



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE BIOCÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**



SILVIA MARIA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE DIBENZO[ b, f ]OXEPINAS  
OBTIDAS DE *BAUHINIA ACURUANA* EM CÉLULAS TUMORAIS**

Recife  
2020

SILVIA MARIA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE DIBENZO[ b, f ]OXEPINAS OBTIDAS DE  
*BAUHINIA ACURUANA* EM CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Área de concentração:** Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos

**Orientadora:** Profa. Dra. Gardenia C. Gadelha Militão

**Coorientador:** Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

Recife  
2020

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Souza, Silvia Maria de

Avaliação da citotoxicidade de dibenzo[ b, f ]oxepinas obtidas de *Bauhinia acuruana* em células tumorais / Silvia Maria de Souza - 2020.

76 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Gardenia C. Gadelha Militão

Coorientador: Daniel Pereira Bezerra

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Recife, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. Câncer 2. *Bauhinia acuruana* 3. Citotoxicidade

I. Militão, Gardenia C. Gadelha (Orientadora) II. Bezerra, Daniel Pereira (Coorientador) III. Título

616.994 CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-198

SILVIA MARIA DE SOUZA

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE DIBENZO[ b, f ]OXEPINAS OBTIDAS DE  
*BAUHINIA ACURUANA* EM CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito á obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

**Área de concentração:** Microbiologia, Bioprocessos e Bioprodutos

Aprovada em: 18 /02 /2020

BANCA EXAMINADORA

---

Profª. Dr. Gardênia Carmen Gadelha Militão

UFPE

---

Profª. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima

UFPE

---

Prof. Dr. Thiago David dos Santos Silva

UPE

Dedico este trabalho a duas pessoas muito queridas e amadas, e que foram de um grande incentivo para a realização desta grande conquista. Primeiramente ao meu eterno companheiro, namorado, noivo e logo esposo Sillas Douglas. Sua grande ajuda e compreensão durante esses dois anos de jornada pós acadêmicos foram de extrema importância. Em segundo, in memoriam à minha querida e eterna amada tia-mãe, Terezinha Maria. Meu início de mestrado foi bastante difícil, em virtude de sua partida tão repentina a casa do nosso Pai Celeste. Sua ausência tem deixado meus dias vazios, mais sigo em paz porque sei que estais bem. Logo, essa vitória também é sua, e sei que no céu estais a torcer por mim.

A Deus seja dada toda honra, toda glória, pelos séculos e séculos. Amém

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, acima de tudo, a Deus, por todo amor, cuidado e amparo que sempre tem comigo, pelas oportunidades fornecidas e pelas ricas experiências vividas durante essa trajetória, assim como as pessoas das quais colocou em meu caminho, para assim tornar mais leve o percurso. Eterna gratidão por me ajudar a chegar até onde cheguei, e pelas quais ainda chegarei.

A minha mãe, Gilvanete Maria da Silva, que sempre batalhou para o meu sustento, dedicando sua vida em prol de minha formação como pessoa cidadã e profissional. Não há palavras apropriadas para externar todo o meu reconhecimento e carinho. Gratidão por tudo. Essa conquista dedico a você, mãe.

A meu noivo e logo esposo Sillas Douglas. Agradeço pelo seu apoio, amor e principalmente pela sua compreensão e paciência, em entender quando pouco nos víamos. Obrigada também pelas ajudas, através das minhas ligações impacientes por não conseguir realizar algum procedimento em algum software, e você com seu amor e paciência, apesar que perdia algumas vezes, rrsrsrs, me esclarecia tirando-me as dúvidas e me auxiliando no processo. Obrigada por toda dedicação e disponibilidade fornecidas a mim em todas as vezes que eu precisava. Você realmente é um presente de Deus, pois em todas as minhas conquistas estavas lá me ajudando de alguma forma. Logo essa conquista também é sua.

À minha grande família: Wanessa Thais, Priscila Karla, Tio Zé, Tia Dalva, Sandra, Vinicius, Thais, Thatiane, aos meus sogros João Batista, Edineide Teodosio, a minha cunhada Priscila Teodosio, muito obrigada a todos vocês pela torcida de sempre.

Ao irmão que Deus me concedeu, Phellyphe, obrigada por toda amizade, carinho, cuidado, pelas nossas conversas, risadas, direcionamentos e orientações de fé. Sou muito grata a Deus pela oportunidade de tê-lo conhecido e de fazermos parte da vida do outro.

A minha orientadora, Dra. Gardenia Militão, que abriu as portas de seu laboratório dando-me a oportunidade que sempre quis, sou muito grata pela paciência, dedicação, orientação e atenção recebidas, assim como as nossas conversas sobre políticas, me instruindo neste campo, onde precisamos conhecer e entende para assim lutarmos por nossos direitos.

Ao meu coorientador, Dr. Daniel Bezerra, que me deu a oportunidade de conhecer e participar do seu grupo de pesquisa no LETI FIOCRUZ Bahia IGM, onde tive a oportunidade de agregar mais conhecimentos e trocar experiências com excelentes profissionais.

A família LETI: Rosane, Rafaela, Matheus, Sheila, Rômulo e Helenita pela amizade e troca de conhecimentos. Em especial a Luciano Souza e Valdenizia Rodrigues, por toda ajuda, ensinamento e parceria com meus experimentos, enquanto estive aí na FIOCRUZ. Em especial também a duas pessoas que fizeram dos meus dias em Salvador, longe de minha família, ser o mais legal possível, a vocês Ivan Pimentel e Cássio Santana, o grande irmão que Deus me concedeu, meu muito obrigada pela recepção, amor, carinho, atenção, pelos açaís, risadas, passeios e ajuda durante os dias aí vividos, longe de casa. Todos vocês foram sensacionais comigo e de um amor sem tamanho, dando-me todo suporte e ajuda necessária.

À técnica do LETI FIOCRUZ Bahia IGM, Larissa, por todo amor e carinho. Você é uma pessoa extremamente linda e de um grande coração.

À Dra. Valéria Pereira, do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular IAM/FIOCRUZ/PE, pela oportunidade, ajuda e parceria.

Às minhas companheiras de laboratório, Paloma e Júlia, por toda ajuda, parceria, amor e trocas de conhecimentos.

Ao amigo e colaborador Thiago David dos santos Silva, pela ajuda prestada durante o mestrado, assim como seus aconselhamentos para a riqueza deste trabalho.

Às minhas amigas de longas datas, pelo apoio e incentivo: Ana Carla, Ana Célia e Marisa Barbosa, amo vocês.

Aos colegas da pós-graduação: Lucas, Pedro, Ana Lemos, Bruno, Ivison e Walter, pelas resenhas, trocas de conhecimentos e preciosa amizade.

Aos professores da pós-graduação pelas aulas excelentes que vivenciei.

À banca de qualificação pelos conselhos, orientação e correção que levou ao aperfeiçoamento deste trabalho.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia UFPE.

Ao secretário da pós-graduação, Klayton Cabral, por toda disponibilidade e ajuda prestada, facilitando sempre nossa vida, principalmente na parte burocrática.

Aos técnicos do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFPE, Sr. Nielson e Dani, pela realização das leituras de meus experimentos.

Ao funcionário da limpeza, Sr. Hildes, pelas nossas conversas e momentos de descontrações, tornando meus dias na UFPE mais leve e divertido.

Meu agradecimento a CAPES, órgãos financiadores deste projeto.

A todas essas pessoas que tive o prazer de trocar experiências, que contribuíram para que esse trabalho pudesse sair e a todos que torcem por mim, meu muito obrigada.

*“O vencedor não será o mais forte, será aquele que melhor se adaptar”.*

*Charles Darwin*

## RESUMO

Câncer é conceituado como um complexo processo que leva ao crescimento desordenado das células para formar um tumor, que em alguns casos, invade os tecidos adjacentes e se propaga por processo de metástase. Pela alta incidência nos últimos tempos, há uma constante procura por terapias mais eficientes. Os compostos da pacharina (PAC) e bauhiniastatina-1 (BAU) são classificados como dibenzo[b, f]oxepinas de ocorrência natural e foram isoladas a partir de *Bauhinia acuruana*. O presente trabalho investigou a ação citotóxica destes compostos em diferentes modelos celulares. Os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1 foram testados contra diferentes tipos de linhagens de células cancerígenas (MCF-7, HL-60, HCT-116, HT-29, HepG2), e não cancerígenas (L929, MRC5), através do ensaio de redução do MTT após 72 h de incubação. Os compostos PAC e BAU foram mais seletivos nas células tumorais da HL-60 e MCF-7. As células com maior sensibilidade foram escolhidas para estudo do mecanismo de ação. Células MCF-7 e HL-60 foram incubadas por 24 e 48 h com os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1 (10, 20 e 40  $\mu\text{M}$ ). A análise do ciclo celular, marcação para anexina V/iodeto de propídio foram determinadas por citometria de fluxo. Os níveis das proteínas antiapoptóticas Mcl-1 e Bcl-xL foram detectados pelo ensaio western blotting. A pacharina e bauhiniastatina-1 apresentou valores de  $\text{IC}_{50}$  após 72 h para as células HL-60 (12,5 e 10,6  $\mu\text{M}$ ), respectivamente e em MCF-7 valores de  $\text{IC}_{50}$  (20 e 21,83  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. A quantidade de células viáveis, tratadas com os compostos nas concentrações de 20  $\mu\text{M}$  (nas células da MCF-7) reduziu (36,2% e 48,23%) para PAC e BAU, após 24 horas, e (49,64% e 70,93%) para PAC e BAU, após 48 horas. A concentração de 10  $\mu\text{M}$  (nas células da HL-60) reduziu (25,17% e 32,21) para PAC e BAU, após 24 horas, e (60,84% e 49,87%) para PAC e BAU, após 48 horas. Observou-se condensação da cromatina e aumento da presença de células nas fases mitóticas após o tratamento com PAC e BAU em HL-60 e MCF-7 tratadas na concentração de 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ . Os compostos PAC e BAU induziram apoptose na MCF-7 após 48 horas de tratamento na concentração de 40  $\mu\text{M}$ . Os compostos PAC e BAU também foram capazes de reduzir os níveis de proteínas anti-apoptóticas nas células MCF-7 após 24 e 48 h nas concentrações de 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$  para as proteínas da Mcl-1, e na concentração de 40  $\mu\text{M}$  na Bcl-xL, após 48 h. Diante dos resultados apresentados as moléculas pacharina e bauhinistatina-1 induziram apoptose em células MCF-7 com redução da expressão de proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 e mais tardiamente Bcl-xL.

**Palavras-chave:** Família Bcl-2. Antineoplásica. Morte celular. Pacharina. Bauhiniastatina-1. *Bauhinia acuruana*. Mcl-1.

## ABSTRACT

Cancer is conceptualized as a complex process that leads to the disordered growth of cells to form a tumor, which in some cases invades adjacent tissues and spreads through the process of metastasis. Due to the high incidence in recent times, there is a constant search for more efficient therapies. The compounds of pacharine (PAC) and bauhiniastatin-1 (BAU) are classified as naturally occurring dibenz[b, f]oxepins and have been isolated from *Bauhinia acuruana*. The present work investigated the cytotoxic action of these compounds in different cell models. The compounds of pacharin and bauhiniastatin-1 isolated from the species *Bauhinia acuruana* were tested against different types of cancer cell lines (MCF-7, HL-60, HCT-116, HT-29, HepG2), and non-cancerous (L929, MRC5), through the MTT reduction test after 72 h of incubation. The compounds PAC and BAU were more selective in HL-60 and MCF-7 tumor cells. The cells with the greatest sensitivity were chosen to study the mechanism of action. MCF-7 and HL-60 cells were incubated for 24 and 48 h with the compounds of pacharin and bauhiniastatin-1 (10, 20 and 40  $\mu\text{M}$ ). Cell cycle analysis, annexin V / propidium iodide labeling were determined by flow cytometry. The levels of the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-xL were detected by the western blotting assay. Pacharin and bauhiniastatin-1 showed  $\text{IC}_{50}$  values after 72 h for HL-60 cells (12.5 and 10.6  $\mu\text{M}$ ), respectively and  $\text{IC}_{50}$  values for MCF-7 (20 and 21.83  $\mu\text{M}$ ), respectively. The number of viable cells, treated with the compounds in concentrations of 20  $\mu\text{M}$  (in MCF-7 cells) decreased (36.2% and 48.23%) for PAC and BAU, after 24 hours, and (49.64% and 70.93%) for PAC and BAU, after 48 hours. The concentration of 10  $\mu\text{M}$  (in HL-60 cells) decreased the number of viable cells from (25.17% and 32.21) for PAC and BAU, after 24 hours, and (60.84% and 49.87 %) for PAC and BAU, after 48 hours. Chromatin condensation and increased presence of cells in the mitotic phases were observed after treatment. The PAC and BAU compounds were also able to reduce the levels of anti-apoptotic proteins in MCF-7 cells after 24 and 48 h at concentrations of 20  $\mu\text{M}$  and 40  $\mu\text{M}$  for Mcl-1 proteins, and at a concentration of 40  $\mu\text{M}$  in Bcl-xL, after 48 h. In view of the results presented, the molecules pacharin and bauhinistatin-1 induced apoptosis in MCF-7 cells with reduced expression of anti-apoptotic proteins Mcl-1 and later Bcl-xL.

**Key words:** Bcl-2 family. Antineoplastic. Cell death. Pacharin. Bauhiniastatin-1. *Bauhinia acuruana*. Mcl-1.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Características do Câncer .....	23
<b>Figura 2-</b> Visão geral generalizada das vias de apoptose extrínseca e intrínseca.....	25
<b>Figura 3-</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	30
<b>Figura 4-</b> Estrutura química do dibenz (b, f) oxepin .....	34
<b>Figura 5-</b> Efeito dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 na viabilidade celular da MCF-7 pela coloração com azul de tripan após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação .....	45
<b>Figura 6-</b> Efeito dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 na viabilidade celular da HL-60 pela coloração com azul de tripan após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação .....	46
<b>Figura 7-</b> Aspectos morfológicos das células MCF-7 e HL-60 após tratamento com pacharina e bauhiniastatina-1 por 24 e 48h nas concentrações de 10, 20 e 40 $\mu$ M .....	47
<b>Figura 8-</b> Efeito dos compostos pacharina (PAC) e bauhiniastatina-1 (BAU), em células MCF-7 in vitro. Células examinadas por microscopia óptica (20X) .....	49
<b>Figura 9-</b> Efeito dos compostos pacharina (PAC) e bauhiniastatina-1 (BAU) na indução de apoptose em células MCF7 determinadas por citometria de fluxo .....	50
<b>Figura 10-</b> Efeito dos compostos pacharina (PAC) e bauhiniastatina-1 (BAU) na indução de apoptose em células MCF-7 determinadas por citometria de fluxo .....	51
<b>Figura 11-</b> Histogramas representativos da análise da distribuição do conteúdo de DNA determinados por citometria de fluxo .....	52
<b>Figura 12-</b> Alterações na expressão de proteínas relacionadas à apoptose após incubação com compostos pacharina e bauhiniastatina-1 .....	54

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 -</b>	Oxepinas isoladas de espécies do gênero Bauhinia .....	33
<b>Tabela 2-</b>	Atividade citotóxica dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 em células com diferentes tipos histológicos. ....	43
<b>Tabela 3-</b>	Índice de seletividade dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1.....	44
<b>Tabela 4-</b>	Efeito dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 na viabilidade celular das linhagens MCF-7 e HL-60 pelo ensaio de exclusão azul de tripan .....	46
<b>Tabela 5-</b>	Efeito dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 sobre a distribuição do conteúdo de DNA celular. ....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
ANOVA	Analisis of Variance (Análise de variância)
APAF-1	Fator de Ativação de Protease Associada a Apoptose 1
Bad	Agonista de Morte Celular Associado a Bcl2, do inglês: Bcl2-Associated Agonist of Cell Death
Bak	Proteína Destruidora de Antagonistas de Bcl2, do inglês: Bcl2- Antagonist/Killer 1
Bau	Bauhiniastatina-1
Bax	Proteína X Associada a Bcl-2, do inglês: Bcl-2 Associated X Protein
Bcl2	Proteína Reguladora anti-apoptótica, do inglês: B-cell CLL/lymphoma
BCL-xL	Proteína antiapoptótica Gene humano pertencente a classe dos genes supressores de tumor, do inglês: breast cancer 1, early onset
<i>Brcal</i>	
<i>Brcal</i>	Gene supressor de tumor, do inglês: breast cancer 2
Citocromo C	Proteína heme associada à membrana externa da mitocôndria
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro padrão da média
HCT-116	Carcinoma do cólon humano
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
HL-60	Leucemia promielocítica humana
HT-29	Adenocarcinoma de cólon humano

IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média de 50%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mL	Mililitro
Mcf-7	Adenocarcinoma de mama humano
Mcl-1	Proteína antiapoptótica
N.d.	Não determinado
Pac	Pacharina
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano, do inglês: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PI	Iodeto de Propídio
p53	Gene supressor tumoral
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1	OBJETIVO .....	19
1.1.1	<b>Objetivo geral</b> .....	19
1.1.2	<b>Objetivos específicos</b> .....	19
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	20
2.1	CÂNCER .....	20
2.2	IMPACTO GLOBAL DO CÂNCER .....	20
2.3	FATORES AMBIENTAIS .....	20
2.3.1	<b>Tabagismo</b> .....	21
2.3.2	<b>Consumo de álcool</b> .....	21
2.3.3	<b>Dieta e obesidade</b> .....	21
2.3.4	<b>Carcinógenos ambientais</b> .....	22
2.4	FATORES CELULARES E MOLECULARES DO CÂNCER .....	22
2.5	APOPTOSE X NECROSE .....	24
2.6	FAMÍLIA BCL-2 .....	28
2.7	CARCINOMA DA MAMA .....	29
2.8	USOS DE FÁRMACOS DE FONTES NATURAIS .....	31
2.9	O GÊNERO <i>BAUHINIA</i> E A ESPÉCIE <i>BAUHINIA ACURUANA</i> .....	31
2.9.1	<b>Estruturas e propriedades químicas dos compostos Pacharina e Bauhiniastatina-1</b> .....	33
2.9.2	<b>Dibenz [ b, f ] oxepina e sua relação com os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1</b> .....	34
3	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
3.1	OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PACHARINA E BAUHINIASTATINA-1 .....	35
3.2	OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS EM CULTURA .....	35
3.3	ENSAIO DA CITOTOXICIDADE PELA REDUÇÃO DO MTT .....	36
3.4	ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR- EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPAN .....	37

3.5	AVALIAÇÃO IN VITRO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR/MECANISMO DE AÇÃO .....	38
3.6	ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS - COLORAÇÃO POR MAY-GRUNWALD-GIEMSA .....	38
3.7	DETERMINAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA .....	39
3.8	DETERMINAÇÃO DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DO DNA....	39
3.9	EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOTTING .....	40
4	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	41
5	<b>RESULTADOS</b> .....	42
5.1	EFEITO DOS COMPOSTOS PACHARINA E BAUHINIASTATINA-1 NA VIABILIDADE CELULAR NAS LINHAGENS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS .....	42
5.2	DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR – EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPAN .....	44
5.3	EFEITO DO TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS PACHARINA E BAUHINIASTATINA-1 NA ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA .....	47
5.4	ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS CÉLULAS MCF-7 EM MONOCAMADA .....	48
5.5	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MORTE CELULAR PELA DUPLA COLORAÇÃO COM ANEXINA V-FITC / PI .....	49
5.6	ANÁLISE DO CICLO CELULAR .....	52
5.7	DETECÇÃO DE EXPRESSÕES DE MCL-1 E BCL-XL USANDO WESTERN BLOTTING .....	53
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	60
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	61
	<b>ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b> .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

No corpo humano, novas células são geradas continuamente para reparar tecidos danificados. Normalmente, a proliferação e morte celular ocorrem de maneira equilibrada (SADEGHI, 2019). Em contrapartida, e em condições cancerígenas, o crescimento celular, a divisão e a morte são desregulados, resultando como formação desta falha de controle, um sangue ou fluido linfático incomum no corpo, ou a formação de uma massa conhecida como tumor (WONG, 2011).

