al.*, 2020).

Em condições normais, a produção de ROS corresponde a apenas 2-5% de todo o O_2 consumido pelas células (LOPACZYNSKI; ZEISEL, 2001) e sua produção é rapidamente balanceada com seu consumo (ou transformação em espécies menos reativas) por enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, glutathione catalase e peroxidase) e outros antioxidantes endógenos (glutathione, vitamina E, vitamina C, caroteno, coenzima Q, entre outros) (ZIECH *et al.*, 2010). Os efeitos deletérios das ROS são observados quando ocorre um desbalanço da dinâmica de produção e consumo (ANDREYEV; KUSHNAREVA; STARKOV, 2005).

Embora as espécies reativas de oxigênio estejam associadas à promoção do fenótipo cancerígeno, altas concentrações de ROS demonstram ser

mediadores dos processos de senescência e de apoptose das células neoplásicas, sendo o último evento através de vias como *ASK1/JNK/P38/MAPK*, que respondem aos altos níveis de estresse oxidativo (GLASAUER; CHANDIL, 2014).

Tais efeitos, aparentemente ambíguos das ROS, também refletem nos tratamentos utilizando agentes antioxidante. Alguns trabalhos demonstram que agentes antioxidantes provocam uma diminuição da progressão tumoral, metástase e autofagia, assim como podem diminuir a toxicidade de alguns tratamentos (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004; TARLOVSKY, 2012; TONG *et al.*, 2015). Contrariamente, outras pesquisas sugerem que estes agentes antioxidantes possuem papel essencial no desenvolvimento e progressão tumoral (PERILLO *et al.*, 2020, WIEL *et al.*, 2019).

Em uma destas pesquisas, WIEL e colaboradores (2019) demonstraram que: a suplementação contínua dos antioxidantes N-acetilcisteína e vitamina E, em camundongos com câncer de pulmão mutados para o gene *KRAS*, induzia a metástase (WIEL *et al.*, 2019). Sendo assim, observa-se que os efeitos das espécies reativas de oxigênio e agentes antioxidantes no câncer permanecem não esclarecidos.

Neste contexto, explorar os efeitos de agentes antioxidantes em células neoplásicas podem se mostrar importantes aliados na compreensão do papel da dinâmica de ROS na manutenção da doença e explorar as possíveis utilizações destes agentes no desenvolvimento de terapias anticâncer.

2.9 *Agave sisalana* Perrine

O uso de plantas com fins medicinais data de aproximadamente 1.500 anos a.C, tendo sido importante no desenvolvimento e sobrevivência de inúmeros povos no decorrer da história humana (DUARTE, 2006; DUTRA *et al.*, 2016).

Já nos dias atuais, a exploração das espécies vegetais se dá principalmente através da bioprospecção de moléculas com potenciais terapêuticos (DUARTE, 2006), as quais podem originar princípios ativos, adjuvantes ou excipientes de novos fármacos e vacinas (BALBANI; STELZER; MONTOVANI, 2006).

A vasta biodiversidade de espécies vegetais presentes no Brasil faz

do país um importante alvo para a bioprospecção de novas moléculas com potencial antineoplásico (DUTRA *et al.*, 2016). Isto porque, cerca de 60% dos quimioterápicos disponíveis no mercado são derivados de moléculas extraídas de plantas (DUTRA *et al.*, 2016). Entre as inúmeras espécies presentes no país, a *Agave sisalana* Perrine tem se mostrado uma notável fonte de prospecção, com diversos trabalhos demonstrando seus interessantes efeitos terapêuticos (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Efeitos biológicos das saponinas

EFEITO BIOLÓGICO	ORIGEM	REFERÊNCIA
Citotóxico/Antineoplásico	<i>Agave sisalana</i>	(ARALDI <i>et al.</i> , 2018)
		(DE OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2019)
		(FAVATO, 2020, no prelo)
		(PAULINO, 2019, no prelo)
	<i>Agave lechuguilla</i>	(ANGUIANO-SEVILLA <i>et al.</i> , 2018))
Anti-inflamatório e analgésico	<i>Agave sisalana</i>	(DUNDER <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Agave sisalana</i>	(MWALE; J. MASIKA; FRANCIS, 2012)
Antioxidante	<i>Agave sisalana</i>	(RIBEIRO <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Tribulus terrestris</i>	(FIGUEIREDO, 2018)
Imunomodulador	<i>Agave sisalana</i>	(CHEN <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Agave salmiana</i>	(MORENO-VILET <i>et al.</i> , 2014)
Adjuvante	<i>Agave sisalana</i>	(ARALDI <i>et al.</i> , 2017)

Na tabela podem ser observados efeitos biológicos diversos das saponinas, presentes em diferentes fontes vegetais. Nota-se que as saponinas relacionadas aos extratos da *Agave sisalana*, demonstram potencial para todos os efeitos listados.

A *Agave sisalana* Perrine, popularmente conhecida como sisal, é uma planta amplamente utilizada na produção de cordas e barbantes, obtidas a partir da fibra extraída de suas folhas (ZHANG; LIU; LIN, 2014). Proveniente da região de Yucatán, no México, o sisal foi introduzido no Brasil e demonstrou boa adaptação ao clima semiárido da região nordeste, ganhando rápida importância econômica na

região, especialmente no estado da Bahia (SANTOS; SILVA, 2017).

Em termos de composição, a fibra da *A. sisalana* corresponde a aproximadamente 5% de toda a biomassa da planta, sendo o restante considerado subproduto da indústria do sisal (OASHI, 1999; SANTOS *et al.*, 2009). Nos últimos anos, este subproduto tem demonstrado propriedades interessantes na área farmacológica, sendo elas: anti-helmínticas (BOTURA *et al.*, 2013), anti-inflamatórias, analgésicas (DUNDER *et al.*, 2010; MWALE; J. MASIKA; FRANCIS, 2012) imunomoduladoras (CHEN *et al.*, 2011) e antineoplásicas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Os resíduos de sisal são compostos principalmente por saponinas esteroidais, que parecem ser os principais responsáveis pelos efeitos farmacológicos observados (ver **Tabela 1**) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). Além disso, compostos como flavonas e homo-isoflavonóides (CHEN *et al.*, 2011), polissacarídeos variados (ZHANG; LIU; LIN, 2014), pectina, manitol e ácido succínico, também podem ser extraídos dos resíduos da *A. sisalana* (SANTOS *et al.*, 2015).

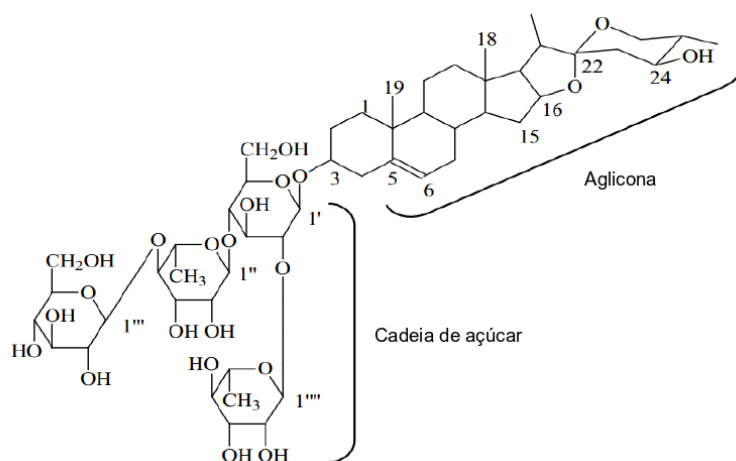
Os extratos de sisal podem ser obtidos de diferentes maneiras, sendo algumas delas: hidrólise ácida (EHAAS), extração com hexano (EH), extração com etanol (EE) e precipitação a seco (EPS) (ARALDI *et al.*, 2018; LUO *et al.*, 2019). Em estudo realizado por ARALDI, *et al.* (2018), avaliando os potenciais citotóxicos, mutagênicos e antioxidantes de três extratos de *A. sisalana* (EHAAS, EH e EPS) em células Vero (rim de macaco verde africano), demonstrou-se que o EHAAS apresenta resultados que sugerem seu maior potencial como um possível antineoplásico (ARALDI *et al.*, 2018).

O EHAAS é obtido conforme descrito por Araldi *et al.* (2018) a partir do aquecimento do suco do sisal e posterior hidrólise com ácido sulfúrico. Em seguida o suco é levado à centrifugação para obtenção do precipitado, que é então filtrado e liofilizado, gerando o produto final, cuja concentração de saponinas beira 90% da massa total do extrato (ARALDI *et al.*, 2018).

As saponinas são glicosídeos presentes em várias espécies de plantas, constituídas por uma porção aglicona (ou sapogenina) e uma porção de

açúcar. A variação de aglicona determina os dois grupos de saponinas existentes: esteroidal e triterpenóides (mais comum) (**Figura 8**) (FRANCIS *et al.*, 2002). A palavra saponina deriva de *soap* (sabão) e a molécula é caracterizada por sua estrutura anfipática, contendo uma porção apolar (aglicona) e outra polar (açúcar), que dá a esse glicosídeo características de detergente e/ou surfactante, proporcionando uma interação especialmente boa com estruturas lipídicas, como as membranas celulares (FRANCIS *et al.*, 2002; SAVAGE, 2003).

Figura 8 - Estutura básica das saponinas



Estutura básica das saponinas, marcadas por uma cadeia de açúcar hidrossolúvel e uma porção hidrofóbica denominada aglicona ou sapogenina. FONTE: MOGHIMIPOUR; HANDALI, 2015.

As interações dadas pelos mais diferentes tipos de saponinas (esteroidais e triterpenóides) possibilitam efeitos biológicos variados para inúmeros tratamentos observados na **Tabela 1** (acima).

3 JUSTIFICATIVA

Dentre os mais variados tipos de câncer, o câncer de pulmão se destaca devido a sua altíssima incidência e mortalidade, bem como por apresentar perspectivas futuras bastante desanimadoras.

Dentre os diferentes tipos histológicos da doença, o câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP) é o mais prevalente entre fumantes e não fumantes. A baixa sobrevida da doença está fortemente associada à baixa eficácia dos tratamentos atuais.

Grande parte dos produtos farmacêuticos atualmente disponíveis são derivados de moléculas extraídas de espécies vegetais. Desta forma, a prospecção de fitoquímicos se mostram importantes para o desenvolvimento de possíveis novas fontes terapêuticas. O extrato de hidrólise ácida da *A. sisalana* (EHAAS) tem demonstrado inúmeras propriedades, incluindo atividade citotóxicas e antineoplásicas. Sendo que tais propriedades têm sido associadas às suas características antioxidantes. Deste modo, o EHAAS se apresenta como um interessante objeto de estudo quanto a seus efeitos citotóxicos em células neoplásicas, em especial em CPCNP, que ainda protagonizam inúmeros desafios terapêuticos no tratamento da doença.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar de forma comparativa a atividade citotóxica do extrato de hidrólise ácida da *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) e da ciclofosfamida em duas linhagens de CPCNP (A549 e NCI-H460) com mutações no gene *KRAS* e em linhagem sadia de fibroblasto de pulmão (MRC-5).

4.2 Objetivos específicos

1. Analisar os efeitos do extrato de hidrólise ácida de *A. sisalana* (EHAAS) sobre a viabilidade celular em diferentes concentrações e ciclofosfamida (CP) nas linhagens celulares de CPCNP (A549 e NCI-H460) e controle (MRC-5).
 - **Estratégias:** investigar a viabilidade celular e vias de morte celular a partir da técnica de citometria de fluxo utilizando o ensaio de anexina V/IP (iodeto de propídio) após tratamento (24 horas) com o extrato nas concentrações de: 400, 200, 100, 75, 50 e 25 µg/mL e a droga ciclofosfamida (CP) na concentração de 100 µg/mL.
2. Avaliar os efeitos do extrato (EHAAS) e CP sobre o estresse metabólico das células, em linhagens neoplásicas (A549 e NCI-H460) e controle (MRC-5).
 - **Estratégias:** analisar, por meio da técnica de citometria de fluxo, os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes nas células pós tratamento (24 horas) com o extrato (400 µg/mL a 25 µg/mL) e CP 100 µg/mL a partir do ensaio de DCFH-DA (2',7'- *Dichlorofluorescein Diacetate*) e investigar alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizando a sonda MitoTracker® *Deep Red* FM.
3. Investigar os efeitos genotóxicos de extrato (EHAAS) e CP sobre as linhagens cancerígenas (A549 e NCI-H460) e controle (MRC-5).
 - **Estratégia:** Avaliar os níveis de clastogenicidade, por meio da técnica de citometria de fluxo, a expressão histona γ -H2AX (histona H2AX Ser139).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Saúde (G004), localizado na Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA – Foz do Iguaçu) em parceria com o Laboratório bases Genéticas dos Tumores da Tireoide da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP - São Paulo) e Laboratório de Genética, Biologia Molecular e Mutagenese da Faculdade de Ciências e Letras de Assis da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP- Campus Assis).

Por se tratar de um patrimônio genético nacional, a utilização do extrato de hidrólise ácida, provindo da planta *Agave sisalana* Perrine foi registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), no processo de número A177E74 (**Anexo A** - abaixo).

5.2 Obtenção do extrato de *Agave sisalana* Perrine

O extrato da hidrólise ácida de *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) foi gentilmente fornecido pela Profa. Dra. Edislane Barreiros de Souza (UNESP-FCLA).

Para a manutenção das propriedades fitoquímicas do EHAAS, o extrato foi enviado liofilizado e protegido da luz. No laboratório, o extrato foi ressuspenso em PBS 1X estéril na concentração estoque de 20 mg/mL e armazenado em tubos de polipropileno de 2 mL (Sarstedt®, Alemanha) a -80°C. Para a execução dos experimentos, a solução estoque (20 mg/mL) foi inicialmente diluída à concentração de 2 mg/mL em meio de cultivo celular RPMI 1640 (Gibco™, EUA) com HEPES (Vitrocell®, Brasil) ou em meio de cultivo α MEM (Vitrocell®, Brasil), de acordo com as especificações de cada linhagem (ver mais adiante). Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino - SFB (Vitrocell®, Brasil) e 1% da solução de penicilina/estreptomicina (100 U/ml) (Sigma-Aldrich®, Alemanha). Por fim, diluições seriadas de 400, 200, 100, 75, 50 e 25 μ g/ml da solução pré-diluída de 2 mg/mL de EHAAS foram realizadas e aplicadas nas culturas de linhagens celulares de CPCNP e normal, seguindo os protocolos descritos por Araldi *et al.* (2018).

5.3 Cultura de células e aplicação da droga

5.3.1. Sobre as linhagens celulares utilizadas

As linhagens celulares A549, NCI-H460 e MRC-5 foram cordialmente doadas pelo Prof. Dr. Sergio Bydlowski - laboratório LIM51 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). A identidade genética destas linhagens foi confirmada por meio de *Short tandem repeat* (STR).

Para este estudo, foram utilizadas duas linhagens de CPCNP (A549 e NCI-H460), já que estas linhagens possuem perfis mutacionais distintos, mas compartilham mutações no gene *KRAS*, conforme dados do banco de dados Expasy e ATCC® (**Tabela 2**).

Tabela 2 - Linhagens de pulmão, suas origens e mutações frequentes

LINHAGENS		DOENÇA	MUTAÇÕES FREQUENTES
A549 171™	ATCC® CCL-	Carcinoma humano, derivado de câncer de pulmão de células não pequenas (CPCNP). Adenocarcinoma	<i>KRAS</i> <i>STK11</i> <i>CDKN2A</i>
NCI-H460 177™	ATCC® HTB-	Carcinoma humano derivados de derrame pleural. Carcinoma de pulmão de células grandes.	<i>KRAS</i> <i>PIK3CA</i> <i>STK11</i> <i>CDKN2A</i>
MRC-5 171™	ATCC® CCL-	Célula normal, derivada de tecido pulmonar fetal humano (14 semanas de gestação).	Célula normal

Fonte: ATCC®; Expasy, 2020.

No momento da aplicação do EHAAS, as linhagens A549, NCI-H460 e MRC-5 se encontravam nas passagens 108, 100 e 5, respectivamente. Os perfis mutacionais das linhagens podem ser observados na **Tabela 2** (acima). As mutações apresentadas são baseadas nas mutações mais frequentemente observadas na literatura, para as dadas linhagens.

5.3.2. Cultura celular

Para a manutenção das condições assépticas, todos os materiais utilizados para a cultura celular foram devidamente esterilizados e manipulados em cabines de fluxo laminar. As linhagens celulares A549, NCI-H460 e MRC-5 foram inicialmente expandidas em frascos de cultura de 25 cm² (KASVI®, Brasil) ou placas de cultura de 150 mm x 25 mm (CORNING®, EUA) com densidades de semeio de 0,5 x 10⁶ células/cm² e 2 x 10⁶ células/cm², respectivamente. As células foram mantidas em cultivo celular até atingirem 70% de confluência, com os meios de cultivo sendo trocados sempre que necessário. Os meios basais de crescimento para cada linhagem e suas condições de cultura estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Linhagens de pulmão e suas respectivas condições de crescimento

Linhagens		Meio de crescimento basal			Condições de crescimento
A549	ATCC®	CCL-	Meio RPMI 1640 (Gibco™, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina 100 U/ml com estreptomicina 100 µg/ml (Sigma-Aldrich®, Alemanha).		As células cresceram em incubadoras de CO ₂ HF212UV (Heal Force, CHN) em atmosfera de 5% a de 37 °C.
171™					
NCI-H460	ATCC®	HTB-			
177™					

Continua

Continuação

Linhagens	Meio de crescimento basal	Condições de crescimento
MRC-5 ATCC® CCL-171™	Meio α MEM (Vitrocell®, Brasil), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina 100 U/ml com	*

* Foram empregadas as mesmas condições de cultivo descritas nas demais linhagens

Alíquotas de cada umas das linhagens foram crio-preservadas em *freezer* de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ em criotubos estéreis de 1,5 mL (CORNING®, EUA) a fim de manter o biobanco de células. Para isso, as células foram congeladas a uma densidade de 1×10^5 células/mL em meio de congelamento (20% SFB, 10% dimetilsufóxido (DMSO) e 70% de meio de cultivo).

5.3.3. Desagregação da monocamada e plaqueamento

Atingidos 70% de confluência celular, os meios de cultivo das placas e frascos foram retirados e as células foram lavadas duas vezes com 1 mL (frascos) a 2 mL (placas) de solução salina tamponada de fosfato (PBS 1x) feita *in house* (**Tabela 4**). As lavagens se fazem necessárias por extraírem resquícios de SFB, que podem interferir na ação da solução de Tripsina/EDTA. A solução de Tripsina/EDTA, por sua vez, é responsável pela desagregação enzimática da monocamada celular, a qual deixa de se aderir ao plástico (poliestireno).

Tabela 4 – Composição PBS 1x feito *in house*

SOLUÇÃO	DESCRIÇÃO
PBS 1x	<ul style="list-style-type: none"> • 800 mL de água destilada • NaCl: 8 g (0.137 M) • KCl: 200 g (0.0027 M) • Na₂HPO₄: 1.44 g (0.01 M) • KH₂PO₄: 240 mg (0.0018 M) • Completar para 1L com água destilada

Para a desagregação foram utilizadas quantidades de 1 mL (frascos) a 2 mL (placas) da solução de Tripsina/EDTA (Vitrocell®, Brasil), deixando-a agir por aproximadamente 3 minutos em estufa a 37 °C. Ao observar-se a total desagregação das células em microscópio óptico invertido, a solução de Tripsina/EDTA (Vitrocell®, Brasil) foi inativada com meio basal de crescimento (sob a mesma proporção de tripsina utilizada), não transpassando o período de 5 minutos de contato entre a solução de Tripsina/EDTA (Vitrocell®, Brasil) e as células.

