



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS NATURAIS PROMISSORES PARA O TRATAMENTO  
DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

**Aluna:** Antonielle Oliveira Cordeiro

**Orientadora:** Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

**Co-Orientadora:** MSc. Mariana Alves Pereira Zóia

**UBERLÂNDIA - MG  
2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS NATURAIS PROMISSORES PARA O TRATAMENTO  
DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

**Aluna:** Antonielle Oliveira Cordeiro

**Orientadora:** Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

**Co-Orientadora:** MSc. Mariana Alves Pereira Zóia

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Uberlândia  
como parte dos requisitos para  
obtenção do Título de Mestre em  
Genética e Bioquímica (Área  
Genética).**

**UBERLÂNDIA - MG  
2019**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

C794  
2019

Cordeiro, Antonielle Oliveira, 1993-  
Extratos e substâncias naturais promissores para o  
tratamento do câncer de próstata [recurso eletrônico] /  
Antonielle Oliveira Cordeiro. - 2019.

Orientadora: Thaise Gonçalves de Araújo.

Coorientadora: Mariana Alves Pereira Zóia.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de  
Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2165>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Araújo, Thaise Gonçalves de , 1985-,  
(Orient.). II. Zóia, Mariana Alves Pereira , 1991-, (Coorient.).  
III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em  
Genética e Bioquímica. IV. Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

## ATA DE DEFESA

Programa de Pós-Graduação ou Curso de Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - PPGGB				
Data:	Vinte e cinco de julho de 2019	Hora de início:	14:00h	Hora de encerramento:	14:40h
Matrícula do Discente:	11722GBI001				
Nome do Discente:	Antonielle Oliveira Cordeiro				
Título do Trabalho:	Compostos naturais promissores para o tratamento do câncer de próstata.				
Área de concentração:	Genética				
Linha de pesquisa:	Biologia molecular				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Prospecção de produtos bioativos para o tratamento dos cânceres de próstata e mama.				

Reuniu-se no Auditório 4K , Campus Umuarama, da Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Assim composta: Professores Doutores: Thaíse Gonçalves de Araújo (Orientadora), Ademar Alves da Silva Filho e Vivian Alonso Goulart. A participação dos dois últimos se deu por epístola.

Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa Dr (a). Thaíse Gonçalves de Araújo apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

( A ) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Thaíse Gonçalves de Araújo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 10/08/2019, às 09:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1453595** e o código CRC **981C0F31**.

Referência: Processo nº 23117.070259/2019-24

SEI nº 1453595



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS NATURAIS PROMISSORES PARA O TRATAMENTO  
DO CÂNCER DE PRÓSTATA**

**ALUNA: ANTONIELLE OLIVEIRA CORDEIRO**

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo (Orientador)

**Examinadores:**

Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho  
Universidade Federal de Juiz de fora

Profa Dra. Vivian Alonso Goulart  
Universidade Federal de Uberlândia

Profa. Dra. Elisângela de Paula Silveira Lacerda (suplente)  
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Robson José de Oliveira Júnior (suplente)  
Universidade Federal de Uberlândia

**Data da Defesa:** \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação foram contempladas

---

Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer).*

## AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus por nunca me abandonar e por me fortalecer a cada batalha enfrentada durante minha vida. Obrigada por me mostrar todos os dias o tamanho do Seu amor por mim.

Agradeço a minha família que sempre acreditou nos meus sonhos e foram o meu combustível para correr atrás de cada um. Obrigada a minha mãe por sempre estar do meu lado, nunca desistir de mim e me ensinar que somos do tamanho dos nossos sonhos e que por isso eu sempre devo sonhar grande. Ao meu pai por me ensinar a importância da humildade. E minha irmã, o melhor presente que Deus me deu, por sempre estar ao meu lado e ser meu apoio incondicional. Obrigada por serem meu ponto de equilíbrio. Vocês são a melhor parte de mim!

Aos meus avós que são a essência da minha dissertação, meus maiores exemplos de vida. Obrigada por todo amor incondicional que a senhora me oferece, obrigada por sempre ver o melhor em mim, por me apoiarem. Eu tenho muito orgulho de dizer que eu não conseguiria chegar até aqui sem o conhecimento de vocês. Encontro meu refúgio em vocês. Eu amo vocês incondicionalmente.

Obrigada aos meus tios, Cassio, Simão, Abias, Dindim, Elen e Kaká por serem meu alicerce em todas as batalhas e por sempre lutarem ao meu lado. Em especial pra Kaká que tenho como uma segunda mãe, que me ensinou a diferença de liberdade e libertinagem e tudo isso com um senso de humor admirável. Obrigada por ser meu vilarejo por onde quer que eu vá.

Agradeço a minha amiga Gabriela, que foi o melhor resultado da dissertação. Obrigada por ser minha família e por compartilhar a sua família comigo. Obrigada por todo suporte emocional.

Obrigada aos meus primos, Greik F. Eduarda, Arthur e Vitor e minha afilhada Emanuely, que sempre estão comigo nos melhores momentos e nos piores. Obrigada por cada sorriso compartilhado, eu amo vocês!

Agradeço aos meus amigos por todos momentos de descontração, por trazerem leveza mesmo em momentos difíceis.

Eu amo vocês infinitamente!

Agradeço a minha orientadora Prof. Dra Thaise, que sempre acreditou em mim, e me fortaleceu quando eu mais precisei. Obrigada por todos os ensinamentos, por todo incentivo e disponibilidade e paciência, isso foi fundamental para a conclusão deste trabalho. Tenho muita admiração e orgulho de você. Obrigada por todas as oportunidades.

Agradeço a minha co-orientadora Profa. MSc. Mariana, que sempre se mostrou disponível em me ajudar e me fez sentir parte do laboratório. Obrigada por cada conversa e por sempre ser tão gentil e paciente comigo. Você é um modelo de ser humano.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz, que abriu as portas do seu laboratório para mim e sempre se mostrou muito solícito.

Agradeço a Natássia que se tornou uma grande amiga. Obrigada por nossas conversas, por todos os conselhos e abraços (nem sei o que seria de mim sem eles).

Aos amigos que o laboratório me deu, que com certeza fazem dos meus dias de trabalho mais felizes. é sempre muito bom dividir meu dia-dia com vocês. Em especial a Aline (chefinha), Cristiane, Douglas, Fernanda, Lara, Sara, Victor.

Agradeço a Dra Luciana por toda disponibilidade e dedicação ao laboratório de Nanobiotecnologia.

Agradeço ao Prof. Dr Ademar, por ter me acolhido em na UFJF. Obrigada por todos ensinamentos e por toda paciência.

Agradeço aos amigos que fiz durante a graduação, por todo apoio durante a minha jornada acadêmica. Em especial a Julia que sempre esteve ao meu lado, comemorando as vitórias.

Agradeço aos órgãos de fomento: CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo financiamento deste trabalho.

Aos amigos que fiz no decorrer dessa jornada, meu muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS E TABELA .....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>xi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Carcinogênese e câncer de próstata: uma visão geral.....	1
1.2 O câncer de próstata resistente à castração (CRPC) e as limitações da quimioterapia convencional.....	3
1.3 Bioprospecção de produtos naturais no tratamento oncológico .....	9
1.4 Espécies encontradas no cerrado como fontes de produtos naturais para o tratamento do câncer de próstata .....	11
1.4.1 <i>Achyrocline satureioides</i> .....	12
1.4.2 <i>Arrabidaea chica</i> .....	12
1.4.3 <i>Bidens pilosa</i> .....	13
1.4.4 <i>Equisetum ssp.</i> .....	13
1.4.5 <i>Kalanchoe brasiliensis</i> .....	13
1.4.6 <i>Pothomorphe umbellata</i> .....	14
1.4.7 <i>Smilax ssp.</i> .....	14
1.4.8 <i>Solanum lycocarpum</i> .....	15
1.4.9 <i>Vernonia polyanthes</i> .....	15
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 Seleção, coleta e obtenção dos extratos das espécies vegetais. ....	17
3.2 Isolamento do 4-NC .....	17
3.4 Ensaio de citotoxicidade .....	18
3.5 Ensaio clonogênico.....	19
3.6 Ensaio de migração celular.....	20

3.7 Análise de apoptose/necrose celular .....	20
3.8 Análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM).....	21
3.11 Ensaio de proliferação celular.....	21
3.12 Padrão de expressão gênica após tratamento com 4-NC.....	21
3.13 Análises estatísticas.....	22
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>23</b>
4.1 Citotoxicidade de extratos vegetais frente a células prostáticas.....	23
4.2. Efeito do 4-NC sobre a viabilidade de células prostáticas .....	27
4.3 4-NC suprime a proliferação e migração de células PC3.....	29
4.4 4-NC induz apoptose e altera PMM de células CRPC.....	32
4.5 Modulação da expressão gênica mediada por 4-NC em células PC3	36
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>

## LISTA DE FIGURAS E TABELA

<b>Figura 1:</b> Representação das principais vias de ativação do receptor de androgênio (AR) no câncer de próstata.....	5
<b>Figura 2:</b> Viabilidade relativa das células prostáticas RWPE-01, LNCaP e PC3 após tratamento com extratos fracionados de espécies vegetais do cerrado.....	23
<b>Figura 3:</b> Viabilidade relativa das células prostáticas RWPE-01, LNCaP e PC3 após tratamento com extratos fracionados das espécies <i>Smilax ssp.</i> e <i>Pothomorphe umbellata</i> .....	25
<b>Figura 4:</b> Citotoxicidade do 4-nerolidilcatecol (4-NC). .....	27
<b>Figura 5:</b> Análise da proliferação das células prostática RWPE-01, LNCaP e PC3 após tratamento com 4-nerolidilcatecol durante 48 h.....	29
<b>Figura 6:</b> Inibição da migração das linhagens celulares prostáticas RWPE-01, LNCaP e PC3. ....	30
<b>Figura 7:</b> Indução de apoptose mediada pelo 4-nerolidilcatecol (4-NC) sobre as células prostáticas RWPE-01, LNCaP e PC3.....	32
<b>Figura 8:</b> Potencial de membrana mitocondrial (PMM) das células RWPE-01, LNCaP e PC3 tratadas com 4-nerolidilcatecol (4-NC) .....	34
<b>Figura 9:</b> Genes diferencialmente expressos em resposta ao 4-nerolidilcatecol (4-NC) em células PC3 de câncer da próstata resistentes a castração (CRPC) em comparação com células não tratadas.....	35
<b>Tabela 1:</b> Quimioterápicos bioprospectados de plantas medicinais.....	11

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

4-NC	4-nerolidilcatecol
7AAD	7-amino-atinomicina
ABS	Absorbância
aC	Antes de Cristo
ADT	Terapia de Privação de Androgênio
AKT	Proteína Kinase B
AR	Receptor de Androgênio
AREs	Elementos de Resposta Androgênica
ARV	Variantes de <i>Splicing</i> de AR
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CaP	Câncer de Próstata
CAPB	Câncer de Próstata e Cérebro
CBP	Proteína Ligadora de CREB
CBP	Proteína Ligadora de CREB
CCD	Cromatografia de camada delgada
CF	Composto Fenólico
CRPC	Câncer de Próstata Resistente à Castração
CSC	Célula-Tronco do Câncer
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
DHT	Di-hidrotestosterona
DMSO	Dimetilsufóxido
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
EMT	Transição Epitélio-Mesenquimal
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FL-AR	Receptor Androgênico de Comprimento Total
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
HIF	Fator Induzido por Hipóxia
HPC1	Câncer de Próstata Hereditário 1
HPC2	Câncer de Próstata Hereditário 2
HPC20	Câncer de Próstata Hereditário 20
HPCX	Câncer de Próstata Hereditário Ligado ao Cromossomo X