O câncer é um dos problemas de saúde mais ameaçadores do mundo. Por apresentarem um problema de saúde pública, dada sua crescente importância como causa de morbidade e mortalidade em todo o mundo, as neoplasias malignas apresentarão uma estimativa para o Brasil, ano do triênio 2020-2022, um crescimento de mais 625 mil casos novos de câncer, sendo estes os mais frequentes: cânceres de próstata (65.840 casos novos) em homens e mama (66.280 mil) em mulheres (INCA, 2020).

Dentre as características encontradas na célula do câncer está a evasão da apoptose (HANAHAN e WEINBERG, 2011). A apoptose é um processo altamente investigado em condições patológicas ou normais (WONG, 2011). Devido ao papel significativo desse processo em diferentes condições patológicas, é importante entender seus mecanismos relacionados para descobrir novas terapias (SADEGHI, 2019). Um dos principais mecanismos de resistência utilizados envolve a participação de membros da família Bcl-2 que controla a integridade da membrana mitocondrial externa. Dentro da família Bcl-2 encontram-se proteínas pró-apoptóticas: Bax, Bak, Bad, Bim, Noxa, PUMA, BIK, HrK e BMF; e proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W, Mcl-1 e BFL-1 (YOULE e STRASSER, 2008). A maquinaria apoptótica é composta de reguladores e componentes efetores (ADAMS e CORY, 2007). Esse mecanismo se inicia a partir de uma cascata de proteólise envolvendo caspases efetoras responsáveis pela fase de execução da apoptose, na qual a célula é progressivamente desmontada e então consumida, por outras células e por células fagocíticas profissionais (PORTT, 2010). Atualmente, o programa apoptótico intrínseco é mais amplamente implicado como uma barreira à patogênese do câncer (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Os produtos naturais tem um longo histórico de uso como medicamentos ou fonte de princípios ativos para tratamento de doenças (GRAGG e NEWMAN, 2013). No caso do câncer pode-se citar vários fármacos derivados de plantas que estão em uso clínico, como no caso dos

alcaloide da vinca, vimblastina e vincristina isolados de *Catharanthus roseus*; etoposido e teniposido, que são derivados semi-sintéticos da epipodofilotoxina, além do Paclitaxel isolado de espécies de *Taxus* (GRAGG e NEWMAN, 2013).

O gênero *Bauhinia* gênero (*Caesalpinioideae*, Leguminosae) compreende mais de 500 espécies distribuídas em áreas tropicais (SOARES e SCARMINIO, 2008). As espécies deste gênero são comumente conhecidas como "Pata de vaca" ou "casco de vaca", devido ao seu formato de folha e têm sido utilizados na medicina popular para tratar várias doenças, especialmente diabetes, infecções, dor e processo inflamatório (CECHINEL, 2009). A composição química do gênero *Bauhinia* mostrou uma predominância de terpenos, esteróides, alcalóides, glicosídeos, lactonas e especialmente flavonóides (CECHINEL, 2009).

*Bauhinia acuruana* (Moric) é um arbusto ou subarbusto, geralmente encontrado nas áreas montanhosas e / ou com altitudes de 600-1.100 m. No Brasil, esta espécie ocorre nos Estados da Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pernambuco e Piauí (VAZ e TOZZI, 2003). A partir de *Bauhinia acuruana* foi isolada uma oxepina denominada de pacharina com atividade larvicida, do *aedes aegypti* (GÓIS, 2013). Investigações anteriores realizadas com pacharina e bauhiniastatina-1 (composto também isolado da espécie *Bauhinia*) demonstraram que estes compostos, apresentaram atividade antitumoral, mostrando inibição significativa do crescimento contra o adenocarcinoma do pâncreas (BXPC-3), adenocarcinoma da mama (MCF-7), glioblastoma do SNC (SF268), células do pulmão (NCI-H460) e carcinoma da próstata (DU-145) (PETTIT et al., 2006).

Quanto a composição química dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 estes são classificados como uma dibenz (b, f) oxepinas, sendo esta de ocorrência natural e rara, presente em uma classe de metabólitos secundários sendo encontradas em plantas do gênero *Bauhinia* (fam. Fabaceae) (PETTIT et al., 2006). Assim, como parte de uma pesquisa com os constituintes fixos da flora brasileira do Nordeste, nesse trabalho foram estudadas as propriedades citotóxicas da pacharina e bauhiniastatina-1 *in vitro* usando diferentes linhagens cancerígenas, e os mecanismos de ação envolvidos na sua citotoxicidade foram avaliados na linhagem MCF-7 (Adenocarcinoma de mama humano).

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Investigar o potencial antitumoral dos compostos da pacharina e bauhiniastatina-1, isolados de *Bauhinia acuruana*.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a citotoxicidade *in vitro* de compostos nas linhagens de tumores de MCF-7, HL-60, HCT-116, HT-29 e HepG2.
- b) Avaliar a atividade citotóxica dos compostos da pacharina e bauhiniastatina-1 em células não tumorais (células mononucleadas do sangue periférico) e realizar uma análise morfológica destas células.
- c) Investigar a integridade da membrana celular, a fragmentação do DNA e do ciclo celular após tratamento das células tumorais com os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1.
- d) Investigar se há a participação das proteínas Mcl-1, Bcl-XL, pertencente à família Bcl-2, na indução da morte celular tumoral provocada por compostos bioativos isolados de *Bauhinia acuruana*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER

O câncer pode ser considerado o resultado de uma série de alterações genéticas que causam a transformação de células normais em células malignas (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Além disso, uma apoptose desregulada contribui para a carcinogênese (SADEGHI, 2019). Assim sendo, pesquisadores relatam que o crescimento do tumor não é apenas resultado de uma proliferação descontrolada, mas também de apoptose reduzida (PARTON, 2001).

### 2.2 IMPACTO GLOBAL DO CÂNCER

Mesmo diante da busca desenfreada por métodos inovadores e eficazes no tratamento contra o câncer, ainda assim, o Brasil enfrenta uma carga crescente de câncer (INCA, 2018). Notavelmente, foi relatado que 218.64 mil mortes relacionadas ao câncer, dentre homens e mulheres foram registrados em 2017 no Brasil. Ainda de acordo com as estimativas do INCA 2018-2019, o número de novos casos de câncer chegará em cerca de 600 mil novos casos, sendo os tipos de câncer mais frequentes: cânceres de próstata (68.220 casos novos) em homens e mama (59.700 mil) em mulheres. Além dos citados, completam a lista dos dez tipos de câncer mais incidentes: cólon e reto (intestino–36.360), pulmão (31.270), estômago (21.290), colo do útero (16.370), cavidade oral (14.700), sistema nervoso central (11.320), leucemias (10.800) e esôfago (10.970), (INCA,2018).

### 2.3 FATORES AMBIENTAIS

Os atuais mecanismos biológicos de câncer sugerem que todos os cânceres são originados tanto do ambiente quanto da genética, o que significa que há múltiplos fatores externos combinados com mudanças genéticas internas que levarão ao câncer humano (SONNENSCHNEIN, 2008). Assim, a uma das melhores medidas de prevenção é evitar as exposições dos agentes carcinogênicos (SONNENSCHNEIN, 2008).

Além disso, indivíduos com predisposições genéticas particulares podem ser mais suscetíveis aos efeitos das exposições ambientais do que outros. Pessoas com alterações genéticas de BRCA1, BRCA2 e p53, por exemplo, tornam-se indivíduos menos capazes de suprimir o crescimento de células cancerígenas (VOGELSTEIN, 2004). Assim, não há somente uma única causa para a ocorrência do câncer, mais sim um conjunto de fatores que aumentam o risco para os diferentes tipos de cânceres humanos, dentre eles se destacam:

### **2.3.1 Tabagismo**

Sendo o fumo, principalmente de cigarros, o grande causador das mortes por câncer de boca, faringe, laringe, esôfago, pâncreas e bexiga. A epidemia do tabaco é uma das maiores ameaças à saúde pública que o mundo já enfrentou, matando mais de oito milhões de pessoas por ano em todo o mundo, e mais de 7 milhões dessas mortes são o resultado do uso direto do tabaco, enquanto cerca de 1,2 milhões são o resultado de não fumantes expostos ao fumo passivo. Cerca de 80% dos 1,1 bilhão de fumantes em todo o mundo vivem em países de baixa e média renda, onde o peso das doenças relacionadas ao tabaco e da morte é maior (TOBACCO, 2019).

### **2.3.2 Consumo de álcool**

O abuso do álcool por si só aumenta o risco de carcinomas de orofaringe (excluindo os lábios), laringe e esôfago e carcinoma hepatocelular (pelo desenvolvimento da cirrose) (INCA, 2019). O álcool e o tabaco, juntos, aumentam de forma sinérgica o risco câncer nas vias aéreas superiores e no trato digestório (INCA, 2019).

### **2.3.3 Dieta e obesidade**

Pessoas que têm uma dieta pobre com atividade física reduzida podem ter risco aumentado de várias doenças. Já as pessoas obesas correm maior risco de doença coronariana, derrame, hipertensão, diabetes e câncer (esôfago, mama, útero, cólon, reto e próstata) (WOLIN, 2010 e WOLIN, 2008). O tecido adiposo produz alta quantidade de estrogênio, que está ligado ao aumento do risco de câncer. Além disso, pessoas obesas podem produzir uma quantidade elevada de fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) no sangue, o que pode levar a certos tipos de câncer. Assim também, a leptina e a adiponectina são produzidas pelas células de gordura, que podem promover e inibir a proliferação celular, respectivamente (WOLIN, 2010 e WOLIN, 2008).

### 2.3.4 Carcinógenos ambientais

Os carcinógenos podem ser encontrados no meio ambiente, em alimentos ou em práticas pessoais. Os indivíduos podem ser expostos a fatores carcinogênicos quando estão em ambientes externos (p. ex., raios ultravioleta [UV], poluição atmosférica), usando certos medicamentos (p. ex., metotrexato), ou até no consumo inadequado de alimentos e bebidas (p.ex., carne grelhada, dieta rica em gordura, álcool) (PARSA, 2012; INCA, 2015).

## 2.4 FATORES CELULARES E MOLECULARES DO CÂNCER

Hanahan e Weinberg (2011), durante suas pesquisas e estudos propuseram algumas características que são utilizadas pelas células do câncer, possibilitando assim entender como essas células se organizam de uma maneira estruturalmente lógica, e assim, propiciar a compreensão de como se mantem e desviam-se dos pontos de checagem do ciclo celular, por exemplo, mantendo-se viáveis e escapando da morte celular programada.

Ainda sobre seus estudos, os autores relatam essas características do câncer, como capacidades distintas e complementares que possibilitam o crescimento do tumor e a disseminação metastática – e que continuam a fornecer uma base sólida para a compreensão da biologia do câncer. Em cada uma dessas mudanças fisiológicas, novas capacidades são adquiridas durante o desenvolvimento do tumor, representando uma violação bem-sucedida de um mecanismo de defesa anticancerígena em células e tecidos (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Sobre estas capacidades apresentadas em comum pela maioria e/ ou talvez por todos os tipos de tumores humanos, estão sendo ilustradas na Figura 1.

**Figura 1.** Características do Câncer.



(Adaptado de Hanahan D, Weinberg R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation, 2011).

Entretanto, dentre as características citadas pelo autor, daremos enfoque na evasão da apoptose, em que essa propriedade apresenta a capacidade, evidenciam os cientistas, de estar presente “talvez em todos os cânceres” (ADAMS e CORY, 2007).

Além disso, a desregulação dos mecanismos de apoptose torna-se um importante fator patológico em diversas doenças humanas importantes, ou seja, a falta de apoptose, como um processo normal, de controle e de regulação celular das células defeituosas, é uma das características do desenvolvimento do câncer, e muitas células cancerígenas exibem resistência significativa à sinalização da apoptose (WINTER, 2014).

Nas células eucarióticas, a apoptose ocorre através de duas vias moleculares distintas, que são reguladas pelas caspases. A via intrínseca ou mitocondrial que é ativada por eventos intracelulares e depende da liberação de fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos das mitocôndrias, como as proteínas da família Bcl-2, citocromo c e APAF-1, entre outros (WINTER, 2014). Já a via extrínseca, é mediada por um subgrupo da superfamília de receptores de fator de necrose tumoral (TNFR) que inclui TNFR, Fas e TRAIL (PORTT, 2011). Esse processo se dá pelo envolvimento de "receptores de morte", ou seja, quando receptores

específicos são ativados por seus ligantes correspondentes (YUAN, 2012). A ativação desses chamados receptores de morte leva ao recrutamento e ativação de caspases iniciadoras, como as caspases 8 e 10, que leva ao envolvimento da formação e ativação de complexos processos de sinalização indutora de morte (DISC) (PORTT, 2011).

## 2.5 APOPTOSE X NECROSE

A apoptose é um processo geneticamente programado de morte celular para eliminar uma célula indesejada, assim como é essencial para a renovação celular (RADHA, 2017). Ela ainda é um regulador chave do controle do crescimento fisiológico e da regulação da homeostase tecidual. Sendo um dos avanços mais importantes na pesquisa do câncer nos últimos anos é o reconhecimento de que a morte celular, principalmente por apoptose, está crucialmente envolvida na regulação da formação de tumores e também determina criticamente a resposta ao tratamento (FULDA, 2006).

No decurso da vida celular o equilíbrio homeostático e funcionais destas células precisam ser regulados e controlados, para que ocorra um bom funcionamento da mesma (FRANCO, 2009). Assim, tão importante quanto a divisão celular, a morte celular programada, ou apoptose, permite que o organismo controle firmemente o número de células e o tamanho dos tecidos, além de se proteger contra células que podem ameaçar a homeostase (FRANCO, 2009).

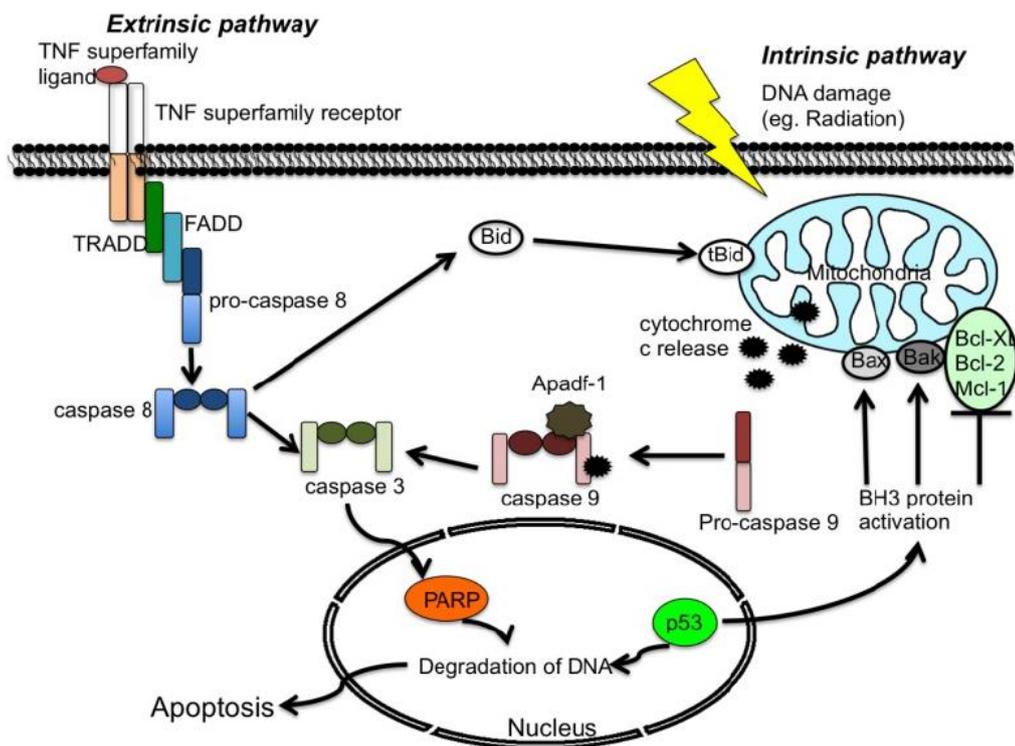
A partir do momento em que uma célula recebe o estímulo para que se inicie a apoptose, começa então a ocorrer diversas alterações em sua morfologia como o seu arredondamento, retração dos pseudópodos, redução do volume, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo, pouca ou nenhuma modificação em suas organelas e divisão em corpos apoptóticos (KROEMER et al., 2005). Esses últimos são rapidamente fagocitados e removidos impedindo a geração de processos inflamatórios em torno da célula que acaba de morrer (GRIVICICH, 2007).

Quanto ao processo de estimulação da apoptose, diversos são os fatores que podem desencadear, entre eles: agentes quimioterápicos, radiação ionizante, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento, baixa quantidade de nutrientes e níveis aumentados de espécies reativas do oxigênio (HENGARTNER, 2000).

Ao passo da ativação da morte celular, esta terá duas principais vias a intrínseca e a extrínseca. A via intrínseca é desencadeada por sinais intracelulares em que as mitocôndrias desempenham um papel fundamental, e a via extrínseca que envolve sinais externos, que se ligam aos receptores de morte celular na superfície celular, levando à formação do complexo de sinalização induzida por morte (DISC), com ativação de caspases e proteínas da família BCL2, culminando assim na morte celular (RADHA, 2017).

**Figura 2.** Visão geral generalizada das vias de apoptose extrínseca e intrínseca.

A via extrínseca é iniciada pela ligação de um ligante da família fator de necrose tumoral (TNF) ao seu receptor, seguido pela ativação de proteínas sinalizadoras a jusante. Na via intrínseca, o estresse celular causa ativação do BH3 e liberação do citocromo c. Ambas as vias ativam o efetor caspase-3 e promovem a morte celular.



(Adaptado de YUAN, Modulation of Apoptotic Pathways by Human Papillomaviruses (HPV): Mechanisms and Implications for Therapy, 2012).

**Via Intrínseca (Mitocondrial) da Apoptose-** Sua ocorrência é dada pela via mitocondrial, através da ativação da caspase, estando essa intimamente ligada à permeabilização da membrana mitocondrial externa por membros proapoptóticos da família Bcl-2 (GREEN e KROEMER, 2004). Além disso, essa via que é governada pela família Bcl-2, tem a característica de impedir a liberação do citocromo c pelas mitocôndrias (RADHA, 2017).

A célula ao ser induzida a um sinal de estresse ou sofrer algum dano no DNA, acionam as proteínas pró-apoptóticas no citoplasma, Bax e Bak, que se ligam à membrana externa da mitocôndria para sinalizar a liberação do conteúdo interno (ADRAIN, 2002; HAGUE, 2004). Os ativadores da apoptose Bax e Bak, ao serem ativados homo-oligomerizam e participam da formação de poros na membrana mitocondrial externa através da qual as moléculas pró-apoptóticas escapam, incluindo o segundo ativador da caspase (Smac) (também conhecido como Diabolo) e o citocromo c derivado de mitocôndrias. A liberação do citocromo c leva à ativação de caspases, que são proteases que clivam as principais proteínas celulares. Isso leva a muitas das características morfológicas da apoptose, incluindo núcleos condensados, formação de DNA e exposição da fosfatidilserina ao folheto externo da membrana plasmática (JOSLYN, 2009).