Estando em suspensão, as células foram coletadas e transferidas para tubos de polipropileno de 15 mL (KASVI®, Brasil) e levadas à centrifugação por 5 minutos a 1.200 rpm (257 x g). Ao fim da centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o *pellet* celular foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultivo. Então, uma alíquota de 10 µL da suspensão homogeneizada de células foi retirada e transferida para um tubo de polipropileno de 500 µL (Sarstedt®, Alemanha), contendo 10 µL do corante azul de tripan (Invitrogen™, EUA). A solução de células e corante foi homogeneizada com o auxílio de uma micropipeta e 10 µL da solução foi disposta sobre uma câmara de Neubauer espelhada, a fim de estimar a quantidade total e viabilidade das células (ver cálculo em **Figura 9**).

Figura 9 – Cálculo de número de células em câmara de Neubauer

$$\text{Nº células/mL} = \frac{\text{Nº células contadas} * \text{Fator de diluição} * 10^4}{\text{Nº de quadrantes}}$$

Para as subculturas, foram utilizadas placas de cultivo de 60 mm (KASVI®, Brasil) e placas de cultivo de 6 poços (Sarstedt®, Alemanha). Densidades de 3×10^5 células/mL (MRC-5) e 1×10^5 células/mL (A549 e NCI-H460) foram semeadas nas placas de 60 mm (KASVI®, BRASIL) e $0,5 \times 10^4$ células/mL (A549 e NCI-H460) e 3×10^4 células/mL (MRC-5) em cada poço da placa de 6 poços (Sarstedt®, Alemanha). As variações de quantidade de células semeadas entre os tipos de placas se devem às superfícies de crescimento, enquanto a variação de semeio entre as linhagens celulares se deve ao maior tempo de dobramento populacional (*doubling time*) da linhagem controle MRC-5.

5.3.4. Aplicação do EHAAS e determinação dos controles

As subculturas foram mantidas em cultivo, sob as condições descritas na **Tabela 3**, até atingirem a confluência de 70%. Neste ponto o meio das placas foi retirado e as células receberam os tratamentos com o EHAAS. Para isso, foram preparadas diluições de 400, 200, 100, 75, 50 e 25 µg/mL do extrato em meio de cultivo basal. As concentrações aplicadas foram escolhidas com base em estudos anteriores, que sugerem esta faixa de concentração como as mais relevantes (ARALDI *et al.*, 2018). Além do EHAAS, a droga ciclofosfamida (CP) (Sigma-Aldrich®, Alemanha) também foi testada, a fim de comparar os efeitos entre uma droga licenciada, comumente utilizada em terapias anticâncer e conhecidamente genotóxica, frente a um novo extrato sob investigação (MURATA *et al.*, 2004; POVIRK; SHUKER, 1994; REHMAN *et al.*, 2012; SZADVARI; KRIZANOVA; BABULA, 2016). A concentração estipulada para a CP foi de 100 µg/mL, baseado em valores preconizados em estudo anteriores (ARALDI *et al.*, 2015, 2018; KRAUS-BERTHIER *et al.*, 2000; REHMAN *et al.*, 2012). Todos os ensaios contaram com uma amostra controle, sem aplicação de droga, denominada controle negativo (C-). O tempo de

incubação para todos os ensaios foi de 24 horas.

5.4 Avaliação da citotoxicidade celular

5.4.1. Ensaio de anexina V/IP

O ensaio de Anexina V/IP é um método robusto de análise de viabilidade celular, o qual permite determinar o percentual de células vivas, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose.

O princípio da técnica se baseia principalmente na morte celular por apoptose, onde os resíduos do componente fosfolipídico fosfatidilserina, encontrados normalmente na face citosólica da membrana celular, são expostos para a face extracelular. A exposição da fosfatidilserina, por sua vez, possibilita a ligação por alta afinidade da proteína celular Anexina V, a qual pode ser identificada na citometria de fluxo graças à sua conjugação com o fluoróforo isocianato de fluoresceína (FITC) (PALMA *et al.*, 2008). Para identificar células vivas, necróticas e em apoptose, a Anexina V é utilizada junto ao iodeto de propídio (IP), um intercalante de DNA fluorescente que permeia apenas células com suas membranas celulares danificadas.

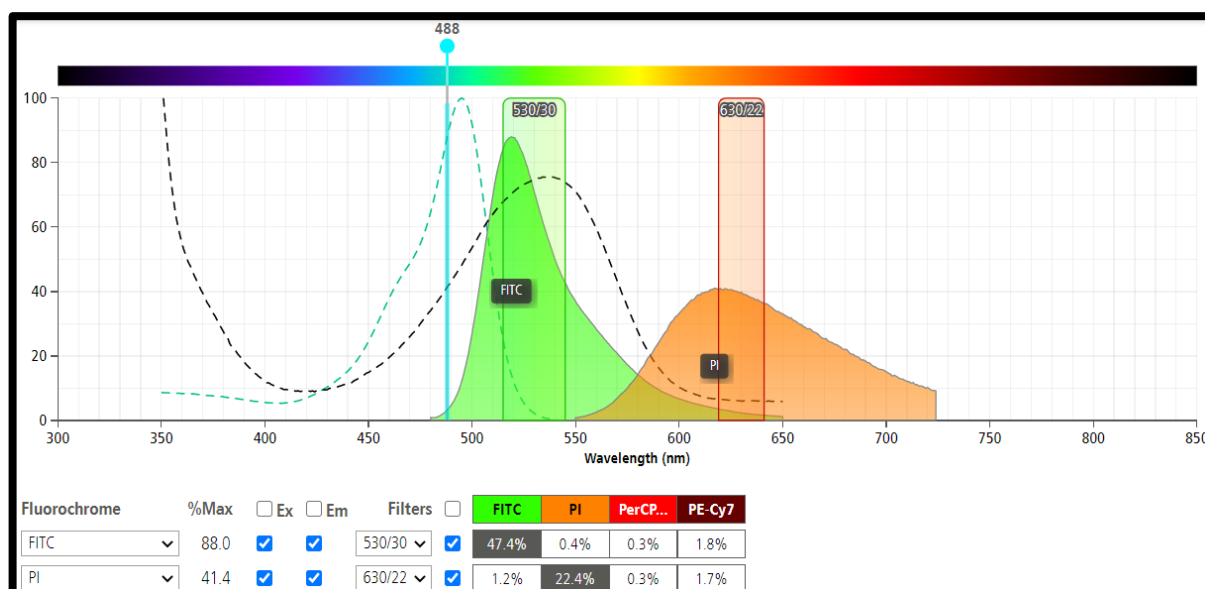
Desta forma, células viáveis, com suas membranas celulares intactas e sem estímulos apoptóticos, não apresentam marcação para nenhum dos agentes fluorescentes (Anexina V⁻/IP⁻). Células em apoptose inicial apresentam marcação apenas para Anexina V, por sua integridade na membrana, mas presente exposição da fosfatidilserina (Anexina V⁺/IP⁻). Células em apoptose tardia apresentam duas marcações: (1) Anexina, considerando a exposição dos resíduos de fosfatidilserina e (2) IP, pelo estágio avançado comprometer a integridade da membrana, o que permite a entrada do IP (Anexina V⁺/IP⁺). Por último, as células em necrose, por não externalizarem a fosfatidilserina, não apresentam marcação para Anexina, mas por apresentarem danos à membrana celular, são marcadas para com o IP (Anexina V⁻/IP⁺).

As células para o ensaio foram cultivadas em placas de cultivo de 6 poços (Sarstedt®, Alemanha) até atingirem 70% de confluência e tratadas com EHAAS (25 a 400 µg/mL) e CP a 100 µg/mL (**seção 5.3.3** acima). Ao fim do período

de incubação (24 horas), o meio de cultivo das células foi recolhido em tubos de polipropileno de 15 mL (Sarstedt®). A coleta do meio de cultivo se faz necessária para que não se excluam células mortas em suspensão. Os poços foram tripsinizados e as células desagregadas foram transferidas para os tubos contendo os meios coletados anteriormente. Após a coleta das células, foram acrescentados 5 µL de Anexina V-FITC e 1 µL de IP (Invitrogen™, EUA) em 100 µL de tampão de ligação, seguindo as recomendações do fabricante do Kit (Molecular Probes®, EUA). As células foram incubadas por 15 minutos a 37°C e 5% de CO₂, protegidas da luz. Transcorrido esse tempo, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1.200 rpm (257 x g). O *pellet* obtido foi homogeneizado em 300 µL de PBS 1x com o auxílio de uma micropipeta.

As células foram então analisadas no citômetro de fluxo BD Accuri (BD Bioscience, EUA) em triplicatas de 10.000 eventos cada. Foram empregados os filtros FL1 (533 ±15 nm) para quantificar a Anexina V-FITC e FL4 (675 ±12.5 nm) para a quantificação do IP. Os resultados foram analisados no software *Accuri* (BD Bioscience, EUA) por *density plot*, sendo realizada sua devida compensação *multicolor* em razão da sobreposição espectral do fluorocromo FITC com o IP, conforme mostrado na **Figura 10**.

Figura 10 – Sobreposição espectral dos fluorocromos FITC e IP



FONTE: BD Biosciences.

As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste paramétrico ANOVA *One Way*, seguido do teste *post hoc* de Tukey, ambos com nível de significância de 5%, através do *software GraphPad 5 Prism* (GraphPad Software®, EUA). Para avaliar a viabilidade celular, foram realizadas médias aritméticas das triplicatas experimentais, utilizando-se o número de células vivas.

5.5 Avaliação do estresse metabólico celular

5.5.1. Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) é elemento chave do metabolismo energético e emprega importante papel sobre a viabilidade celular. A geração de energia na organela acontece através da passagem de elétrons pela cadeia transportadora de elétrons, composta por quatro complexos proteicos, onde a passagem de energia através dos complexos I, III e IV provoca o bombeamento de prótons H^+ para a porção externa da matriz mitocondrial (NELSON; COX, 2014).

A formação do gradiente de prótons entre as porções internas e externas da membrana leva à geração de energia próton-motriz, separada em energia potencial química e energia potencial elétrica (NELSON; COX, 2014). O $\Delta\Psi_m$ é a diferença transmembrana do potencial elétrico, medida em volts (NELSON; COX, 2014). Esta energia acumulada mantém a membrana mitocondrial com uma carga altamente negativa, o que possibilita o sequestro de estruturas catiônicas (NELSON; COX, 2014; POOT *et al.*, 1996).

Quando a membrana mitocondrial é depletada em situações de estresse oxidativo, indução de apoptose ou alguma alteração funcional, o $\Delta\Psi_m$ tende a diminuir, o que influi diretamente em sua carga e capacidade de se ligar a cátions (POOT *et al.*, 1996; ZOROVA *et al.*, 2018).

Para avaliar o potencial de membrana mitocondrial, sondas com fluoróforos catiônicos podem ser utilizadas, uma vez que são sequestradas e acumuladas de forma específica e permanente na matriz mitocondrial (POOT *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 2019). A exemplo disto, a sonda MitoTracker® *Deep Red* permite analisar células com o $\Delta\Psi_m$ ativo, através da fluorescência emitida pela sua marcação

(FRICK et al., 2015). A quantificação da fluorescência pode ser avaliada pela técnica de citometria de fluxo (VIZLER; GLAVINAS, 2002).

No ensaio de $\Delta\Psi_m$, as células foram cultivadas em placas de 6 poços (Sarstedt®, Alemanha) e tratadas com o EHAAS nas concentrações de 400 a 25 $\mu\text{g/mL}$ e CP a 100 $\mu\text{g/mL}$ (**seção 5.3.3** acima). Após o período de incubação de 24 horas dos tratamentos, os meios de cultivo foram descartados e foram adicionados aos poços 2 mL de meio basal com 500 nM da sonda MitoTracker® *Deep Red* (Invitrogen®, USA), diluída previamente em solução estoque de 1mM de DMSO (Synth®, Brasil). As células foram incubadas com as sondas a 37°C e 5% de CO_2 por 40 minutos, em ausência de luz. Passado esse período, o meio com a sonda foi descartado e a monocamada celular foi desagregada com 300 μL de solução Tripsina-EDTA (Vitrocell®, Brasil). Adicionou-se 1mL de meio de crescimento basal aos poços e a suspensão celular foi coletada e transferida a tubos de polipropileno de 1,5 mL (Sarstedt®, Alemanha). Nos tubos, as células foram centrifugadas a 1.200 rpm (257 x g) por 5 minutos, descartando-se posteriormente o sobrenadante. Por fim, o *pellet* foi ressuspensão e homogeneizado com 300 μL de PBS 1x e as células foram analisadas no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Bioscience, EUA). No citômetro, as células foram analisadas em triplicatas, contabilizando 10.000 eventos em cada passagem. Foi empregando o filtro FL4, na faixa de 675 ± 12.5 nm. Os resultados foram analisados no *software* FlowJo™ versão V10 (TreeStar®, EUA), por meio de histogramas relacionando o número de células na amostra que fluoresceram para a sonda (devido ao seu $\Delta\Psi_m$ ativo).

As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste não-paramétrico Kruskal-Wallis, seguido do teste *post hoc* de Dunn, ambos com nível de significância de 5%, através do *software* GraphPad 5 Prism (GraphPad Software®, EUA)

5.5.2. Análise de produção de ROS por meio da sonda DCFH-DA

Buscando compreender a ação do EHAAS nos níveis de ROS em células de CPCNP e controle, as espécies reativas de oxigênio foram quantificadas através do ensaio de diacetato de dicloro-diidro-fluoresceína (DCFH-DA). Neste

ensaio, a sonda DCFH-DA reage em contato com as ROS presentes nas células, sendo oxidada e transformada em uma molécula fluorescente (DCF) (KALYANARAMAN *et al.*, 2012), a qual pode ser quantificada através de técnicas de citometria de fluxo.

Para o ensaio da DCFH-DA, a linhagem controle (MRC-5) e as linhagens de neoplásicas (A549 e NCI-H460) foram cultivadas em placas de cultura celular de 6 poços (Sarstedt®, Alemanha) e tratadas com CP a 100 µg/mL e EHAAS em concentrações de 400 a 25 µg/mL, como descrito na **seção 5.3.3** (acima). Ao transcorrer o período de 24 horas de incubação, o meio de cultura dos poços foi descartado e adicionou-se 1 mL de meio basal com 100 µM da sonda DCFH-DA (Sigma-Aldrich®, Alemanha). As placas foram então incubadas por 40 minutos a 37°C e 5% de CO₂, ao abrigo da luz. Em seguida o meio foi removido e a monocamada celular foi desagregada através da adição de 300 µL da solução de Tripsina-EDTA (Vitrocell®, Brasil).

As células de cada poço foram coletadas em 1 mL de meio basal e transferidas para tubos de polipropileno de 1,5 mL (Sarstedt®). Nos tubos, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1.200 rpm (257 x g). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuspendido e homogeneizado com 300 µL de PBS 1x. O material foi analisado no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD Bioscience, EUA), em triplicatas contabilizando 10.000 eventos em cada passagem. Foi empregando o filtro FL1 na faixa de 533 ±15 nm. Os resultados foram analisados por meio do *software* FlowJo™ versão V10 (TreeStar®, EUA), em histogramas que relacionam o número de células que fluoresceram com a sonda.

As análises estatísticas foram realizadas através do teste paramétrico ANOVA *one way* seguido do teste *post hoc* de Tukey, ambos com nível de significância de 5%, por meio do *software* GraphPad 5 Prism (GraphPad Software®, EUA).

5.6 Avaliação do potencial genotóxico do extrato

5.6.1. Ensaio de histona γ -H2AX

Em células eucariotas, danos que induzem quebras de dupla fita do DNA, conhecidas como DSBs (do inglês, *double strand breaks*), levam ao recrutamento de inúmeras moléculas relacionadas ao reparo do material genético danificado. Um dos passos iniciais e mais rápidos desse recrutamento (que ocorre de 1 a 3 minutos após o dano) é a fosforilação da histona H2AX no resíduo Ser 139, passando a se chamar histona γ -H2AX. Por ser uma modificação rápida, extremamente abundante e com alta correlação aos níveis de danos no DNA, o emprego de imunomarcacão da histona γ -H2AX é considerado o método mais sensível para averiguar os níveis de clastogenicidade celular produzidos por DSBs – danos mais graves de mais difícil reparo (COX; DOUDNA; O'DONNELL, 2012; SHARMA; SINGH; ALMASAN, 2012).

Para compreender o potencial clastogênico, a fim de determinar o potencial genotóxico do EHAAS, o ensaio de histona γ -H2AX foi realizado nas duas linhagens neoplásicas (A549 e NCI-H460) e na linhagem controle (MRC-5), aplicando o EHAAS nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, além do tratamento com CP a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Sigma-Aldrich®, Alemanha) e controle negativo (sem tratamento). As imunorreacções foram realizadas através de marcação indireta, utilizando um anticorpo primário anti- γ -H2AX feito em coelho (*rabbit*) (Novus *Biologicals*®, EUA) e um anticorpo secundário anti IgG de coelho (anti-*rabbit*-IgG) conjugado com FITC (Sigma-Aldrich®, Alemanha), feito em cabra (*goat*).

As linhagens celulares foram cultivadas e tratadas sob as mesmas condições descritas anteriormente (**seção 5.3** - acima). Após o tempo de 24 horas da aplicação dos tratamentos, o meio de cultivo foi descartado e as células foram desagregadas com 300 μL de solução de Tripsina-EDTA (Vitrocell®, Brasil). Ao fim da tripsinização, as células foram coletadas em 1 mL de meio basal e transferidas para tubos de polipropileno de 15 mL (Sarstedt®, Alemanha), onde foram centrifugadas a 1.200 rpm (257 x g), por 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular foi ressuscitado em 300 μL de paraformaldeído a 2%

(Synth®, Brasil) para a fixação do material, o que possibilita a manutenção das células em sua morfologia ideal e os antígenos íntegros para as demais etapas do ensaio. A fixação foi realizada pelo período de 2 horas, ao abrigo de luz, a 4 °C (para evitar possíveis degradações).

A remoção do fixador foi realizada em duas lavagens consecutivas com 1 mL de PBS (1x), onde as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (1.500 rpm – 321 x g - por 5 minutos, a 4°C) - posteriormente o sobrenadante foi descartado. As duas lavagens se fazem necessárias devido à autofluorescência do paraformaldeído, que pode interferir na leitura do citômetro. O aumento da rotação foi realizado para diminuir possíveis perdas do número de células, considerando as demais lavagens posteriores. A diminuição de temperatura se deu para evitar possível degradação proteica e danos à amostra.

Em seguida, as membranas celulares foram permeabilizadas com 300 µL de detergente Tween® 20 (Invitrogen®, USA) a 0,1 %, pelo período de 15 minutos em geladeira. A permeabilização se mostra importante para que poros na membrana celular deem acesso à entrada dos anticorpos na célula, possibilitando o ingresso destes ao núcleo celular - local onde se encontra seu antígeno: histona γ-H2AX. A remoção do permeabilizante foi efetuada por duas lavagens com PBS 1x, seguidas de centrifugação, descarte do sobrenadante e ressuspensão do *pellet*.