HSP	Proteínas de Choque Térmico
IC <sub>50</sub>	Índice Citotóxico para 50%
IGF-1R	Receptor do Fator de Crescimento 1 Semelhante à Insulina
IL-6	Interleucina-6
LDB	Domínio de Ligação ao Ligante
MAPK	Proteína-Quinases Ativadas por Mitógenos
MMP	Metaloproteinases da Matriz
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais
NTD	Domínio de Ligação ao N-terminal (NTD)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino
PCaP	Predisposição para Câncer de Próstata
PMM	Potencial de Membrana Mitocondrial
PN	Produtos Naturais
PSA	Antígenos Específicos da Próstata
qPCR	PCR em Tempo Real
RPM	Rotação Por Minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SFB	Soro fetal bovino
STAT	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição
TMPRSS2	Protease Transmembrana Serina 2
TMRE	Tetramethylrhodamine Ethyl Ester
TR	Exame de Toque Retal (TR)
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular

## RESUMO

O tratamento eficaz do câncer ainda desafia a medicina, uma vez que as estratégias até então empregadas não se mostram suficientemente seguras e capazes de eliminar de maneira específica as células tumorais. O câncer de próstata (CaP) é uma neoplasia maligna altamente incidente e o desfecho dos pacientes depende diretamente do tratamento adotado, sobretudo da eficácia dos quimioterápicos utilizados. Nesse contexto, a busca por produtos naturais ativos com ação antineoplásica tem se mostrado promissora. No presente estudo é relatado o efeito citotóxico de diferentes extratos vegetais (obtidos de espécies do cerrado brasileiro) e da substância 4-nerolidilcatecol (4-NC) frente a células tumorais prostáticas. Além disso, o 4-NC foi avaliado quanto à sua capacidade de suprimir diferentes mecanismos associados ao CaP. Foram cultivadas três linhagens celulares de próstata: RWPE-01 (não tumorigênica), LNCaP (tumorigênica sensível a andrógeno) e PC3 (tumorigênica resistente à castração). Estas foram tratadas, individualmente, com extratos hexânicos, clorofórmicos e hidrometanólicos de 10 espécies vegetais e a citotoxicidade avaliada pelo método MTT. O extrato hexânico de *Pothomorphe umbellata* se mostrou promissor ao diminuir a viabilidade das linhagens tumorais. A substância obtida deste extrato hexânico de *P. umbellata*, o 4-NC, apresentou citotoxicidade seletiva contra linhagens de CaP, em especial sobre as linhagens PC3, induzindo também a apoptose, alterando o potencial de membrana mitocondrial e reduzindo a proliferação e invasão. Finalmente, a análise da expressão de 84 genes associados a diferentes vias oncogênicas demonstrou que o 4-NC é capaz de modular, além da apoptose e ciclo celular, o mecanismo de Transição epitélio-mesenquimal (EMT), angiogênese e hipóxia nas células PC3. Nossos achados elucidaram a atividade antitumoral do 4-NC frente a células de CaP, o qual se mostrou promissor sobretudo na supressão de mecanismos oncogênicos do modelo resistente à castração. Estudos adicionais são necessários para melhor descrever seu comportamento validando o 4-NC como uma nova alternativa para o tratamento do CaP avançado ou como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais.

**Palavras-chave:** Câncer de próstata resistente à castração, produtos naturais, *Pothomorphe umbellata*, 4-nerolidilcatecol e bioprospecção.

## ABSTRACT

Effective cancer treatment still challenges medicine, since the strategies employed so far are not sufficiently safe and capable of specifically eliminating tumor cells. Prostate cancer (PCa) is a highly incident malignant neoplasm and the outcome of patients depends directly on the treatment adopted, especially on the efficacy of the chemotherapeutic agents. In this context, the search for active natural products with antineoplastic action is promising. In the present study, is reported the cytotoxic effect of different plant extracts from Brazilian savanna and of the substance 4-nerolidylcatechol (4-NC) against prostate tumor cells. In addition, 4-NC was evaluated for its ability to suppress different mechanisms associated with CaP. Three prostate cell lines were cultured: RWPE-01 (non-tumorigenic), LNCaP (tumorigenic sensitive to androgen) and PC3 (tumorigenic resistant to castration). They were individually treated with hexanic, chloroformic and hydromethanolic extracts from 10 plant species and the cytotoxicity evaluated by the MTT method. The hexanic extract of *Pothomorphe umbellata* was promising by decreasing the viability of the tumor cell lines. The substance obtained from this hexanic extract of *P. umbellata*, 4-NC, showed selective cytotoxicity against PCa lineages, especially on PC3, inducing apoptosis, altering mitochondrial membrane potential and reducing proliferation and invasion. Finally, analysis of the expression of 84 genes associated with different oncogenic pathways demonstrated that 4-NC modulated apoptosis, cell cycle, epithelial-mesenchymal Transition (EMT), angiogenesis and hypoxia in PC3 cells. Our findings elucidated the antitumor activity of 4-NC against PCa, which was promising especially in the suppression of oncogenic mechanisms of the castration-resistant model. Further studies are needed to better describe their behavior by validating 4-NC as a new alternative for the treatment of advanced CaP or as a prototype for the development of new antitumor drugs.

**Key words:** Castration-resistant prostate cancer, natural products, *Pothomorphe umbellata*, 4-nerolidylcatechol and bioprospecting.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Carcinogênese e câncer de próstata: uma visão geral

O câncer é uma doença crônica que agrupa um conjunto de mais de 100 patologias caracterizadas por possuírem em comum alterações moleculares que culminam com a divisão celular descontrolada (KOTECHA; TAKAMI; ESPINOZA, 2016; STRMISKA *et al.*, 2019). A malignidade resulta do acúmulo de mutações que elevam o potencial agressivo e a capacidade metastática das células (STRMISKA *et al.*, 2019). A metástase é a principal causa de morbimortalidade pela doença (SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013), uma vez que envolve o comprometimento de tecidos e órgãos adjacentes e/ou distantes do sítio tumoral primário (STEEG, 2016). Esta colonização extrínseca progressiva decorre do rompimento de barreiras impostas pelo organismo, como escape imunológico, degradação da matriz extracelular, infiltração e sobrevivência no sistema vascular e/ou linfático (MASSAGUÉ; OBENAUF, 2016; ZEESHAN; MUTAHIR, 2017). A origem da cascata metastática inclui diferentes mecanismos como a transição celular epitélio-mesenquimal (EMT) e o acúmulo de células-tronco em um microambiente dinâmico e heterogêneo (LIU *et al.*, 2017; SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013).

Apesar dos notórios avanços dos métodos de detecção e tratamento de neoplasias, o câncer continua sendo um grande problema para a saúde pública (BASTOS *et al.*, 2016). Seus índices epidemiológicos são alarmantes, incluindo alta incidência e mortalidade (KOTECHA; TAKAMI; ESPINOZA, 2016; MARROW; SECRETED; PROTECT, 2014; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). No ano de 2017, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 8,8 milhões de pessoas chegaram a óbito em nível mundial em decorrência do câncer, sendo a grande maioria em países em desenvolvimento. São previstas 12 milhões de mortes até o ano de 2030 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019; WU, W. *et al.*, 2019). O câncer de próstata (CaP) e o de pulmão para o sexo masculino e o câncer de mama e o do colo

do útero para o feminino são os mais incidentes, à exceção do câncer de pele não melanoma (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019).

O CaP é a segunda principal causa de morte decorrente de tumores nos Estados Unidos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019). No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), são estimados 68.220 novos casos da doença para o biênio 2018-2019 (INCA - Instituto Nacional de Câncer”, 2018). Trata-se de um tumor indolente e assintomático em sua fase inicial. Os sinais, quando presentes, assemelham-se aos da hiperplasia prostática benigna (HPB) (DAMBER; AUS, 2008). Contudo, sua evolução pode ocorrer de maneira rápida e agressiva, obstruindo a vesícula e atingindo, primariamente, os ossos (STOCKARD *et al.*, 2004).

Tumores prostáticos são multifatoriais, heterogêneos e complexos molecular e clinicamente (MIMEAULT; BATRA, 2011). Entre os fatores de risco, destacam-se a idade avançada, a predisposição genética, a etnia, doenças sexualmente transmissíveis, atrofia inflamatórias, desregulação hormonal e a obesidade (DAMBER; AUS, 2008; HOANG *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018; ZADRA; PHOTOPOULOS; LODA, 2013). Acomete, majoritariamente, homens com idade superior a 60 anos (REBBECK, 2018) e a maioria dos casos da doença é esporádica. Contudo, traços genéticos são relevantes para a promoção e progressão do tumor (NWOSU *et al.*, 2001). A presença de pai ou irmão já diagnosticados com CaP aumenta em duas vezes a chance de desenvolvimento da doença (GRÖNBERG *et al.*, 1997; NWOSU *et al.*, 2001). Além disso, *loci* envolvidos na susceptibilidade ao CaP já foram descritos, quais sejam: o 1q24-25, referente ao gene Câncer de Próstata Hereditário 1 (*HPC1*); o 1q42.2-43 do gene Predisposição para Câncer de Próstata (*PCaP*); o Xq27-28, onde se localiza o gene Câncer de Próstata Hereditário Ligado ao Cromossomo X (*HPCX*); o 1p 36 do gene Câncer de próstata e cérebro (*CAPB*); o 17p12 referente ao gene Câncer de Próstata Hereditário 2 (*HPC2*) e o 20q13 do gene Câncer de Próstata Hereditário 20 (*HPC20*) (GRÖNBERG *et al.*, 1997). Alterações nesses *loci* conduzem à tradução de proteínas que atuam em várias vias como angiogênese, apoptose, proliferação e diferenciação celular (EM; GOULART, 2014).

A etnia também influencia o CaP, sendo este mais incidente em afro-americanos. Variações genéticas e hormonais são associadas a esses índices

(RIVAS *et al.*, 2016). Quanto às doenças sexualmente transmissíveis, assim como as prostatites, favorecem um ambiente inflamatório rico em citocinas, as quais corregulam a sinalização androgênica e, portanto, conduzem à evolução da doença (PERDANA *et al.*, 2016). Já a obesidade também é considerada um fator de risco devido às alterações metabólicas associadas ao estresse oxidativo e aos níveis alarmantes de insulina circulante, que potencializam o crescimento celular (ZADRA; PHOTOPOULOS; LODA, 2013).

O diagnóstico, em sua maioria, ocorre tardiamente, comprometendo a sobrevida dos pacientes (MIMEAULT; BATRA, 2011). Além disso, o desconhecimento acerca dos mecanismos moleculares associados à promoção do CaP limita o aprimoramento das técnicas rotineiramente utilizadas no rastreio da doença (BASTOS *et al.*, 2016; LEE; CHO; KIM, 2011; STRMISKA *et al.*, 2019). Portanto, a heterogeneidade do CaP, além de dificultar seu diagnóstico, favorece sua evolução e a consequente ineficácia das estratégias terapêuticas adotadas. Sua complexidade é traduzida nos diferentes subtipos moleculares os quais exigem estratégias terapêuticas específicas (KALYANASUNDARAM *et al.*, 2013). Nesse contexto, torna-se necessário melhor caracterizar esses tumores, sobretudo os mais agressivos, além de desenvolver novos métodos e medicamentos na busca por uma maior sobrevida dos pacientes.