Numerosos estímulos citotóxicos e moléculas de transdução de sinal pró-apoptóticas convergem nas mitocôndrias para induzir a permeabilização da membrana mitocondrial externa (GREEN e KROEMER, 2004). Essa permeabilização é regulada por proteínas da família Bcl-2, lipídios mitocondriais, proteínas que regulam o fluxo de metabólitos bioenergéticos e componentes do poro de transição de permeabilidade (GREEN e KROEMER, 2004). Após a ruptura da membrana mitocondrial externa, um conjunto de proteínas normalmente encontradas no espaço entre as membranas mitocondriais interna e externa é liberado, incluindo citocromo c, Smac / DIABLO, Omi / HtrA2, AIF e endonuclease G (SAELENS et al., 2004).

Uma vez no citosol, essas proteínas apoptogênicas desencadeiam a execução da morte celular promovendo a ativação da caspase ou atuando como efetores de morte independentes de caspase (SAELENS et al., 2004). As mitocôndrias possuem proteínas, tais como o citocromo c, que são essenciais para a vida. Entretanto, quando estas proteínas como o citocromo c, é liberado para o citoplasma, significa dizer que a célula não está saudável, e a partir desta indicação, inicia-se o esquema de suicídio da apoptose, ou seja, a liberação do citocromo c da mitocôndria desencadeia diretamente a ativação da caspase-3 por meio da formação do complexo de apoptosoma contendo citocromo c / Apaf-1 (fator ativador da apoptose-1), /

caspase-9 (CAIN et al., 2000). Uma vez no citosol, o citocromo c liga-se à região C-terminal de Apaf-1, uma proteína citosólica com um domínio de recrutamento de caspase N-terminal (CARD), um domínio de ligação de nucleotídeos com homologia ao CED-4 e um Domínio C-terminal contendo 12-13 repetições WD-40 (ZOU et al., 1997). A ligação do citocromo c a Apaf-1 facilita a associação de dATP com Apaf-1 e expõe sua CARD N-terminal, que agora pode oligomerizar e se tornar uma plataforma na qual a caspase-9 iniciadora é recrutada e ativada por meio de uma interação CARD-CARD (ADRAIN e COLS, 1999). Consecutivamente, a caspase-3 é recrutada para o apoptosome, onde é ativado pela caspase-9 (BRATTON et al., 2001). A caspase-3 então cliva substratos chave na célula para produzir muitos dos eventos celulares e bioquímicos da apoptose, resultando assim numa via de execução da apoptose (FULDA, 2006; HILL et al., 2004).

**Via Extrínseca da Apoptose (Iniciada por Receptor de Morte)** – As vias de sinalização extrínsecas que iniciam a apoptose envolvem interações mediadas por receptores transmembranares. Estes envolvem receptores de morte que são membros da superfamília do gene do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) (LOCKSLEY et al., 2001). Assim, a via extrínseca é desencadeada por essa família de receptores de morte localizados na membrana celular, que inclui além do TNFR1, outros como FAS (CD95), FasR, TNF-  $\alpha$ , TRAIL-R1, TRAIL-R2, Apo3L / DR3, Apo2L / DR4 e Apo2L / DR5 (SULIMAN et al., 2001; RUBIO-MOSCARDO et al., 2005 e revisado em GREEN e LLAMBI, 2015). O Fas (glicoproteína transmembranar do tipo II) é um receptor de morte expresso em muitos tipos celulares, e o mecanismo de apoptose induzido por esses receptores de morte, é bem ilustrado pelo Fas. O FasL (Fas ligante) se ligara ao receptor Fas, que juntamente com três ou mais moléculas de Fas se reúnem e seus domínios de morte citoplasmáticas formará um sítio de ligação para uma proteína adaptadora que também contém um domínio de morte sendo denominada de FADD (do inglês, Fas-associated death domain). O FADD contém, na sua região N terminal, um domínio DED (do inglês death effector domain) que se liga à pró-caspase 8 (e em humanos, caspase-10) (KAVURMANN et al., 2008). Ao ativar a caspase 8, através da clivagem dada por várias moléculas da pró-caspase 8, ocorrerá subseqüentes eventos equivalentes ao da via mitocondrial, culminando na ativação de várias caspases efetoras. Ao passo seguinte, a via da apoptose pode ser inibida por uma proteína denominada FLIP, a qual se liga à pró-caspase-8 mas não pode clivar nem ativar a caspase porque lhe falta um domínio de protease. Alguns vírus e células normais produzem FLIP e usam esse inibidor para se proteger da apoptose mediada

por Fas. Logo, as duas vias de iniciação convergem para uma cascata de ativação de caspases que medeiam a fase final da apoptose (KAVURMANN et al., 2008).

As vias extrínseca e intrínseca terminam no ponto da fase de execução, considerada a via final da apoptose. É a ativação das caspases de execução que inicia essa fase de apoptose. As caspases de execução ativam a endonuclease citoplasmática, que degrada o material nuclear, e as proteases que degradam as proteínas nucleares e do citoesqueleto. Caspase-3, caspase-6 e caspase-7 funcionam como caspases efetoras ou “executoras”, clivando vários substratos, incluindo citoqueratinas, PARP, proteína citoesquelética alfa-diarreina da membrana plasmática, a proteína nuclear NuMA e outras, que causam o efeito morfológico e alterações bioquímicas observadas em células apoptóticas (SLEE et al., 2001).

A necrose é considerada uma morte celular quase "acidental", um processo aleatório e descontrolado, tendo como principais mediadores de sua morte, o RIP quinases e PARP, (GALLUZZI, 2008 e GOLSTEIN, 2007). Ao sofrerem deste tipo de morte, as células apresentam como características, perda da integridade da membrana celular com interrompimento da mesma, de modo que os materiais intracelulares são libertados para o meio extracelular, conduzindo a respostas inflamatórias pelas células imunitárias. A inflamação local subsequente induzida por necrose programada pode promover o crescimento do tumor. Ainda, a morte celular necrótica pode ser explorada para eliminar as células cancerígenas (ZONG, 2004 e AGOSTINIS, 2004).

Apoptose e a necrose programada apresentam características morfológicas e processos fisiológicos distintos; no entanto, ainda existem inter-relações entre eles (AMELIO, 2011). Quanto as principais alterações morfológicas que ocorrem com a necrose incluem inchaço celular; formação de vacúolos citoplasmáticos; retículo endoplasmático distendido; formação de bolhas citoplasmáticas; mitocôndrias condensadas, inchadas ou rompidas; desagregação e desprendimento dos ribossomos; membranas organelares rompidas; lisossomos inchados e rompidos; e, finalmente, a ruptura da membrana celular (TRUMP et al., 1997).

## 2.6 FAMÍLIA BCL-2

Para que se tenha um equilíbrio celular, é fundamental que se mantenha a homeostase tecidual, sendo fornecida pela ocorrência da apoptose, programa de suicídio celular executado

por caspases, sendo esse um passo fundamental na tumorigênese. Assim, o que determina se uma célula deve viver ou morrer é largamente determinada pela família Bcl-2 de reguladores anti- e proapoptóticos. Essas proteínas respondem a estímulos de várias formas de estresse intracelular, como dano ao DNA ou privação de citocinas, e interagem com membros da família opostos para determinar se a cascata proteolítica das caspases deve ser liberada ou não (CORY, 2003).

A família Bcl-2 é uma família de proteínas indutoras e repressoras de morte por apoptose que participam ativamente da regulação da apoptose (BORNER, 2003). Dentro da família Bcl-2 encontram-se proteínas: Pró-apoptóticas: Bax, Bak, Bad, Bim, Noxa, PUMA, BIK, HrK e BMF; e antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e Bfl-1 (YOULE e STRASSER, 2008). Além disso, foi relatado que proteínas da família Bcl-2 anti-apoptóticas protegem as células dos estímulos da morte em vários modelos de câncer (TAKAHASHI, 2013).

Dentre as famílias aqui citadas como antiapoptóticas, temos o Mcl-1 que foi reconhecido como um importante alvo terapêutico no câncer, e tendo sido altamente expresso em uma variedade de cânceres humanos (WEI, 2012). O Bcl-xL também pertencente à classe de proteínas antiapoptóticas, atua bloqueando a libertação de citocromo c (sinalizador para o processo de ativação de várias cascatas para o evento apoptótico) e a ativação de caspases que induzem a apoptose (KHARBANDA, 2000).

Em um dos estudos realizados sobre a investigação da proteína antiapoptótica Mcl-1, mostrou que o silenciamento dessa expressão proteica por RNA de interferência (siRNAs) reduziu significativamente a viabilidade e aumentou apoptose em quase 30% das linhagens de células testadas, incluindo câncer de pulmão e o adenocarcinoma da mama (MODUGNO et al, 2015). Além disso, combinação de medicamentos direcionados para inibir Mcl-1 resultou em radiosensibilização das células tumorais de mama. Coletivamente esses fatos tornam interessante a busca por moléculas que inibam as proteínas da família Bcl-2, assim como as caspases (MITCHEL et al., 2010).

## 2.7 CARCINOMA DA MAMA

O carcinoma da mama se classifica como neoplasia maligna extracutânea, sendo mais comum em mulheres, perdendo apenas para o câncer de pulmão como causa de mortes por câncer (INCA, 2019). A pré-disposição ou estilo de vida são importantes fatores determinantes

de risco de câncer de mama (COSTANZA, 2001). Outro fator determinante, desta neoplasia, relaciona-se com a expectativa de vida de uma mulher, ou seja, quanto maior for mais chances está terá em desenvolver o câncer de mama (RODNEY, et. al. 2003).

Quanto as estimativas, em 2018, aproximadamente 266.120 mulheres nos Estados Unidos foram diagnosticadas com carcinoma invasor de mama, e quase 40.920 mulheres morreram da doença (dados do Surveillance Epidemiology and End Results [SEER] em <http://seer.cancer.gov/>). No Brasil, o câncer de mama é classificado como o câncer mais comumente diagnosticado, perdendo apenas para o câncer de próstata, com uma estimativa de 59.700 novos casos no ano de 2018, e foi responsável por mais de 15.403 casos de mortes no Brasil. Dados também informam que é o primeiro mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na Região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil) (INCA, 2018).

Outros dados também sugerem que o impacto do estilo de vida e padrões reprodutivos estão na tendência ascendente para a incidência de câncer de mama; por exemplo, países agrícolas mudando para sociedades industriais (COLDITZ, 2014), menarca em idade mais jovem e menopausa mais tarde (COLDITZ, 2000). Além disso, o uso de Terapia de reposição hormonal (TRH) na pré e pós-menopausa (MAHON, 2011), o uso de contraceptivos orais e uma primeira gravidez a termo mais tarde, estão ligados ao aumento da ocorrência de câncer de mama.

**Figura 3.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	<b>Homens</b>  <b>Mulheres</b> 	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.520	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%
Cavidade Oral	11.180	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.220	2,3%

\* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: MS/INCA – Estimativa do câncer no Brasil, 2020.

## 2.8 USOS DE FÁRMACOS DE FONTES NATURAIS

Nos últimos anos, os medicamentos derivados de produtos naturais têm sido amplamente utilizados no tratamento do câncer devido à sua ampla variedade de fontes, melhores bioatividades e baixa toxicidade (HUANG, et. al. 2019). Além disso, muitos estudos indicaram que drogas derivadas de produtos naturais podem exercer efeitos anticâncer, agindo sobre metástases, invasões, apoptose e angiogênese, que são as principais características dos cânceres humanos (SHARMA, 2018; HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Os produtos naturais tem um longo histórico de uso como medicamentos ou fonte de princípios ativos para tratamento de doenças. No caso do câncer pode-se citar vários fármacos derivados de plantas que estão em uso clínico, como no caso dos alcaloide da vinca, vimblastina e vincristina isolados de *Catharanthus roseus*; etoposido e teniposido, que são derivados semi-sintéticos da epipodofilotoxina, além do Paclitaxel isolado de espécies de *Taxus* (GRAGG e NEWMAN, 2013). No Brasil também são observados estudos de moléculas isoladas de plantas com atividade antitumoral pertencente a diversas classes químicas, como pterocarpanos, alcalóides, diterpenos, cucurbitacinas (MILITÃO et al., 2014; FERREIRA et al., 2014; MILITÃO et al., 2012, SILVA et al., 2009; BEZERRA et al., 2007). De fato, a diversidade da flora encontrada no Brasil contribui o isolamento e identificação de moléculas biologicamente ativas.

## 2.9 O GÊNERO *BAUHINIA* E A ESPÉCIE *BAUHINIA ACURUANA*

O gênero *Bauhinia* está incluído na família (*Caesalpinioideae*, Leguminosae) de acordo com a lista de espécies da Flora do Brasil (VAZ, 2003). Este gênero compreende mais de 500 espécies localizadas nas zonas tropicais do planeta, assim como nas zonas tropicais da Ásia, leste do Paraguai e nordeste da Argentina e representa uma das maiores famílias de angiospermas (SOARES e SCARMINIO, 2008). As espécies deste gênero são comumente conhecidas como "Pata de vaca" ou "casco de vaca", devido ao seu formato de folha lembrarem o rastro da pata dos bovinos e têm sido utilizados na medicina popular para tratar várias doenças, especialmente diabetes, infecções, dor e processo inflamatório (CECHINEL, 2009).

Quanto ao seu uso na medicina popular, este gênero apresenta numerosos efeitos medicinais, como ações anti-inflamatórias (MOHAMED, 2009), hipoglicemiante e antioxidantes (SOUZA e colaboradores, 2004), antimicrobiana (KITTAKOOP et al., 2000),

antimalárica (KITTAkoop et al., 2000), antinociceptiva (ZAKARIA et al., 2007), antitumoral (PETTIT, 2006) e antimutagênica (AGRAWAL, 2009).

Quanto aos estudos fitoquímicos e farmacológicos realizados com estas plantas, do referido gênero, indicam que as mesmas são constituídas principalmente de flavonóides, comprovado assim sua eficácia terapêutica (CECHINEL FILHO, 2009).

A espécie *Bauhinia acuruana* de acordo com Vaz e Tozzi (2003), são subarbusto de comprimento variando entre 1,5-3,0 cm. Quanto as suas folhas são inteiras, lâmina 3,3-10,0 x 1,7-6,5 cm, cartácea e coreácea, ovado-oblonga a cordado-ovada, base cordada a emarginada, ápice mais ou menos agudo a obtuso até arredondado, face superior vilosa. Suas flores com pedicelo 1-2 cm comprimento, bractéolas lineares, hipanto cilíndrico; cálice fendido na antese; pétalas linear-oblongas e seus tricomas glandulares esparsos. Quanto a distribuição geográfica, essa espécie ocorre no Brasil, nos estados da Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Pernambuco e Piauí. Geralmente é encontrada em áreas montanhosas e/ou com altitudes de 600 até 1.100 metros. Pode crescer tanto em solo pedregoso ou arenoso, ou ainda argiloso, na caatinga, cerrado e ou ainda nos campos gerais e campo rupestre (VAZ; TOZZI, 2003).

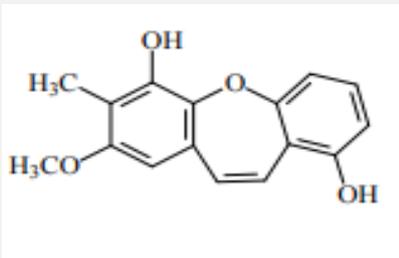
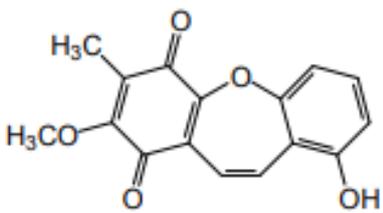
A partir de *Bauhinia acuruana* foi isolada uma oxepina denominada de pacharina com atividade larvicida (GÓIS, 2013). A pacharina foi isolada pela primeira vez em *Bauhinia racemosa* e posteriormente de *B. purpúrea* e das partes aéreas de *Cerces chinensis*. A pacharina causou inibição das células tumorais em um mini painel contendo, dentre as células testadas, a adenocarcinoma de mama (MCF-7) (PETTIT et al., 2006). Ainda na mesma espécie foram realizados estudos prévios na qual revelou que o óleo essencial das folhas de *B. acuruana* provindo do composto pacharina que foi isolado das raízes dessa espécie, apresentou atividade larvicida contra o *Aedes aegypti* (GÓIS et al., 2011; GÓIS et al., 2013). Investigações anteriores realizadas com pacharina e bauhiniastatina-1 (composto também isolado do extrato etanólico das raízes de *B. acuruana* e derivados oxepínicos) demonstraram que estes compostos, também apresentaram atividade antitumoral, mostrando inibição significativa do crescimento contra o adenocarcinoma do pâncreas (BXPC-3), células leucêmicas de rato (P388), adenocarcinoma da mama (MCF-7), glioblastoma do SNC (SF268), células de carcinoma de pulmão humano (NCI-H460) e carcinoma de próstata humana (DU-145) (PETTIT et al., 2006).

### 2.9.1 Estruturas e propriedades químicas dos compostos Pacharina e Bauhiniastatina-1

O composto da pacharina de fórmula molecular ( $C_{16}H_{14}O_4$ ), com nome químico dado por 8-metoxi-1,6-diidroxí-7-metil-dibenzo[b,f]oxepina, possuindo peso molecular de 270,284 g / mol (pubchem), permitiu o cálculo do IDH (Índice de deficiência de hidrogênio) sendo obtido o valor dez. Essa informação em conjunção com os dados espectroscópicos, levaram aos autores a concluir que a mesma tratava-se de um derivado oxepínico, da classe dos metabólito secundário de ocorrência rara na natureza (PETTIT *et al.*, 2006).

O composto da Bauhiniastatina 1 de fórmula molecular ( $C_{16}H_{12}O_5$ ), de nome químico 8-metoxi-1-hidroxi-7-metil-benzo [b] [1] benzoxepina-6,9-diona, e peso molecular de 284,267 g / mol (pubchem). Do mesmo modo realizou-se análise dos dados por espectroscópicos de RMN, sendo assim observado juntamente o valor do IDH (dez) sendo possível concluir que o composto aqui estudado tratava-se também de um derivado oxepínico, com características de um grupo hidroxilo, uma cetona conjugada e um anel aromático, diferindo pela presença de um anel ciclo-hexadienona e tendo sido descrita anteriormente em *Bauhinia purpurea* (PETTIT *et al.*, 2006) cuja estrutura está mostrada na Tabela 1.