Findadas as duas lavagens, as células foram incubadas com solução de albumina sérica bovina (BSA) (Sigma-Aldrich®, Alemanha) a 5% por 40 minutos. O BSA se ligar reversivelmente aos antígenos da amostra, bloqueando o acesso e impedindo ligações inespecíficas do anticorpo anti-γ-H2AX. Na sequência, as células em solução de BSA foram lavadas com PBS 1x (300 µL) e incubadas *overnight* (18 horas) em solução com 1 µL do primeiro anticorpo: *anti-human-γ-H2AX* (Novus Biologicals®, EUA) e 50 µL de solução de BSA a 1%. O processo de incubação foi realizado na ausência de luz a 4°C. Ao fim da primeira reação de ligação, as células foram lavadas com PBS 1x, retirando todos os anticorpos não ligados a seus antígenos específicos. Posteriormente, as células foram incubadas por 1 hora, em temperatura baixa, junto ao anticorpo secundário anti-*rabbit*-IgG conjugado com FITC

(Sigma-Aldrich®, Alemanha). Neste ponto foi criado um novo controle: o controle secundário, representando um grupo de células não submetidas à incubação com o anticorpo primário, mas incubadas com o anticorpo secundário. Este controle serve para determinar possíveis marcações inespecíficas do anticorpo secundário (anti-*rabbit*-IgG conjugado com FITC) que poderiam culminar em falsos valores de clastogenicidade.

Cessado o tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS 1x e ressuspensas em 300 µL de PBS 1x, estando aptas à análise no citômetro de fluxo Accuri C6 (BD *Bioscience*, EUA). Foi empregado o filtro FL1 (533 ±15 nm) e contabilizados 10.000 eventos em uniplicatas. Os resultados foram avaliados utilizando o *software* FlowJo™ versão V10 (TreeStar®, EUA), onde foram obtidos histogramas comparativos entre as células incubadas com os dois anticorpos e o controle secundário. Desta forma, considera-se fluorescência real apenas as partes do gráfico que transpassaram a marcação do controle secundário.

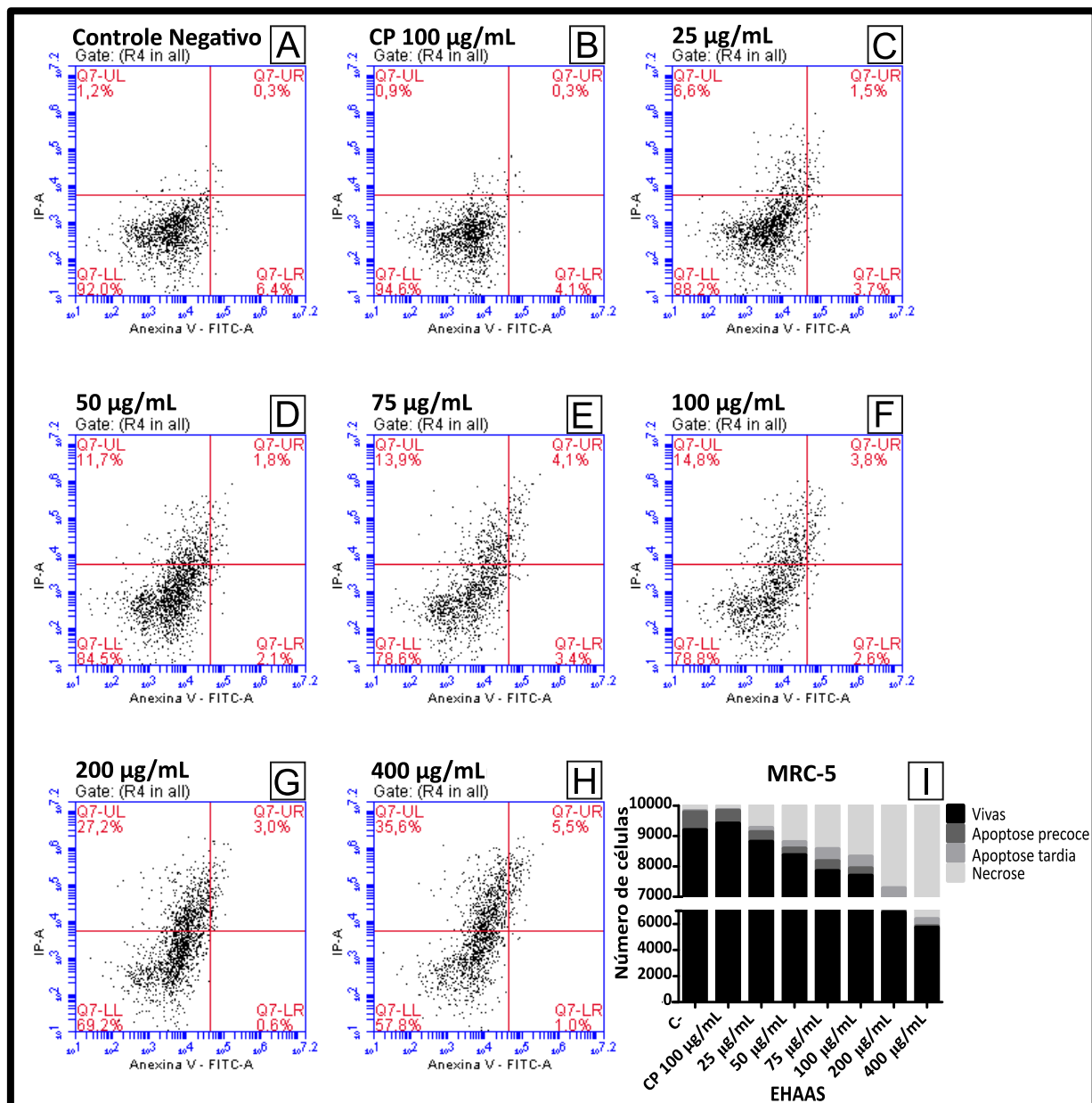
Os histogramas de intensidade de fluorescência foram obtidos através das medianas de intensidade de fluorescência (MIF) geradas no *software* FlowJo™ versão V10 (TreeStar®, EUA) e plotadas no *software* *GraphPad 5 Prism* (GraphPad *Software*®, EUA). Os valores inseridos nos histogramas contaram com a subtração inicial do MIF do controle secundário (tratado como o valor zero de fluorescência). Não foram realizadas análises estatísticas para o ensaio.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação de citotoxicidade pelo ensaio de Anexina V-FITC/IP

A fim de avaliar o potencial antineoplásico do EHAAS e da ciclofosfamida, foi executado o ensaio de anexina V/IP. Com base no número de células viáveis, foi realizada a análise de variância (ANOVA) *one way* seguida do *post hoc* de Tukey. Os resultados mostraram que, para a linhagem controle (MRC-5), foram observadas diferenças estatísticas significativas entre os diferentes tratamentos ($p < 0,0001$; $F = 130,6$). De acordo com o teste *post hoc*, foi observado que o EHAAS apresenta atividade citotóxica às células MRC-5, sendo que o principal tipo de morte celular identificada pós-tratamento foi a necrose (**Figura 11**). Entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas significativas entre as células controle (não tratadas) e aquelas tratadas com a ciclofosfamida (**Figura 11**). Interessantemente, não foram observadas diferenças estatísticas significativas do número de células viáveis tratadas com o EHAAS nas concentrações de 25, 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 11**). Porém, os resultados mostraram uma expressiva redução da viabilidade celular, de forma dose-dependente, nas células tratadas com EHAAS nas concentrações acima de 75 $\mu\text{g/mL}$ (EHAAS 100 – 400 $\mu\text{g/mL}$). Logo, a concentração de EHAAS de 400 $\mu\text{g/mL}$ mostrou-se a mais citotóxica, tendo promovido a morte de 42,73% das células, das quais 36,2% (3.620) destas se deram através de necrose (**Figura 11**).

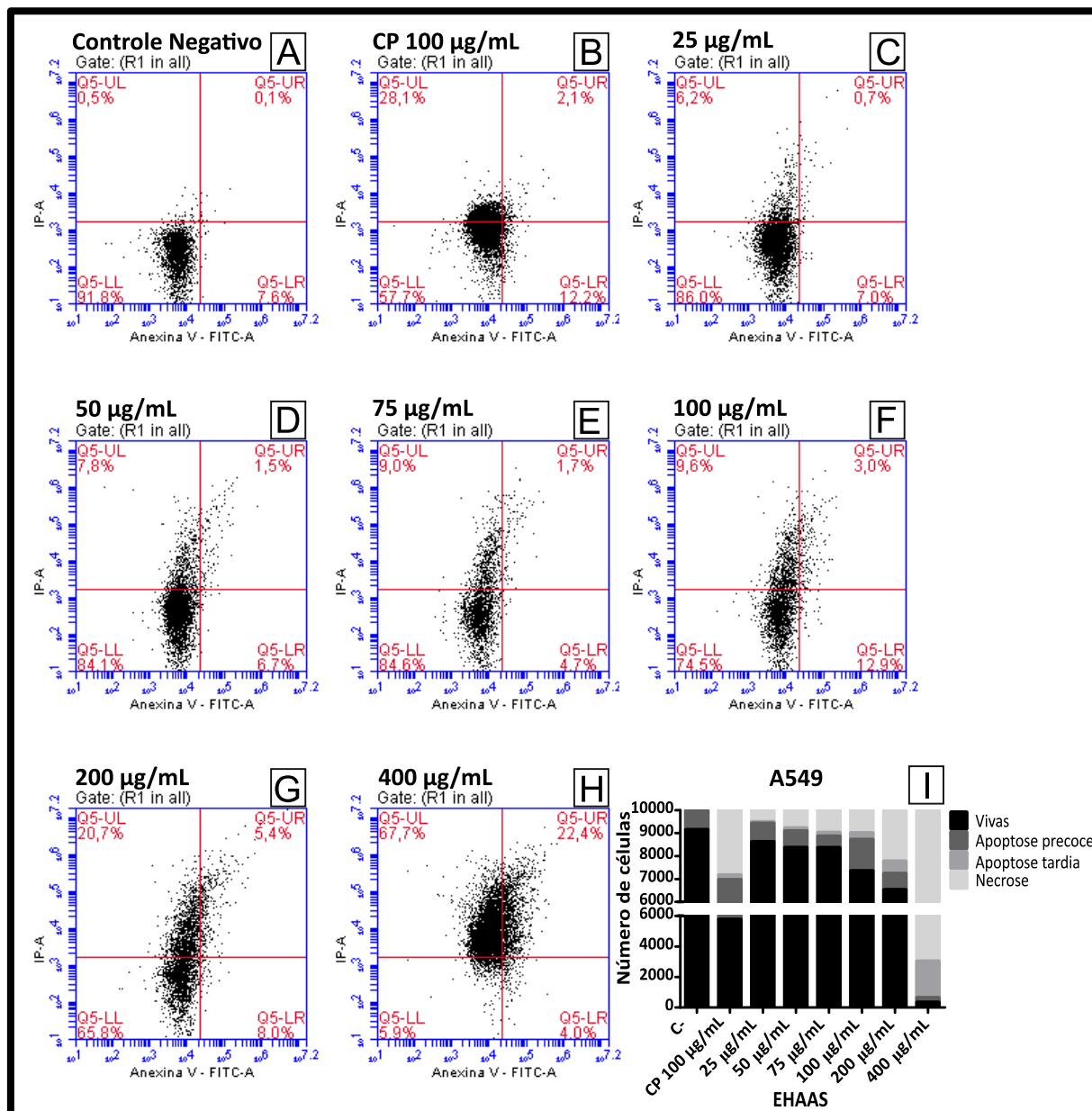
Figura 11 - Gráficos *Dotplot* e histograma do ensaio de Anexina V/IP da linhagem MRC-5



Resultados do ensaio de Anexina V/IP da linhagem normal MRC-5. De (A) a (H) gráficos *dotplot* representando percentual de células: Vivas (Q-LL); em Apoptose Precoce (Q-LR); Apoptose Tardia (Q-UR) e em Necrose (Q-UL). Em (A) controle negativo, sem tratamento; (B) CP = ciclofosfamida a 100 µg/mL; de (C) a (H), concentrações crescentes do EHAAS. Em (I) gráfico do tipo histograma representando o número de células vivas (preto) e em diferentes tipos de morte (tons de cinza) dos tratamentos com EHAAS, CP e controle negativo (C-). As análises estatísticas demonstraram diferenças significativas de quase todos os tratamentos em relação ao controle negativo, com exceção dos tratamentos com CP 100 µg/mL e EHAAS 25 µg/mL ($p < 0,0001$; $F = 130,6$). Dados estatísticos obtidos a partir dos testes ANOVA *One way* e *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%.

A viabilidade da linhagem cancerígena A549, assim como a linhagem normal MRC-5, apresentou relação de dose dependência ao extrato. Entretanto, assim como na linhagem normal (MRC-5), os tratamentos de 25, 50 e 75 µg/mL não apresentaram diferenças estatísticas entre si. Todas as concentrações do EHAAS e CP 100 µg/mL, diferem significativamente em relação ao controle negativo ($p < 0,0001$; $F = 1019$). Quanto aos mecanismos de morte, observa-se que nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL a apoptose é prevalente. Os valores de apoptose, por sua vez, praticamente não diferiram entre si, considerando: apoptose precoce ($p < 0,0001$; $F = 51,11$) e tardia ($p < 0,0001$; $F = 681,7$). Nas concentrações mais altas do extrato (200 e 400 µg/mL), que apresentaram maior citotoxicidade, a necrose se mostrou o mecanismo mais prevalente de morte celular, correspondendo a 22,17% (2.217 células) e 69,8 % (6.980 células) dos 10.000 eventos analisados nas concentrações de 200 e 400 µg/mL, respectivamente ($p < 0,0001$; $F = 590,1$). A maior concentração do extrato (400 µg/mL) demonstrou altíssima citotoxicidade, matando 96,65% (9.665) das células, tendo 69,80% se dado através de necrose. Por fim, a droga comercial ciclofosfamida a 100 µg/mL foi citotóxica a 42,43% (4.243) das células A549, sendo 28,33% (2.833) das mortes causadas por necrose (**Figura 12**).

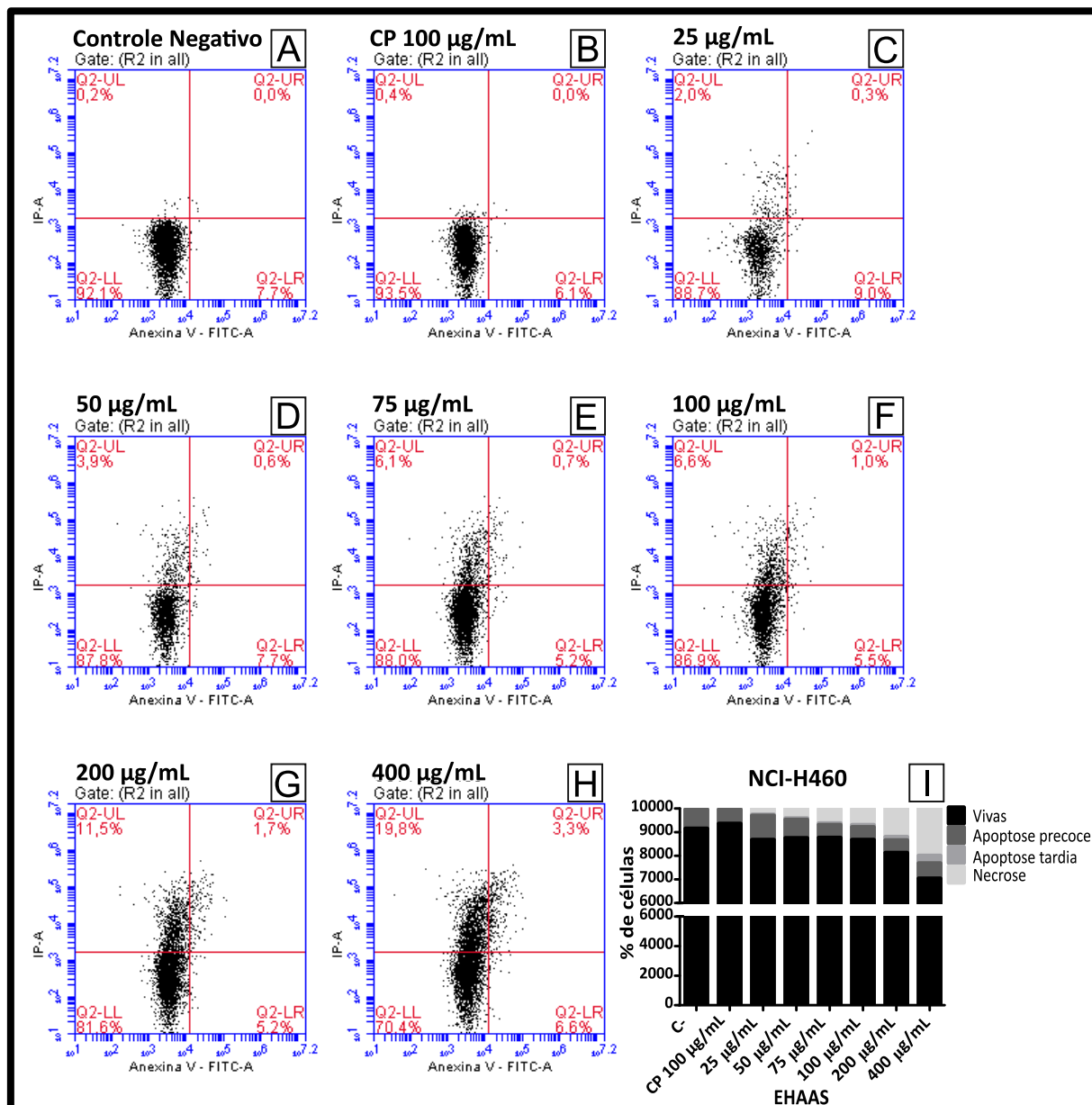
Figura 12 – Gráficos *Dotplot* e histograma do ensaio de Anexina V/IP da linhagem A549



Resultados do ensaio de Anexina V/IP da linhagem cancerígena A549. De (A) a (H) gráficos *dotplot* representando percentual de células: Vivas (Q-LL); em Apoptose Precoce (Q-LR); Apoptose Tardia (Q-UR) e em Necrose (Q-UL). Em (A) controle negativo, sem tratamento; (B) CP = ciclofosfamida a 100 µg/mL; de (C) a (H) concentrações crescentes do EHAAS. Em (I) gráfico do tipo histograma representando o número de células vivas (preto) e em diferentes tipos de morte (tons de cinza) dos tratamentos com EHAAS, CP e controle negativo (C-). Todos os tratamentos diferiram estatisticamente do controle negativo, com elevada mortalidade nos tratamentos com CP 100 µg/mL e EHAAS a 200 e 400 µg/mL, tendo o último apresentado uma notável citotoxicidade (9.665 de células inviáveis). As concentrações de 25, 50 e 75 µg/mL não apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,0001$; $F = 1019$). Dados estatísticos foram obtidos a partir dos testes ANOVA *One way* e *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%.

A linhagem neoplásica NCI-H460 apresentou a menor responsividade ao extrato. Apesar de diferenças estatísticas serem observadas entre todas as concentrações de EHAAS e controle negativo ($p < 0,0001$; $F = 97,06$), a viabilidade celular permaneceu acima dos 80% em praticamente todas as concentrações do extrato (25 $\mu\text{g/mL}$: 86,83% - 200 $\mu\text{g/mL}$: 81,33%), com exceção do tratamento com EHAAS a 400 $\mu\text{g/mL}$, onde foi observada a morte de apenas 29,5% (2.950) das células. Não foram observadas diferenças estatísticas entre as concentrações de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ do EHAAS. Frente à CP 100 $\mu\text{g/mL}$, não foram observadas diferenças significativas, tendo o tratamento com a droga apresentado 93,63% (9.363 células) de viabilidade celular em relação a 91,57% (9.157 células) do controle negativo. (**Figura 13**). Quanto aos mecanismos de morte, as concentrações mais altas do extrato (200 e 400 $\mu\text{g/mL}$) mostraram uma maior relação de morte celular por necrose ($p < 0,0001$; $F = 575,3$), enquanto nas concentrações de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$, observa-se uma relação quase correspondente (1:1) entre os níveis de apoptose e necrose. Os valores de apoptose não diferiram estatisticamente entre si (apoptose precoce: $p < 0,0001$; $F = 12,57$. Apoptose tardia: $p < 0,0001$; $F = 149,3$).