## **1.2 O câncer de próstata resistente à castração (CRPC) e as limitações da quimioterapia convencional.**

A tumorigênese da próstata é altamente dependente de andrógenos, assim como as células normais da glândula (DAMBER; AUS, 2008). Esses hormônios encontram-se envolvidos com a maturação sexual, espermatogênese e desenvolvimento do órgão sexual masculino (EM; GOULART, 2014). Além disso, também coordenam a apoptose e a proliferação de células prostáticas (HOANG *et al.*, 2017).

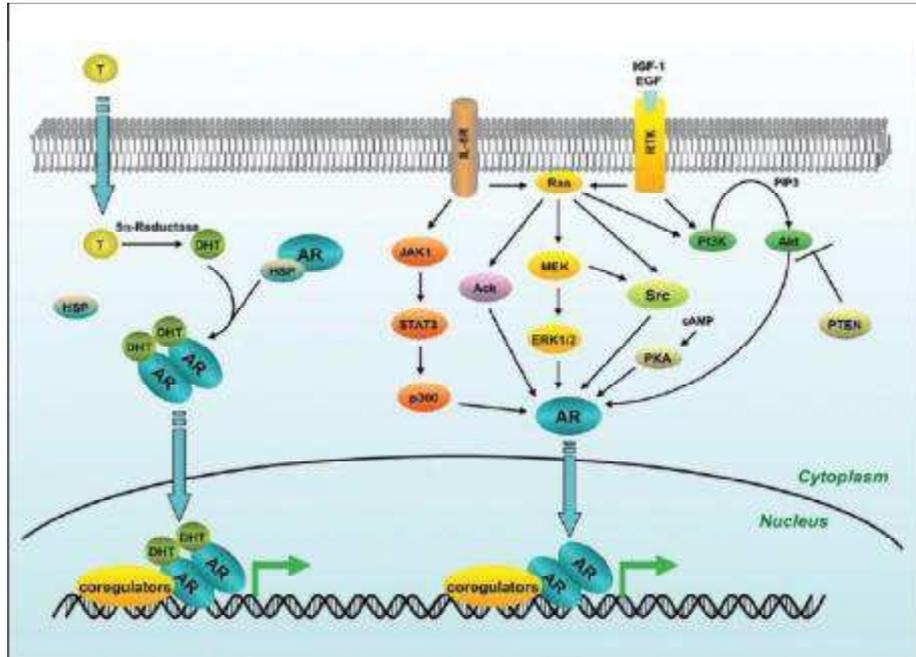
O principal androgênio circulante é a testosterona, produzida majoritariamente pelas células de *Leydig* nos testículos, sob regulação do hormônio luteinizante (LH) (WANG *et al.*, 2018). A testosterona circula no sangue associada a albumina e globulinas de ligação a hormônios sexuais

(EM; GOULART, 2014). Após difusão pela membrana plasmática, é convertida no citoplasma em di-hidrotestosterona (DHT) pela enzima 5- $\alpha$  redutase (WANG *et al.*, 2018). A DHT apresenta uma afinidade cinco vezes maior ao receptor de androgênio (AR). Este é um receptor nuclear de hormônios esteroides altamente dependente de ligante e controla a expressão de vários genes (HEINLEIN; CHANG, 2004).

O gene que codifica o AR está localizado no cromossomo Xq11-12, sendo formado por 8 exons. Estruturalmente é constituído por um arcabouço com três domínios funcionais: um N-terminal (NTD) de transativação, um de ligação ao DNA (DBD) e o de ligação ao ligante (LDB) (WADOSKY; KOOCHEKPOUR, 2017b). Quando livre da presença de hormônio, o AR se encontra no citoplasma associado a proteínas de choque térmico (HSP), responsáveis por protegê-lo da proteólise (EM; GOULART, 2014) (Figura 1). Após se ligar ao DHT, por meio do LDB, uma mudança conformacional conduz o deslocamento das HSPs (TAN *et al.*, 2015). Há a dimerização do receptor e a ligação de corretores, com a posterior translocação para o núcleo, onde o AR se liga a elementos de resposta androgênica (AREs). No núcleo, portanto, associado também a proteínas correletórias, o AR controla a expressão de genes alvo, como o antígeno prostático específico (PSA) e a protease transmembrana, serina 2 (TMPRSS2) (SHAFI; YEN; WEIGEL, 2013).

O rastreamento do CaP é realizado, principalmente, pela dosagem séria do PSA (CHEN *et al.*, 2017). Os níveis desse antígeno se alteram quando o epitélio do órgão se rompe, o que decorre de alterações benignas (HPB e inflamações) e malignas, como o câncer (WALLACE *et al.*, 2014). Também é realizado o toque retal e ultrassonografia da glândula. A extensão do tumor direciona a decisão terapêutica (ZHOU, L. *et al.*, 2017). Já o tratamento inclui múltiplas abordagens como cirurgia, radioterapia, terapia hormonal e quimioterapia (DAMBER; AUS, 2008; GAO *et al.*, 2019).

**Figura 1: Representação das principais vias de ativação do receptor de androgênio (AR) no câncer de próstata.** Ao se ligar à di-hidrotestosterona (DHT) o AR transloca para o núcleo regulando a expressão de diferentes genes. Mecanismos adicionais são também responsáveis por manter a sinalização androgênica ativada como o receptor de interleucina-6 (IL-6), o receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF-1R) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR).



Fonte:(LONERGAN; TINDALL, 2011)

Em 1972, Huggins e Hodges foram pioneiros em demonstrar a dependência do CaP à sinalização androgênica (CHANDRASEKAR *et al.*, 2015). A terapia de privação androgênica (ADT) tem sido o tratamento primário em casos de CaP metastático e tumor localmente avançado (SHAFI; YEN; WEIGEL, 2013). A ADT consiste na ablação hormonal por castração cirúrgica, com a orquiectomia bilateral, ou química (CHANDRASEKAR *et al.*, 2015), com a utilização de medicamentos como agonistas do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), os quais reduzem a produção hipofisária do hormônio luteinizante, impedindo a produção da testosterona testicular (GROSSMANN; CHEUNG; ZAJAC, 2013). Além destes, também são administrados inibidores competitivos pelo domínio de ligação ao AR (GELMANN, 2002). Contudo, muitos pacientes, em um prazo de cerca de dois anos, não mais respondem à ADT, o que caracteriza o quadro de CRPC, com a constante ativação do eixo

androgênico e a conseqüente progressão da doença (HEINLEIN; CHANG, 2004).

Portanto, com a resistência à castração, mesmo com o bloqueio hormonal, o receptor continua desempenhando suas funções (SHAFI; YEN; WEIGEL, 2013). Diferentes fatores contribuem para esse fenótipo como amplificação, mutações, *splicing* alternativo, mudanças estruturais, modificações em suas proteínas corregulatórias, alterações em vias adicionais que culminam na ativação do AR e desregulação metabólica com produção de testosterona pelo córtex adrenal (SHAFI; YEN; WEIGEL, 2013). A compreensão das vias envolvidas na reativação do AR são de extrema importância para o delineamento de terapias futuras e para a compreensão dos mecanismos de ação de compostos capazes de conter a progressão do CRPC (GELMANN, 2002).

A reativação do AR intratumoral no CRPC pode decorrer de amplificação do receptor (HEINLEIN; CHANG, 2004). A amplificação promove hipersensibilidade, a qual compensa os baixos níveis séricos de androgênio (NWOSU *et al.*, 2001). Mutações em seus domínios, em especial no LDB, também conduzem à resistência, uma vez que moléculas não androgênicas, como progesterona, estradiol e alguns antagonistas de AR também ativam o receptor (HEEMERS; TINDALL, 2007). Embora estas sejam as mais frequentes, também são descritas mutações em NTD e DBD (GROSSMANN; CHEUNG; ZAJAC, 2013).

Nas últimas décadas, tem sido demonstrado que variantes de *splicing* do AR (ARV) também regulam a transdução do sinal androgênico (WADOSKY; KOOCHEKPOUR, 2017a). ARVs que não possuem o LDB continuam ativos, direcionando o maquinário transcricional mesmo na ausência de hormônios, sustentando o quadro de CRPC (LU, C.; LUO, 2013). Já foram descritos pelo menos 18 ARVs. O ARV7 tem se destacado, uma vez que consegue adentrar o núcleo celular, mesmo na ausência do androgênio, sinalizando para o crescimento e a proliferação de células CRPC (CHAN; LI; DEHM, 2012), além de manterem a expressão de PSA (LU, J.; DER STEEN; TINDALL, 2015; SHAFI; YEN; WEIGEL, 2013).

Os correguladores do AR são macromoléculas moduladoras que induzem ou reprimem o funcionamento gênico (HEEMERS; TINDALL, 2007).

Co-ativadores de AR remodelam a cromatina e modificam histonas, facilitando o acesso do maquinário transcricional ao DNA nucleossomal (HEEMERS; TINDALL, 2007). Uma das principais famílias de co-ativadores é a p160, composta por três proteínas: SRC-1, SRC-2 (TIF2) e SRC-3 (DAI; HEEMERS; SHARIFI, 2017). Estas se ligam ao AR pelo NTD e atuam com transativadores gênicos (EM; GOULART, 2014). A família p300 também se destaca, ao promover modificações epigenéticas que garantem o funcionamento gênico (EM; GOULART, 2014). Já foi demonstrado que em CRPC há elevados níveis de expressão do p300 (ZHONG *et al.*, 2014) e, portanto, essas proteínas se mostram chave para o quadro de CaP avançado (DAI; HEEMERS; SHARIFI, 2017; HEEMERS; TINDALL, 2007).

Finalmente, fatores de crescimento e citocinas também são moduladores do AR (HUANG; FU, 2015). Existem outras vias que ativam essa sinalização reprimida pela ADT (HEINLEIN; CHANG, 2004), aumentando, inclusive, a transcrição do receptor (HUANG; FU, 2015) (Figura 1). O receptor do fator de crescimento 1 semelhante à insulina (IGF-1R) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), quando estimulados, ativam proteína-quinase ativadas por mitógenos (MAPK), proteína kinase B (AKT) e transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT), conduzindo à evolução do tumor (HEEMERS; TINDALL, 2007; HUANG; FU, 2015). A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina que modula co-ativadores do AR e, portanto, se mostra importante no quadro de CRPC (HEEMERS; TINDALL, 2007).

Em decorrência da reativação do AR, o CRPC apresenta um fenótipo distinto que garante um perfil migratório, invasivo e metastático. Nesse contexto, a transição epitélio-mesenquimal (EMT) tem se mostrado um mecanismo chave para esse grave quadro clínico (GHOLAMZADEH *et al.*, 2019; IMRAN *et al.*, 2019; KOTECHA; TAKAMI; ESPINOZA, 2016; WU, C. Y.; CHEN, 2019). A EMT envolve a sinalização mediada pelo microambiente tumoral onde há a perda da polaridade apico-basal das células, com o ganho de uma estrutura desordenada e fibroblástica (FEITELSON *et al.*, 2015). Essa transição é desencadeada por fatores de transcrição Snail com a consequente perda da expressão de E-caderinas (JEON; LEE, 2017; NOURI *et al.*, 2014) e superexpressão de N-caderina, Vimentina e Fibronectina (FEITELSON *et al.*, 2015). O Snail também protege a células tumorais de sofrerem apoptose

(JEON; LEE, 2017) e promove a multiplicação de células-tronco tumorais (CSC) (ZEESHAN; MUTAHIR, 2017), as quais também estão envolvidas com a resistência a terapias convencionais (LEE; CHO; KIM, 2011). Além disso, estudos anteriores em linhagem LNCaP comprovaram que, na presença de ARV7, há o aumento da expressão de moduladores mesenquimais, como N-caderina e a Vimentina (JEON; LEE, 2017; LU, J.; DER STEEN; TINDALL, 2015).