**Tabela 1** - Oxepinas isoladas de espécies do gênero Bauhinia.

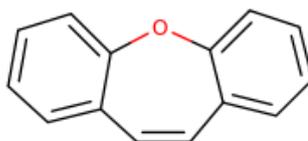
NOME	ESTRUTURA	REFERÊNCIA
<b>Pacharina</b>		PETTIT <i>et al.</i> , 2006 GOIS, 2014
<b>Bauhiniastatina-1</b>		PETTIT <i>et al.</i> ; 2006 GOIS, 2014

### 2.9.2 Dibenz [ b , f ] oxepina e sua relação com os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1

Os dibenzo[ *b*, *f* ]oxepina são compostos tricíclicos. A classe tricíclica é usada em medicamentos antidepressivos. Quanto a estrutura dibenz (b, f) oxepinas, esta é de ocorrência natural e rara, presente em uma classe de metabólitos secundários sendo encontradas em plantas do gênero *Bauhinia* (fam. Fabaceae) (PETTIT et al., 2006), e os produtos obtidos por síntese, exibem atividades biológicas importantes; como antidepressivo (ONG, 1980), ansiolítico (TRABANCO, 2004), antipsicótico (PHILLIPS, 1995), agentes terapêuticos (UMEDA, 2018), antagonista do receptor da angiotensina II (KIYAMA, 1995), neuroprotetoras (ANDRINGA, 2000), antineoplásica (PETTIT, 2006; GÓIS, 2013) e propriedades anti-inflamatórias (NAGAI, 1982; MORENO, 2013).

Em circunstância dos poucos relatos na literatura a respeito do mecanismo de atuação dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1, o presente trabalho buscou estudar o potencial citotóxico desses compostos em diferentes modelos celulares, e compreender melhor o mecanismo de atuação destes frente as células tumorais da MCF-7.

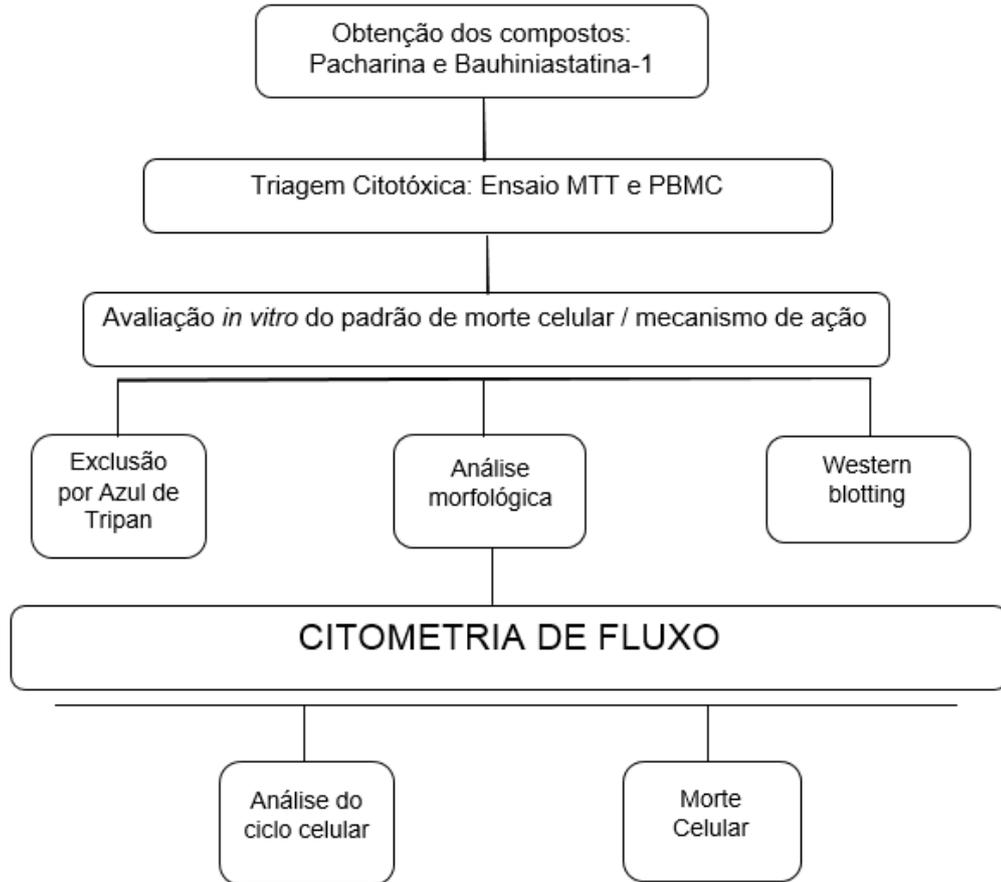
**Figura 4.** Estrutura química do dibenz (b, f) oxepin.



Fonte: Banco de dados ChemIDplus. Acesso em julho/2018.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia do trabalho foi desenvolvida de acordo com o fluxograma abaixo:



Delineamento experimental (Sílvia Souza, 2018).

#### 3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS PACHARINA E BAUHINIASTATINA-1

A obtenção e caracterização dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 foram realizadas pela professora Dra. Gilvandete Maria Pinheiro Santiago da Universidade Federal do Ceará e estes foram isolados da espécie *Bauhinia acuruana*.

#### 3.2 OBTENÇÃO E CULTIVO DAS CÉLULAS EM CULTURA

Nos ensaios aqui realizados foram utilizadas as linhagens tumorais MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), HL-60 (leucemia promielocítica humana), HCT-116 (carcinoma do cólon humano), HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), e as não tumorais L929 (fibroblasto de tecido conjuntivo animal), e MRC5 (fibroblasto de pulmão humano), obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro. Células mononucleares do sangue periférico humano (PBMC) estimuladas com Fitohemaglutinina-lectina com propriedade mitogénica, sendo adicionada para induzir a proliferação dos linfócitos, também foram utilizadas. As células (PBMC) foram obtidas de voluntários saudáveis com idades entre 18 a 30 anos, não fumantes, que não faziam uso de bebidas alcoólicas, sem exposição recente a radiações e sem ter feito uso crônico de fármacos.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brasil) aprovou o protocolo experimental (nº do parecer 2.980.861) para a coleta de PBMC. As linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>2</sup>, volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 (Gibco®) ou DMEM suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SFB, Gibco®) e 1 % de antibióticos. Nas células de PBMC, após a coleta, esse sangue foi centrifugado em um gradiente de Ficoll, e as células foram lavadas com tampão fosfato e ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina para uma concentração final de  $0,3 \times 10^6$  células/mL, e Fitohemaglutinina a (3%). As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C e acompanhadas diariamente.

### 3.3 ENSAIO DA CITOTOXICIDADE PELA REDUÇÃO DO MTT

Para avaliar a atividade citotóxica dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1, assim como determinar seus valores de IC<sub>50</sub> (concentração necessária para inibir 50% das células) foi utilizado o método colorimétrico do MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil, da marca Himedia). O teste foi utilizado para determinar a redução na viabilidade de células cancerígenas induzida por agentes citotóxicos, e baseia-se na capacidade de células viáveis metabolizarem o tetrazólio na mitocôndria pela ação de enzimas desidrogenases a um produto final formazan (MOSMANN, 1983).

As células foram distribuídas em placas de 96 poços numa densidade de  $0,3 \times 10^6$  células/mL ou  $1,0 \times 10^5$  células/mL. Os compostos testes, na concentração de 5 mg/mL,

dissolvidos em DMSO, e diluídos no meio RPMI (final de 0,5% DMSO) para obtenção das concentrações finais, foram adicionados em cada poço e encubados por 72 h. Para fins de comparação a doxorubicina (pureza  $\geq 95\%$ , cloridrato de doxorubicina, Laboratório IMA S.A.I.C., Buenos Aires, Argentina), foi utilizada como controle positivo. Todas as substâncias foram testadas com concentrações variando de 0,03 a 25  $\mu\text{g/mL}$ .

Decorridos 72 horas após o tratamento das células, o MTT 5mg/mL (20  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado procedendo-se a uma nova incubação que teve duração de 3 horas. Após esse período, o MTT excedente foi removido e 60  $\mu\text{L}$  de DMSO (PA) foi adicionado para solubilizar os cristais de formazan produzidos durante a incubação. Em seguida, as absorbâncias das amostras foram lidas a 575nm em um leitor de microplacas (Varioskan, Thermo Scientific).

A partir dos valores de  $\text{IC}_{50}$  obtidos para as células tumorais e não tumorais, foi selecionada a linhagem mais promissora, ou seja, que obteve o menor valor de  $\text{IC}_{50}$  e melhor seletividade, entre todas as linhagens testadas para os demais ensaios de mecanismo de morte. Neste estudo, a linhagem selecionada para os ensaios de padrão de morte e mecanismos de ação foram a MCF-7 e HL-60.

#### 3.4 ENSAIO DA VIABILIDADE CELULAR- EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPAN

Para avaliar a viabilidade celular e confirmar os resultados encontrados no ensaio de citotoxicidade pelo MTT, foi realizado o ensaio por azul de tripan. As células MCF-7 e HL-60 foram distribuídas em placa de 24 poços numa densidade de células/mL  $1,0 \times 10^5$  células/mL e  $0,3 \times 10^6$  células/mL, respectivamente, com meio RPMI suplementada com 10% de SBF e incubada com diferentes concentrações dos compostos testes (10, 20 e 40  $\mu\text{M}$ ).

Ao término do período de incubação com os compostos testes, 24 e 48 horas, as células foram tripsinizadas e uma alíquota de 90  $\mu\text{L}$  foi acrescida a 10  $\mu\text{L}$  do corante azul de tripan. O mecanismo de ação do teste baseia-se na capacidade de células viáveis expulsarem o corante de dentro da célula, enquanto células com membranas não íntegras, portanto não viáveis, retêm o corante, corando-se de azul. A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer por meio de microscópio óptico (Nikon, Tóquio, Japão), e cada amostra foi testada em triplicata em experimentos independentes.

### 3.5 AVALIAÇÃO IN VITRO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR/MECANISMO DE AÇÃO

Para os ensaios a seguir, denominado padrão de morte celular/mecanismo de ação, inicialmente foram desenvolvidos conforme a seguinte metodologia: as células da linhagem MCF-7 ( $1,0 \times 10^5$  células/mL) e HL-60 ( $0,3 \times 10^6$  células/mL) foram adicionadas em placas de 24 poços por um período inicial de 24 horas para aderirem (MCF-7); após este período, as células foram tratadas com pacharina e bauhiniastatina-1 nas concentrações de 10, 20  $\mu$ M para as linhagem de HL-60 e 20, 40  $\mu$ M para as linhagens de MCF-7, (concentrações estabelecidas previamente com base no valor de  $IC_{50}$ ) por 24 e 48 horas; as células foram mantidas em estufa a 37 ° C e a 5% de  $CO_2$ ; a doxorrubicina (1.8  $\mu$ M) foi utilizada como controle positivo e o controle negativo recebeu apenas o veículo (DMSO 0,1%) usado para solubilizar e diluir a substância testada.

### 3.6 ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS - COLORAÇÃO POR MAY-GRUNWALD-GIEMSA

Estabelecido o tempo de ação citotóxico, 24 e 48 horas, nas células tumorais MCF-7 e HL-60, realizou-se a análise morfológica destas a partir da confecção de lâminas. A coloração por May-Grunwald-Giemsa cora os componentes nucleares e citoplasmáticos das células, permitindo avaliar alterações morfológicas a nível de membrana, citoplasma e núcleo. O citoplasma cora-se em tons que variam do azul ao rosa claro, e o núcleo, em tons de roxo, sendo possível observar a morfologia celular e avaliar o padrão de morte celular.

Para a realização da análise morfológica, as células foram incubadas em placas de 24 poços e tratadas com os compostos testes. Transcorrido o tempo de incubação, as células foram tripsinizadas, e uma alíquota de 50 $\mu$ L da suspensão destas células tratadas, foram adicionadas na citocentrífuga (cytospin) e centrifugadas por 5 minutos a 2000 rpm. Em seguida, estas lâminas foram fixadas com metanol 100% por 30 segundos e coradas com May-Grunwald por 10 segundos, e logo após com Giemsa por 10 segundos. Seguidamente as lâminas com as células coradas foram avaliadas com o auxílio do microscópio óptico (Eclipse NI, NIKON) e as alterações morfológicas foram analisadas e fotografadas utilizando o software NIS Elements F, com auxílio da câmara (Digital Sight DS-U3, NIKON).

### 3.7 DETERMINAÇÃO DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA

A avaliação da externalização da fosfatidilserina é uma importante ferramenta para a compreensão do tipo de morte celular ocorrida uma vez que um dos primeiros eventos que ocorre na superfície de uma célula em processo de apoptose é a externalização da fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática, consequente da perda de assimetria dos fosfolípidos de membrana. (BOERSMA et. al., 2005).

O procedimento de detecção de apoptose e necrose por Anexina V FITC/ Iodeto de Propídio (AN/PI) consiste na ligação da anexina V-FITC (BD Biosciences) à fosfatidilserina, na membrana das células íntegras, mas com exposição de fosfatidilserina, que estão iniciando o processo apoptótico e na ligação do iodeto de propídio (BD Biosciences), que emite alta fluorescência quando ligado ao DNA de células não íntegras. Assim, foram classificadas como células em apoptose aquelas com marcação somente para Anexina-V (AN+)/(PI-), e aquelas com dupla marcação de Anexina V e PI (AN+)/(PI+), células em necrose somente com marcação para PI (AN-)/(PI+) e células viáveis não apresentaram nenhuma marcação.

A marcação para anexina V/iodeto de propídio foi realizada utilizando o kit FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) seguindo as instruções do próprio fabricante. Células MCF-7 na concentração de  $1,0 \times 10^5$  células/mL, foram incubadas por 24 e 48 h com a substância teste. Após os tratamentos as células foram centrifugadas e posteriormente lavadas com salina. O sobrenadante foi descartado e ao pellet celular foi adicionado 400  $\mu$ L de tampão de ligação e em seguida acrescentados 5  $\mu$ L de Anexina V-FITC e 5  $\mu$ L de iodeto de propídio. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 min, e posteriormente foi feito à aquisição dos dados em citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) usando o Software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA). Ao todo 10.000 mil eventos foram analisados por amostra.

### 3.8 DETERMINAÇÃO DO CICLO CELULAR E FRAGMENTAÇÃO DO DNA

O ciclo celular é constituído pelas seguintes fases: G1, S, G2 e M. Na (fase G1) a célula é bastante ativa e atuando na construção do DNA cromossômico e das proteínas associadas, além de acumular reservas de energia suficientes para concluir a tarefa de replicar cada

cromossomo no núcleo. Durante a fase S, (fase de síntese), a replicação do DNA resulta na formação de duas cópias idênticas de cada cromossomo - cromátides irmãs - firmemente fixadas na região do centrômero. Na fase seguinte (fase G2), sintetiza as proteínas necessárias para a transcrição seguida para a mitose. Diante das informações aqui apresentadas as fases do ciclo celular podem ser caracterizadas por variações no seu conteúdo de DNA que elas apresentam, que quando analisadas por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídeo, permitem quantificar a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular (CIBAS, 1995). O iodeto de propídeo (IP) é um agente fluorogênico hidrofílico com capacidade de se ligar no DNA celular emitindo alta fluorescência, refletindo a fase celular em que essas células se encontram (MACKLIS; MADISON, 1990).

As células MCF-7 foram plaqueadas na densidade de  $1,0 \times 10^5$  células/mL com diferentes concentrações do composto teste. Uma alíquota de 2mL foi recolhida após a incubação com a substância. As células foram diluídas com uma solução de permeabilização para que o PI pudesse se ligar aos núcleos de todas as células analisadas (100 µg/mL de DNase, 0,1% de citrato de sódio, 0,1 % de triton X-100 e foi acrescentado 2 µg/mL de iodeto de propídeo (BD Biosciences). Na ausência de luz e a 37 °C, após 15 minutos, as células foram analisadas por citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) usando o Software BD FACSDiva (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Ao todo 10.000 mil eventos foram analisados por amostra. As diferentes fases do ciclo celular foram identificadas usando o programa Flowjo Software 10 (Flowjo LCC, Ashland, OR, EUA).

### 3.9 EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS E WESTERN BLOTTING

Os níveis de proteína Mcl-1 e Bcl-xl foram detectados por análise de Western blotting. As células MCF-7 foram inoculadas em garrafas pequenas de cultura a  $5,0 \times 10^5$  células / mL e tratadas com as seguintes condições durante 24 h e 48 h: 1) DMSO (0,1 %) como controle negativo, 2) Pacharina (20 µM), 3) Pacharina (40 µM), 4) Bauhiniastatina-1 (20 µM), e 5) Bauhiniastatina-1 (40 µM). Após os tratamentos, as células foram recolhidas por centrifugação a 2000 rpm durante 5 min. Os sedimentos celulares foram ressuspensos em 60 µl de tampão RIPA (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, Triton 1%, Deoxicolato de Sódio 0,5%, SDS 0,1%, EDTA 1µM) mais 3 µl de inibidor de protease (1:100 v/v), ortovanadato de sódio e fluoreto de sódio e os lisados foram centrifugados (13.000 rpm 20 min a 4 ° C). De cada amostra, 30 µg de

proteína total foram carregadas com o tampão Blue Juice 5X. O marcador de peso molecular *Full-Range Rainbow Marker* (12 – 225 kDa; GE Healthcare) foi utilizado. As amostras foram separadas em 5 a 12,5% de SDS PAGE e as proteínas foram transferidas para a membrana de nitrocelulose GE Amersham Hybond ECL 0.45µm Nitrocellulose Blotting Membrane. Em seguida a membrana foi incubada com tampão de bloqueio (1X TBST- 5% nonfort dry milk) durante 1 h e depois incubada com os anticorpos primários Mcl-1 e Bcl-xl (Cell Signaling Technology™) deixados em overnight. Transcorrido o tempo, a membrana foi lavada 3 vezes com TBST e depois incubada com o anticorpo secundário Anti-Rabbit (Cell Signaling Technology™). Para o controle usou-se o anticorpo primário β-actina (sigmaaldrich™) e o secundário anti-mouse, seguindo as mesmas especificações acima. As bandas de interesse foram reveladas usando ECL prime Western Blotting (GE helthcare) e depois fotografadas e analisadas, usando o Software Image Lab 6.0.1 Bio- RAD.

#### **4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados segundo suas médias e respectivos intervalos de confiança de 95%, por regressão não linear, a partir de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. A diferença entre os grupos experimentais foi avaliada pelo teste ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Dunnett's Multiple Comparison ( $P < 0,05$ ). O programa Graphpad Prism versão 5.0 foi utilizado para a realização de todas as análises (GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DOS COMPOSTOS PACHARINA E BAUHINIASTATINA-1 NA VIABILIDADE CELULAR NAS LINHAGENS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS

Para análise quantitativa da viabilidade e proliferação celular, os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1 foram testados em diferentes linhagens celulares (MCF-7, HT-29, HCT 116, HL-60, HepG2, L292, MRC-5 e PBMC), para uma triagem citotóxica utilizando o ensaio do MTT.

A tabela 2 apresenta os resultados encontrados dos valores de Concentração Inibitória em 50% após 72 h de incubação. Os compostos PAC e BAU apresentaram efeito citotóxico para todas as linhagens de células tumorais testadas. Tendo para estes resultados valores de IC<sub>50</sub> variando de 12,5 a 62,48 µM para as linhagens HL-60 e HT-29, respectivamente, para o composto da pacharina. A bauhiniastatina-1 apresentou valores de IC<sub>50</sub> variando de 10,6 a maior que 100 µM para as linhagens de células tumorais HL-60 e HT-29, respectivamente. A doxorrubicina apresentou valores de IC<sub>50</sub> variando de 0,14 a 2,67 µM também para as linhagens HL-60 e HT-29 respectivamente.