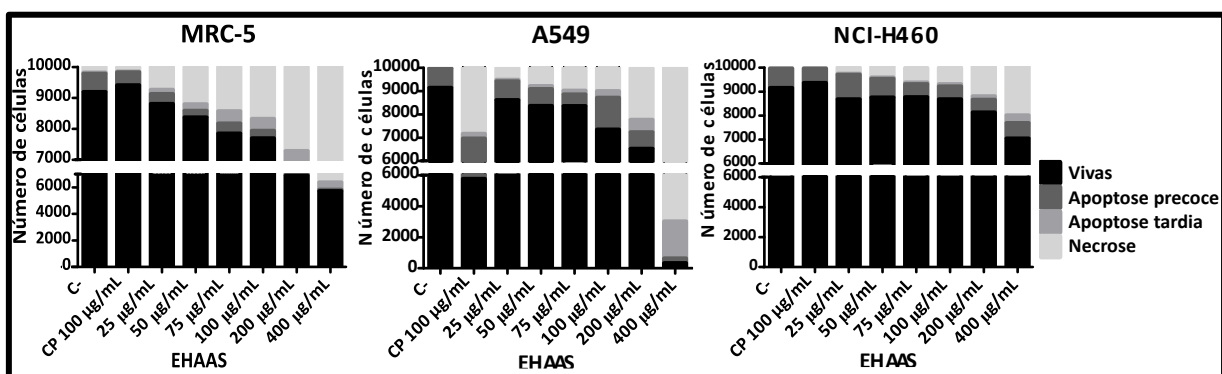
Figura 13 – Gráficos *Dotplot* e histograma do ensaio de Anexina V/IP da linhagem NCI-H460



Resultados do ensaio de Anexina V/IP da linhagem cancerígena NCI-H460. De (A) a (H) gráficos *dotplot* representando percentual de células: Vivas (Q-LL); em Apoptose Precoce (Q-LR); Apoptose Tardia (Q-UR) e em Necrose (Q-UL). Em (A) controle negativo, sem tratamento; (B) CP = ciclofosfamida a 100 µg/mL; de (C) a (H) concentrações crescentes do EHAAS. Em (I) gráfico do tipo histograma representando o número de células vivas (preto) e em diferentes tipos de morte (tons de cinza) dos tratamentos dom EHAAS, CP e controle negativo (C-). Quanto à viabilidade celular, todos os tratamentos diferem estatisticamente em relação com controle negativo, com exceção do tratamento com CP a 100 µg/mL. Em EHAAS a 25, 50, 75 e 100 µg/mL, as amostras não apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,0001$; $F = 97,06$). As concentrações de 200 e 400 µg/mL de EHAAS se mostraram as mais citotóxicas para a linhagem. Dados estatísticos obtidos a partir dos testes ANOVA *One way* e *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%.

Nas análises de viabilidade celular, observam-se efeitos bastante distintos do EHAAS e da ciclofosfamida nas três linhagens de pulmão. A linhagem neoplásica A549 ($p < 0,0001$; $F = 1019$) foi a única que sofreu efeitos citotóxicos da ciclofosfamida, enquanto as demais (NCI-H460: $p < 0,0001$; $F = 97,06$ e MRC-5: $p < 0,0001$; $F = 130,6$) não responderam à droga (**Figura 14**). A linhagem A549 foi também a linhagem mais susceptível à atividade citotóxica do EHAAS nas concentrações de 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$, chegando a 96,65% de morte celular na maior concentração do extrato. A linhagem NCI-H460 apresentou a maior resistência para o extrato, mostrando uma viabilidade celular abaixo de 80% apenas na concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$, enquanto este efeito foi obtido a partir da concentração de 75 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens MRC-5 e A549, respectivamente. A indução de morte por necrose também variou entre as três linhagens, com o mecanismo sendo mais perceptível na linhagem controle (MRC-5) em todas as concentrações e sendo prevalente nas concentrações mais citotóxicas, tanto na linhagem MRC-5, quanto nas linhagens neoplásicas (A549 e NCI-H460).

Figura 14 - Histogramas do ensaio de Anexina V/PI das três linhagens de pulmão



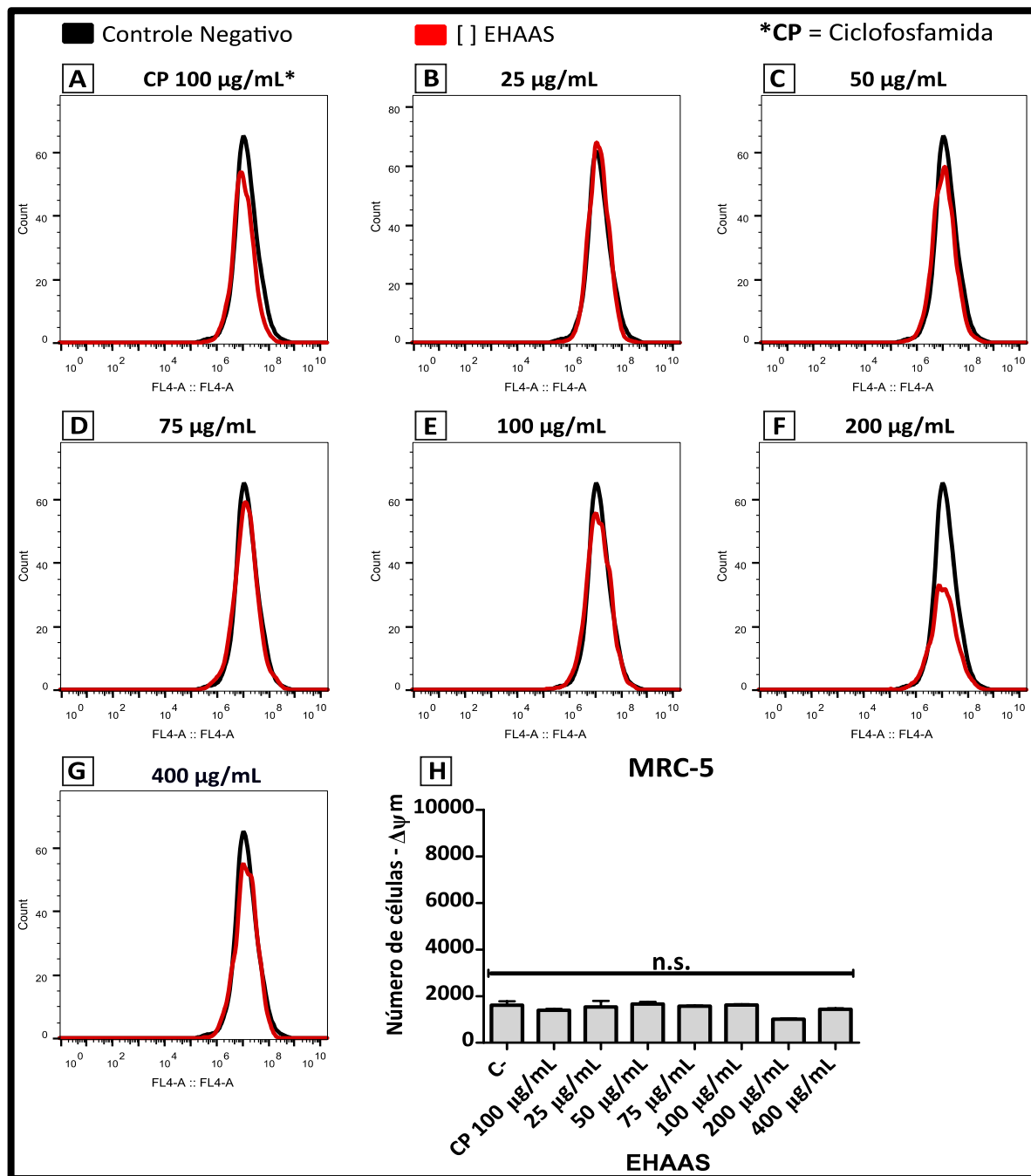
Histogramas representando células vivas (em preto) e em diferentes tipos de morte (tons de cinza). Da esquerda para a direita: linhagem normal MRC-5 e linhagens de CPCNP A549 e NCI-H460. No eixo "x" estão representados os tratamentos com: CP = ciclofosfamida e concentrações crescentes de EHAAS (25 a 400 $\mu\text{g/mL}$); C- = células sem tratamento. No eixo "y" observam-se o número de células correspondentes a: células vivas, em apoptose (precoce e tardia e em necrose). As referências dos tons de cinza são demonstradas na legenda da própria imagem, à direita dos gráficos.

6.2 Ensaio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Para compreender o papel do EHAAS e CP sobre a funcionalidade mitocondrial, foi investigado o potencial de membrana mitocôndria ($\Delta\Psi_m$), com o auxílio da sonda MitoTracker® *Deep Red*. As análises estatísticas foram obtidas a partir do teste não paramétrico Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn, através do número de células com marcação para a sonda, o que implica na captura da mesma por mitocôndrias funcionais, *i.e.* com $\Delta\Psi_m$ ativo. O controle negativo corresponde ao $\Delta\Psi_m$ basal de cada linhagem.

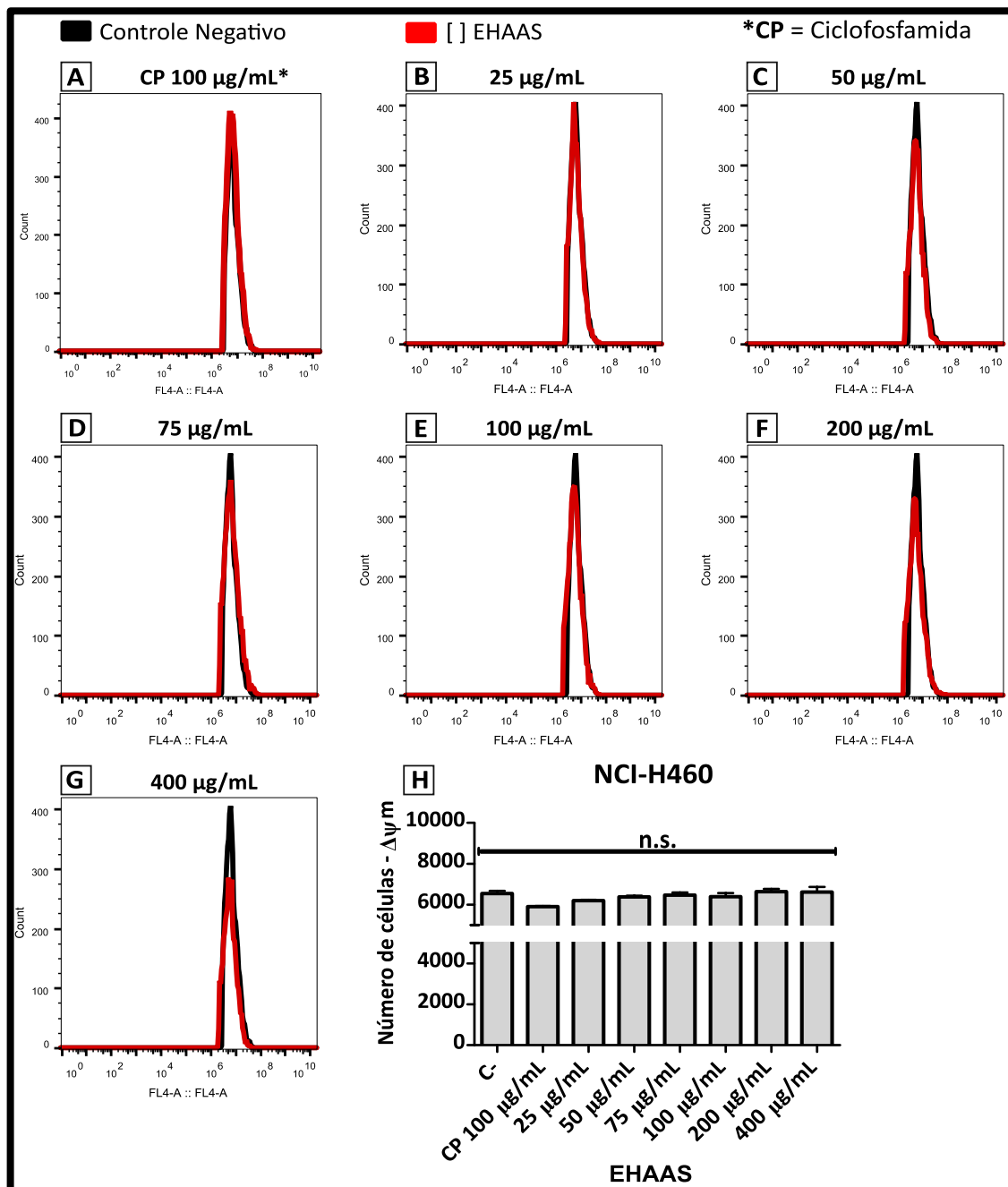
Não foram observadas diferenças estatísticas entre nenhum tratamento nas linhagens MRC-5 ($p=0,0951$) (**Figura 15**) e NCI-H460 ($p=0,0806$) (**Figura 16**). Na linhagem controle (MRC-5) observou-se uma baixa atividade mitocondrial, com atividade em menos de 20% de todas as células analisadas: o maior valor observado foi para EHAAS 50 $\mu\text{g/mL}$, com 16,67% (1.667) das células com $\Delta\Psi_m$ ativo.

Figura 15 – Histogramas do ensaio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) da linhagem MRC-5



Resultados do ensaio de $\Delta\Psi_m$ da linhagem saudável MRC-5. De (A) a (G) histogramas comparando as quantidades de células responsivas à sonda MitoTracker Deep Red (eixo y) entre as células sem tratamento, denominadas Controle Negativo (em preto) e células com diferentes tratamentos (em vermelho). Em (A) CP = Ciclofosfamida; de (B) a (G): concentrações crescentes de EHAAS (25 a 400 $\mu\text{g/mL}$). Em (H) histograma estatístico mostrando número de células com $\Delta\Psi_m$ ativo (eixo y) em células com tratamento (CP e EHAAS) e sem tratamento (C-) (eixo x). As análises estatísticas não mostraram diferença significativa entre nenhum grupo ($p=0,0951$). n.s. = Não significativa. Dados estatísticos obtidos a partir dos testes Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn, com nível de significância de 5%. n.s. = Não significativa.

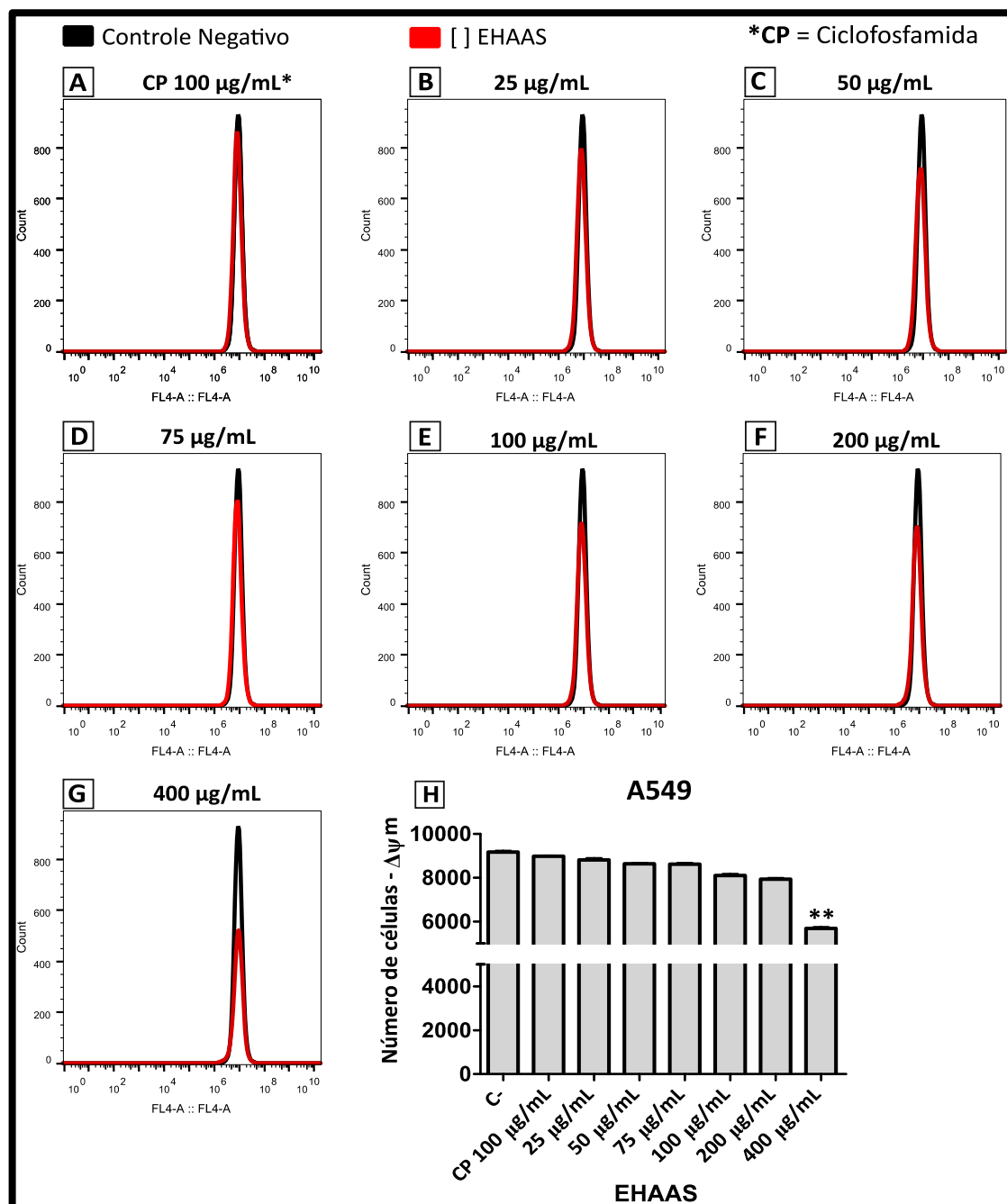
Figura 16 – Histogramas do ensaio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) da linhagem NCI-H460



Resultados do ensaio de $\Delta\Psi_m$ da linhagem cancerígena NCI-H460. De (A) a (G) histogramas comparando as quantidades de células responsivas à sonda MitoTracker Deep Red (eixo y) entre as células sem tratamento, denominadas Controle Negativo (em preto) e células com diferentes tratamentos (em vermelho). Em (A) CP = Ciclofosfamida; de (B) a (G): concentrações crescentes de EHAAS (25 a 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Em (H) histograma estatístico mostrando número de células com $\Delta\Psi_m$ ativo (eixo y) em células com tratamento (CP e EHAAS) e sem tratamento (C-) (eixo x). As análises estatísticas não mostraram diferenças significativas entre nenhum grupo ($p=0,0806$). Dados estatísticos obtidos a partir dos testes Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn, com nível de significância de 5%. n.s. = não significante.

A linhagem neoplásica A549 apresentou a única diferença estatística do ensaio, observada entre os grupos controle negativo e EHAAS 400 µg/mL ($p=0,0028$). (**Figura 17**). Apesar da alta citotoxicidade na concentração de 400 µg/mL (96,65%), o $\Delta\Psi_m$ se mostrou ativo em 56,9% (5.690) das células avaliadas (total de 10.000), demonstrando uma baixa relação entre a citotoxicidade e atividade mitocondrial na linhagem.