Interessantemente, o processo EMT promove a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e, portanto, sinaliza para a angiogênese, uma das marcas do câncer. A neovascularização é crucial tanto para o surgimento quanto para a progressão da doença (HANAHAN; WEINBERG, 2011), sendo também estimulada pela hipóxia, um ambiente de baixa oxigenação (FANG; GILLIES; GATENBY, 2008) superado pelas células tumorais por meio do aumento de expressão de enzimas glicolíticas e transportadores de glicose, o que leva ao estímulo do metabolismo glicolítico (FANG; GILLIES; GATENBY, 2008). A resistência a hipóxia é adquirida a partir da transcrição de fatores induzidos por hipóxia (HIF) (ZIMNA; KURPISZ, 2015), o qual mantém a proliferação e angiogênese (MUZ *et al.*, 2015).

Importante salientar que a progressão ao CRPC metastático é refratária tanto à ablação androgênica, quanto a quimioterápicos convencionais de primeira linha, como o docetaxel (M CHANDRASEKAR *et al.*, 2015; IMAULT; BATRA, 2011). Este tem potencial anti-mitótico, estabilizando os microtúbulos e inviabilizando a divisão celular (CHANDRASEKAR *et al.*, 2015). Além disso, este medicamento ativa caspases, induzindo a apoptose (CHANDRASEKAR *et al.*, 2015). Por fim, o docetaxel também atua diminuindo a expressão de AR (JEON; LEE, 2017). Embora o docetaxel tenha contribuído substancialmente para o aumento da sobrevida dos pacientes, ainda se faz necessária a busca por novos agentes que possam melhorar a resposta terapêutica, seja isoladamente ou associados às drogas até então aprovadas. Além disso, a toxicidade inerente à quimioterapia debilita os pacientes e, por vezes, compromete o ciclo de administração dos quimioterápicos.

Portanto, é premente a descoberta e caracterização de novos agentes terapêuticos seletivos e mais eficazes (GHOLAMZADEH *et al.*, 2019; WU, C. Y.; CHEN, 2019). A compreensão de seus mecanismos de ação também é

igualmente relevante, oferecendo subsídios para novos desenhos terapêuticos que possam, de fato, contribuir para a cura dos pacientes.

### **1.3 Bioprospecção de produtos naturais no tratamento oncológico**

Os primeiros registros da utilização medicinal de espécies vegetais datam de 2600 antes de Cristo (aC). Documentos descrevem o uso histórico de aproximadamente 1000 preparações diferentes derivadas de plantas na composição de chá, tinturas, emplastros e outras formulações (NEWMAN, D. J. AND CRAGG, 2012). Contudo, sua aplicabilidade na medicina não se restringe aos tempos antigos e diferentes espécies continuam sendo estudadas no cuidado de pacientes acometidos por diferentes enfermidades (CRAGG; PEZZUTO, 2016; CHEUKA *et al.*, 2016).

Os produtos naturais (PN) são vantajosos ao se mostrarem menos tóxicos, acarretando menos efeitos colaterais sem o comprometimento de sua eficácia (CRAGG; NEWMAN, 2013; DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015; KOTECHA; TAKAMI; ESPINOZA, 2016). A ação terapêutica de plantas é mediada por seus metabólitos secundários (O'CONNOR, 2015). Estes desempenham um papel adaptativo relevante (ZAYNAB *et al.*, 2018), sendo classificados por sua estrutura química e biosintetizados a partir de vias essenciais, como a do ácido chiquimico e mevalonato (O'CONNOR, 2015). Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: alcaloides, terpenos e compostos fenólicos (CF). O primeiro alcaloide a ser isolado foi a morfina, por Serturmer, em 1805 (KRISHNAMURTI; RAO, 2016). Desde então, metabólitos secundários vêm sendo explorados, principalmente alcaloides e terpenos, revolucionando o tratamento de diferentes doenças, incluindo o câncer (NEWMAN, D. J. AND CRAGG, 2012).

Os CFs são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático em sua estrutura molecular, em que pelo menos um hidrogênio é substituído por uma hidroxila (BAILÃO *et al.*, 2015; PERES, L., 2012). Nas espécies vegetais atuam na fotoproteção (flavonoides), na defesa contra patógenos (taninos), na ação inseticida (isoflavonoides) e na pigmentação (antocioninas) (AGATI *et al.*, 2013; ELLIS; FIELD, 2016; NIRMA *et al.*, 2012). O

CF vanilina, extraído da *Vanilla planifolia*, já é amplamente explorado na indústria alimentícia como principal componente da essência de baunilha (YANG *et al.*, 2017). Além disso, os CFs têm desempenhado papel importante na medicina, principalmente devido à sua ação antioxidante (ZHOU, Y. *et al.*, 2016). Diversos compostos fenólicos já tiveram seu potencial antitumorigênico comprovado a partir da ação em diversas vias envolvidas no desenvolvimento tumoral (CRAGG; PEZZUTO, 2016; KUMAR; RIMANDO; LEVENSON, 2017; WENG; YEN, 2012). De fato, embora as plantas possam conter centenas de metabólitos secundários, apenas os majoritários são extraídos em maior concentração (BALUNAS; KINGHORN, 2005; KALYANASUNDARAM *et al.*, 2013).

O isolamento de compostos biologicamente ativos a partir de espécies vegetais envolve uma abordagem multidisciplinar, que combina química, botânica, bioquímica combinatória e análises moleculares, entre outras (BAILÃO *et al.*, 2015). Considerando tumores, substâncias naturais são potencialmente promissoras. Cerca de 60% dos fármacos antitumorais atuais são derivadas de fontes naturais, sendo estas referências no tratamentos contra diversos tipos de cânceres (BALUNAS; KINGHORN, 2005; CRAGG; NEWMAN, 2013; CRAGG; PEZZUTO, 2016). A Tabela 1 apresenta medicamentos bioprospectados de plantas medicinais (FEITELSON *et al.*, 2015).

**Tabela 1: Quimioterápicos bioprospectados de espécies vegetais com ação antitumoral.**

Princípio ativo	Classe e espécie	Tipo	Tipo de tumor
Paclitaxel (Taxol®)	Taxano/ <i>Taxus brevifolia</i>	Produto natural	Carcinoma de ovário, mama. Sarcoma de Kaposi
Docetaxel	Taxano/ <i>Taxus brevifolia</i>	Derivado semisintético	Câncer de mama, próstata (incluindo resistente a castração) e de cabeça e pescoço
Cabazitaxel	Taxano/ <i>Taxus brevifolia</i>	Derivado semisintético	Câncer de próstata resistente a castração
Vincristina (Oncovin®)	Alcalóide de vinca/ <i>Catharanthus roseu</i>	Produto natural	Leucemia aguda, câncer de mama, neuroblastoma e tumor de Wilms
Vimblastina (Velban®)	Alcalóide de vinca/ <i>Catharanthus roseu</i>	Produto natural	Câncer de mama, rins e testículos

Fonte: (FEITELSON *et al.*, 2015).

O Brasil é detentor da maior e mais rica biodiversidade do planeta com significativo potencial para pesquisas por novos medicamentos de fontes naturais (MELO *et al.*, 2017; NASCIMENTO *et al.*, 2011). Contudo, a bioprospecção de sua potencialidade terapêutica é incipiente (DOS SANTOS *et al.*, 2016), evidenciando a importância de novos estudos na área, sobretudo voltados para o tratamento oncológico.

#### **1.4 Espécies encontradas no cerrado como fontes de produtos naturais para o tratamento do câncer de próstata**

O cerrado é um dos diversos biomas existentes no território brasileiro, com vasta e pouco explorada biodiversidade (RIBEIRO, *et al.*, 2014). Mesmo rico em espécies com potencial farmacológico e terapêutico, as pesquisas permanecem negligenciadas, além de estar em risco devido às queimadas para fins agroindustriais (RIBEIRO, *et al.*, 2014). Entre as espécies medicinais com potencial para o tratamento de câncer, estão a *Achyrocline satureioides*,

*Arrabidaea chica*, *Bidens pilosa*, *Equisentum ssp*, *Kalanchoe brasiliensis*, *Pothomorphe umbellata*, *Smilax ssp*, *Solanum lycocarpum* e *Vernonia polyanthes*.

#### **1.4.1 *Achyrocline satureioides***

*Achyrocline satureioides* (família Asteraceae), popularmente conhecida como Macela-do-campo, é nativa da América do Sul. Apresenta-se como um arbusto perene, com folhas finas e alongadas, chegando a um metro de altura (BASSANI *et al.*, 2018). A *A. satureioides* é empregada no tratamento de doenças respiratórias, distúrbios inflamatórios, doenças do sistema nervoso, problemas hepáticos e do sistema gastro intestinal; além de também ser utilizada como calmante. Seus compostos fenólicos (CF), principalmente flavonoides, têm sido associados aos efeitos antitumorais e antivirais já descritos (CARINI; KLAMT; BASSANI, 2014; SOUZA *et al.*, 2018). Estudos comprovaram que essa planta é rica em terpenos, chalconas e CFs, os quais se destacam por seus efeitos antioxidantes (BASSANI *et al.*, 2018; SOUZA *et al.*, 2018).

#### **1.4.2 *Arrabidaea chica***

*Arrabidaea chica* (família Bignoniaceae) é denominada popularmente por crajirú e é amplamente encontrada no cerrado e mata atlântica. pertencente à (BEHRENS; TELLIS; CHAGAS, 2012) e utilizada como diurética, antiinflamatória, cicatrizante, bactericida, expectorante, e para o tratamento de distúrbios intestinais. Sua atividade antitumoral já foi relatada para o câncer uterino e de boca (RIBEIRO, A. F. C. *et al.*, 2012; TAFFARELLO *et al.*, 2013). A cajurina, metabólito principal da *A. chica*, tem uma pigmentação avermelhada, sendo muito utilizada por tribos indígenas como corante. Além disso, suas ações antioxidantes e antiinflamatória já foram relatadas (ARO *et al.*, 2013; PAULA *et al.*, 2013).

### **1.4.3 *Bidens pilosa***

*Bidens pilosa* (família Asteraceae) é uma planta amplamente encontrada em países tropicais, (CORTÉS-ROJAS *et al.*, 2013), e conhecida popularmente como picão-preto. A *B. pilosa* é considerada uma erva daninha em alguns países. Contudo, também é utilizada na alimentação e como planta medicinal (LI, S. *et al.*, 2018; WU, J. *et al.*, 2013) para o tratamento de doenças hepáticas, cardiovasculares, inflamações, infecções, diabetes e alguns tipos de cânceres, como o linfoma (LI, S. *et al.*, 2018; WU, J. *et al.*, 2013). Investigações fitoterápicas dessa planta demonstraram a presença de flavonoides em suas folhas (GONÇALEZ *et al.*, 2008).