Para as células não tumorais L292, MRC-5 e PBMC, a pacharina apresentou valores de IC<sub>50</sub> variando de 62,85 para a célula L292 a maior que 100 µM para as células MRC-5 e PBMC. Enquanto a bauhiniastatina-1 apresentou valores de IC<sub>50</sub> entre 65,0 para a célula MRC-5 a maior que 100 µM para a célula PBMC. A doxorrubicina, 0,97 e 3,31 µM, para as células L292 e MRC-5, respectivamente. A Tabela 3 mostra o índice de seletividade (IS) calculado.

**Tabela 2.** Atividade citotóxica dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 em células com diferentes tipos histológicos.

Células	Tipo histológico	IC <sub>50</sub> em µM		
		DOX	PAC	BAU
<b>Células cancerígenas</b>				
HL-60	Leucemia promielocítica humana	0,14 0,10 - 0,19	12,5 9,93 - 15,73	10,6 8,15 - 13,77
MCF-7	Adenocarcinoma de mama humano	0,55 0,36 - 0,92	20,0 14,81 - 26,66	21,83 14,43 - 32,74
HCT116	Carcinoma de colorretal	0,23 0,16 - 0,31	19,25 16,29 - 22,96	25,70 22,53 - 28,87
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano	0,25 0,16 - 0,40	48,22 35,62 - 65,29	41,33 23,41 - 72,92
HT-29	Adenocarcinoma de cólon humano	2,67 1,76 - 4,01	62,48 40,07 - 97,40	>100 77,07 - 404,57
<b>Células não cancerígenas</b>				
L929	Fibroblasto de tecido conjuntivo animal	0,97 0,68 - 1,38	62,85 27,44 - 143,92	>100 33,69 - 317,35
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> ativados com fitohemaglutinina	1,8 0,9 - 3,3	>100	>100
MRC5	Fibroblasto de pulmão humano	3,31 1,91 - 5,74	>100 61,18 - 130,92	65 47,35 - 89,19

Valores de IC<sub>50</sub> e o respectivo intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do MTT após 72 h de incubação obtidos por regressão não-linear. A doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo. Pacharina (PAC) e Bauhiniastatin-1 (BAU).

**Tabela 3.** Índice de seletividade dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1.

Células cancerígenas	Células não cancerígenas								
	L292			MRC5			PBMC		
	DOX	PAC	BAU	DOX	PAC	BAU	DOX	PAC	BAU
HL-60	6,92	5,02	9,75	23,64	7,16	6,13	10,85	6,4	7,54
MCF-7	1,76	3,14	4,73	6,01	4,47	2,97	3,27	4,0	3,6
HCT116	4,21	3,26	4,02	14,39	4,64	2,52	7,82	4,15	3,11
HepG2	3,88	1,30	2,50	13,24	1,85	1,57	7,2	1,65	1,93
HT-29	0,36	1,00	0,58	1,23	1,43	0,36	0,67	1,28	0,45

Os dados apresentam o índice de seletividade (IS) calculado com a seguinte fórmula:  $IS = IC_{50}[\text{células não cancerígenas}] / IC_{50}[\text{células cancerígenas}]$ . Células cancerígenas: MCF7 (adenocarcinoma de mama humano); HT-29 (Adenocarcinoma de cólon humano); HCT 116 (carcinoma do cólon humano); HL-60 (leucemia promielocítica humana) e HepG2 (Carcinoma hepatocelular humano). Células não cancerígenas: L292 (Fibroblasto de tecido conjuntivo animal) e MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano). Doxorubicina (DOX) foi utilizada como controle positivo. Pacharina (PAC) e Bauhiniastatina-1 (BAU).

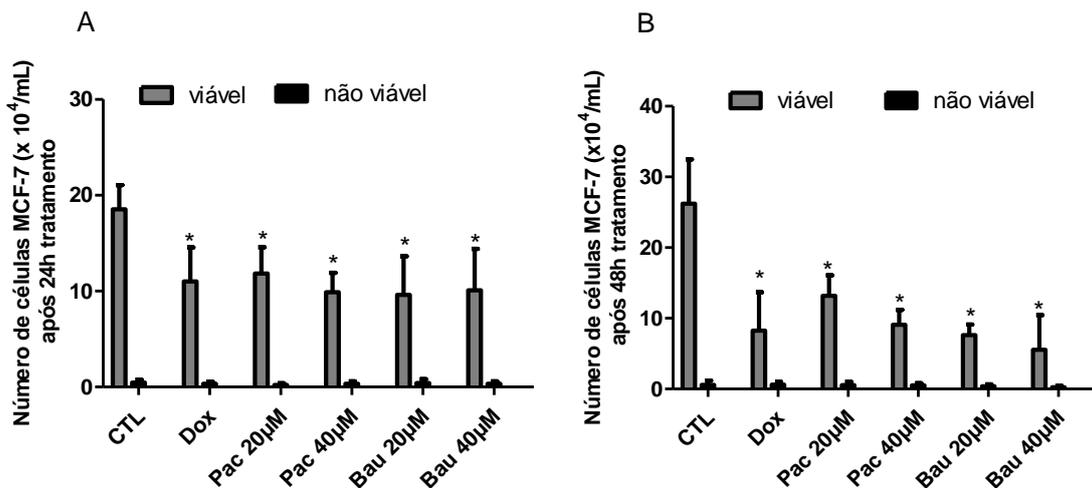
## 5.2 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR – EXCLUSÃO POR AZUL DE TRIPAN

A citotoxicidade dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 foi confirmada pelo ensaio de exclusão azul de tripan em células MCF-7 e HL-60, após 24 e 48 h de incubação. A pacharina e a bauhiniastatina-1 reduziram significativamente o número de células viáveis.

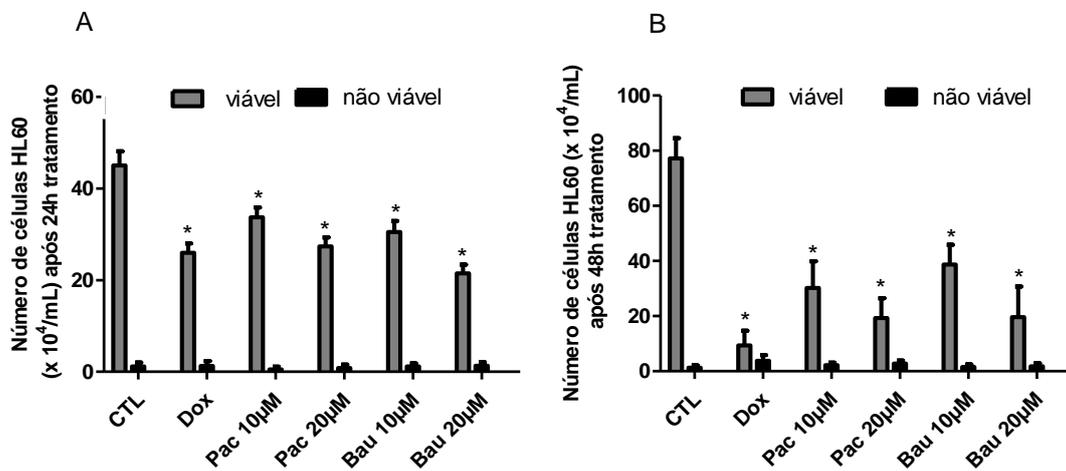
Nas células da MCF-7, o composto da pacharina nas concentrações de 20 e 40  $\mu\text{M}$  reduziu o número de células viáveis de 36,2 % e 46,74 % após 24h, para 49,64 % e 65,36 % após 48h (**Fig. 5A-B, tabela 4**). A bauhiniastatina-1 na mesma linhagem, nas concentrações de 20 e 40  $\mu\text{M}$ , reduziu o número de células viáveis de 48,23 % e 45,64 % após 24h para 70,93 % e 78,87 % após 48h (**Fig. 5A-B, tabela 4**). A doxorubicina na concentração de 1,8  $\mu\text{M}$  reduziu o número de células viáveis de 40,67 % após 24h para 68,53 % após 48h de tratamento.

Na linhagem HL-60 houve redução do número de células viáveis, pelo tratamento com o composto da pacharina nas concentrações de 10 e 20  $\mu\text{M}$ , de 25,17 % e 39,19 % após 24 h, para 60,84 % e 70% após 48 h, respectivamente (**Fig. 6A-B, tabela 4**). Para o composto da bauhiniastatina-1, também nas mesmas concentrações 10 e 20  $\mu\text{M}$ , houve redução do número de células viáveis de 32,21 % e 52,34 % após 24h, para 49,87 % e 74,55 % após 48 h, respectivamente (**Fig. 6A-B, tabela 4**). Já a doxorubicina reduziu o número de células viáveis de 42,39 % após 24h, para 87,88 % após 48h. Não foi observado aumento significativo ( $p > 0,05$ ) nas células não viáveis.

**Figura 5.** Efeito dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 na viabilidade celular da MCF-7 pela coloração com azul de tripan após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado, nesta concentração o DMSO não é citotóxico. Pacharina (PAC, 20 - 40  $\mu\text{M}$ ) e Bauhiniastatina-1 (BAU, 20 - 40  $\mu\text{M}$ ). A doxorubicina (DOX, 1.8  $\mu\text{M}$ ) foi utilizada como controle positivo. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média) de dois experimentos independentes realizados em triplicata. \*  $P < 0,05$  em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido do teste de Dunnett's Multiple Comparison apresentando significância.



**Figura 6.** Efeito dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 na viabilidade celular da HL-60 pela coloração com azul de tripan após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado, nesta concentração o DMSO não é citotóxico. Pacharina (PAC, 10 - 20  $\mu$ M) e Bauhiniastatina-1 (BAU, 10 - 20  $\mu$ M). A doxorubicina (DOX, 1,8  $\mu$ M), foi utilizado como controle positivo. Os dados são apresentados como a média  $\pm$  E.P.M. (erro padrão da média) de dois experimentos independentes realizados em triplicata. \* P <0,05 em comparação com controle negativo por ANOVA seguido do teste de Dunnett's Multiple Comparison apresentando significância.



**Tabela 4.** Efeito dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 na viabilidade celular das linhagens MCF-7 e HL-60 pelo ensaio de exclusão azul de tripan após 24 h e 48 h de incubação.

Linhagem	Tratamento	Taxa de Inibição dos compostos testes após tratamentos (%)	
MCF-7		% Inibição 24h	% Inibição 48h
	Doxorrubicina	40,67	68,53
	Pacharina 20 $\mu$ M	36,2	49,64
	Pacharina 40 $\mu$ M	46,74	65,36
	Bauhiniastatina-1 20 $\mu$ M	48,23	70,93
	Bauhiniastatina-1 40 $\mu$ M	45,64	78,87

HL-60	Doxorrubicina	42,39	87,88
	Pacharina 10 $\mu$ M	25,17	60,84
	Pacharina 20 $\mu$ M	39,19	70,06
	Bauhiniastatina-1 10 $\mu$ M	32,21	49,87
	Bauhiniastatina-1 20 $\mu$ M	52,34	74,55

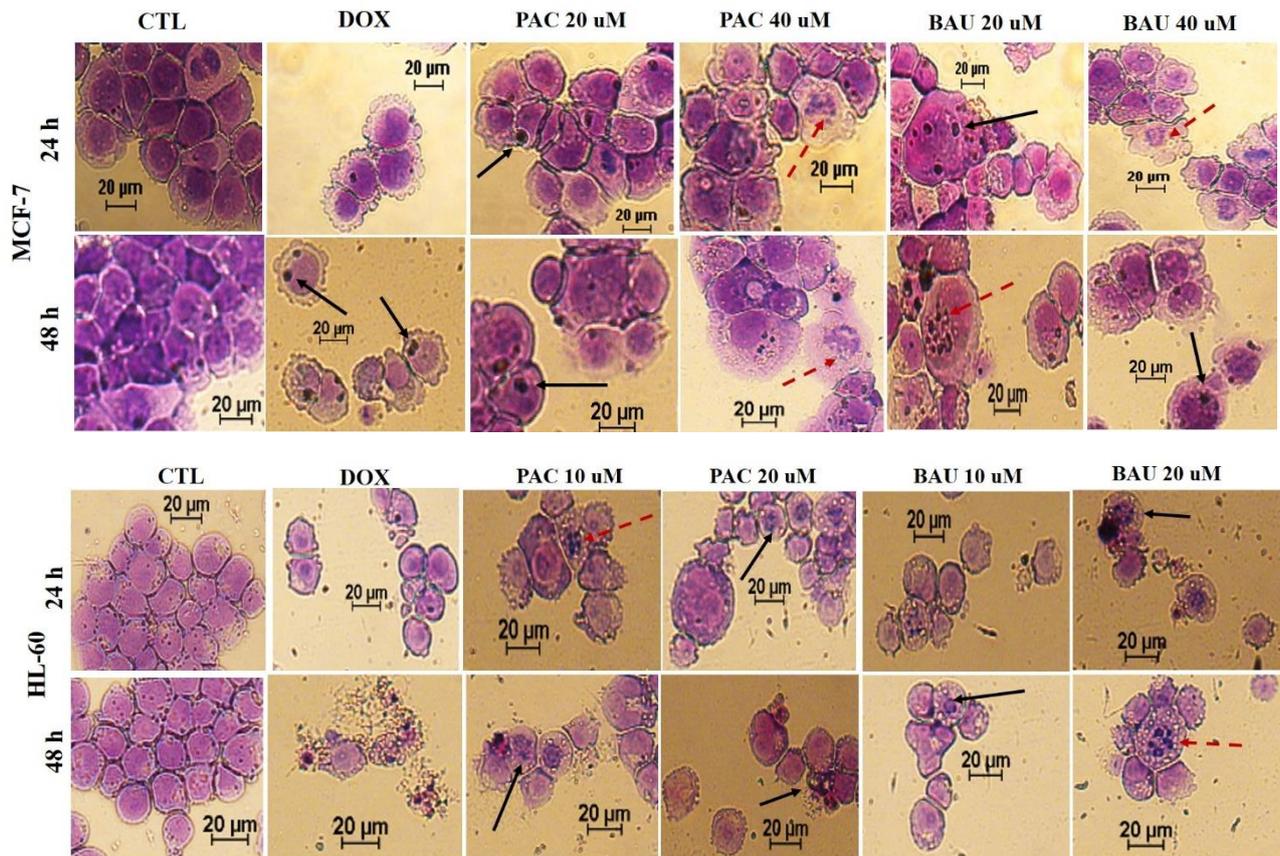
---

A tabela apresenta os valores correspondentes a porcentagem de pelo menos dois experimentos independentes realizados em triplicata. A doxorrubicina foi usada como controle positivo.

### 5.3 EFEITO DO TRATAMENTO COM OS COMPOSTOS PACHARINA E BAUHINIASTATINA-1 NA ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA APÓS INCUBAÇÃO ENTRE 24 H E 48 H

A Figura 7 apresenta a morfologia das células MCF-7 e HL-60 tratadas com pacharina e bauhiniastatina-1, por coloração com May-Grunwald Giemsa, onde se observa redução no volume celular, condensação da cromatina e presença aumentada de células em fases mitóticas.

**Figura 7.** Aspectos morfológicos das células MCF-7 e HL-60 após tratamento com pacharina e bauhiniastatina-1 por 24 e 48h nas concentrações de 10, 20 e 40  $\mu$ M. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado, nesta concentração o DMSO não é citotóxico. A doxorrubicina (DOX, 1.8  $\mu$ M), foi usada como controle positivo. O efeito das substâncias sobre a morfologia celular foi avaliado por comparação ao controle tratado apenas com o veículo utilizado para diluir as substâncias. As setas indicam células com condensação da cromatina ou DNA fragmentado, alterações morfológicas características de processo apoptóticos e mitóticos.

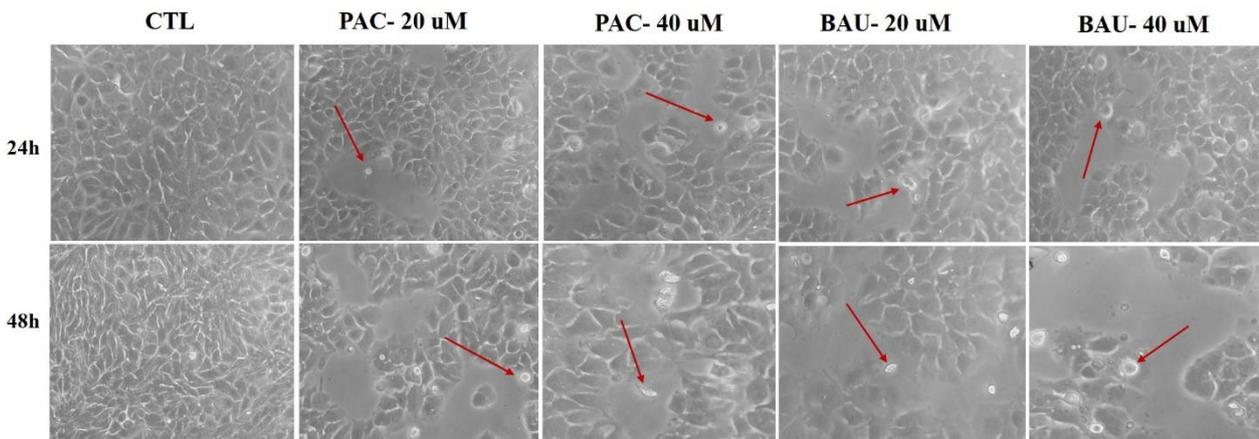


LEGENDA: Setas → Dna fragmentado; - - → parada na mitose.

#### 5.4 ASPECTOS MORFOLÓGICOS DAS CÉLULAS MCF-7 EM MONOCAMADA

A citotoxicidade dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 foi avaliada nas células vivas *in vitro* da cultura formada a partir de células MCF-7. O tratamento com esses compostos nas concentrações de 20 e 40 μM, nos intervalos de 24 e 48 horas, resultou na detecção de paradas de fusos mitóticos, assim como diminuição no volume celular, sugerindo que ambos compostos apresentam ação citostática (Fig. 8).

**Figura 8.** Efeito dos compostos pacharina (PAC) e bauhiniastatina-1 (BAU), em células MCF-7 *in vitro*. Células examinadas por microscopia óptica (20X). Células MCF-7 foram tratadas por 24 e 48h com os compostos nas concentrações de 20 e 40  $\mu\text{M}$ . O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado, nesta concentração o DMSO não é citotóxico. As setas indicam paradas nas fases mitóticas.



### 5.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MORTE CELULAR PELA DUPLA COLORAÇÃO COM ANEXINA V-FITC / PI

A citometria de fluxo mostrou que os compostos pacharina e bauhiniastatina-1 atuaram na indução de apoptose de células MCF-7 humanas (Fig. 9). As células do quadrante superior esquerdo Q1, representam o grupo de células necróticas, o da direita Q2, o grupo de células em apoptose tardia. As células que estão no quadrante inferior direito Q3, representa o grupo de células em apoptose inicial e o quadrante inferior da esquerda Q4, as células viáveis.

Para determinar a porcentagem de morte celular por apoptose e necrose causada pelos compostos pacharina e bauhiniastatina-1, as células foram tratadas nas concentrações 20 e 40  $\mu\text{M}$  por 24 e 48 horas, seguido de análise em citômetro de fluxo com marcação para anexina V-FITC/PI.