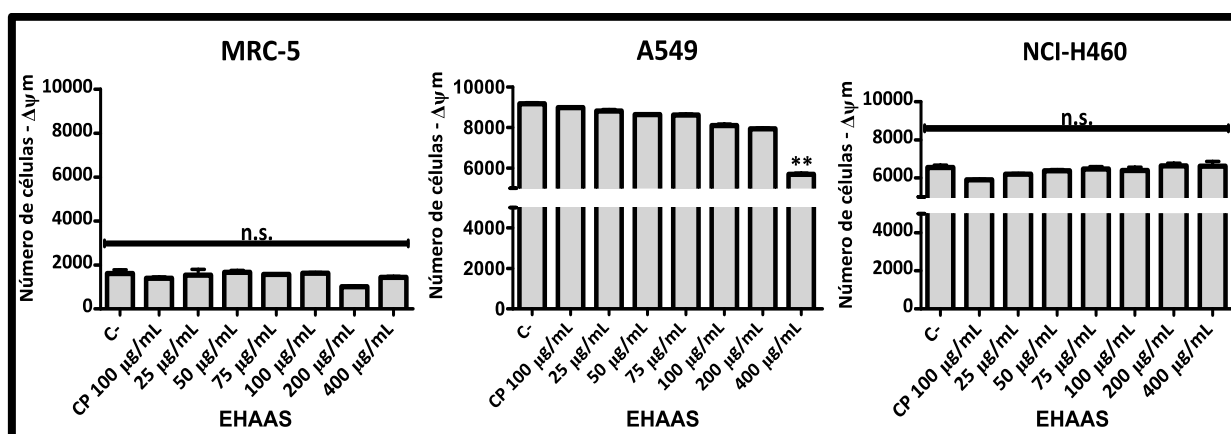
Figura 17 – Histogramas do ensaio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) da linhagem A549



Resultados do ensaio de $\Delta\Psi_m$ da linhagem cancerígena A549. De (A) a (G) histogramas comparando as quantidades de células responsivas à sonda MitoTracker *Deep Red* (eixo y) entre as células sem tratamento, denominadas Controle Negativo (em preto) e células com diferentes tratamentos (em vermelho). Em (A) CP = Ciclofosfamida; de (B) a (G): concentrações crescentes de EHAAS (25 a 400 $\mu\text{g/mL}$). Em (H) histograma estatístico mostrando número de células com $\Delta\Psi_m$ ativo (eixo y) em células com tratamento (CP e EHAAS) e sem tratamento (C-) (eixo x). Diferenças estatísticas foram observadas apenas entre os grupos: controle negativo e EHAAS 400 $\mu\text{g/mL}$ ($p=0,0028$). Dados estatísticos obtidos a partir dos testes Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn, com nível de significância de 5%. ** $p<0,001$.

Assim como no ensaio de Anexina V/IP, as linhagens de pulmão apresentaram comportamentos distintos entre si, com (1) nenhuma resposta frente aos tratamentos (MRC-5 e NCI-H460) e (2) diferenças apenas em tratamentos com altíssima citotoxicidade (A549) (**Figura 18**). Apesar de todas as concentrações do extrato terem causado algum nível de citotoxicidade nas três linhagens, deve-se considerar que poucas células morreram através do mecanismo de apoptose, o que justificaria uma redução do $\Delta\Psi_m$.

Figura 18 – Histogramas do ensaio de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) das três linhagens de pulmão



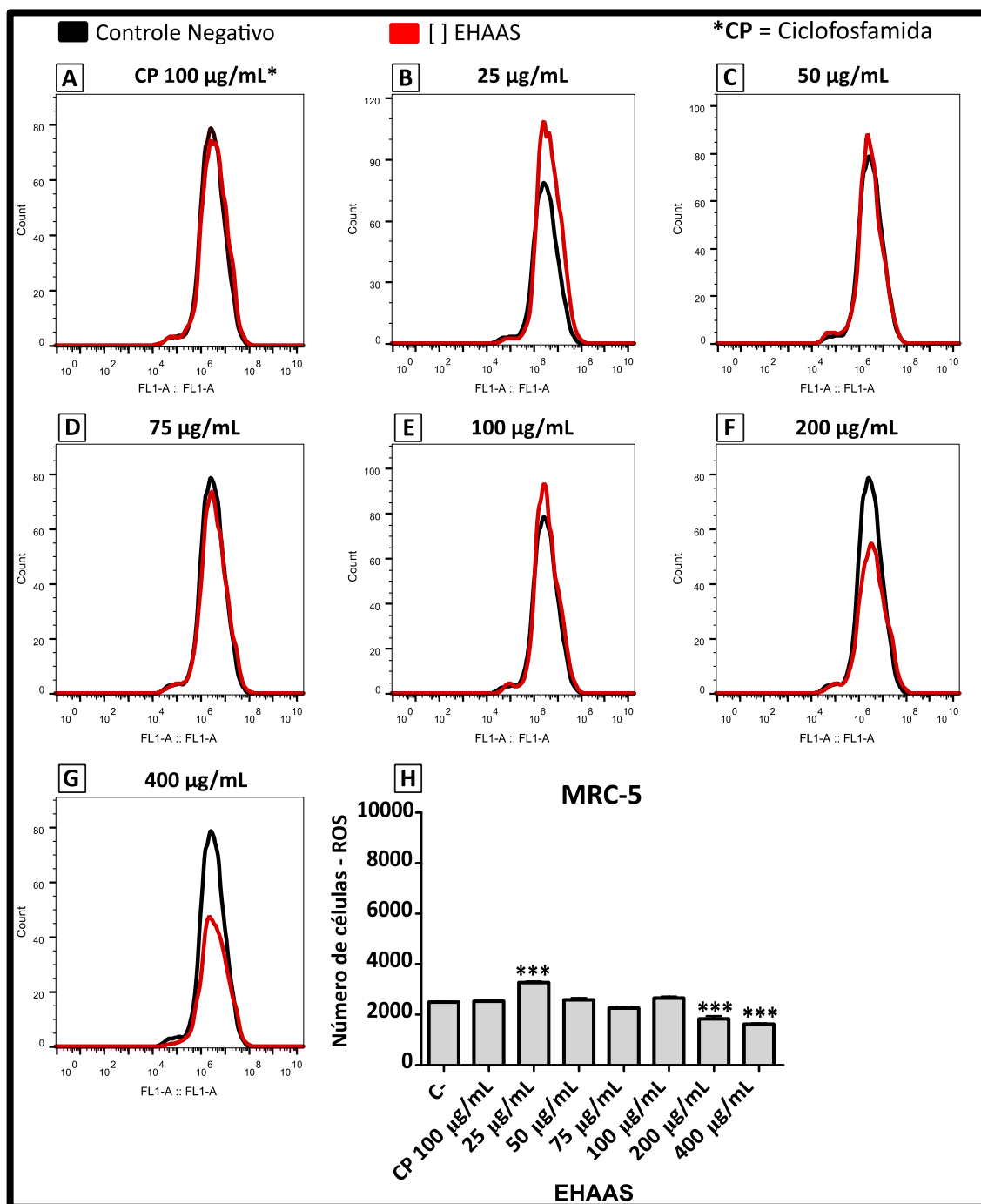
Histogramas representando o número de células responsivas à sonda MitoTracker *Deep Red* para o ensaio de $\Delta\Psi_m$ (eixo y), em relação a células sem tratamento (C-), tratadas com ciclofosfamida (CP) a 100 $\mu\text{g/mL}$ e concentrações crescentes de EHAAS (25 a 400 $\mu\text{g/mL}$). Da esquerda para a direita: célula normal MRC-5 ($p=0,0951$); células neoplásicas A549 e NCI-H460. Diferenças estatísticas foram observadas apenas entre C- e EHAAS 400 $\mu\text{g/mL}$ na linhagem A549 ($p=0,0028$); não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos nas linhagens MRC-5 ($p=0,0951$.) e NCI-H460 ($p=0,0806$). Apesar da diferença estatística observada na linhagem A549 ($p=0,0028$), a diminuição do $\Delta\Psi_m$ não parece relevante frente à citotoxicidade apresentada na linhagem (96,65% de morte) Dados estatísticos obtidos a partir dos testes Kruskal-Wallis e *post hoc* de Dunn, com nível de significância de 5%. ** $p<0,001$. n.s. = não significante.

6.3 Avaliação da produção de ROS através da sonda DFCH-DA

O ensaio de detecção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi realizado a fim de investigar o estresse oxidativo sofrido pelas linhagens celulares frente aos tratamentos. A quantificação de ROS foi obtida através do número de células marcadas com a sonda DFCH-DA, a qual é detectável apenas quando oxidada pelas ROS. As análises estatísticas foram realizadas a partir do teste paramétrico ANOVA *one way* seguido do *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%. O controle negativo corresponde a células sem tratamento, representando os valores basais de ROS das linhagens em condições normais de cultivo.

Na linhagem MRC-5, apenas as concentrações de EHAAS a 25, 200 e 400 µg/mL diferiram estatisticamente do controle negativo ($p < 0,0001$; $F = 84,45$) (**Figura 19**). Este comportamento se mostrou bastante interessante, já que a menor concentração do extrato - 25 µg/mL - apresentou uma elevação no número de células sofrendo estresse oxidativo, enquanto as maiores concentrações do extrato (200 e 400 µg/mL) apresentaram uma marcada diminuição na quantidade de ROS. As concentrações de 200 e 400 µg/mL não diferiram estatisticamente entre si. Comparados aos valores de citotoxicidade, observa-se que a concentração de EHAAS que provocou menor morte celular (25 µg/mL) foi, entretanto, a com mais células sofrendo estresse oxidativo (32,67%), enquanto as concentrações com maiores efeitos citotóxicos (200 µg/mL e 400 µg/mL) foram as que tiveram menores níveis de ROS detectados (18,36% e 17,03%, respectivamente). Assim como no ensaio de $\Delta\Psi_m$, a detecção de ROS foi bastante baixa para a linhagem, indicando um metabolismo basal menos ativo.

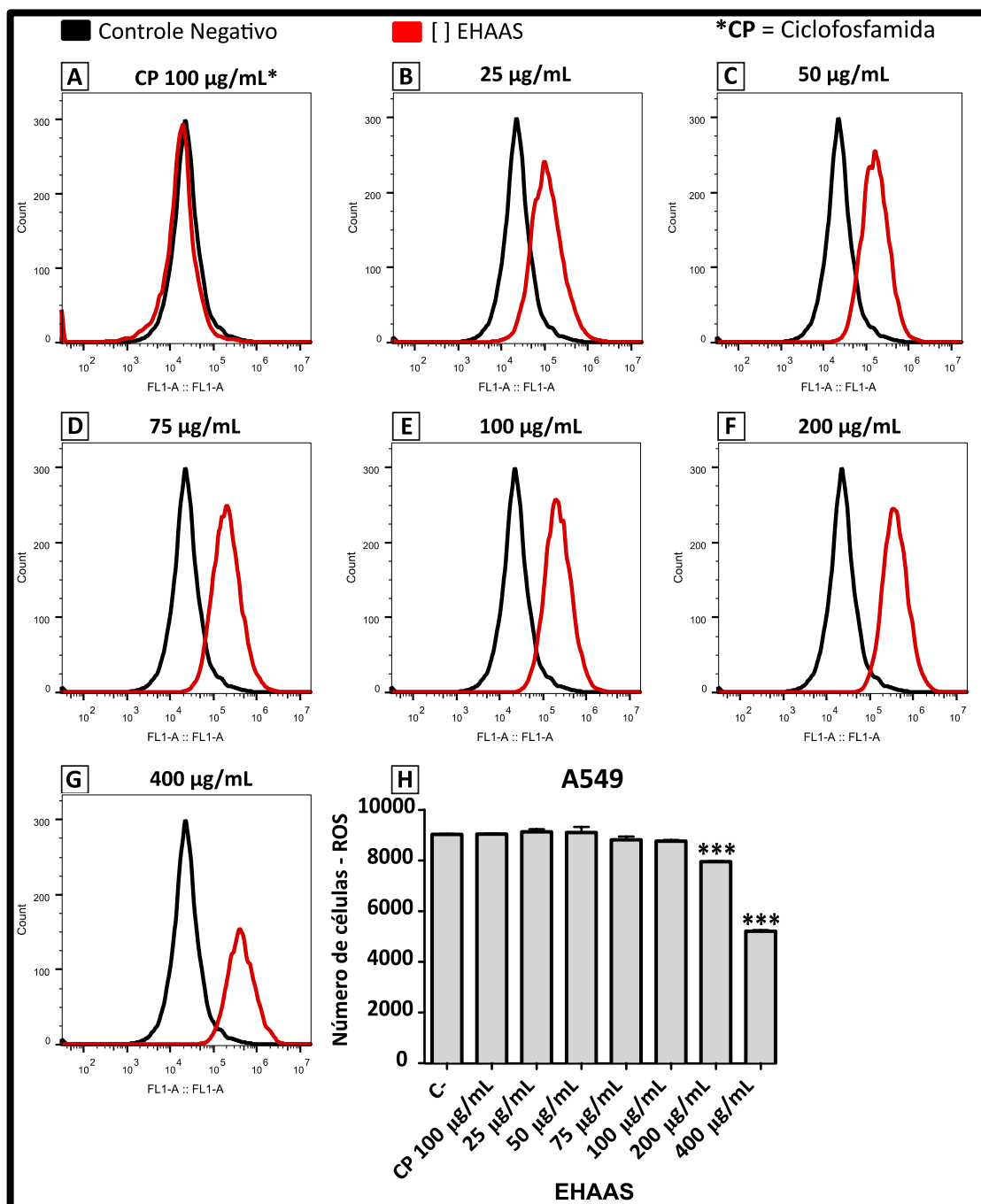
Figura 19 – Histogramas do ensaio de ROS da linhagem MRC-5



Resultados do ensaio de espécies reativas de oxigênio (ROS) da linhagem normal MRC-5. De (A) a (G), representação de histogramas comparativos da quantidade de células marcadas pela sonda DCFH-DA (eixo y) entre células não tratadas (Controle Negativo), representadas em preto, e células tratadas com EHAAS (25 a 400 µg/mL) e CP 100 µg/mL, representadas em vermelho. Em (H), histograma estatístico mostrando os diferentes tratamentos da célula (eixo x) e número de células marcadas pela sonda (eixo y). As análises estatísticas mostram diferenças estatísticas entre o controle negativo e os grupos tratados com EHAAS 25, 200 e 400 µg/mL ($p < 0,0001$; $F = 84,45$). Dados estatísticos obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) *one way* e *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%. *** $p < 0,0001$.

A linhagem cancerígena A549 apresentou pouca diferença no número de células responsivas à sonda, com apenas os tratamentos com EHAAS a 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ diferindo estatisticamente do controle negativo ($p < 0,0001$; $F = 1,786$). Considerando o ensaio de citotoxicidade, as respostas quanto ao estresse oxidativo do EHAAS a 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ parecem ser opostas às esperadas, já que as concentrações que mais induziram morte celular (200 $\mu\text{g/mL}$ -34,7%; 400 $\mu\text{g/mL}$ -96,65%), se mostraram com os menores níveis de estresse oxidativo (**Figura 20**). Além disso, a concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ foi a que mais causou depleção mitocondrial, apresentado no ensaio de $\Delta\Psi\text{m}$ (**Figura 16**). Além das respostas obtidas, levando em consideração o número de células, é nítido nos histogramas da **Figura 20** o deslocamento à direita das curvas em vermelho, representando os grupos tratados. Tal deslocamento é observado apenas nos tratamentos com EHAAS e aumenta gradativamente frente ao aumento das concentrações do extrato. Este comportamento sugere uma elevação da intensidade de fluorescência da sonda, o que pode representar uma quantidade maior de espécies reativas sendo detectadas.

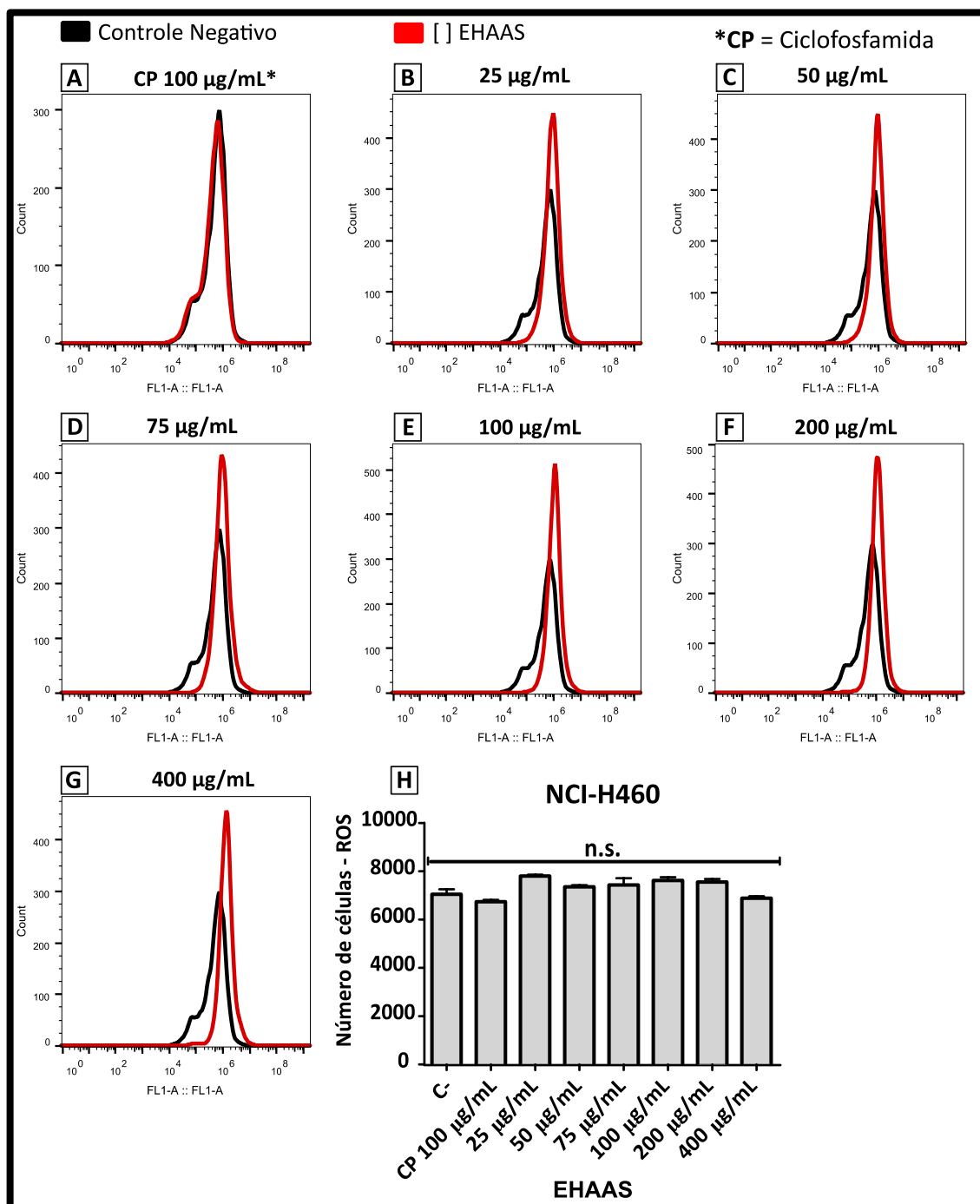
Figura 20 – Histogramas do ensaio de ROS da linhagem A549



Resultados do ensaio de espécies reativas de oxigênio (ROS) da linhagem cancerígena A549. De (A) a (G), representação de histogramas comparativos da quantidade de células marcadas pela sonda DCFH-DA (eixo y) entre células não tratadas (Controle Negativo), representadas em preto, e células tratadas com EHAAS (25 a 400 µg/mL) e CP 100 µg/mL, representadas em vermelho. Em (H), histograma estatístico mostrando os diferentes tratamentos da célula (eixo x) e número de células marcadas pela sonda (eixo y). As análises estatísticas mostram diferenças estatísticas entre o controle negativo e EHAAS a 200 e 400 µg/mL ($p < 0,0001$; $F = 178,6$). Observa-se um deslocamento à direita das curvas correspondentes aos tratamentos com EHAAS. Dados estatísticos obtidos a partir de análise de variância (ANOVA) *one way* e *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%. *** $p < 0,0001$.