### **1.4.4 *Equisetum ssp.***

*Equisetum ssp.* (família Equisetaceae) é uma herbácea encontrada na América do Sul é popularmente conhecida como cavalinha e predominante em regiões ribeirinhas (USLU *et al.*, 2013) utilizada em casos de problemas renais, vasculares, infecciosos, inflamatórios e câncer (MIMICA-DUKIC *et al.*, 2008). A quercetina já foi descrita como seu composto majoritário, o qual já foi avaliado quanto aos seus efeitos antioxidantes, ao sequestrar radicais-livre, diminuindo assim a probabilidade de danos por estresse oxidativo (IMAI *et al.*, 2009; LI, H. *et al.*, 2012; MIMICA-DUKIC *et al.*, 2008).

### **1.4.5 *Kalanchoe brasiliensis***

A *Kalanchoe brasiliensis* é uma Crassulaceae amplamente disseminada no cerrado, com folhas suculentas. É comumente utilizada como ornamento, contudo, também possui aplicabilidade medicinal com efeito anti-inflamatório (FONSECA *et al.*, 2018). A *K. brasiliensis* é popularmente conhecida como saião ou flor-da-fortuna. Seu consumo também é indicado em casos de asma, cálculos renais, diabetes, doenças pulmonares, úlceras, tumores e feridas. Seus constituintes majoritários são flavonoides glicosilados derivados da

aglicona patuletina, que possuem atividade gastroprotetora (DE ARAÚJO *et al.*, 2018; DE SOUZA DOS SANTOS *et al.*, 2011; FONSECA *et al.*, 2018).

#### **1.4.6 *Pothomorphe umbellata***

A *Pothomorphe umbellata*, popular caapeba, é uma planta pertencente à família Piperaceae, típica do cerrado e da mata atlântica, com ciclo de vida longo, podendo chegar a 2,5 metros. Suas folhas são largas e em formato de coração, comumente encontrados em locais úmidos e sombreados (NEUWINGER, 1996). É indicada em casos de diabetes, febres, doenças hepáticas, doenças gastrointestinais, doenças respiratórias e em feridas, devido à sua ação anti-inflamatória (SPONCHIADO *et al.*, 2014; VALADARES *et al.*, 2007).

A *P. umbellata* se destaca por seus metabólitos secundários, principalmente o 4-NC, o qual possui importantes atividades biológicas (CORTEZ *et al.*, 2015; VALADARES *et al.*, 2007). Alguns estudos mostraram que o 4-NC tem propriedades antioxidantes, citotóxica, antimaláricas, antitumorais e quimiopreventivas (CORTEZ *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2013; PAULIQUEVIS *et al.*, 2015; SACOMAN *et al.*, 2008; SPONCHIADO *et al.*, 2014; VALADARES *et al.*, 2007).

#### **1.4.7 *Smilax ssp***

A *Smilax ssp.* é uma espécie pertencente a família Smilacaceae, típica da região mediterrânea, mas amplamente difundida no cerrado brasileiro. Suas folhas são comestíveis e recomendadas para o tratamento de sífilis, diabetes, problemas renais e reumatismo (IVANOVA *et al.*, 2011). Também conhecida como Salsaparrilha, suas partes aéreas são ricas em saponinas esteroidais (SPARG; LIGHT; VAN STADEN, 2004), as quais apresentam atividades antitumorais, depurativas e antidiabéticas (SPARG, 2004; IVANOVA *et al.*, 2011). Estudos com extratos de *Smilax* relataram a indução de morte de células tumorais por apoptose e autofagia, sugerindo seu papel enquanto agente antitumoral (SHE *et al.*, 2017; TIAN *et al.*, 2017).

#### **1.4.8 *Solanum lycocarpum***

A *Solanum lycocarpum* é um arbusto nativo do cerrado, pertencente a família Solanaceae. Popular lobeira, seus frutos são utilizados em casos de diabetes, colesterol alto, espasmos, dores abdominais e renais (ANDRADE *et al.*, 2016; MUNARI *et al.*, 2012). Além de não serem mutagênicos, seus extratos protegem o material genético contra danos cromossômicos causados por quimioterápicos (TAVARES *et al.*, 2011). Seus metabólitos majoritários são dois glicoalcaloides denominados, solamargina e solasonina, também citotóxicos a células tumorais (MUNARI *et al.*, 2014).

#### **1.4.9 *Vernonia polyanthes***

A *Vernonia polyanthes* é um arbusto perene, nativo do cerrado pertencente à família Asteraceae. Suas folhas são muito utilizadas em casos de reumatismo, bronquite, malária e tosse constante (TOYANG; VERPOORTE, 2013). Conhecida popularmente como assa-peixe, a *V. polyanthes* tem como metabólitos principais lactonas sesquiterpênicas com propriedades terapêuticas antiinflamatórias (BARBASTEFANO *et al.*, 2007).

Portanto, no presente trabalho investigou-se compostos biologicamente ativos para o tratamento do CaP. Em suma, demonstrou-se, por meio de ensaios funcionais, que o metabólito da *P. umbellata*, o 4-NC, age de forma efetiva e seletiva contra a linhagem CRPC (PC3). Ademais, foi investigado o mecanismo de ação do 4-NC sobre as células PC3 ao se quantificar a expressão diferencial de 84 genes associados a diferentes mecanismos oncogênicos. Finalmente, este estudo se destaca não somente por apresentar resultados promissores para o tratamento do CRPC, mas também por evidenciar a importância da biodiversidade brasileira quanto à sua potencial riqueza farmacológica.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar extratos vegetais de espécies vegetais encontradas no cerrado brasileiro e substância isolada de extrato promissor quanto à sua capacidade em interceptar mecanismos tumorigênicos do CaP.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Selecionar extratos de espécies vegetais encontradas no cerrado brasileiro com potencial antitumoral;
- Investigar a citotoxicidade dos extratos selecionados sobre linhagens neoplásicas e não neoplásicas da próstata.
- Definir os extratos promissores para o tratamento do CaP;
- Validar o potencial antiproliferativo da substância pura 4-NC, obtida de *P. umbellata*, sobre as linhagens tumorais prostáticas, sobretudo sobre a PC3, modelo de CRPC;
- Investigar, por meio de estudos funcionais, a capacidade do 4-NC em induzir a apoptose de células tumorais prostáticas;
- Investigar o mecanismo de ação do 4-NC sobre vias oncogênicas;
- Definir, a partir dos genes regulados, os mecanismos chave de ação do 4-NC sobre células CRPC.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### **3.1 Seleção, coleta e obtenção dos extratos das espécies vegetais.**

O presente estudo foi desenvolvido em parceria com a Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) e encontra-se em consonância com a Lei Federal número 13.123/2015 de Acesso ao Patrimônio Genético, registrado sob o número A5BD484. As espécies vegetais foram definidas utilizando estratégias integradas e racionais de seleção, incluindo farmacognosia reversa e critérios taxonômicos e quimiotaxonômicos. As partes aéreas foram coletadas no Horto da Faculdade de Farmácia – UFJF e as exsicatas se encontram depositadas no Herbário Leopoldo Krieger - UFJF, juntamente com seu número de tombo *A. satureioides* (19717), *B. pilosa* (19613), *Equisentum ssp* (49200), *K. brasiliensis* (43980), *P. umbellata* (48624), *Smilax ssp* (65909), *S. lycocarpum* (65906) e *V. polyanthes* (49336).

As amostras foram processadas e os extratos cedidos pelo Laboratório de Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN). Em suma, após a coleta, as folhas foram secas a temperatura ambiente e, em seguida, pulverizadas em moinho de facas. Posteriormente, procedeu-se a maceração fracionada, em temperatura ambiente, utilizando como solventes o hexano, clorofórmio e a mistura de metanol:água (proporção 7:3 v/v), como solventes extratores. As soluções hexânicas, clorofórmicas e hidrometanólicas obtidas de cada amostra foram filtradas para um balão de fundo redondo e rotaevaporadas a 40°C para a obtenção dos extratos fracionados. A rotaevaporação foi repetida por 5 vezes a cada 3 dias.

#### **3.2 Isolamento do 4-NC**

O 4-NC foi gentilmente cedido pelo laboratório de Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN).

### **3.3 Linhagens celulares**

As linhagens celulares foram obtidas do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC). Foram cultivadas as linhagens RWPE-01 (não tumorigênica) e as linhagens tumorais LNCaP (hormônio dependente) e PC3 (CRPC). As células RWPE-01 foram mantidas em meio de cultivo de queratinócitos enriquecido com 1ug/mL de extrato de pituária bovina, 5 ng/mL de Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) humano recombinante e 100 mg/mL do antibiótico sulfato de gentamicina. As LNCaP e PC3 foram cultivadas em meio RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino a 10% e 100 mg/mL do antibiótico sulfato de gentamicina. Todas foram mantidas a 37°C em incubadora úmida com ambiente controlado contendo 5% de CO<sub>2</sub>, até atingirem 80-90% de confluência.

### **3.4 Ensaio de citotoxicidade**

Para se determinar a citotoxicidade das amostras, foi realizado o ensaio baseado na metabolização mitocondrial do Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). As frações foram diluídas em uma solução estoque a 50 mg/mL em Dimetil-sulfóxido (DMSO) e os experimentos realizados em triplicata.

Após a confluência, as células RWPE-01, LNCaP e PC3 foram coletadas e centrifugadas por 5 min a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células foram solubilizadas em 1 mL de meio de cultura suplementado. Para o plaqueamento, foram utilizadas  $2 \times 10^4$  células/poço, em placas de 96 poços, mantidas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por 24 h para aderência. Transcorrido esse período, foram adicionados os extratos nas seguintes concentrações, diluídos em meio de cultivo: 0,125 µg/µL; 0,25 µg/µL; 0,5 µg/µL e 1 µg/µL. Após 24 horas de tratamento foi adicionado 10 µl de MTT diluído em meio a 5mg/mL por 4 h. Em seguida, foram acrescidos 50 µl de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%/N-dimetil-formamida a 50% e a placa incubada por 16 horas. Por fim, foi realizada a leitura da absorbância (Abs) em espectrofotômetro (Multiskan GO) no comprimento de onda a 570 nm. Os valores da viabilidade

celular foram expressos em porcentagem relativa à absorbância determinada de acordo com a Fórmula (F1).

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{(\text{Abs tratamento} - \text{Abs branco})}{\text{Abs DMSO} - \text{Abs branco}} \times 100 \quad (\text{F1})$$

Abs tratamento = Absorbância da Amostra contendo diferentes tratamentos.

Abs branco = Absorbância do controle negativo (apenas meio de cultura)

Abs DMSO = Absorbância do controle de tratamento (diluyente-DMSO)

Para os ensaios de citotoxicidade do 4-NC, foram utilizadas as mesmas condições supracitadas. Contudo, o composto foi avaliado nas concentrações de 6,12µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 80 µM, 100µM, 125µM, 150 µM, 200 µM, 250 µM, 300 µM e 350 µM por 24 e 48 horas. O índice citotóxico para 50% (IC<sub>50</sub>) foi calculado por regressão não linear utilizando-se o *software* GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A partir do ensaio de MTT foram definidas as concentrações do 4-NC para os experimentos posteriores, quais sejam: 6µM, 65µM, 80µM, 100µM e 125µM.