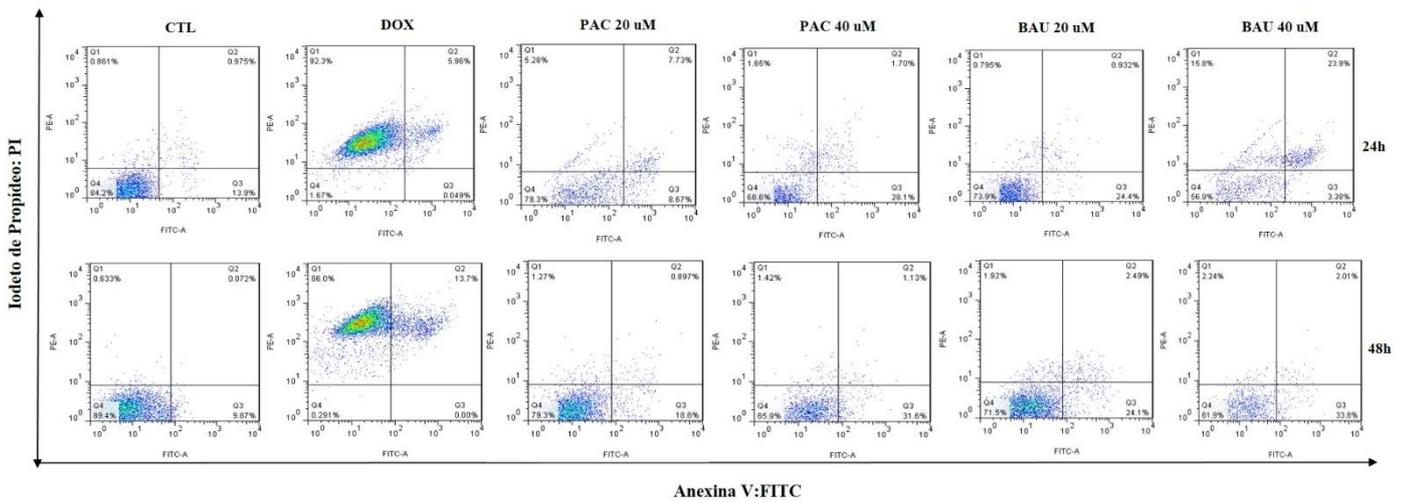
As células da MCF-7 incubadas por 24h com os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1, apresentaram uma porcentagem de apoptose variando de 24 e 47% para as concentrações de 20 e 40  $\mu\text{M}$ . Com um aumento significativo de 47% de apoptose nas células

tratadas com a bauhiniastatina-1 na concentração de 40  $\mu\text{M}$ . A doxorubicina utilizada como controles positivo, apresentou uma porcentagem de 23% para apoptose, e induziu um aumento de modo significativo de 81% para necrose no mesmo intervalo de incubação (figuras 9 e 10A).

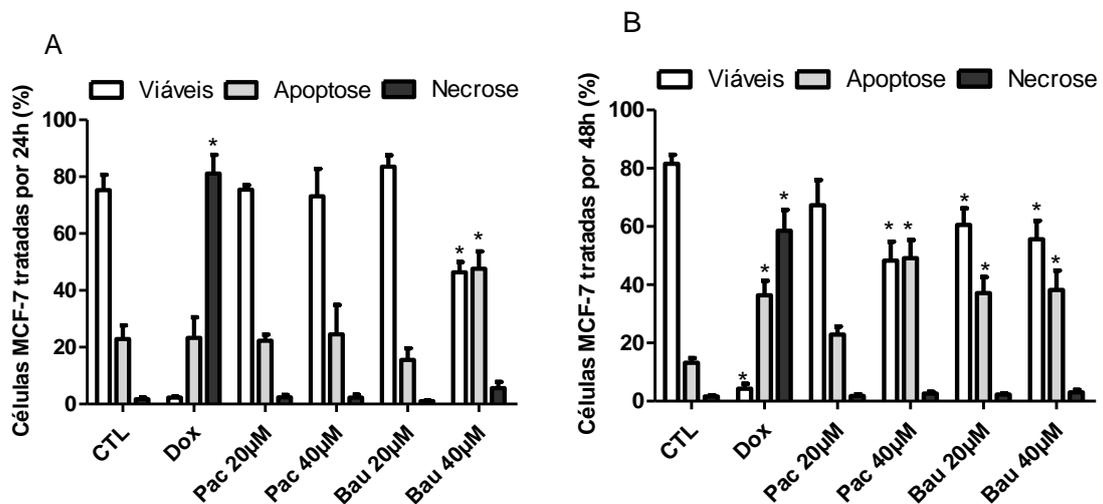
Para o tratamento com 48h, com os compostos da pacharina na maior concentração 40  $\mu\text{M}$ , observou-se um aumento significativo de apoptose com uma média de 49%. Nas células tratadas com o composto bauhiniastatina-1 observou-se um aumento significativo nas concentrações (20 e 40  $\mu\text{M}$ ), com porcentagens de 37 e 38% de apoptose. A doxorubicina também utilizada como controles positivo, induziu um aumento de modo significativo de 36% de apoptose e 58% para necrose (figuras 9 e 10B).

Assim, sugerimos que os compostos em estudos apresentam ação apoptótica. Para o composto da bauhiniastatina-1 este apresentou apoptose no intervalo de 24h na concentração de 40  $\mu\text{M}$ , já no tratamento com 48h houve indução de apoptose tanto nas concentrações de 20 e 40  $\mu\text{M}$ . No composto da pacharina observamos apoptose para o intervalo de 48h na concentração de 40  $\mu\text{M}$ .

**Figura 9.** Efeito dos compostos pacharina (PAC) e bauhiniastatina-1 (BAU) na indução de apoptose em células MCF7 determinadas por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/PI após 24 e 48 h de incubação. Dot plots representativos mostrando a porcentagem de células viáveis (Q4), em apoptose inicial (Q3), apoptose tardia (Q2) e necrose (Q1). O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO). A doxorubicina (DOX, 1.8  $\mu\text{M}$ ), foi utilizada como controle positivo.



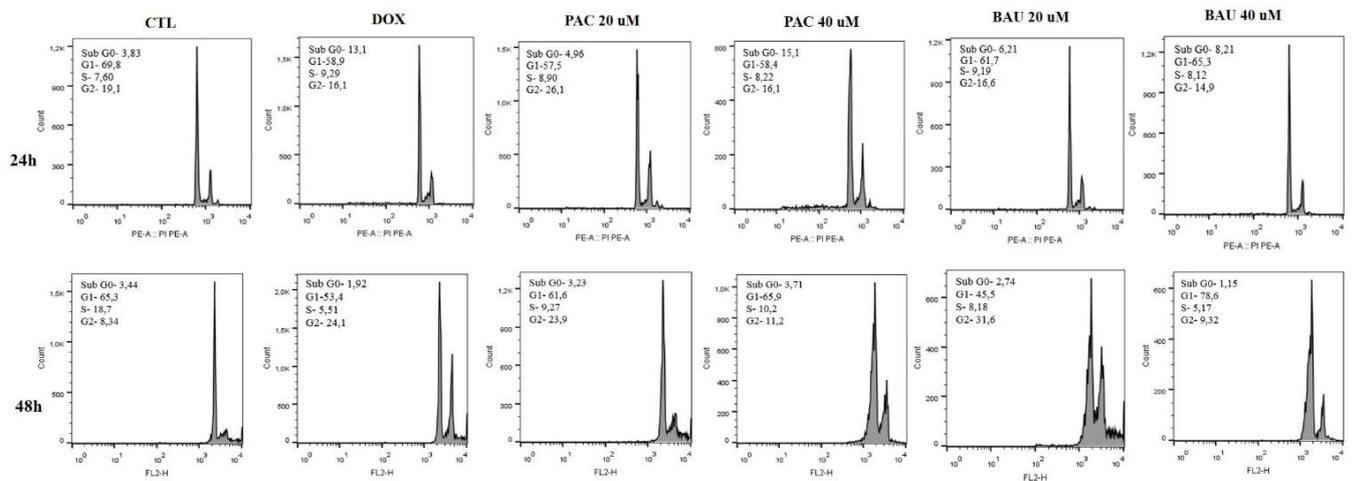
**Figura 10.** Efeito dos compostos pacharina (PAC) e bauhiniastatina-1 (BAU) na indução de apoptose em células MCF-7 determinadas por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/PI após 24 (fig. A) e 48 h (fig. B) de incubação. Quantificação da porcentagem de células viáveis, em apoptose e necrose. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO). A doxorubicina (DOX, 1,8  $\mu$ M), foi utilizada como controles positivos. Os dados são apresentados independentes realizados em duplicata. \*  $P < 0,05$  em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett's Multiple Comparison. como a média  $\pm$  E.P.M. de três experimentos.



## 5.6 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

A distribuição do ciclo celular em células MCF-7 tratadas com os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1 foram investigados por citometria de fluxo após 24 e 48 h de incubação. Em todas as concentrações, o tratamento com os compostos pac e bau, não resultou em um aumento significativo no número de células em nenhuma fase específica do ciclo celular em comparação com o controle negativo, ou seja, os compostos não atuaram numa fase específica do ciclo celular, como mostrado na (Fig. 11). Havendo apenas parada no ciclo para o controle positivo, doxorrubicina, com aumento na fase G2/M após 48h de tratamento, como pode ser visto na (Tabela. 5). Sugerimos assim, que os efeitos dos compostos sejam mais lentos, precisando de maior tempo de incubação, por exemplo 72 h, para que se possa ter uma melhor resposta quanto a indução de fragmentação do DNA. Sugerindo-se um tempo maior de incubação para que se possa obter uma resposta mais específica quanto a atuação destes compostos frente ao mecanismo de regulação do ciclo celular.

**Figura 11.** Histogramas representativos da análise da distribuição do conteúdo de DNA determinados por citometria de fluxo. Células de adenocarcinoma de mama MCF-7 foram analisadas após o tratamento com os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1 por 24 e 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias. A doxorrubicina (1.8  $\mu$ M) foi utilizado como controle positivo. Os histogramas são representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.



**Tabela 5.** Efeito dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 sobre a distribuição do conteúdo de DNA celular.

Tratamento	Concentração (uM)	Distribuição do Conteúdo de DNA (%)			
		Sub G0	G1	S	G2/M
<b>24 h de tratamento</b>					
DMSO 0,1%	-	16,04 ± 9,7	40,32 ± 10,93	7,183 ± 1,59	22,21 ± 7,71
Doxorrubicina	1.8 uM	33,33 ± 26,4	34,55 ± 11,86	6,160 ± 2,27	17,14 ± 11,76
Pacharina	20 uM	19,07 ± 8,4	39,60 ± 14,64	5,998 ± 4,29	18,56 ± 8,51
Pacharina	40 uM	24,63 ± 9,03	32,93 ± 10,49	8,675 ± 3,63	17,01 ± 6,87
Bauhiniastatina-1	20 uM	18,51 ± 13,6	39,08 ± 10,59	8,267 ± 4,19	21,93 ± 8,29
Bauhiniastatina-1	40 uM	22,37 ± 11,3	39,73 ± 12,80	7,930 ± 5,48	17,23 ± 5,50
<b>48 h de tratamento</b>					
DMSO 0,1%	-	2,578 ± 0,93	62,67 ± 2,26	12,51 ± 7,00	18,18 ± 9,68
Doxorrubicina	1.8 uM	1,868 ± 0,35	47,20 ± 6,89	7,585 ± 1,57	34,80* ± 9,86
Pacharina	20 uM	2,668 ± 1,90	61,47 ± 7,33	8,495 ± 4,78	17,96 ± 6,17
Pacharina	40 uM	2,042 ± 1,93	58,22 ± 9,61	8,573 ± 2,19	19,07 ± 3,81
Bauhiniastatina-1	20 uM	2,498 ± 1,45	50,03 ± 9,46	8,322 ± 1,13	27,57 ± 10,73
Bauhiniastatina-1	40 uM	2,366 ± 1,70	59,92 ± 17,29	8,010 ± 1,66	17,60 ± 8,59

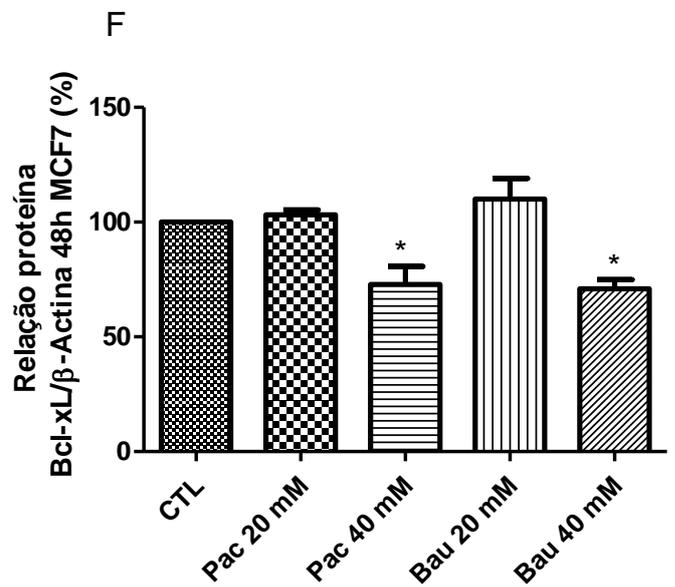
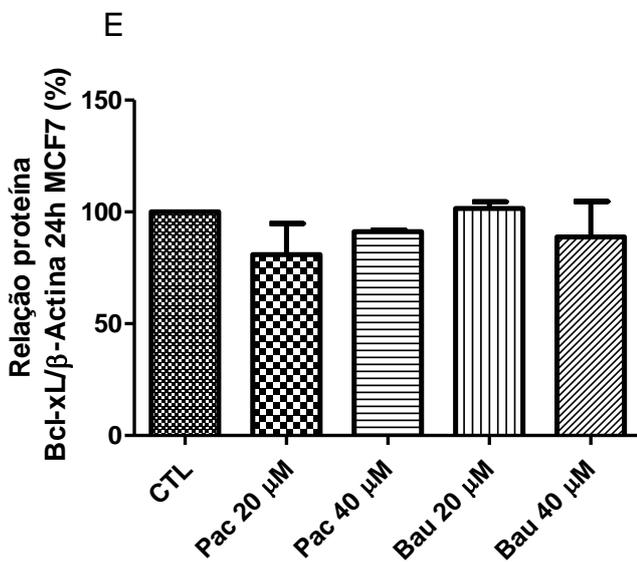
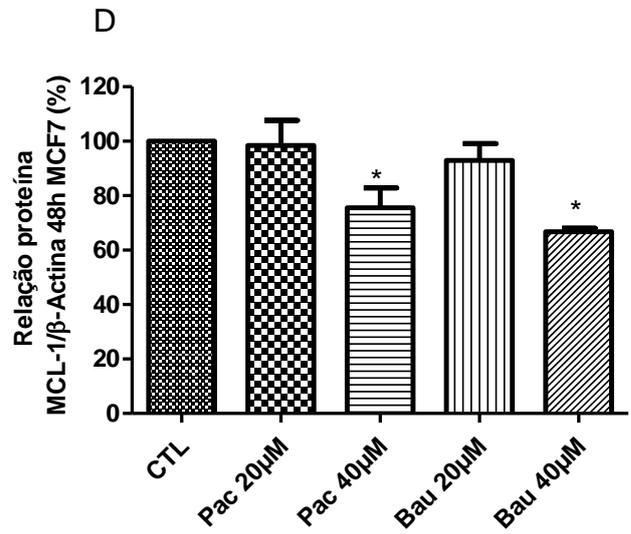
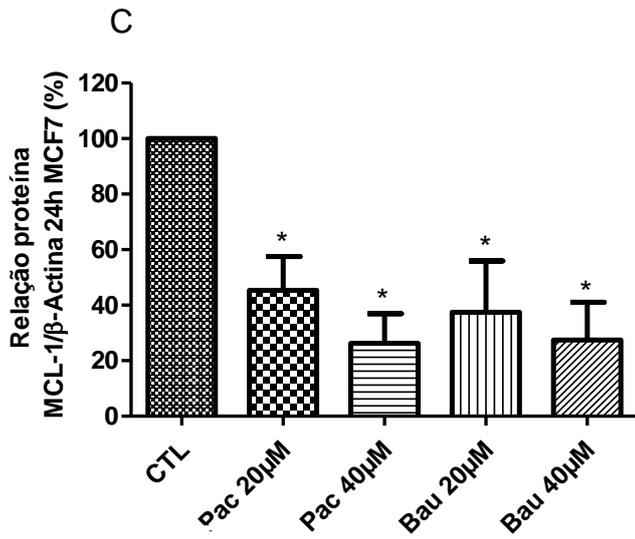
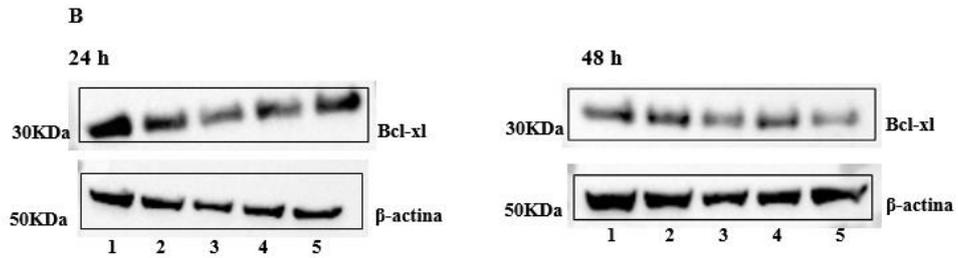
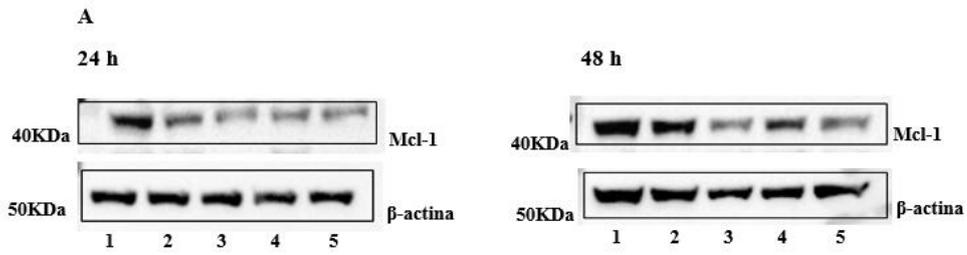
A tabela apresenta os valores correspondentes a média ± E.P.M de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) utilizado para solubilizar e diluir as substâncias. A doxorrubicina foi usada como controle positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. \* $P < 0,05$  quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

## 5.7 DETECÇÃO DE EXPRESSÕES DE MCL-1 E BCL-XL USANDO WESTERN BLOTTING

Para compreender melhor a via de morte celular das células MCF-7 pelos compostos pacharina e bauhiniastatina-1, foi realizado o ensaio de western blotting. As proteínas Mcl-1 e

Bcl-xL, foram analisadas após o tratamento dessas células pelos mesmos compostos entre os intervalos de tempo 24 e 48 h, nas concentrações de 20 e 40  $\mu\text{M}$ . Os compostos aqui estudados induziram uma diminuição significativa da expressão proteica do Mcl-1 no intervalo de 24h para as concentrações de 20 e 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 12 A, C). No intervalo de 48h, houve a repressão desta proteína, Mcl-1, nas células tratadas com os compostos pacharina e bauhiniastatina-1 nas maiores concentrações 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 12 A, D). Observou-se também uma diminuição na expressão da proteína Bcl-xL nos resultados pelo blot, no intervalo com 48h para os compostos PAC e BAU de maior concentração 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 12 B, F). Além disso, os compostos PAC e BAU não induziram alterações estatisticamente significativas na expressão da proteína Bcl-xL após 24h de tratamento (Fig. 12 B, E), no entanto, esses mesmos compostos conseguiram reduzir significativamente a expressão proteica da Bcl-xL após 48h de tratamento nas maiores concentrações, 40  $\mu\text{M}$  (Fig. 12 F).