Os resultados de ROS da linhagem NCI-H460 não demonstraram nenhuma diferença estatística entre as amostras, com os tratamentos com CP ou EHAAS ($p= 0,2659$; $F=1,416$) (**Figura 21**). Estes resultados, assim como os de $\Delta\Psi_m$ e Anexina V/IP sugerem uma responsividade quase nula da linhagem aos tratamentos.

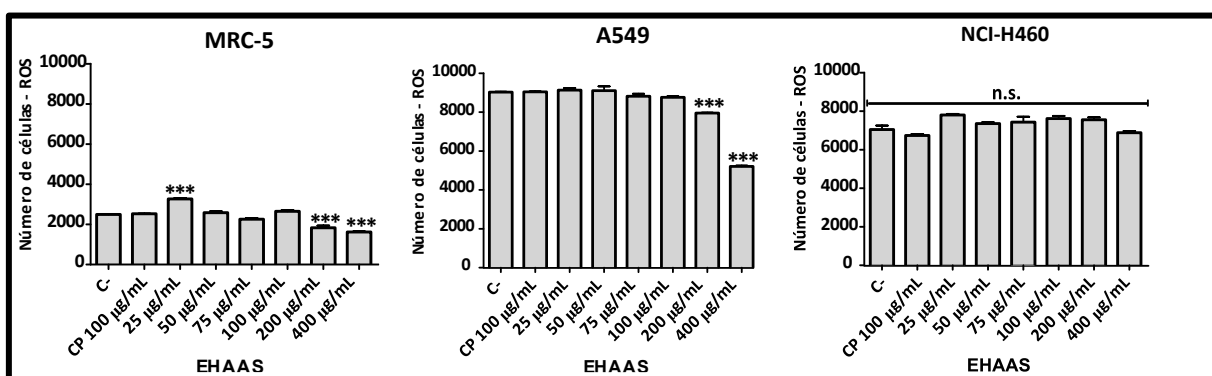
Figura 21 – Histogramas do ensaio de ROS da linhagem NCI-H460



Resultados do ensaio de espécies reativas de oxigênio (ROS) da linhagem cancerígena NCI-H460. De (A) a (G), representação de histogramas comparativos da quantidade de células marcadas pela sonda DCFH-DA (eixo y) entre células não tratadas (Controle Negativo, representadas em preto), e células tratadas com EHAAS (25 a 400 µg/mL) e ciclofosfamida 100 µg/mL, representadas em vermelho. Em (H), histograma estatístico mostrando os diferentes tratamentos da célula (eixo x) e número de células marcadas pela sonda (eixo y). As análises estatísticas não mostram diferença significativas entre nenhum grupo ($p = 0,2659$; $F = 1,416$). ns = não significante. Dados estatísticos obtidos a partir da análise de variância (ANOVA) *one way* e *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%

O ensaio de ROS mostrou mais uma vez respostas bastante distintas entre as linhagens, com maiores variações observadas na linhagem controle MRC-5. Como nos demais ensaios, a linhagem NCI-H460 se comportou de maneira excepcional às demais linhagens, sem apresentar resposta ao extrato ou à CP (**Figura 22**).

Figura 22 - Histogramas do ensaio de ROS das três linhagens de pulmão



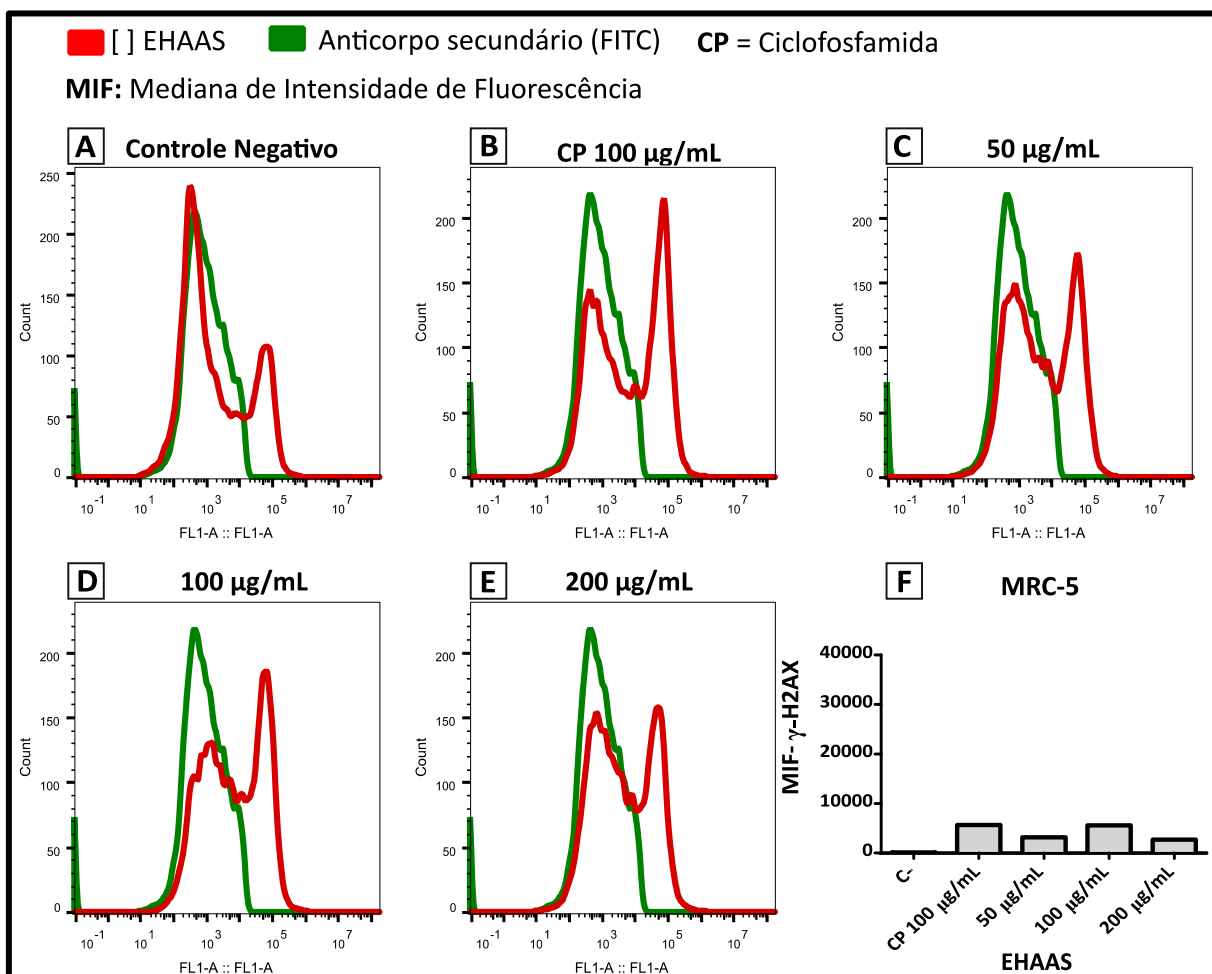
Histogramas representando o número de células marcadas com a sonda DFCH-DA para o ensaio de ROS das linhagens de CPCNP (A) A549, (B) H460 e linhagem saudável de pulmão MRC-5 (C). No eixo "x" são representados os tratamentos com EHAAS (25 a 400 µg/mL), ciclofosfamida 100 µg/mL e controle negativo (sem droga). As linhagens MRC-5 e A549 apresentaram respostas bastante similares, com as concentrações mais altas do extrato (200 e 400 a 400 µg/mL) apresentando diminuição de ROS. No eixo "y" observam-se o número de células marcadas para a sonda. Dados estatísticos obtidos a partir do teste paramétrico ANOVA *one way* e *post hoc* de Tukey, com nível de significância de 5%. *** $p < 0,0001$. n.s. = não significante.

6.4 Avaliação de genotoxicidade por meio do ensaio de histona γ -H2AX

A robustez do ensaio histona γ -H2AX permite avaliar os níveis de clastogênese causados pelos tratamentos com EHAAS e CP e, portanto, a genotoxicidade dos mesmos. Os valores utilizados nas análises foram os das medianas de intensidade de fluorescência (MIF) das amostras.

A linhagem normal MRC-5 apresentou baixos níveis de clastogenicidade no controle negativo, característica esperada em células saudáveis. Tanto os tratamentos com EHAAS e CP apresentaram uma branda genotoxicidade às linhagens, com EHAAS a 100 $\mu\text{g/mL}$ e CP (100 $\mu\text{g/mL}$) causando os maiores índices clastogênicos (**Figura 23**). Curiosamente, apesar de causar grandes danos ao DNA, característica conhecida da droga, a ciclofosfamida não apresentou citotoxicidade à linhagem, nem alterou seu metabolismo energético. Os tratamentos com EHAAS, por sua vez, apresentaram resultados bastante interessantes: observaram-se maiores danos ao DNA na concentração intermediária do extrato (100 $\mu\text{g/mL}$), enquanto nas concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$, foram visualizados níveis de danos praticamente iguais entre si.

Figura 23 – Histogramas do ensaio de histona γ -H2AX da linhagem MRC-5

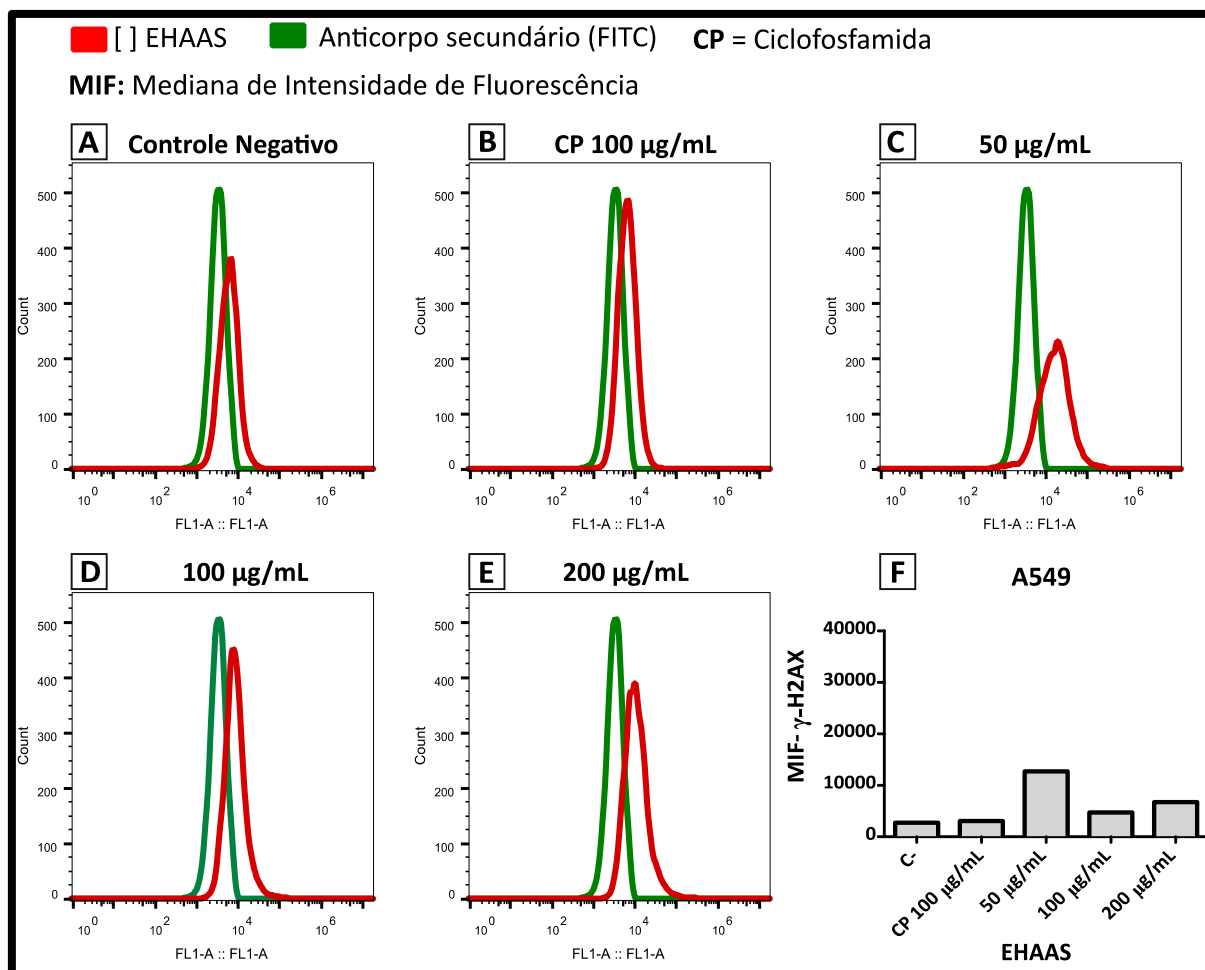


Resultados do ensaio de histona γ -H2AX da linhagem normal MRC-5. De (A) a (E), histogramas mostrando a intensidade de fluorescência de marcação (eixo x) e quantidade e células marcadas com o anticorpo (eixo y). Em verde: marcação com o anticorpo secundário conjugado com FITC e em vermelho: controle negativo (sem tratamento com drogas), ciclofosfamida a 100 µg/mL e concentrações crescentes de EHAAS (50, 100, 200 µg/mL). Desvios dos histogramas das amostras no eixo “x” do gráfico representam a marcação real da proteína histona γ -H2AX. Em (F) histograma representando as medianas de intensidade de fluorescência (MIF) relacionadas à marcação da proteína histona γ -H2AX (eixo y) e diferentes tratamentos (eixo x). No ensaio, observa-se um baixo dano basal no DNA e a indução de DSBs em todos os tratamentos, destacando-se os tratamentos com CP a 100 µg/mL e EHAAS a 100 µg/mL. Não foram realizadas análises estatísticas para o ensaio.

Na linhagem A549, um elevado dano foi visualizado no tratamento com EHAAS a 50 µg/mL. As demais concentrações do EHAAS, por sua vez, causaram danos bastante discretos (**Figura 24**). A ciclofosfamida, apesar de citotóxica a um grande número de células, não provocou DSBs no DNA. Em contrapartida, células tratadas com EHAAS 50 µg/mL, cuja citotoxicidade (Anexina V/IP) ou efeitos sobre metabolismo energético ($\Delta\Psi_m$ e ROS) não se mostraram altos ou relevantes

estatisticamente, apresentaram os níveis de clastogenicidade mais elevados do ensaio.

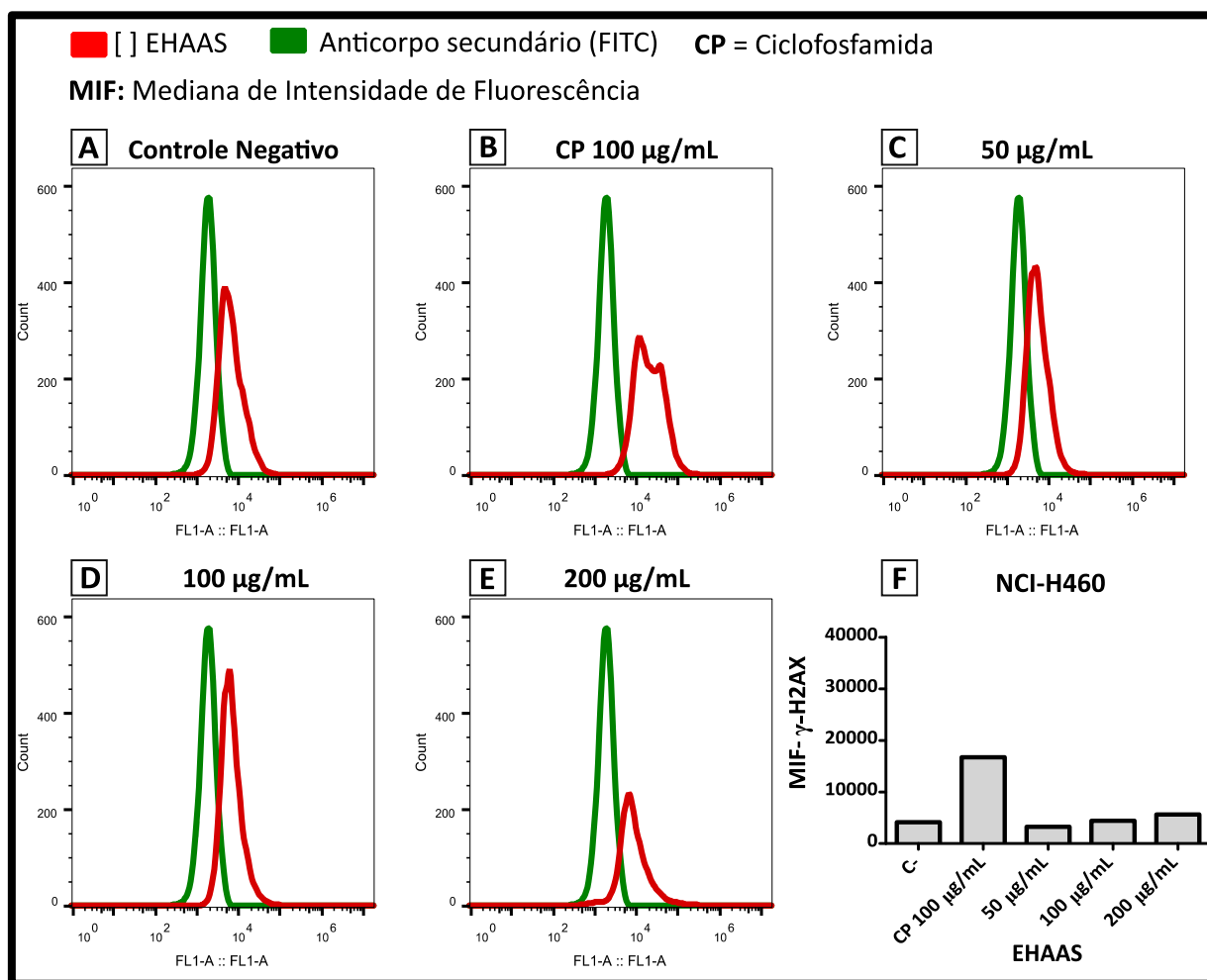
Figura 24 – Histogramas do ensaio de histona γ -H2AX da linhagem A549



Resultados do ensaio de histona γ -H2AX da linhagem tumoral A549. De (A) a (E), histogramas mostrando a intensidade de fluorescência de marcação (eixo x) e quantidade e células marcadas com o anticorpo (eixo y). Em verde: marcação com o anticorpo secundário conjugado com FITC e em vermelho: controle negativo (sem tratamento com drogas), ciclofosfamida a 100 µg/mL e concentrações crescentes de EHAAS (50, 100, 200 µg/mL). Desvios dos histogramas das amostras no eixo "x" do gráfico representam a marcação real da proteína histona γ -H2AX. Em (F) histograma representando a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) relacionada à marcação da proteína histona γ -H2AX (eixo y) e diferentes tratamentos (eixo x). No gráfico observa-se um elevado dano do tratamento com EHAAS a 50 µg/mL. Não foram realizadas análises estatísticas para o ensaio.