### **3.5 Ensaio clonogênico**

A capacidade proliferativa das células PC3 foi mensurada pelo ensaio clonogênico. A análise foi realizada em triplicata e após tratamento com concentração sub-citotóxica (6µM) e citotóxica (80µM) de 4-NC. Foram plaqueadas  $1 \times 10^2$  células/poço em placas de 6 poços. As células foram mantidas por 15 dias, com troca do meio no sétimo dia após o plaqueamento. Após 15 dias, as células foram fixadas em metanol 100% gelado, por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, o metanol foi removido e então adicionados 1 mL de cristal violeta 0,1% por 1 minuto. As colônias coradas

foram lavadas por três vezes com água destilada e aquelas com mais de 50 células foram contabilizadas para análise.

### **3.6 Ensaio de migração celular**

Para a avaliação da migração celular foi realizado o ensaio de *wound healing*. Foram plaqueadas  $8 \times 10^4$  células/poço em placas de 24 poços, em triplicata. Após confluência, os poços foram riscados, na posição vertical, com ponteiros de pipetas de 200 $\mu$ L, com posterior lavagem suave com tampão fosfato salino (PBS) 1x para retirada do excesso de células. Nesse momento imagens foram capturadas para o tempo zero. O meio contendo o 4-NC foi, então, adicionado nas concentrações 6 $\mu$ M, 65 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 125 $\mu$ M, mantido por 24 e 48h e imagens capturadas após cada tempo de incubação em Microscópio Evos®.

### **3.7 Análise de apoptose/necrose celular**

A apoptose celular foi avaliada por citometria de fluxo a partir da externalização da fosfatidilserina e a consequente marcação com Anexina V/7-AAD (BD Pharmingen™). As três linhagens foram plaqueadas em placas de 6 poços, em triplicata, contendo  $2 \times 10^5$  células/poço e tratadas com as concentrações de 6 $\mu$ M, 65 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 125 $\mu$ M de 4-NC por 48 h.

Após o tratamento, foram adicionados 5 $\mu$ L de Anexina V/7-AAD, com incubação à temperatura ambiente por 15 minutos. Foram incluídos os seguintes controles: (i) positivos com 3% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; (ii) negativo sem tratamento; (iii) linhagens não coradas; (iv) linhagens coradas apenas com Annexin V e (v) linhagens coradas apenas com 7-AAD. A quantificação da fluorescência foi realizada em Citômetro de fluxo (BD AccuriCytometers). Para a análise dos dados foi utilizado o programa *FlowJo* (Tree Star, Inc).

### **3.8 Análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM)**

A alteração no PMM foi analisada citometricamente utilizando o reagente MitoStatus Tetramethylrhodamine ethyl Ester (TMRE) (BD Pharmigen), seguindo-se as recomendações do fabricante, com modificações. Sucintamente, as três linhagens foram plaqueadas, em triplicata, em placas de 6 poços, contendo  $2 \times 10^5$  células/poço. Estas foram tratadas com  $6\mu\text{M}$ ,  $65\mu\text{M}$ ,  $80\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$  e  $125\mu\text{M}$  de 4-NC por 48h e, para o ensaio, também foram incluídos o controle negativo sem tratamento e positivo de morte (3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Após 48h de tratamento as células foram coletadas, centrifugadas e lavadas com PBS1x, para então ser adicionado 1uL do regente TMRE. Após incubação por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , protegida da luz, a solução celular/TMRE foi centrifugada por 5 min a 1.000 rpm e lavada duas vezes com PBS 1x para então ser realizada a leitura em citômetro de fluxo (BD-AccuriCytometers).

### **3.11 Ensaio de proliferação celular**

Para a quantificação da proliferação celular foi utilizado  $5\mu\text{M}$  do corante CellTrace™ CFSE diluído em DMSO. As linhagens foram coradas com CFSE a  $37^\circ\text{C}$  por vinte minutos protegidas de luz, sob agitação lenta. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes com PBS1x e ressuspensas em meio de cultura completo pré-aquecido, com incubação posterior de 5 minutos. Por fim as linhagens coradas foram plaqueadas, em triplicata, para a então adição dos tratamentos do 4-NC a  $6\mu\text{M}$ ,  $65\mu\text{M}$ ,  $80\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$  e  $125\mu\text{M}$ . Foram incluídos o controle negativo com células não tratadas e outro com células não coradas, para a compensação no citômetro. As análises foram conduzidas após 48 h de tratamento em Citômetro de fluxo (BD AccuriCytometers). Para a análise dos dados foi utilizado o programa *FlowJo* (Tree Star, Inc).

### **3.12 Padrão de expressão gênica após tratamento com 4-NC**

A linhagem CRPC, PC3, foi cultivada até confluência em duas garrafas T25, e, então, tratada com  $80\mu\text{M}$  de 4-NC por 48 h. Após o tratamento, o RNA

total das células foi extraído utilizando-se o reagente *TrizolReagent®* (Invitrogen), de acordo com as recomendações do fabricante. A qualidade do material foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com GelRed 1X, assim como pela razão das leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm conduzidas em Nanodrop 1000 (Unisciences). O RNA foi imediatamente transcrito reversamente em cDNA, utilizando-se o kit GoScript (Promega) conforme recomendado pelo fabricante.

Foi utilizado um arranjo personalizado de PCR em Tempo Real (qPCR) (RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Cancer PathwayFinder™, Quiagen) para a detecção da expressão diferencial de 84 genes, representantes de nove mecanismos celulares envolvidos na tumorigênese (apoptose, angiogênese, ciclo celular, senescência celular, dano e reparo do DNA, EMT, hipóxia, metabolismo e atividade telomérica). O ensaio foi conduzido no aparelho 7300 Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) e as condições conforme estabelecidas pelo fabricante. Foram considerados os genes com níveis de expressão superiores a 2x quando comparados ao controle sem tratamento.

### **3.13 Análises estatísticas**

Os dados foram avaliados utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Após confirmação da normalidade dos dados, foi utilizado o teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para as comparações múltiplas. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Citotoxicidade de extratos vegetais frente a células prostáticas

No presente estudo foram utilizados diferentes extratos das seguintes espécies de plantas do cerrado brasileiro: *A. chica*, *Equisetum ssp.*, *K. brasiliensis*, *P. umbellata*, *Smilax ssp.*, *S. lycocarpum*, *A. saturoioides*, *B. pilosa* e *V. polyanthes*. Esses foram avaliados quanto ao seu efeito antitumoral frente a células de CaP e sua seletividade validada ao se verificar seu comportamento na linhagem não tumorigênica RWPE-01.

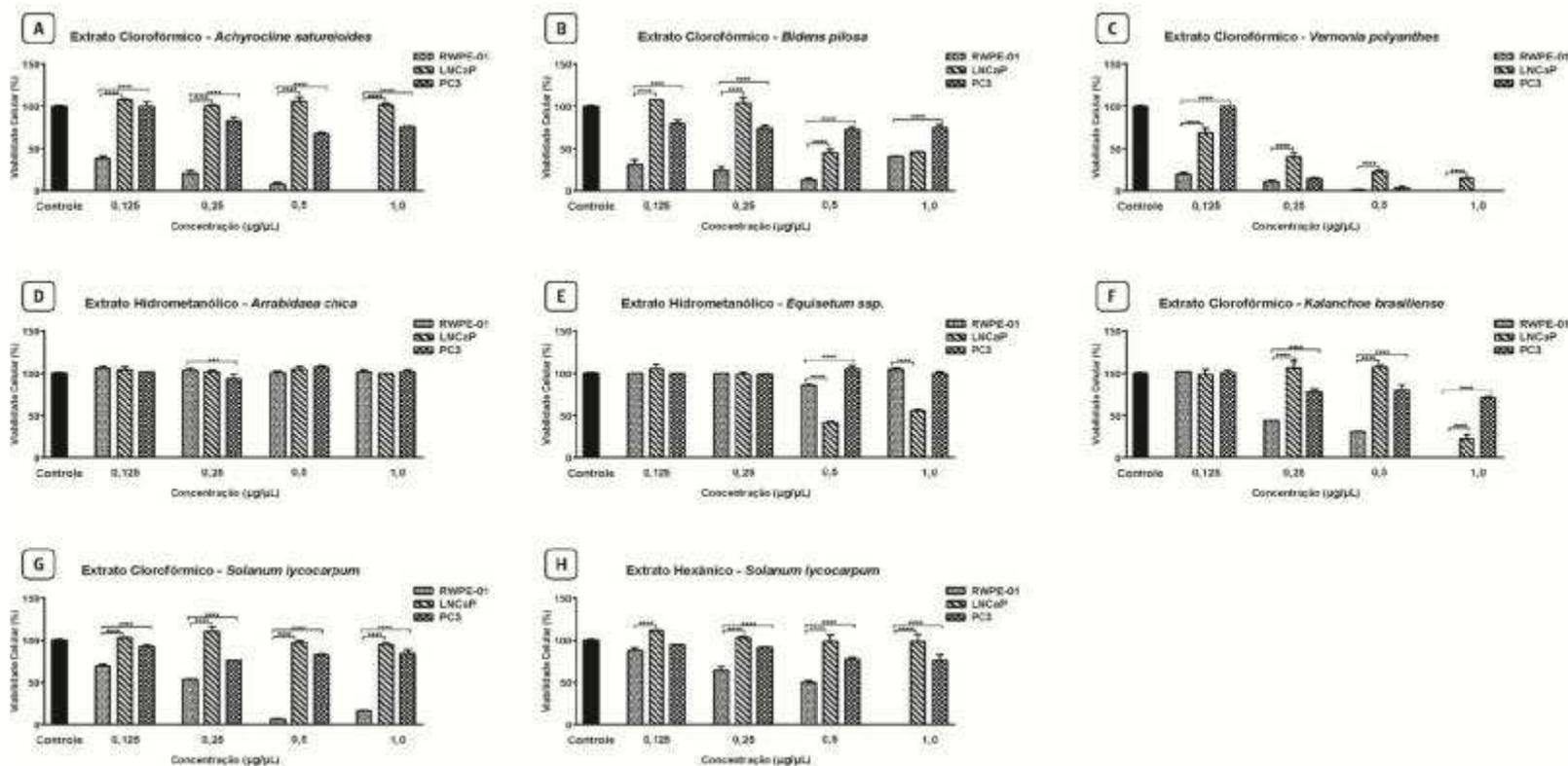
Em um *screening* inicial, as células RWPE-01, LNCaP e PC3 foram cultivadas e tratadas com quatro diferentes concentrações dos extratos (0,125 µg/µL; 0,25 µg/µL; 0,5 µg/µL e 1 µg/µL) por 24 h. Nessa etapa, foram selecionadas as amostras vegetais citotóxicas às células neoplásicas, sem efeito significativo sobre as não tumorigênicas (Figura 2).

Os extratos clorofórmicos da família Asteraceae foram inicialmente testados e se mostraram citotóxicos à linhagem RWPE-01 em todas as concentrações e para todas as espécies avaliadas (*A. saturoioides* – Figura 2A; *B. pilosa* – Figura 2B e *V. polyanthes* – Figura 2C). Além disso, para *A. saturoioides* e *B. pilosa* não foi observado efeito citotóxico às linhagens tumorais.

As células também foram tratadas com o extrato hidrometanólico de *A. chica*, o qual não reduziu a viabilidade de nenhuma das linhagens cultivadas (Figura 2D). Nas concentrações de 0,5 µg/µL e 1,0 µg/µL do extrato hidrometanólico de *Equisetum ssp.* houve uma redução seletiva de 25% e 47%, respectivamente, na viabilidade da linhagem LNCaP (Figura 2E) quando comparada à RWPE-01. Já o extrato clorofórmico de *K. brasiliense* não se mostrou seletivo, sendo citotóxico às células não tumorigênicas (Figura 2F).