**Figura 12.** Alterações na expressão de proteínas relacionadas à apoptose após incubação com compostos pacharina e bauhiniastatina-1. Em (A-B) análises de Mcl-1 e Bcl-xL realizadas por western blotting, tratadas com as seguintes condições durante 24 h e 48 h: 1) DMSO (0,1 %) como controle negativo, 2) Pacharina (20  $\mu\text{M}$ ), 3) Pacharina (40  $\mu\text{M}$ ), 4) Bauhiniastatina-1 (20  $\mu\text{M}$ ), e 5) Bauhiniastatina-1 (40  $\mu\text{M}$ ). Em (C, D, E, F) quantificação da porcentagem dos níveis de inibição das proteínas Mcl-1 e Bcl-xL nos intervalos de 24 e 48h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO). Os dados são apresentados como a média  $\pm$  E.P.M. \*  $P < 0,05$  em comparação com o controle negativo por ANOVA seguido pelo teste de Dunnett's Multiple Comparison.



## 6 DISCUSSÃO

De acordo com os poucos relatos na literatura sobre os compostos pacharina e bauhiniastatina-1 e tendo em vista suas propriedades farmacológicas e medicinais, buscamos compreender melhor o mecanismo de atuação desses compostos em células cancerosas. Logo, foi realizado um estudo farmacológico para avaliar seu potencial citotóxico em diferentes linhagens de células cancerígenas. Inicialmente foram avaliadas a atividade citotóxica e sua seletividade em relação a células cancerígenas e não cancerígenas. Em seguida, foi estudado o mecanismo de ação envolvidos na citotoxicidade destes compostos, assim como as vias pelas quais eram induzidas as mortes destas células.

Um número de dibenzo[b, f]oxepinas de ocorrência natural foi isolado a partir de plantas do género *Bauhinia* e muitas delas também exibem atividades biológicas importantes (FILHO, 2009). Por exemplo, alguns estudos com o extrato bruto da raiz de *Bauhinia saccocalyx* Pierre exibiu atividade antimalárica e antimicobacteriana (KITTAKOOP, 2004). Pettit et al. isolou de *Bauhinia purpurea* L., a bauhiniastatina-1 que exibiu atividade significativa de inibição de crescimento contra linhagens de câncer humano (PETTIT, 2006). Da mesma planta, Kittakoop et al. descreveram a bauhinioxepina J, que mostra potentes atividades antimicobacterianas e antimaláricas, bem como atividade inibitória do crescimento tumoral, contra células KB (BOONPHONG, 2007).

Com base nestes dados e tendo em vista a ausência detalhada na literatura, sobre as vias envolvidas de morte nas células cancerosas, estudamos o mecanismo de ação dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1 em células tumorais.

Nesse estudo, os achados para o teste de citotoxicidade, corroboraram para com outros estudos, apresentando-se atividade citotóxica com inibição significativa no crescimento celular das linhagens tumorais MCF-7 e HL-60 (PETTIT, 2006; GÓIS, 2013).

Quanto a análise para o grau de seletividade dos compostos pacharina e bauhiniastatina-1, observamos que os valores de IC<sub>50</sub> nas células cancerígenas eram menores do que nas não cancerígenas. Tendo em vista que, valores de IS são considerados significativos quando apresenta valores  $\geq 2,0$  (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990). Dentre as linhagens testadas para os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1, a HL-60 e MCF-7 apresentaram maior valor de IS (9,75) e (4,73) respectivamente, para o tratamento com o composto da bauhiniastatina-1. Logo, quanto a avaliação para a citotoxicidade em células não tumorais aqui realizadas, observou-se

que os compostos aqui testados, induziram morte celular significativa nas células tumorais, porém se mostraram menos tóxicos quando comparados as linhagens não tumorais.

Aqui sugerimos também, que os compostos pacharina e bauhiniastatina-1 apresentam características citostáticas, em virtude da capacidade de inibição no estado de evolução das neoplasias, sendo confirmado pelo teste de azul de tripan, onde foi observado uma redução do volume celular, sem um aumento do crescimento das células viáveis, nas linhagens testadas (MCF-7 e HL-60) durante os tratamentos com 24 h, e sendo mais acentuada para os tratamentos com 48 h de incubação. Os achados para as modificações morfológicas foram observados apresentando redução do volume celular, condensação da cromatina e aumento das células bloqueadas nas fases mitóticas. Nada se achou na literatura a respeito das alterações morfológicas aqui apresentadas, quanto ao uso desses compostos.

Após a célula sofrer um dano, seja por um agente interno como dano ao DNA, choque térmico, privação de nutrientes, ou por indução de um agente farmacológico, essa célula passa por um processo de morte celular programada (FULDA, 2006). Proteínas existentes dentro do compartimento celular, são como guarda costa, que atuam na defesa destas células e ao sinal de algum erro elas agem ativando outros receptores de morte para assim dá início a uma cascata de sinalização de morte celular. A apoptose ou morte celular programada pode ser desencadeada por vários estímulos extracelulares e intracelulares que irão resultar na ativação coordenada de uma família de proteases de cisteína denominadas caspases, e esse mecanismo de ativação irá percorrer duas vias a extrínseca e intrínseca (DEVARAJAN, 2002; PHILLIPYAU, 2004). Na via intrínseca a ativação da caspase está intimamente ligada à permeabilização da membrana mitocondrial externa por membros proapoptóticos (Bax/Bak) da família Bcl-2 (FULDA, 2006).

As células cancerígenas escapam da apoptose por meio de diversas estratégias que incluem aumento da expressão de proteínas pró-sobreviventes, como Bcl-2, Bcl-xL ou Mcl-1 (MERINO, 2017). Em nossos achados conseguimos identificar umas das vias de morte celular pelas células da MCF-7, por exemplo, através da redução do nível de expressão destas proteínas pró-sobreviventes, como foi o caso da Mcl-1 e Bcl-xL. Consequentemente, células malignas também atuam desregulando várias vias moleculares importantes, que atuam no controle e reparo celular (AIRD, 2019). Portanto, o desenvolvimento de estratégias direcionadas a esses fatores pró-sobrevivência tem sido um tema central para o desenvolvimento de medicamentos e fármacos de origem natural contra o câncer (AIRD, 2019).

Numerosos estímulos citotóxicos e moléculas transdutoras de sinal proapoptóticas convergem nas mitocôndrias para induzir a permeabilização da membrana mitocondrial externa, sendo essa regulada por proteínas da família Bcl-2, e que após ocorrida a ruptura dessa membrana, um conjunto de proteínas normalmente encontradas no espaço entre as membranas mitocondriais internas e externas será liberada, incluindo o citocromo c (FULDA, 2006; GREEN e KROEMER, 2004). E uma vez no citosol, essas proteínas apoptogênicas desencadeiam a execução da morte celular, promovendo a ativação da caspase ou agindo como efetores da morte independentes da caspase (SAELENS et al., 2004).

No entanto, essa via contará com proteínas antiapoptóticas (Mcl-1, Bcl-xL, Bcl-2) que atuará impedindo a ocorrência de sinalização pelo citocromo c, sendo assim, uma das características marcantes das células tumorais, a resistência à apoptose (OKADA, 2004). Além do mais, a superexpressão da proteína Mcl-1 tem sido associada com mau prognóstico, e evidências recentes de experimentos *in vitro* sugerem um papel importante do Mcl-1 na sobrevivência de células de câncer de mama, assim como resistência a drogas e a apoptose (PERRI, 2014; SHANGARY, 2003; XIAO, 2015). Apesar disso, nossos compostos se mostraram eficientes, na repressão desta proteína Mcl-1, para o tratamento com 24 h nas concentrações de 20 e 40  $\mu\text{M}$ , assim como, para o tratamento com 48 h na concentração de 40  $\mu\text{M}$ .

A proteína antiapoptóticas Bcl-xL, também apresenta características marcantes quanto aos mecanismos de morte celular, bloqueando a libertação de citocromo c e a ativação de caspases que induzem a apoptose (KHARBANDA, 2000), assim, sua inativação potênci a apoptose (AMUNDSON, 2000). Neste estudo, fornecemos evidências, de que Mcl-1 e Bcl-xL, desempenham um papel crítico nos mecanismos de morte celular nas células da MCF-7. Em que a eliminação considerável de Bcl-xL e Mcl-1, observada pelos resultados do western blotting (fig.12) após tratamento pelos compostos PAC e BAU, resultou em uma indução significativa de apoptose em linhagens de células da MCF-7. Nossos dados sugerem que a medida que o nível de expressão proteica do Bcl-xL foi reduzido após 48 h de tratamento para os compostos da pacharina e bauhiniastatina-1, nas concentrações de 40  $\mu\text{M}$ , pode-se observar um aumento para a taxa de apoptose, entre os dois compostos em estudos, para o mesmo tempo de tratamento (fig. 12-B). Confirmando assim, que a redução na atividade do Bcl-xL é suficiente para induzir a célula a entrar em apoptose (GRIVICICH, 2007).

Por outro lado, há também um outro determinante que atua na indução da via de morte celular, as caspases, que podem ser divididas em caspases iniciadoras (caspase-2, -8, -9 e -10) e efetoras (caspase-3, -6 e -7). Dentre essas, tendo-se a caspase-3, um membro do último grupo, que é absolutamente crucial para a indução de apoptose, pois essa enzima não é apenas ativada a jusante da via extrínseca e intrínseca da morte, mas também é responsável pela clivagem da maioria dos substratos (FISCHER, 2003). No entanto, essa mesma caspase 3 é ausente em linhagens MCF-7, e o interesse neste trabalho pelo estudo com a mesma, foi dada por apresentar-se como uma linhagem de tumor sólido, onde nossos resultados demonstraram um índice de seletividade interessante, instigando nosso interesse de estudo, apresentando assim perspectivas de investigação por essa via. Além disso, a inexistência dessa caspase 3, traz como consequência a redução da sensibilidade à indução de morte celular por vários estímulos incluindo TNF (JANICKE, 1998), assim como por outros agentes danosos ao DNA (JANICKE, 2001), e a morte dessas células ocorre muitas vezes na ausência de fragmentação do DNA.

Apesar de serem essências na apoptose, neste trabalho não foram estudadas as vias das caspases. No entanto, alguns achados informam que características morfológicas típicas de células apoptóticas, como retração e formações de bolhas, também não são evidentes nas células MCF-7 com deficiência de caspase 3, sendo essa protease de crucial importância para a ativação das alterações bioquímicas e morfológicas típicas das células que são submetidas à apoptose (JANICKE, 2009). Contudo, nossos achados mostraram que tanto os compostos da pacharina quanto a da bauhiniastatina-1 na linhagem de MCF-7, após os tratamentos com 24 e 48 h, induziu alterações da morfologia por condensação da cromatina e principalmente pela presença aumentada de células em fases mitóticas.

Por fim, os compostos aqui estudados, da pacharina e bauhiniastatina-1 mostraram-se com propriedades citotóxicas, assim como indutoras a apoptose por via de repressão das proteínas antiapoptóticas, Mcl-1 e Bcl-xL. Desta forma, sugerimos que estudos complementares de mecanismo de ação, bem como estudos *in vitro*, com outros tipos de linhagens tumorais, devam ser realizados com essas moléculas para melhor caracterizar seu potencial antineoplásico. Assim também, sendo necessário experimentos *in vivo* com animais, para comprovar a toxicidade desses compostos frente a tumores no organismo vivo, para então descobriremos se a ação dos compostos neste ambiente remete ao mesmo observado *in vitro*.

## 7 CONCLUSÃO

Dentre os resultados obtidos neste estudo, podemos identificar que as moléculas pacharina e bauhiniastatina-1 obtidas de *Bauhinia acuruana* apresentaram atividade antiproliferativa nas células tumorais, MCF-7 (adenocarcinoma de mama) e HL-60 (leucemia promielocítica), e uma baixa toxicidade quando expostas a células mononucleares do sangue periférico humano, indicando segurança nas concentrações testadas.

Nos achados para as modificações morfológicas e bioquímicas induzidas em MCF-7 e HL60, os compostos em estudo foram capazes de reduzir o volume celular, assim como induzir a condensação da cromatina, externalização da fosfatidilserina e aumento de figuras mitóticas.

No presente estudo, também relatamos pela primeira vez que a pacharina e a bauhiniastatina-1, induziu apoptose após 48h de tratamento, mediada pela redução do nível de expressão das proteínas antiapoptóticas, Bcl-xL e Mcl-1 em células MCF-7.

**REFERÊNCIAS**

1. ADAMS, J. M., CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene** 26, 1324–1337, 2007.
2. AMUNDSON, S. A.; MYERS, T. G.; SCUDIERO, D.; KITADA, S.; REED, J. C.; FORNACE, A. J. JR. An informatics approach identifying markers of chemosensitivity in human cancer cell lines. **Cancer Res.**, 60 pp. 6101-6110, 2000.
3. AGOSTINIS, P.; BUYTAERT, E.; BREYSSSENS, H.; HENDRICKX, N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. **Photochem. Photobiol. Sci.** V. 3, p.721–729, 2004.
4. AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 383–395, 2007.
5. AGRAWAL, R. C.; PANDEY, S. Evaluation of Anticarcinogenic and Antimutagenic Potential of Bauhinia variegata Extract in Swiss Albino Mice. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 10, n. 5, p. 913-916, 2009.
6. AIRD, D.; TENG, T.; HUANG, C. L.; PAZOLLI, E.; BANKA, D.; CHEUNG-ONG, K.; EIFERT, C.; FURMAN, C.; WU, Z. J.; SEILER, M.; BUONAMICI, S.; FEKKES, P.; KARR, C.; PALACINO, J.; PARK, E.; SMITH, P. G.; YU, L.; MIZUI, Y.; WARMUTH, M.; CHICAS, A.; CORSON, L.; ZHU, P. Sensitivity to splicing modulation of BCL2 family genes defines cancer therapeutic strategies for splicing modulators. **Nature Communications**. 137, 2019.
7. ALBUQUERQUE, U. P. et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 325–354, 2007.

8. ALMEIDA, E. R.; XAVIER, H.; GUEDES, M. C. Estudo preliminar da ação hipoglicemiante do extrato meatólico da *Bauhinia cheilantha* Steud (Fabaceae) em ratos. In: **III Jornada Paulista de Plantas Mediciniais**. Campinas, SP, Anais, 1997.
9. AMELIO, I.; MELINO, G.; KNIGHT, R. A. Cell death pathology: cross-talk with autophagy and its clinical implications. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 414, 277–281, 2011.
10. ARNOLD, L. A.; LUO, W. C.; GUY, R. K. Synthesis of medium ring heterocycles using an intramolecular Heck reaction. **Org. Lett.** 6, 3005–3007, 2004.
11. ANSARI, M. I.; HUSSAIN, M. K.; ARUN, A.; CHAKRAVARTI, B.; KONWAR, R\*.; HAJELA, K. Synthesis of targeted dibenzo[b,f]thiepinines and dibenzo[b,f]oxepines as potential lead molecules with promising anti-breast cancer activity. **European Journal of Medicinal Chemistry.** 113-124, 2015.
12. BERTOIA, M. L., RIMM, E. B., MUKAMAL, K. J., HU, F. B., WILLETT, W. C., CASSIDY, A. Dietary flavonoid intake and weight maintenance: three prospective cohorts of 124 086 US men and women followed for up to 24 years. *BMJ* 352, i17. <https://doi.org/10.1136/bmj.i17>, 2016.
13. BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol.** 39:615-47, 2003.
14. BOERSMA, H. H.; KIETSELAER, B. L.; STOLK, L. M.; BENNAGHMOUCH A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J., HEIDENDAL, G. A.; REUTELINGSPERGER, C. P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 46, p. 2035-2050, 2005.
15. BOONPHONG, S.; PUANGSOMBAT, P.; BARAMEE, A.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, S.; KITTAKOOP, P. Bioactive compounds from *Bauhinia purpurea* possessing antimalarial, antimycobacterial, antifungal, anti-inflammatory, and cytotoxic Activities. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 5, p.795-801, 2007.

16. CAGLIARI, R.; KREMER, S. F.; PINTO, L. S. Bauhinia lectins: Biochemical properties and biotechnological applications. **International Journal of Biological Macromolecules**. 811-820, 2018.
17. CECHINEL, F. V. Chemical composition and biological potential of plants from the genus Bauhinia. **Phytother Res**, 23:1347–1354, 2009.
18. CHOI, Y. L.; LIM, H. S.; LIM, H. J.; HEE, J. N. One-pot transition-metal-free synthesis of dibenzo[b,f]oxepins from 2-halobenzaldehydes. **Org. Lett**, V. 14, p. 5102–5105, 2012.
19. CIBAS, E. S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. **Diagnostic cytopathology**, v.13, p.166–171, 1995.
20. CORY, S.; HUANG, D. C; ADAMS, J. M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**. 22(53):8590-607, 2003.
21. COLDITZ, G. A.; BOHLKE, K.; BERKEY, C. S. Breast cancer risk accumulation starts early: prevention must also, *Breast Cancer Res. Treatment* 145 (3) 567–579, <http://dx.doi.org/10.1007/s10549-014-2993-8>, 2014.
22. COLDITZ, G. A.; ROSNER, B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study, *Am. J. Epidemiol.* 152 (10) 950–964, 2000.
23. COSTANZA, M. E. Epidemiology and risk factors for breast cancer. In: *UpToDate*.9:2–3, 2001.
24. DAI, J., MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Mol. Basel Switz.** 15, 7313–7352. <https://doi.org/10.3390/molecules15107313>. 2010.
25. FAROMBIA, E. O.; AKINMOLADUNB, A. C.; OWUMIC, S.E. Anti-cancer Foods: Flavonoids. **Elsevier Inc**, 2019.

26. FRANCO, R.; CIDLOWSKI, J. A. Apoptosis and glutathione: beyond and antioxidant. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 1303-1314. 2009.
27. FISCHER, U.; JANICKE, R. U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. **Cell Death Differ**, V. 10, p. 76–100, 2003.
28. FULDA, S., DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**. V. 25, p. 4798–4811, 2006.
29. GALLUZZI, L.; KROEMER, G. Necroptosis: a specialized pathway of programmed necrosis. **Cell** **135**, 1161–1163, 2008.
30. GOIS, R. W. S., DE SOUSA, L. M., LEMOS, T. L. G., ARRIAGA, A. M. C., ANDRADE-NETO, M., SANTIAGO, G. M. P., FERREIRA, Y. S.; ALVES, P. B., DE JESUS, H. C. R. Chemical composition and larvicidal effects of essential oil from *Bauhinia acuruana* (Moric) against *Aedes aegypti*. J. Essent. **Oil Res.** 23, 59–62, 2011.
31. GÓIS, R. W. S., DE SOUSA, L. M., SANTIAGO, G. M. P., ROMERO, N. R., LEMOS, T. L. G., ARRIAGA, A. M. C., BRAZ-FILHO, R. Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of pacharin from *Bauhinia acuruana*. **Parasitol. Res.** 112, 2753–2757, 2013.
32. GOIS, R. W. S.; SANTIAGO, G. M. P. Estudo químico e avaliação biológica de *Bauhinia acuruana* Moric. 2014.
33. GOLSTEIN, P.; KROEMER, G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends Biochem. Sci.** 32, 37–43, 2007.
34. GRAGG, G. M; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta.** 1830(6):3670-95, Jun 2013.
35. GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Apoptosis: Programmed Cell Death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343. 2007.