A linhagem NCI-H460 se mostrou bastante sensível à droga ciclofosfamida, a qual teve um efeito altamente clastogênico na linhagem. Os tratamentos com EHAAS, em contrapartida, não se mostraram genotóxicos à linhagem (Figura 25).

Figura 25 – Histogramas do ensaio de histona γ -H2AX da linhagem NCI-H460



Resultados do ensaio de histona γ -H2AX da linhagem tumoral NCI-H460. De (A) a (E), histogramas mostrando a intensidade de fluorescência de marcação (eixo x) e quantidade e células marcadas com o anticorpo (eixo y). Em verde: marcação com o anticorpo secundário conjugado com FITC e em vermelho: controle negativo (sem tratamento com drogas), CP a 100 μ g/mL e concentrações crescentes de EHAAS (25 a 400 μ g/mL). Desvios dos histogramas das amostras no eixo "x" do gráfico representam a marcação real da proteína histona γ -H2AX. Em (F) histograma representando a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) relacionada à marcação da proteína histona γ -H2AX (eixo y) e diferentes tratamentos (eixo x). Os resultados demonstram que a CP a 100 μ g/mL foi a única a causar genotoxicidade na linhagem celular. Não foram realizadas análises estatísticas para o ensaio.

7 DISCUSSÃO

O câncer de pulmão de células não pequenas é conhecido por sua alta morbidade e mortalidade, com uma taxa de sobrevivência de apenas 5 anos (ALTORKI *et al.*, 2019). Entre os cânceres de pulmão, o CPCNP é o de maior recorrência, possuindo diversos subtipos histológicos que, por sua vez, apresentam inúmeros perfis genéticos (ALTORKI *et al.*, 2019). Estes perfis genéticos auxiliam no desenvolvimento de terapias direcionadas e tratamentos mais específicos ao câncer (HIRSCH *et al.*, 2017; TERLIZZI *et al.*, 2019). Entretanto, apesar da boa resposta inicial a fármacos que se utilizam de alvos moleculares direcionados, como os inibidores de tirosina quinase (TKIs) para mutantes dos genes *EGFR* e *ALK*, o prognóstico da doença permanece preocupante, principalmente pelo comum desenvolvimento de resistência das células a estes medicamentos (HIRSCH *et al.*, 2017).

Ademais, alguns pacientes não se enquadram em terapias que se utilizam destes alvos moleculares, como os detentores de mutações no gene *KRAS* (MASSARELLI *et al.*, 2007; RE *et al.*, 2017). Esta mutação se mostra de grande relevância, já que está presente em 25% dos pacientes com adenocarcinomas de pulmão e é mutuamente excludente a mutações no gene *EGFR*, implicando assim em uma baixa resposta aos *EGFR*/TKIs (HIRSCH *et al.*, 2017). Apesar de inúmeras tentativas, o desenvolvimento de terapias direcionadas a mutantes do gene *KRAS* não têm se mostrado muito promissoras (HIRSCH *et al.*, 2017).

Em casos onde terapias direcionadas não são uma opção, os tratamentos de linha de frente continuam sendo através de medicamentos à base de platina (cisplatina e carboplatina) combinado ou não a sessões de radioterapia. Entretanto, como nos demais perfis genéticos, o desenvolvimento de resistência é recorrente (HIRSCH *et al.*, 2017).

Em vista disto, demonstra-se a necessidade do desenvolvimento de drogas que se utilizem de outros mecanismos de morte, ou a combinação de fármacos convencionais com outras estratégias terapêuticas (HUANG *et al.*, 2017). Uma das maneiras de atenuar estas lacunas terapêuticas é a bioprospecção de novas

moléculas, as quais podem apresentar efeitos promissores no combate às células neoplásicas.

Entre diversas fontes de bioprospecção, a *A. sisalana* se mostra como um importante alvo biotecnológico, em vista dos variados efeitos terapêuticos observados (**Tabela 1**). Além do mais, o extrato de hidrólise ácida da *A. sisalana* (EHAAS) se mostrou capaz de induzir efeitos citotóxicos em células Vero (ARALDI *et al.*, 2018) e antineoplásicos em células de melanoma metastático (FAVATO, 2020), características atribuídas pelos autores à presença de altas concentrações de saponinas em sua composição (ARALDI *et al.*, 2018).

Neste sentido, o presente trabalho investigou os efeitos citotóxicos e antineoplásicos causados pelo EHAAS em linhagens de CPCNP (A549 e NCI-H460), ambas mutantes para o gene *KRAS*, e uma linhagem fibroblástica normal de pulmão (MRC-5). A linhagem MRC-5 foi utilizada a fim de investigar possíveis efeitos nas CAFs (células fibroblásticas associadas ao câncer), que compõem o microambiente neoplásico. A droga ciclofosfamida (CP) foi utilizada para comparações entre efeitos tóxicos gerados pelo extrato e uma droga antineoplásica conhecida.

Inicialmente, investigou-se os efeitos citotóxicos do EHAAS e CP. Para isso, utilizou-se o ensaio de Anexina V/IP, permitindo investigar a viabilidade celular e suas vias de morte (apoptose e necrose). Neste ensaio, foi demonstrada uma elevada quimiorresistência da linhagem neoplásica NCI-H460, com efeitos citotóxicos mais relevantes apenas nas maiores concentrações do extrato (200 e 400 µg/mL) (**Figura 13**).

As linhagens A549 e MRC-5 se comportaram de maneiras bastante similares frente ao extrato, apresentando uma relação de dose dependência a partir da concentração de 100 µg/mL e baixa citotoxicidade em concentrações menores do extrato (25 a 75 µg/mL) (**Figura 14**). Entretanto, a linhagem A549 se mostrou mais suscetível aos tratamentos com CP 100 µg/mL e EHAAS a 400 µg/mL, comparado à linhagem MRC-5 (**Figura 14**).

A linhagem NCI-H460 geralmente se mostra menos resistente que a

linhagem A549 (GOMEZ-CASAL *et al.*, 2013; HOWARD *et al.*, 1999; JI *et al.*, 2018; KRAUS-BERTHIER *et al.*, 2000), entretanto, os resultados obtidos frente ao EHAAS condizem com dados prévios da literatura, onde foram relatados que células NCI-H460 apresentam pouca suscetibilidade à ação de algumas saponinas (principais componentes do EHAAS) (CHEN *et al.*, 2011; QIAN *et al.*, 2020) e se mostram quimiorresistentes à droga ciclofosfamida (KRAUS-BERTHIER *et al.*, 2000) (**Figura 14**).

Quanto às vias de morte celular, observou-se que, em concentrações menos citotóxicas (25 a 100 µg/mL), o EHAAS causou mais morte por apoptose nas linhagens A549 e NCI-H460 (CPCNP) (**Figura 14**). Entretanto, concentrações mais citotóxicas (200 e 400 µg/mL) provocaram mais mortes por necrose. Curiosamente, o tratamento com CP na linhagem A549 também induziu altos níveis de necrose, indicando um provável mecanismo de resistência à apoptose na linhagem (**Figura 14**).

A evasão das vias programadas de apoptose é uma das formas mais comuns de resistência terapêutica no câncer, sendo alcançada através de mecanismos pouco esclarecidos das células neoplásicas (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020). Para a linhagem A549 (CPCNP), diferentes vias e marcadores moleculares têm sido associados à fuga da apoptose e resistência terapêutica, destacando-se a presença de membros das famílias Bcl-2 e NF-κβ (HUISMAN *et al.*, 2002; JI *et al.*, 2018; LANGSCH *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2009; ZOU *et al.*, 2015). Ademais, recentes estudos têm demonstrado a importância da regulação das vias de morte celular no câncer de linhagens A549, tais como: superexpressão de microRNAs (microRNA-196a), superexpressão do gene *BCL-2* (anti-apoptótico) e transportadores *ABCC1* (MRP1)(LI *et al.*, 2016; MOHR *et al.*, 2002).

Embora as características intrínsecas das linhagens neoplásicas possam influenciar na fuga dos mecanismos apoptóticos, os altos índices de necrose observados na linhagem MRC-5 (controle) (**Figura 11**), são indicadores que o acesso às vias necróticas possivelmente não são apenas reflexo da resistência das linhagens de CPCNP, mas sim, de características do próprio EHAAS.

A promoção da necrose pelo EHAAS nas três linhagens celulares

apresenta alta relevância, visto que a via intrínseca (ou mitocondrial) da apoptose é o principal mecanismo de morte induzido pelos extratos da *A. sisalana* (CHEN *et al.*, 2011; SOBOLEWSKA *et al.*, 2020). Nossos dados de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) corroboram com o não-acesso do EHAAS às vias mitocondriais de morte celular, já que não foram observadas alterações do $\Delta\Psi_m$ nas três linhagens de pulmão (**Figura 18**).

A indução de morte pela via intrínseca da apoptose tem sido relacionada, principalmente, à elevada concentração de saponinas esteroidais da *A. sisalana* e sua alta afinidade com membranas biológicas, incluindo a mitocondrial (AUGUSTIN *et al.*, 2011; DE OLIVEIRA *et al.*, 2019). No entanto, a heterogeneidade de compostos ainda não estudados da *A. sisalana* e do EHAAS podem estar relacionados a vias alternativas de morte celular. Neste sentido, é sabido que a necrose pode ser induzida por vias de morte celular mais reguladas, como a necroptose (NAJAFOV; CHEN; YUAN, 2017).

Nossos dados demonstram que a citotoxicidade do EHAAS nas linhagens estudadas não apresenta relação com o $\Delta\Psi_m$ e vias mitocondriais de morte celular. Interessantemente, a ativação de algumas vias da apoptose extrínseca (não mitocondrial) compartilham dos mesmos receptores e fatores indutores da via da necroptose. Uma das vias clássicas de morte ocorre pela interação do fator de necrose tumoral (TNF- α) com o receptor TNF 1 (TNFR1), subsequente ativação dos receptores RIP1 e RIP3, e indução de vias de sobrevivência (pela ativação da via NF- $\kappa\beta$) ou de morte celular, pelas vias de apoptose extrínseca ou necroptose (FULDA, 2013; GALLUZZI *et al.*, 2012; NAJAFOV; CHEN; YUAN, 2017). A convergência entre apoptose extrínseca e necroptose está geralmente associada à presença (apoptose) ou ausência (necroptose) das caspases 8 e 3 (NAJAFOV; CHEN; YUAN, 2017; SU *et al.*, 2016).

No câncer, a exploração da via de necroptose e a investigação de seus agentes indutores têm ganhado atenção nos últimos anos, já que, tanto a inibição, quanto a indução desta via, têm sido apontados como formas de erradicar células resistentes à apoptose (KEPP *et al.*, 2011). Neste sentido, sugere-se a

investigação do papel do EHAAS na indução da via de necroptose, por meio de técnicas de imunoensaio que identifiquem diferentes marcadores da necroptose (p.ex. RIP1 e RIP3).

Além da importante participação nas vias de morte celular, as mitocôndrias participam ativamente na manutenção do ambiente redox das células (GLASAUER; CHANDIL, 2014). A desestabilização mitocondrial e o desacoplamento energético da cadeia respiratória levam ao desbalanço do ambiente redox, culminando na hiperprodução de espécies reativas de oxigênio (ROS). Todavia, a produção de ROS também é desestabilizada em vias de morte independentes da mitocôndria, como a necrose (KEPP *et al.*, 2011). O desbalanço da dinâmica das ROS e altos níveis intracelulares podem induzir danos irreversíveis ao DNA e à ativação de diversas cascatas de sinalização pró sobrevivência e/ou antitumorais (PERILLO *et al.*, 2020). Deste modo, a fim de investigar a dinâmica das ROS e o estresse oxidativo das células, assim como o potencial antioxidante do EHAAS, foram analisadas a produção de ROS por meio da sonda DCFH-DA.

O tratamento das linhagens A549 (CPCNP) e MRC-5, em concentrações mais citotóxicas do extrato (200 e 400 µg/mL), apresentaram uma redução nos níveis de ROS (**Figura 22**). O estresse oxidativo gerado durante os processos de morte celular tendem a aumentar significativamente as espécies reativas de oxigênio (KEPP *et al.*, 2011). Contudo, estudos têm demonstrado o potencial antioxidante das saponinas, *A. sisalana* e EHAAS em diferentes linhagens celulares (ARALDI *et al.*, 2018; FAVATO, 2020; PAULINO, 2019). Nossos dados corroboram esses achados, onde observamos o efeito antioxidante do extrato nas linhagens MRC-5 e A549 (**Figura 22**). Desta forma, sugerimos que o equilíbrio do estresse oxidativo durante a morte celular nas linhagens MRC-5 e A549 está relacionado ao potencial antioxidante do EHAAS, comportamento similar aos demonstrados em trabalhos prévios do nosso grupo (Dados não publicados-FAVATO, 2020; PAULINO, 2019)

A linhagem MRC-5 tratada com 25 µg/mL do EHAAS apresentou níveis elevados de estresse oxidativo (**Figura 19**). Deste modo, sugerimos que concentrações iguais ou abaixo de 25 µg/mL não apresentam efeito antioxidante

suficientes para suprimir a produção de ROS desencadeada pelo processo de morte celular.

Os resultados indicam que o EHAAS possui interessantes propriedades terapêuticas exploráveis. Todavia, os efeitos citotóxicos do extrato nas menores concentrações (25-100 µg/mL) se mostram muito similares entre as linhagens MRC-5 (controle) e A549 (CPCNP) (**Figura 22**), indicando que, embora o EHAAS apresente propriedades interessantes no tratamento do câncer, é necessário investigar formas mais diretas de administração sobre as células alvo, otimizando assim a ação e segurança do extrato.

Sabidamente, boa parte dos antineoplásicos de rotina apresentam efeitos adversos (HUANG *et al.*, 2017). Em especial, a ciclofosfamida (CP) destaca-se como uma droga de elevado potencial mutagênico, correlacionado ao desenvolvimento de leucopenia e leucemia mieloide aguda (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009; POVIRK; SHUKER, 1994; REHMAN *et al.*, 2012). Neste sentido, a investigação do potencial mutagênico e efeitos a longo prazo é crucial na prospecção e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Baseado nisto, investigamos o potencial genotóxico do EHAAS por imunomarcagem da proteína histona γ -H2AX, que identifica DSBs (SHARMA; SINGH; ALMASAN, 2012).

No ensaio de histona γ -H2AX, a CP foi utilizada como um controle de genotoxicidade, considerando seu amplo uso na literatura (IARC, 1987). Embora os efeitos da CP estejam associados aos produtos da metabolização hepática: acroleína e mostarda fosforamida, o produto de sua transformação espontânea "4-hidroxíciclofosfamida" também apresenta alto potencial clastogênico, teratogênico e citotóxico (HALES, 1982), o que justifica seu uso para o fim empregado no ensaio.

Devido à indesejada citotoxicidade provocada na linhagem saudável MRC-5, a concentração de 400 µg/mL do extrato foi excluída do desenho experimental do ensaio histona γ -H2AX (**Figura 23**). Concentrações de 25 µg/mL e 75 µg/mL, também foram excluídas, respectivamente, por apresentarem respostas baixas ou nulas em todos os ensaios/linhagens e por apresentarem respostas muito similares às demais concentrações intermediárias (50 e 100 µg/mL). Deste modo, para o ensaio

da histona γ -H2AX, as concentrações do EHAAS de 50, 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ foram avaliadas, além da droga CP a 100 $\mu\text{g/mL}$ (**Figura 23**).

Curiosamente, a droga CP não causou danos ao DNA na única linhagem a qual foi citotóxica - A549. Entretanto, o mecanismo de ação da CP se utiliza da formação de ligações cruzadas com o DNA (*crosslinks*), interferindo na replicação do material genético (**Figura 24**) (EMADI; JONES; BRODSKY, 2009). Portanto, apesar do potencial mutagênico apresentado, a CP não necessariamente induz DSBs.

Interessantemente, a linhagem NCI-H460 demonstrou os maiores danos sofridos pela droga (**Figura 25**) indicando maior sensibilidade a droga CP. A ausência de efeitos citotóxicos do EHAAS na linhagem NCI-H460 (**Figura 25**) são indicativos de que estas células não internalizaram o extrato. Em estudos anteriores, nosso grupo sugeriu que a alta resistência ao EHAAS em células de carcinoma papilífero de tireoide está relacionada à superexpressão dos ABC transportadores MRP1 e MRP3 (PAULINO, 2019, no prelo). Neste sentido, se faz importante a investigação dos papéis destes transportadores no comportamento da linhagem de CPCNP NCI-H460, utilizando técnicas de imunomarcagem nas proteínas MRP1 e MRP3.

Para a linhagem controle (MRC-5) observou-se uma baixa genotoxicidade de todos os tratamentos na linhagem controle MRC-5, com CP e EHAAS a 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentando os maiores danos para a linhagem (**Figura 23**). Esta genotoxicidade, embora baixa, concomitante aos efeitos citotóxicos provocados pelo EHAAS na linhagem MRC-5, reforçam a necessidade de uma entrega mais direcionada dos componentes do extrato, diminuindo possíveis riscos sistêmicos. Para isto, a melhor compreensão da composição do extrato se faz necessária.

Neste sentido, Araldi e colaboradores (2018) demonstraram que o EHAAS é predominantemente composto por estruturas químicas muito similares às saponinas comerciais (ARALDI *et al.*, 2018), contudo, o ensaio realizado pelo autor não foi capaz de identificar os tipos de saponinas presentes no EHAAS, ou mesmo outros compostos com possíveis papéis terapêuticos.

Neste sentido, técnicas cromatográficas (p.ex. cromatografia líquida de alta performance - HPLC) associadas a técnicas espectrométricas (p.ex. espectrometria de massa - MS) e/ou espectroscópicas (p.ex. ressonância magnética nuclear-NMR) podem ser empregadas no isolamento e identificação mais específica do conteúdo do EHAAS, possibilitando a caracterização de moléculas conhecidas e, possivelmente, novas moléculas de interesse terapêutico (KITE; PORTER; SIMMONDS, 2007; OLESZEK, 2002).

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Com base na elevada necrose e presença de morte por apoptose, desencadeada pela ação da EHAAS em linhagens MRC-5 e A549, concomitante com a ausência de depleção do potencial mitocondrial (com exceção de EHAAS a 400 µg/mL- A549), enfatizamos a importância de investigar o papel do extrato EHAAS na indução da necroptose nas linhagens MRC-5 e A549, considerando os potenciais terapêuticos desta via no câncer. Para isto, marcadores da via como RIP1 e RIP3 podem ser identificados por meio de técnicas de imunomarcagem.
- A linhagem NCI-H460 apresentou elevada quimiorresistência nos tratamentos com EHAAS. A baixa resposta citotóxica da NCI-H460 ao extrato, pode estar relacionada a uma baixa internalização do EHAAS. A baixa internalização podendo estar relacionada à superexpressão dos ABC transportadores MRP1 e MRP3 – observado em diferentes células tumorais e já observado por nosso grupo em células de carcinoma papilífero de tireoide (PAULINO, 2019, no prelo) e melanoma (FAVATO, 2020, no prelo). Para tanto, se faz necessária a investigação do papel destes transportadores na quimiorresistência ao EHAAS da linhagem NCI-H460.
- O EHAAS apresentou significativos efeitos antioxidantes em linhagens MRC-5 e A549, nas concentrações mais citotóxicas do extrato (200 e 400 µg/mL). Com base nisso, sugerimos que o equilíbrio do estresse oxidativo durante a morte celular nas linhagens MRC-5 e A549 está relacionado ao potencial antioxidante

do EHAAS. Entretanto, o quanto este efeito antioxidante auxilia na citotoxicidade ou induz um efeito citoprotetor é inconcluso.