Foram também avaliados os extratos clorofórmico (Figura 2G) e hexânico (Figura 2H) de *S. lycocarpum*. Contudo, além do discreto efeito antitumoral, os tratamentos reduziram significativamente a viabilidade da linhagem RWPE-01 e, portanto, considerados não seletivos à condição maligna.

**Figura 2: Viabilidade relativa das células prostáticas RWPE-01, LNCaP e PC3 após tratamento com extratos fracionados de espécies vegetais do cerrado.** Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente e controle negativo. As linhagens celulares foram tratadas com quatro concentrações diferentes dos extratos: 0,125 µg/µL; 0,25 µg/µL; 0,5 µg/µL e 1 µg/µL, por 24 h. Em (A) extrato clorofórmico de *Achyrocline satureioides*; em (B) extrato clorofórmico de *Bidens pilosa*, em (C) extrato clorofórmico de *Vernonia polyanthes*; em (D) extrato hidrometanólico de *Arrabidaea chica*; em (E) extrato hidrometanólico de *Equisetum ssp.*; em (F) extrato clorofórmico de *Kalanchoe brasiliensis*; em (G) extrato clorofórmico de *Solanum lycocarpum* e em (H) extrato hexânico de *S. lycocarpum*. Os resultados estão apresentados como Média ± Desvio Padrão de três experimentos independentes para cada tratamento. \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.



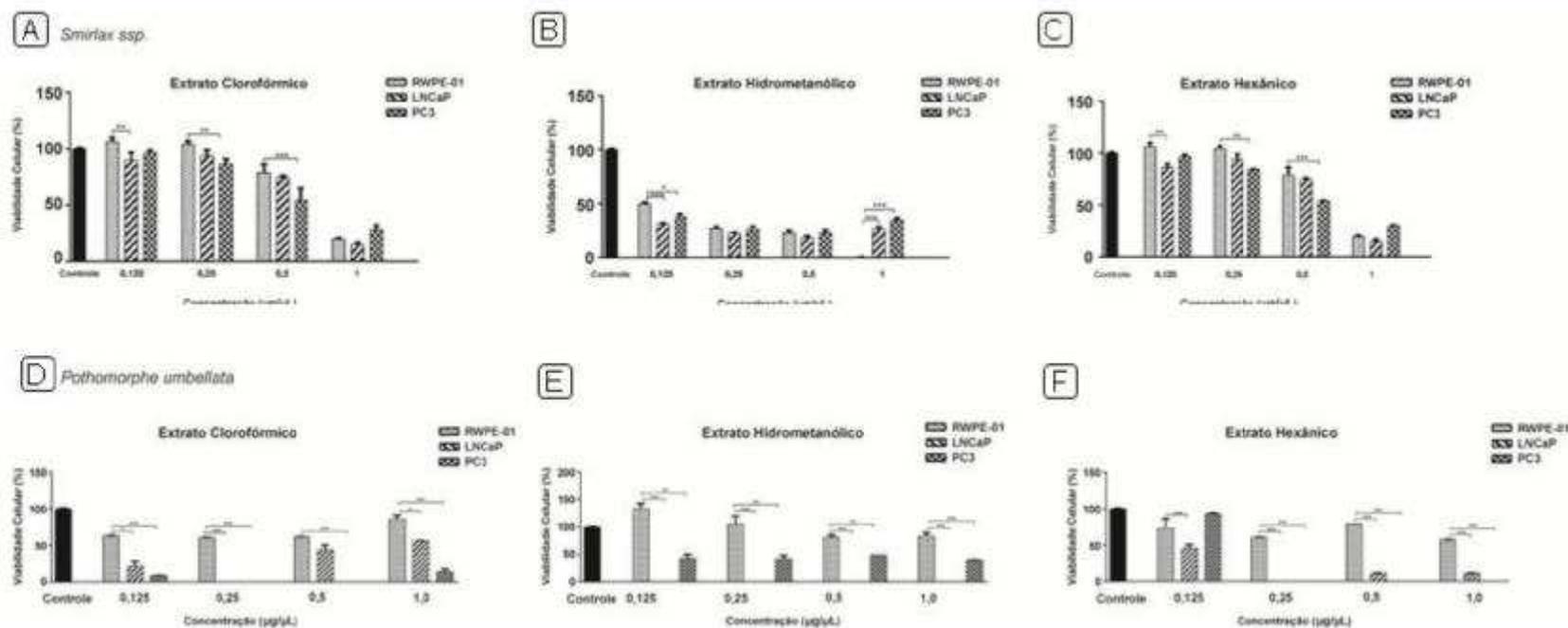
O extrato clorofórmico da *Smilax ssp.* não reduziu em mais de 50% a viabilidade das células tumorais nas três primeiras concentrações (Figura 3A). Quando o tratamento foi realizado com o extrato a 1 µg/µL, este se mostrou citotóxico para as células tumorais, mas também para o controle não neoplásico. Para o hidrometanólico, já na menor concentração, verificou-se uma diminuição em 23% da viabilidade da linhagem RWPE-01. Nas demais observou-se o efeito antitumoral, contudo não seletivo (Figura 3B). O extrato hexânico, por sua vez, apresentou o mesmo comportamento do clorofórmico, com discreta ação antineoplásica e, quando a 1 µg/µL, igualmente citotóxico para as três linhagens (Figura 3C).

Finalmente, os extratos clorofórmico, hidrometanólico e hexânico de *P. umbellata* foram testados e diminuíram expressivamente a viabilidade das linhagens LNCaP e PC3 em todas as concentrações avaliadas, comparando-se à não neoplásica, que se manteve viável (Figura 3D-E-F). Para o ensaio com o extrato clorofórmico, a partir da concentração de 0,25 µg/µL, observou-se a inibição da linhagem modelo para CRPC (Figura 3D). O extrato hidrometanólico se mostrou seletivo e mais citotóxico à linhagem LNCaP. Além disso, também reduziu significativamente a viabilidade das células PC3 em todas as concentrações utilizadas (Figura 3E). As células tumorais, especialmente as PC3 foram mais sensíveis ao extrato hexânico. A partir do tratamento com 0,25 µg/µL dessa fração, a redução da viabilidade das células neoplásicas foi expressiva, e a da RWPE-01 se manteve em torno de 60% (Figura 3F).

Portanto, os extratos obtidos da espécie *P. umbellata*, sobretudo o hexânico, demonstraram especificidade às linhagens tumorais, diminuindo significativamente sua viabilidade, quando comparada às células RWPE-01. Os extratos das demais espécies, apesar de citotóxicos às linhagens LNCaP e PC3, também diminuíram de maneira significativa a viabilidade da linhagem controle, o que evidenciou sua inespecificidade à condição tumoral.

Diante de resultados promissores para a espécie *P. umbellata*, sobretudo sua atividade no controle de células CRPC, o composto foi isolado de sua fração hexânica e, posteriormente, avaliado quanto à sua capacidade de interceptar diferentes mecanismos associados à progressão e agressividade tumorais. Nosso estudo é pioneiro ao descrever o efeito dessa espécie vegetal e de seu produto purificado no tratamento do CaP.

**Figura 3: Viabilidade relativa das células prostáticas RWPE-01, LNCaP e PC3 após tratamento com extratos fracionados das espécies *Smilax ssp.* e *Pothomorphe umbellata*.** Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente e controle negativo. As linhagens celulares foram tratadas com quatro concentrações diferentes dos extratos: 0,125 µg/µL; 0,25 µg/µL; 0,5 µg/µL e 1 µg/µL, por 24 h. Em (A) extrato clorofórmico de *Smilax ssp.*; em (B) extrato hidrometanólico de *Smilax ssp.*, em (C) extrato hexânico de *Smilax ssp.* (D) extrato clorofórmico de *P. umbellata*; em (E) extrato hidrometanólico de *P. umbellata* e em (F) extrato hexânico de *P. umbellata*. Os resultados estão apresentados como Média ± Desvio Padrão de três experimentos independentes para cada tratamento. \*p<0,05; \*\*p<0,001; \*\*\*p<0,001; \*\*\*\*p<0,0001.



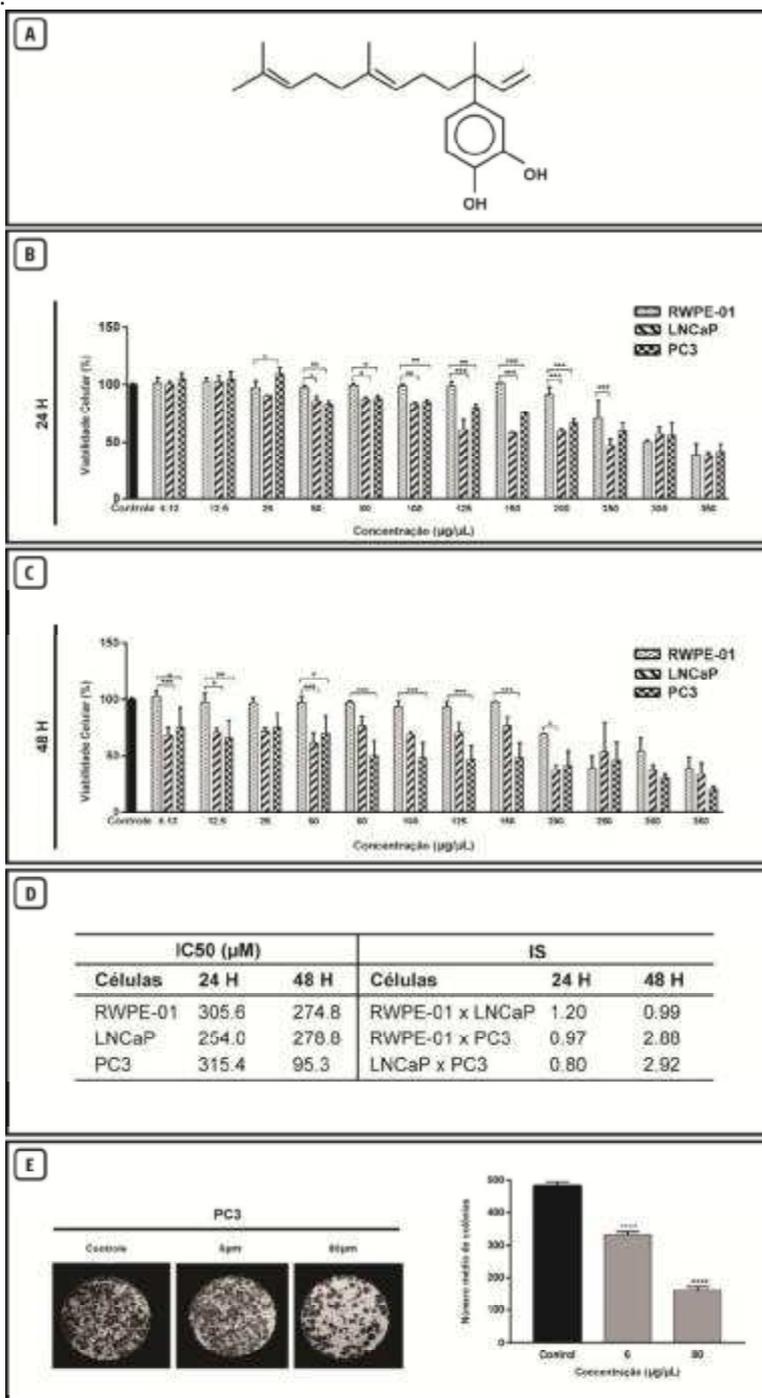
## **4.2. Efeito do 4-NC sobre a viabilidade de células prostáticas**

O composto isolado do extrato hexânico de *P. umbellata* foi o 4-NC, um CF (Figura 4A) cuja atividade no CaP ainda não foi descrita. Primeiramente foi avaliada sua citotoxicidade sobre as linhagens RWPE-01, LNCaP e PC3. Concentrações crescentes do composto foram utilizadas no tratamento das células por 24 (Figura 4B) e 48h (Figura 4C). Observou-se uma inibição dose dependente da viabilidade dos modelos celulares tumorais após o tratamento, enquanto a não tumorigênica permaneceu viável (cerca de 100%) até 150 $\mu$ M de 4-NC em ambos os tempos.