36. HANAHAAN, D.; WEINBERG, R. A. **The Hallmarks of Cancer**. *Cell*. Vol. 100, 57–70, January 7, 2000, Copyright, 2000 by Cell Press.
37. HANAHAAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks Of cancer: the next generation, *Cell* 144 646–674, 2011.
38. HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**; 407:770-76, 2000.
39. HIROKI, TAKAHASHI; MONICA, C. CHEN.; HUNG, PHAM.; YOICHI, MATSUO.; HIDEYUKI, ISHIGURO.; HOWARD, A. REBER.; HIROMITSU, TAKEYAMA.; OSCAR, J. HINES.; GUIDO, EIBL. Simultaneous knock-down of Bcl-xL and Mcl-1 induces apoptosis through Bax activation in pancreatic cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**. V. 1833, 12, p. 2980-2987, 2013.
40. HUNG, J.; HSU Y.; KO.Y.; TSAI Y.; YANG C.; HUANG, M.; KU P. Didymin a dietary flavonoid glycoside from citrus fruits, induces Fas- mediated apoptotic pathway im human non-small-cell lung cancer cells in vitro and in vivo. **Lung Cancer**. V.68, p. 366-374. 2010.
41. INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional do Câncer**. <<http://www2.inca.gov.br>> Acesso em Fevereiro. 2018.
42. INCA, Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Instituto Nacional de Câncer**. Estimativas 2020: Incidência de Câncer no Brasil. 2020.
43. JANICKE, R. U.; SPRENGART, M. L.; WATI, M. R.; PORTER, A. G. Caspase3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. **J Biol Chem** 273:9357–9360, 1998.
44. JANICKE, R. U.; ENGELS, I. H.; DUNKERN, T.; KAINA, B.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; PORTER, A. G. Ionizing radiation but not anticancer drugs causes cell cycle arrest and failure to activate the mitochondrial death pathway in MCF-7 breast carcinoma cells. **Oncogene** 20:5043–5053, 2001.

45. JANICKE, R. U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. **Breast Cancer Res Treat** 117:219–221, 2009.
46. SCOCCIA JIMENA, M. JULIA CASTRO, M. BELÉN FARAONI, CECILIA BOUZAT, VÍCTOR S. MARTÍN, DARÍO C. GERBINO. Iron (II) promoted direct synthesis of dibenzo[b,e]oxepin-11(6H)-one derivatives with biological activity. A short synthesis of doxepin. **Tetrahedron** 73, 2913-2922, 2017.
47. KAUFMANN, T; SCHINZEL, A; BORNER, C. Bcl-w (edding) with mitochondria. **Trends Cell Biol.** 14(1):8-12, 2004.
48. KAVURMANN, M. M; TAN, N. Y; BENNETT, M. R. Death receptors and their ligands in atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 28: 1694-1702, 2008.
49. KHARBANDA, S.; SAXENA, S.; YOSHIDA, K.; PANDEY, P.; KANEKI, M.; WANG, Q.; CHENG, K.; CHEN, Y. N.; CAMPBELL, A.; SUDHA, T.; YUAN, Z. M.; NARULA, J.; WEICHSELBAUM, R.; NALIN, C.; KUFEL, D. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-x(L) in response to DNA damage. **J. Biol. Chem.**, 275, pp. 322-327, 2000.
50. KITTAKOOP, P.; KIRTIKARA, K.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, Y. Antimalarial Preracemosols A and B, possible biogenetic precursors of racemosol from *Bauhinia malabarica* Roxb. **Phytochemistry**, v. 55, n. 4, p. 349-352, 2000.
51. KITTAKOOP, P.; NOPICHAJ, S.; THONGON, N.; CHARONENCHAI, P.; THEBTARANNONTH, Y. Bauhinioxepins A e B: New antimycobacterial dibenzo[b,f]oxepins from *Bauhinia saccocalyx*. **Helvetica Chimica Acta**, V. 87, n. 1, p. 175-179, 2004.
52. KOZŁOWSKA, A., SZOSTAK-WEGIEREK, D. Flavonoids—food sources and health benefits. *Rocz. Panstw Zakl. Hig.* 65, 79–85, 2014.

53. KROEMER, G.; EI-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; PETER, M. E.; VAUX, D.; VANDENABEELE, P.; ZHIVOTOVSKY, B.; BLAGOSKLONNY, M. V.; MARLONI, W.; KNIGHT, R. A.; PIACENTINI, M.; NAGATA, S. MELINO, G. Classification of the cell death: recommendations of the nomenclature committee on cell death. *Cell Death and Differentiation*, v. 12, p. 1463-1467. 2005.
54. KRYCH, J.; GEBICKA, L. Catalase is inhibited by flavonoids. **Int J Biol Macromol**, V. 58, p. 148–153, 2013.
55. LUNA, J. DE S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 199-206, fev. 2005.
56. LORENZI, H.; MATOS, F.J. de A. Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e exóticas. 2.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 544 p., 2008.
57. LOTITO, S. B., FREI, B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic. Biol. Med.* 41, 1727–1746. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.04.033>, 2006.
58. MAHON, S. M. Site-specific cancer series: Breast cancer, 2nd ed., **Oncology Nursing Society**, Pittsburgh, PA, 2011.
59. MACKLIS, J. D.; MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidium iodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **Journal of Neuroscience Methods**, v.31, p. 43-46, 1990.
60. MERINO, DELPHINE.; JAMES, R. WHITTLE.; FRANÇOIS, VAILLANT.; ANTONIN, SERRANO.; JIA-NAN, GONG.; GOKNUR, GINER.; ANA LETICIA, MARAGNO.; MAÏA, CHANRION.; EMILIE, SCHNEIDER.; BHUPINDER, PAL; XIANG, LI.; GRANT, DEWSON.; JULIUS, GRÄSEL.; KEVIN, LIU.; NAJOUA, LALAOUI.; DAVID, SEGAL.; MARCO, J. HEROLD.; DAVID, C. S. HUANG.;

- GORDON, K. SMYTH.; OLIVIER, GENESTE.; GUILLAUME, LESSENE.; JANE, E. VISVADER.; GEOFFREY, J. LINDEMAN. Synergistic action of the MCL-1 inhibitor S63845 with current therapies in preclinical models of triple-negative and HER2-amplified breast cancer. **Science translational medicine**, V. 9, p.7049, 2017.
61. MILITÃO, G. C. G.; DANTAS, I. N. F.; FERREIRA, P. M. P.; ALVES, A. P. N. N.; CHAVES, D. C.; MONTE, F. J. Q.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOFUTO, L. V. In vitro and in vivo anticancer properties of cucurbitacin isolated from *Cayaponia racemosa*. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, p. 1479-1787, 2012.
62. MILITÃO, G. C. G.; PRADO, M. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; VELOSO, P. A.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MACHADO, S. G. M. Pterocarpans induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase. **Biochimie** (Paris. Print), v. 14, p. 148, 2014.
63. MODUGNO, M., BANFI, P., GASPARRI, F., BORZILLERI, R., CARTER, P., CORNELIUS, L., GOTTARDIS, M., LEE, V., MAPELLI, C., NAGLICH, J. G., TEBBEN, A., VITE, G., PASTORI, W., ALBANESE, C., CORTI, E., BALLINARI, D., GALVANI, A. Mcl-1 antagonism is a potential therapeutic strategy in a subset of solid cancers. **Experimental cell research**, 332, p. 267 – 277, 2015.
64. MOHAMED, M. A.; MAMMOUD, M. R.; HAYEN, H. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of a new triterpene saponin from *Bauhinia variegata* leaves. *Zeitschrift für Naturforschung C. Journal of biosciences*, v. 64, n.11-12, p. 798-808, 2009.
65. OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**. 4:592-603, 2004.
66. OLIVERA, R.; SANMARTIN, R.; CHURRUCA, F.; DOMINGUEZ, E. Dibenzo[b,f]oxepines: Syntheses and applications. **A review. Org. Prep. Proced.** V. 36, p. 297–330, 2004.
67. OSTI, R. Z. et al. The in vitro and in vivo antitumour activities of nitrosyl ruthenium amine complexes. **Aust. J. Chem.**, v. 65, p. 1333–1341, 2012.

68. PARTON MARINA, MITCHELL DOWSETT, IAN SMITH. Studies of apoptosis in breast câncer. 322, 1528–32, 2001.
69. PERRI MARIARITA, JEREMY L.YAP, JIANSHI YU, ERIKA CIONE, STEVEN FLETCHER, MAUREEN A. KANE. BCL-xL/MCL-1 inhibition and RAR $\gamma$  antagonism work cooperatively in human HL60 leukemia cells. **Experimental cell research**, V. 327, p.183 – 191, 2014.
70. PETROS, A. M; OLEJNICZAK, E. T; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochim Biophys Acta**. 1644(2-3):83-94, 2004.
71. PETTIT, G. R., NUMATA, A., IWAMOTO, C., USAMI, Y., YAMADA, T., OHISHI, H., CRAGG, G.M. Antineoplastic agents. 551. Isolation and structures of bauhiniastatins 1–4 from Bauhinia purpurea. **J. Nat. Prod.** 69, 323–327, 2006.
72. PHILLIPYAU. Apoptosis. **The science creative quarterly**, 2004.
73. QUEIROZ, L. P. Leguminosas da Caatinga. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira de Santana, 467p, 2009.
74. RADHA, G.; RAGHAVAN, S. C. BCL2: A promising cancer therapeutic target. **BBA - Reviews on Cancer**. 1868, 309–314p, 2017.
75. RAGAB, F.A.; YAHYA, T. A. A.; EL-NAA, M, M, et al. Design, synthesis and structure–activity relationship of novel semi-synthetic flavonoids as antiproliferative agents. **Eur J Med Chem**; 82(23):506–520; 2014.
76. RODNEY, C.; RICHIE, M. D.; FACP, F. C. C. P.; JOHN, O.; SWANSON, M. D. Breast Cancer: A Review of the Literature. **Journal of insurance medicine**, 35:85–101, 2003.
77. R.S. WONG. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment, J. Exp. Clin. **Cancer Res**. V. 30, p. 87, 2011.

78. SAELENS X, NELE FESTJENS, LIESELOTTE VANDE WALLE, MARIA VAN GURP, GEERT VAN LOO & PETER VANDENABEELE. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, V. 23, pages 2861–2874, 2004.
79. S. H. SHARMA, J. SURESH, D. RAJ, S. Nagarajan Biomedicine & pharmacotherapy molecular chemoprevention by morin – a plant flavonoid that targets nuclear factor kappa B in experimental colon cancer. **Biomed. Pharmacother.** V. 100, p. 367-373, 2018.
80. S. KHARBANDA, S. SAXENA, K. YOSHIDA, P. PANDEY, M. KANEKI, Q. WANG, K. CHENG, Y. N. CHEN, A. CAMPBELL, T. SUDHA, Z. M. YUAN, J. NARULA, R. WEICHSELBAUM, C. NALIN, D. KUFEL. Translocation of SAPK/JNK to mitochondria and interaction with Bcl-2 (L) in response to DNA damage. **J. Biol. Chem.** V. 275, p. 322–327, 2000.
81. SOARES, P. K.; SCARMINIO, I. S. Multivariate chromatographic fingerprint preparation and authentication of plant material from the genus Bauhinia. **Phytochemistry Analysis.** v. 19, p. 78-85, 2008.
82. SOUZA, L. M.; CARVALHO, J. L.; GOIS, R. W. S.; SILVA, H. C.; SANTIAGO, G. M. P. S.; LEMOS, T. L. G.; ARRIAGA, A. M. C.; ALVES, P. B.; MATOS, I. L.; MILITÃO, G. C. G.; SILVA, P. B. N.; SILVA, T. G. **Rec. Nat. Prod.** 10:3 341-348, 2016.
83. SUFFNESS, M; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K, editor. *Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity.* **London: Academic Press**, p. 71–133, 1990.
84. TIAN, S. S.; JIANG, F. S.; ZHANG, K, et al. Flavonoids from the leaves of *Carya cathayensis* Sarg. inhibit vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis. **Fitoterapia**; 92:34–40, 2014.
85. TEIXEIRA, M. Explicação diversa para a origem do câncer, com foco nos cromossomos, e não nos genes, ganha corpo no establishment científico. **Rev. Latinoam. Psicopat. Fund.**, São Paulo, v. 10, n. 4, p. 664-676, dez.2007.

86. TOBACCO. Disponível <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs339/en/>>. Acesso em: 03 Agos. 2019.
87. TRUMP, B. F.; BEREZESKY, I. K.; CHANG, S. H.; PHELPS, P. C. The pathways of cell death: oncosis, apoptosis, and necrosis. **Toxicol Pathol.** 25:82–8, 1997.
88. VAZ, A. M. S. T.; TOZZI, A. M. G. A. Bauhinia ser. Cansenia (Leguminosae: Caesalpinioideae) no Brasil. **Rodriguésia** 54:55–143, 2003.
89. ZHANG, X.; HUANG, H.; ZHAO, X, et al. Effects of flavonoids-rich Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) pulp extracts on glucose consumption in human HepG2 cells. **J Funct Foods**, 14:144–153, 2015.
90. ZONG, W. X.; DITSWORTH, D.; BAUER, D. E.; WANG, Z. Q.; THOMPSON, C. B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death. **Genes Dev.** 18, 1272–1282, 2004.
91. WEI, G.; MARGOLIN, A. A.; HAERY, L.; BROWN, E.; CUCOLO, L.; JULIAN, B.; SHEHATA, S.; KUNG, A. L.; BEROUKHIM, R.; GOLUB, T. R. Chemical Genomics Identifies Small-Molecule MCL1 Repressors and BCL-xL as a Predictor of MCL1 Dependency. **Cell press. Cancer Cell** 21, 547–562, 2012.
92. WOLIN, K. Y.; CARSON, K.; COLDITZ, G. A. Obesity and cancer. **Oncologist.** 15(6):556–565, 2010.
93. WOLIN, K. Y.; COLDITZ, G. A. Can weight loss prevent cancer? **Br J Cancer.** 99(7):995–999, 2008.
94. WINTER, E.; CHIARADIA, L. D.; SILVA, A. H.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; PASA, T. B. C. Involvement of extrinsic and intrinsic apoptotic pathways together with endoplasmic reticulum stress in cell death induced by naphthylchalcones in a leukemic cell line: Advantages of multi-target action. **Toxicology in Vitro**, 769-77, 2014.

95. XIAO, Y. et al. MCL-1 Is a key determinant of breast cancer cell survival: validation of MCL-1 dependency utilizing a highly selective small molecule inhibitor. *Mol. Cancer Ther.* **14**, 1837–1847, 2015.
96. XUAN-MEI HUANG.; ZHI-JIE YANG.; QING XIE.; ZI-KANG ZHANG.; HUA ZHANG.; JUN-YING MA. Natural products for treating colorectal cancer: A mechanistic review. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, V. 117, p. 109142, 2019.
97. YOULE, R. J., STRASSER, A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9** 47–59, 2008.
98. YUAN, C. H.; FILIPPOVA, M.; HUGHES, P. D. Modulation of Apoptotic Pathways by Human Papillomaviruses (HPV): Mechanisms and Implications for Therapy. *Viruses*, 3831–3850, 2012.

## ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação da ação citotóxica de compostos obtidos de Bauhinia sp. em células tumorais.

**Pesquisador:** SILVIA MARIA DE SOUZA

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 93850318.0.0000.5208

**Instituição Proponente:** CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.980.861

#### Apresentação do Projeto:

A pesquisa tem como título "Avaliação da ação citotóxica de compostos obtidos de Bauhinia sp. em células tumorais". Trata de um Projeto de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Departamento de Antibióticos, Centro de Biociências e será desenvolvido por Silvia Maria de Souza e orientação da Professora Gardenia Carmen Gadelha Militão do Departamento de Fisiologia e Farmacologia do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco.

#### Objetivo da Pesquisa:

##### Objetivo Primário:

Investigar o potencial antiproliferativo de compostos isolados de Bauhinia Acruana e Bauhinia chleilantha em células tumorais.

##### Objetivo Secundário:

Determinar a citotoxicidade in vitro de compostos nas linhagens de tumores de mama- (MCF-7), carcinoma pulmonar- (NCI H292), leucemia promielocítica- (HL-60) e carcinoma colorretal (HCT-116). Avaliação da atividade citotóxica em células mononucleadas do sangue periférico (CMSP) pelo método do MTT.

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.980.861

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Sensação de desconforto no local da punção (ponto de retirada do sangue) há o risco de ocorrer uma vermelhidão local que será tratada com compressas de gelo. O risco será reduzido pelo fato de ser um profissional habilitado e treinado que irá coletar o sangue.

**Benefícios:**

O benefício gerado com a pesquisa será a indicação para a sociedade de compostos naturais (princípio ativo) no tratamento do câncer.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O estudo pretende identificar uma molécula ou óleo essencial de origem natural a partir de Bauhinia sp., com capacidade de inibir o crescimento de células tumorais. Para isso, serão utilizadas as linhagens tumorais, HL60 (Leucemia promielocítica), HCT-116 (Câncer de colorretal), MCF-7 (câncer de mama), e NCI H292 (Câncer de pulmão), obtidas do Banco de células do Rio de Janeiro. Para citotoxicidade em células mononucleares do sangue periférico será coletado sangue periférico humano de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, utilizando seringas de 10 mL estéreis e descartáveis. Serão incluídos 10 voluntários adultos saudáveis de 18 a 30 anos, sem histórico de doenças recentes, não fumante ou etilista, sem exposição recente a radiações ou a medicamentos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados adequadamente todos os termos necessários para o desenvolvimento da pesquisa.

**Recomendações:**

Não há recomendações

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências ou inadequações

**Considerações Finais a critério do CEP:**

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.980.861

Relatório Final”, disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1111737.pdf	05/10/2018 11:55:26		Aceito
Outros	carta_de_anuencia_comite.pdf	05/10/2018 11:52:45	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Outros	projeto_editado_comite_etica_SILVIA.pdf	05/10/2018 11:50:59	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA_AS_PENDENCIA_S_SILVIA.pdf	05/10/2018 11:49:49	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Outros	Lattes_Daniel_Pereira_Bezerra.pdf	12/09/2018 11:41:23	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Outros	projeto_detalhado_comite_de_etica_SILVIA.pdf	12/09/2018 11:37:12	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Outros	CARTA_DE_RESPOSTA_AS_PENDENCIAS_SILVIA.docx	12/09/2018 11:34:59	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	16/07/2018 17:06:20	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de	TCLE_Silvia.docx	16/07/2018	SILVIA MARIA DE	Aceito

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 2.980.861

Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Silvia.docx	17:05:01	SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_mestrado.pdf	16/07/2018 17:02:22	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Outros	Declaracao_mestrado.pdf	03/07/2018 22:33:20	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Outros	termo_de_compromisso.pdf	17/05/2018 18:43:49	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Outros	carta_de_anuencia.pdf	17/05/2018 18:41:25	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Outros	Lattes_Gardenia_Carmen.pdf	17/05/2018 18:39:21	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito
Outros	Lattes_Silvia_Souza.pdf	17/05/2018 18:36:30	SILVIA MARIA DE SOUZA	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

RECIFE, 25 de Outubro de 2018

Assinado por:  
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde  
**Bairro:** Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600  
**UF:** PE **Município:** RECIFE  
**Telefone:** (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br