- Os efeitos citotóxicos e baixa genotoxicidade na linhagem MRC-5 demonstram a necessidade de uma administração mais direcionada dos componentes do extrato, diminuindo possíveis riscos sistêmicos.
- Por fim, considerando os interessantes efeitos citotóxicos e antioxidantes demonstrados neste estudo, é de grande relevância investigar o perfil molecular do EHAAS, possibilitando a elucidação de sua composição e abrindo portas para a descoberta de possíveis novas biomoléculas de interesse biotecnológico.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, L. Are we facing a noncommunicable disease pandemic? **Journal of Epidemiology and Global Health**, v. 7, n. 1, p. 5–9, 2017.
- ALTORKI, N. K. et al. The lung microenvironment: an important regulator of tumour growth and metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 1, p. 9–31, 2019.
- ANDREYEV, A. Y.; KUSHNAREVA, Y. E.; STARKOV1, A. A. Metabolism, Mitochondrial Species, of Reactive Oxygen. **Biochemistry**, v. 70, n. 2, p. 246_264, 2005.
- ANGUIANO-SEVILLA, L. A. et al. Apoptosis induction of agave lechuguilla torrey extract on human lung adenocarcinoma cells (SK-LU-1). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.
- ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74–82, 2015.
- ARALDI, R. P. et al. Analysis of Mutagenic Potential of Therapeutic Vaccine Based on BPV-1 E6 Recombinant Protein Combined with Different Adjuvants. **Journal of Veterinary Medicine and Health**, v. 1, n. 1, p. 1–10, 2017.
- ARALDI, R. P. et al. Analysis of antioxidant, cytotoxic and mutagenic potential of Agave sisalana Perrine extracts using Vero cells, human lymphocytes and mice polychromatic erythrocytes. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 98, n. December 2017, p. 873–885, 2018.
- AUGUSTIN, J. M. et al. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 435–457, 2011.
- BALBANI, A. P. S.; STELZER, L. B.; MONTOVANI, J. C. Excipientes de medicamentos e as informações da bula. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 3, p. 400–406, 2006.
- BALGKOURANIDOU, I.; LILOGLOU, T.; LIANIDOU, E. S. Lung cancer epigenetics: Emerging biomarkers. **Biomarkers in Medicine**, v. 7, n. 1, p. 49–58, 2013.
- BEDARD, K.; KRAUSE, K. H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 245–313, 2007.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396–398, 2007.
- BOTURA, M. B. et al. In vitro ovicidal and larvicidal activity of Agave sisalana Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary Parasitology**, v. 192, n. 1–3, p. 211–217, 2013.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- CARNEIRO, B. A.; EL-DEIRY, W. S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 17, n. 7, p. 395–417, 2020.

- CHEN, P. Y. et al. Isolation and immunomodulatory effect of homoisoflavones and flavones from *Agave sisalana* Perrine Ex Engelm. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 1789–1795, 2009.
- CHEN, P. Y. et al. Cytotoxic steroidal saponins from *Agave sisalana*. **Planta Medica**, v. 77, n. 9, p. 929–933, 2011.
- COLEMAN, W. B.; TSONGALIS, G. J. **The molecular basis of human cancer**. 2. ed. New York: Springer Science, 2016.
- COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular Princípios e Técnicas**. 1. ed. São Paulo: Artmed, 2012.
- DE GROOT, P.; MUNDEN, R. F. Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. **Radiologic Clinics of North America**, v. 50, n. 5, p. 863–876, 2012.
- DE OLIVEIRA, J. V. A. et al. Saponin-rich fraction from *Agave sisalana*: effect against malignant astrocytic cells and its chemical characterisation by ESI-MS/MS. **Natural Product Research**, v. 33, n. 12, p. 1769–1772, 2019.
- DUARTE, M. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7, p. 16, 2006.
- DUNDER, R. J. et al. Potencial anti-inflamatório e analgésico do extrato hidrolisado de *Agave sisalana* Perrine ex Engelm, Asparagaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 376–381, 2010.
- DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.
- EMADI, A.; JONES, R. J.; BRODSKY, R. A. Cyclophosphamide and cancer: Golden anniversary. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 6, n. 11, p. 638–647, 2009.
- FAVATO, R. A. **ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DO EXTRATO DA HIDRÓLISE ÁCIDA DA *Agave sisalana* Perrine (EHAAS) EM LINHAGENS CELULARES DE MELANOMA METASTÁTICO**. [s.l.] UNILA, 2020.
- FIGUEIREDO, C. C. M. **Atividade antioxidante, antiglicante e microencapsulação de extrato e saponinas obtidas de *Tribulus terrestris***. [s.l.] UNESP, 2018.
- FRANCIS, G. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **British Journal of Nutrition**, v. 88, n. 6, p. 587–605, 2002.
- FRICK, A. et al. Immune cell-based screening assay for response to anticancer agents : applications in pharmacogenomics. **Pharmacogenomics and Personalized Medicine**, v. 8, p. 81–98, 2015.
- FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Tumor microenvironment abnormalities: Causes, consequences, and strategies to normalize. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 101, n. 4, p. 937–949, 2007.
- FULDA, S. The mechanism of necroptosis in normal and cancer cells. **Cancer Biology and Therapy**, v. 14, n. 11, p. 999–1004, 2013.

- GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.
- GOLDBERG, A. D.; ALLIS, C. D.; BERNSTEIN, E. Epigenetics: A Landscape Takes Shape. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 635–638, 2007.
- GRIDELLI, C. et al. Non-small-cell lung cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1–16, 2015.
- HALES, B. F. Comparison of the Mutagenicity and Teratogenicity of Cyclophosphamide and Its Active Metabolites, 4-Hydroxycyclophosphamide, Phosphoramidate Mustard, and Acrolein. **Cancer Research**, v. 42, n. 8, p. 3016–3021, 1982.
- HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 309–322, 2012.
- HASSANPOUR, S. H.; DEGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, 2017.
- HERBST, R. S.; MORGENZTERN, D.; BOSHOFF, C. The biology and management of non-small cell lung cancer. **Nature**, v. 553, n. 7689, p. 446–454, 2018.
- HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. Higgins, C F. 1992. „ABC transporters: from microorganisms to man.“ *Annual review of cell biology* 8: 67–113. doi:10.1146/annurev.cb.08.110192.000435.an. **Annual review of cell biology**, v. 8, p. 67–113, 1992.
- HIRSCH, F. R. et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. **The Lancet**, v. 389, n. 10066, p. 299–311, 2017.
- HOWARD, R. B. et al. Characterization of a highly metastatic, orthotopic lung cancer model in the nude rat. **Clinical and Experimental Metastasis**, v. 17, n. 2, p. 157–162, 1999.
- HUANG, C. Y. et al. A review on the effects of current chemotherapy drugs and natural agents in treating non-small cell lung cancer. **BioMedicine (France)**, v. 7, n. 4, p. 12–23, 2017.
- HUISMAN, C. et al. Paclitaxel triggers cell death primarily via caspase-independent routes in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 2, p. 596–606, 2002.
- IARC, I. A. FOR R. ON C. EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS Overall Evaluations of Carcinogenicity : **IARC Monographs**, v. 1–42, 1987.
- JI, K. et al. Regulation of Apoptosis and Radiation Sensitization in Lung Cancer Cells via the Sirt1/NF- κ B/Smac Pathway. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 48, n. 1, p. 304–316, 2018.
- JUN, C. J. et al. Hypoxia-Inducible Factors and Cancer. **Current Sleep Medicine Reports**, v. 176, n. 12, p. 1–17, 2017.
- KALYANARAMAN, B. et al. Free Radical Biology & Medicine Measuring reactive

oxygen and nitrogen species with fluorescent probes : challenges and limitations. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 1, p. 1–6, 2012.

KAN, Z. et al. Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. **Nature**, v. 466, n. 7308, p. 869–873, 2010.

KATHAWALA, R. J. et al. The modulation of ABC transporter-mediated multidrug resistance in cancer: A review of the past decade. **Drug Resistance Updates**, v. 18, p. 1–17, 2015.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 221–237, 2011.

KERSTING, B. M. et al. Differential Frequencies of p16 INK4a Promoter Hypermethylation, p53 Mutation, and K-ras Mutation in Exfoliative Material Mark the Development of Lung Cancer in Symptomatic Chronic Smokers. v. 18, n. 18, p. 3221–3229, 2019.

KIM, D. H. et al. p16INK4a and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. **Cancer Research**, v. 61, n. 8, p. 3419–3424, 2001.

KITE, G. C.; PORTER, E. A.; SIMMONDS, M. S. J. Chromatographic behaviour of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, n. 2, p. 177–183, 2007.

KRAUS-BERTHIER, L. et al. Histology and sensitivity to anticancer drugs of two human non-small cell lung carcinomas implanted in the pleural cavity of nude mice. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 1, p. 297–304, 2000.

LANGSCH, S. et al. miR-29b mediates NF- κ B signaling in KRAS-Induced non-small cell lung cancers. **Cancer Research**, v. 76, n. 14, p. 4160–4169, 2016.

LI, J. H. et al. Inhibition of microRNA-196a might reverse cisplatin resistance of A549/DDP non-small-cell lung cancer cell line. **Tumor Biology**, v. 37, n. 2, p. 2387–2394, 2016.

LOPACZYNSKI, W.; ZEISEL, S. H. Antioxidants, programmed cell death, and cancer. **Nutrition Research**, v. 21, n. 1–2, p. 295–307, 2001.

LUO, S. et al. Antioxidant Activity and Components of the Ethanol Extract of Sisal Waste. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 248–257, 2019.

MALHOTRA, J. et al. Risk factors for lung cancer worldwide. **European Respiratory Journal**, v. 48, n. 3, p. 889–902, 2016.

MASSARELLI, E. et al. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 10, p. 2890–2896, 2007.

MOGHIMIPOUR, E.; HANDALI, S. Saponin: Properties, Methods of Evaluation and Applications. **Annual Research & Review in Biology**, v. 5, n. 3, p. 207–220, 2015.

MOHAMMAD, I. S.; HE, W.; YIN, L. Understanding of human ATP binding cassette

superfamily and novel multidrug resistance modulators to overcome MDR. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 100, n. December 2017, p. 335–348, 2018.

MOHR, S. et al. Microarrays as cancer keys: An array of possibilities. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 14, p. 3165–3175, 2002.

MORENO-VILET, L. et al. In vitro assessment of agave fructans (*Agave salmiana*) as prebiotics and immune system activators. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 63, p. 181–187, 2014.

MURATA, M. et al. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 6, p. 793–802, 2004.

MWALE, M.; J. MASIKA, P.; FRANCIS, J. Anti-inflammatory and analgesic activities of the aqueous leaf extract of *Agave sisalana* in rats. **Scientific Research and Essays**, v. 7, n. 14, 2012.

NAJAFOV, A.; CHEN, H.; YUAN, J. Necroptosis and Cancer. **Trends in Cancer**, v. 3, n. 4, p. 294–301, 2017.

NELSON, D. L.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l: s.n.].

NOOTER, K. et al. Expression of the multidrug resistance-associated protein (MRP) gene in primary non-small-cell lung cancer. **Annals of Oncology**, v. 7, n. 1, p. 75–81, 1996.

OASHI, M. C. G. Estudo da cadeia produtiva como subsídio para pesquisa e desenvolvimento do agro negócio do sisal na Paraíba. p. 188, 1999.

OLESZEK, W. A. J-chr-A-2002-967-147.pdf. v. 967, p. 147–162, 2002.

PALMA, P. F. R. et al. Evaluation of annexin V and calcein-AM as markers of mononuclear cell apoptosis during human immunodeficiency virus infection. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 108–114, 2008.

PALMISANO, W. A. et al. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. **Cancer Research**, v. 60, n. 21, p. 5954–5958, 2000.

PAO, W.; CHMIELECKI, J. Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 11, p. 760–774, 2010.

PENG, X.; FENG, F.; ZHANG, W. Expression of multidrug resistance-associated protein in human non-small cell lung cancer. **Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases**, v. 22, n. 11, p. 655–658, 1999.

PERILLO, B. et al. ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 2, p. 192–203, 2020.

POOT, M. et al. Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, n. 12, p. 1363–1372, 1996.

POVIRK, L. F.; SHUKER, D. E. DNA damage and mutagenesis induced by nitrogen mustards. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 318, n. 3, p. 205–

226, 1994.

QIAN, S. et al. Paris saponin VII extracted from *Trillium tschonoskii* induces autophagy and apoptosis in NSCLC cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 248, n. June 2019, p. 112304, 2020.

RE, M. DEL et al. EGFR to acquired resistance to EGFR-TKIs in EGFR mutant NSCLC: a study on circulating tumor DNA. **Oncotarget**, v. 8, n. 8, p. 13611–13619, 2017.

REHMAN, M. U. et al. Cyclophosphamide-induced nephrotoxicity, genotoxicity, and damage in kidney genomic DNA of Swiss albino mice: The protective effect of Ellagic acid. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 365, n. 1–2, p. 119–127, 2012.

RIBEIRO, B. D. et al. Functional properties of saponins from sisal (*Agave sisalana*) and juá (*Ziziphus joazeiro*): Critical micellar concentration, antioxidant and antimicrobial activities. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 736–743, 2013.

SAITO, R. DE F. et al. **Fundamentos de Oncologia Molecular**, 2015.

SAMET, J. M. Review: radon and lung cancer. **Jnci**, v. 89, n. 10, p. 745–58, 1989.

SANTOS, E. M. C.; SILVA, O. A. DA. SISAL NA BAHIA - BRASIL. **Mercator (Fortaleza)**, v. 16, p. 13, 2017.

SANTOS, J. D. G. et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. **African Journal of Biotechnology**, v. 22, p. 6181–6184, 2009.

SANTOS, J. D. G. et al. Chemicals from *agave sisalana* biomass: Isolation and identification. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8761–8771, 2015.

SAVAGE, G. P. Saponins. **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, p. 5095–5098, 2003.

SHARMA, A.; SINGH, K.; ALMASAN, A. Histone H2AX Phosphorylation: A Marker for DNA Damage. **DNA Repair Protocols, Methods in Molecular Biology**, v. 920, p. 613–626, 2012.

SHOLL, L. M. The Molecular Pathology of Lung Cancer. **Surgical Pathology Clinics**, v. 9, n. 3, p. 353–378, 2016.

SHOPLAND, D. R.; EYRE, H. J.; PEACHACEK, T. F. Smoking-attributable cancer mortality in 1991: Is lung cancer now the leading cause of death among smokers in the United States? **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 16, p. 1142–1148, 1991.

SOBOLEWSKA, D. et al. **Saponins as cytotoxic agents: an update (2010–2018). Part I—steroidal saponins**. [s.l: s.n.]. v. 19

STEEG, P. S. Tumor metastasis: Mechanistic insights and clinical challenges. **Nature Medicine**, v. 12, n. 8, p. 895–904, 2006.

STEINBICHLER, T. B. et al. Cancer stem cells and their unique role in metastatic

- spread. **Seminars in Cancer Biology**, v. 60, n. September 2019, p. 148–156, 2020.
- SU, Z. et al. Cancer therapy in the necroptosis era. **Cell Death and Differentiation**, v. 23, n. 5, p. 748–756, 2016.
- SUGAWARA, I. et al. Preferential expression of the multidrug-resistance-associated protein (MRP) in adenocarcinoma of the lung. **International Journal of Cancer**, v. 64, n. 5, p. 322–325, 1995.
- SZADVARI, I.; KRIZANOVA, O.; BABULA, P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. **Physiological Research**, v. 65, p. S441–S453, 2016.
- TERLIZZI, M. et al. Drug resistance in non-small cell lung Cancer (NSCLC): Impact of genetic and non-genetic alterations on therapeutic regimen and responsiveness. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 202, p. 140–148, 2019.
- TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 2003.
- U.S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. **How Tobacco Smoke Causes Disease: The Biology and Behavioral Basis for Smoking-Attributable Disease**. [s.l.: s.n.].
- VAISSIÈRE, T. et al. Quantitative analysis of DNA methylation profiles in lung cancer identifies aberrant DNA methylation of specific genes and its association with gender and cancer risk factors. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p. 243–252, 2009.
- VIZLER, C.; GLAVINAS, H. Flow Cytometric Cytotoxicity Assay for Measuring Mammalian and Avian NK Cell Activity. v. 162, p. 158–162, 2002.
- WADDINGTON, C. H. The epigenotype. 1942. **International journal of epidemiology**, v. 41, n. 1, p. 10–13, 2012.
- WANG, W. et al. Fluorescence Imaging of Mitochondria with Three Different Sets of Signals Based on Fluorene Cation Fluorescent Probe. **Journal of Fluorescence**, v. 29, p. 1457–1465, 2019.
- WICHA, M. S.; LIU, S.; DONTU, G. Cancer stem cells: An old idea - A paradigm shift. **Cancer Research**, v. 66, n. 4, p. 1883–1890, 2006.
- WIEL, C. et al. BACH1 Stabilization by Antioxidants Stimulates Lung Cancer Metastasis. **Cell**, v. 178, n. 2, p. 330- 345.e22, 2019.
- WU, C. P.; HSIEH, C. H.; WU, Y. S. The emergence of drug transporter-mediated multidrug resistance to cancer chemotherapy. **Molecular Pharmaceutics**, v. 8, n. 6, p. 1996–2011, 2011.
- WU, Q.; NI, X. ROS-Mediated DNA Methylation Pattern Alterations in Carcinogenesis. **Current Drug Targets**, v. 16, n. 1, p. 13–19, 2015.
- YANG, T. M. et al. Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 41, n. 1, p. 14–23, 2009.
- ZHANG, X.; LIU, L.; LIN, C. Isolation, structural characterization and antioxidant

activity of a neutral polysaccharide from sisal waste. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 10–18, 2014.

ZHAO, Y. et al. ABCC3 as a marker for multidrug resistance in non-small cell lung cancer. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1–6, 2013.

ZÖCHBAUER-MÜLLER, S.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D. Molecular Pathogenesis of Lung Cancer. **Annual Review of Physiology**, v. 64, n. 1, p. 681–708, 2002.

ZOROVA, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50–59, 2018.

ZOU, Y. et al. Apoptosis of human non-small-cell lung cancer A549 cells triggered by evodiamine through MTDH-dependent signaling pathway. **Tumor Biology**, v. 36, n. 7, p. 5187–5193, 2015.

ANEXO A – DOCUMENTAÇÃO SISGEN



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A177E74

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A177E74**
 Usuário: **Edislane barreiros de Souza**
 CPF/CNPJ: **444.755.439-91**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**
 Finalidade do Acesso:
 Pesquisa Científica **Bioprospecção** **Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

**Agave sisalana
 saponinas**

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Estudo do potencial anticâncer de extratos de Agave sisalana em diferentes linhagens de carcinoma.**

Equipe

Edislane barreiros de Souza **UNESP - faculdade de Ciências e Letras**
Rodrigo Pinheiro Araldi **UNILA - Universidade Federal da Integração Latino-Amer**

Parceiras Nacionais

05.497.968/0001-99 / Secretaria de Ciência Tecnologia e Inovação do Estado da Bahia

Data do Cadastro: **01/04/2019 17:06:16**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:53** de **02/04/2019**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**