O 4-NC foi altamente citotóxico para a PC3, após 48 horas de tratamento. De 80  $\mu$ M a 150  $\mu$ M, a viabilidade das células CRPC diminuiu significativamente (~49%) em comparação com as células não-tumorigênicas RWPE-01 e às hormônio-responsivas LNCaP. Já que, após 24 horas, a citotoxicidade para a linhagem PC3 foi discreta, a resposta das células CRPC ao 4-NC também se mostrou dependente do tempo, sugerindo a sua capacidade em inibir a proliferação e o importante papel do metabolismo na resposta ao tratamento. De fato, metabólitos podem alterar o efeito biológico a compostos terapêuticos (EDWARDSON *et al.*, 2015) e análises metabolômicas/metabonômicas adicionais são necessárias para melhor caracterizá-los.

Após 48 horas, o valor de IC<sub>50</sub> para LNCaP foi de 278.8  $\mu$ M, superior, inclusive, ao da RWPE-01. Para a PC3 o IC<sub>50</sub> foi 95,33  $\mu$ M e IS > 2,0 (Figura 4D). Sugere-se, portanto, uma maior eficácia do 4-NC no controle de células CRPC. A citotoxicidade à PC3 foi posteriormente validada em ensaio clonogênico (Figura 4E). A formação de colônias diminuiu após 15 dias de tratamento, mesmo na menor concentração (6  $\mu$ M), quando comparada ao controle com diluente (DMSO). Quando utilizada a concentração de 80  $\mu$ M a inibição foi ainda mais expressiva. Para os ensaios posteriores foram definidas cinco concentrações diferentes (6 $\mu$ M, 65 $\mu$ M, 80 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 125 $\mu$ M), incluindo sub-tóxica (6 $\mu$ M), para examinar, *in vitro*, mecanismos oncogênicos adicionais, incluindo proliferação, apoptose e migração.

**Figura 4: Citotoxicidade do 4-nerolidilcatecol (4-NC).** A estrutura molecular do 4-NC encontra-se demonstrada em (A). O efeito do 4-NC sobre a viabilidade celular das linhagens tumorais de próstata LNCaP e PC3, e da linhagem não tumorigênica RWPE-01 foi avaliado por 24 h (B) e 48 h (C). O IC<sub>50</sub> e o índice de seletividade (IS) também foram calculados (D). O ensaio clonogênico (E) foi conduzido na linhagem PC3 com o 4-NC nas concentrações de 6 μM e 80 μM por 48 horas. Foi considerado o número de células por área de cultivo (F). Os resultados são apresentados como média ± DP de três experimentos em triplicata (n=3). Células tratadas com o diluente DMSO foram utilizadas como controle. \* p <0,05; \*\* p <0,01; \*\*\* p <0,001.



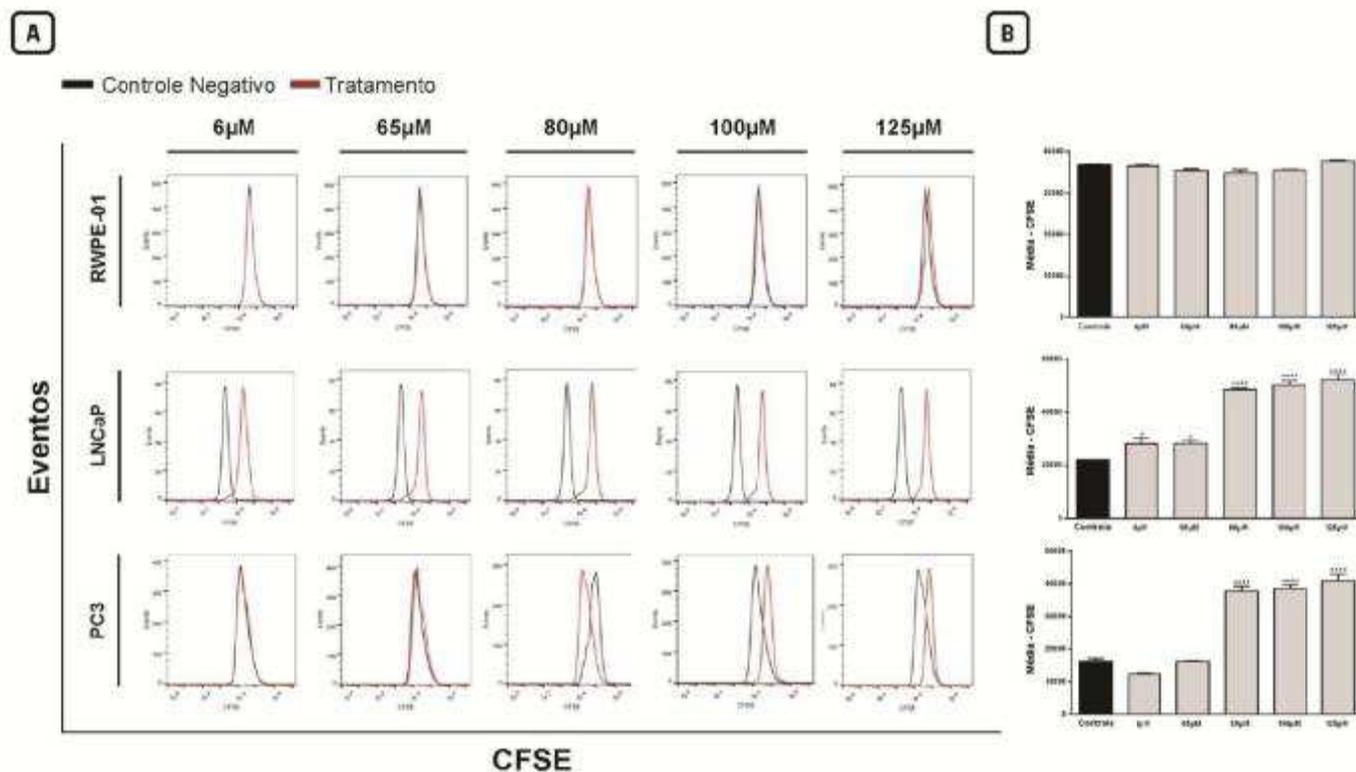
### **4.3 4-NC suprime a proliferação e migração de células PC3**

Primeiro, analisamos o efeito do 4-NC na proliferação celular através da marcação com CFSE por citometria de fluxo (Figura 5A). Os resultados demonstraram que o tratamento com 4-NC, comparado com o controle, não afetou as células RWPE-01 (Figura 5B). Além disso, o composto inibiu a proliferação das células LNCaP em todas as concentrações (Figura 5B). Já o efeito antiproliferativo sobre as células PC3 foi identificado quando estas foram tratadas com o 4-NC a 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 125  $\mu$ M ( $p < 0,01$ ) (Figura 5B).

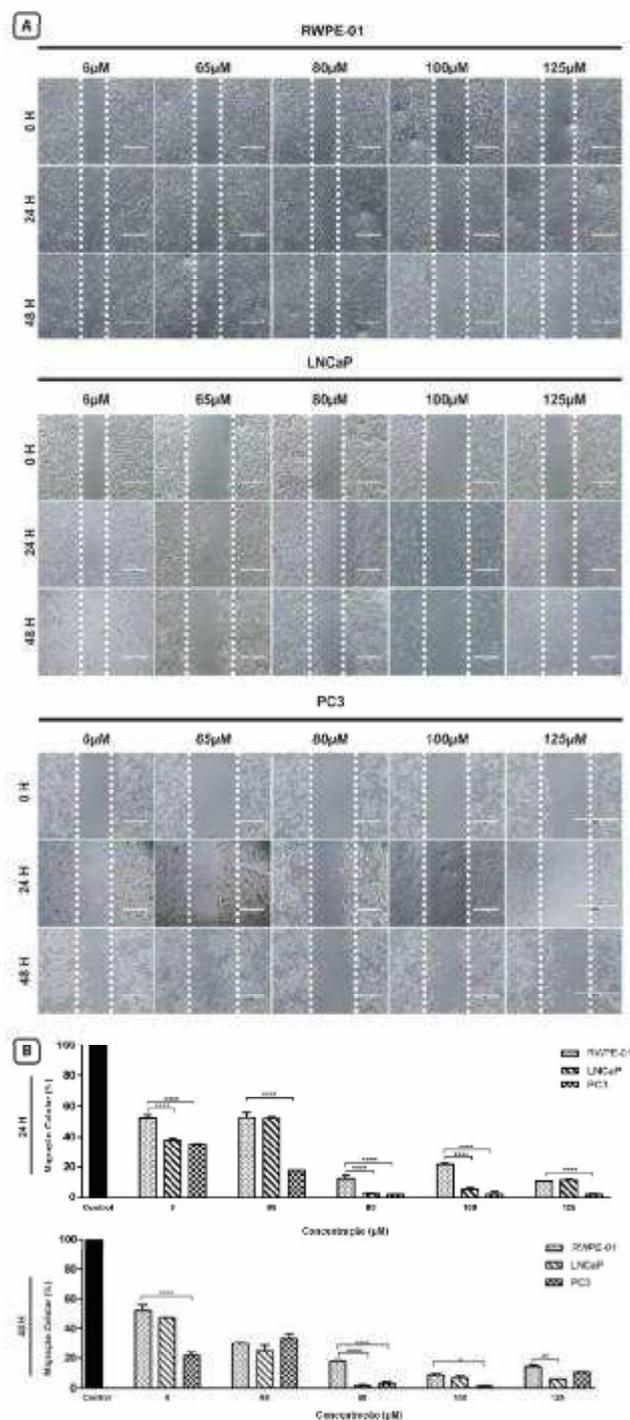
Verificou-se, ainda, se o 4-NC inibe a migração celular por meio do ensaio de *wound healing*. Como mostrado na Figura 6A e 6B, o tratamento por 24h e 48h com 4-NC reduziu a capacidade de migração das linhagens PC3 e LNCaP. Já a 6  $\mu$ M, o composto inibiu em mais de 60% a migração da linhagem PC3, o que se mostrou significativamente diferente da RWPE-01, cuja capacidade migratória foi mantida. Nas concentrações maiores, o perfil se manteve e, apesar de também inibir a migração das células não tumorigênicas, o efeito do 4-NC se mostrou mais expressivo nas linhagens tumorais.

Como as células CRPC são propensas a metastatizar, nossos resultados demonstram que, além de se mostrar mais citotóxico à PC3, o 4-NC é capaz de inibir a proliferação e migração dessas células, em uma evidência adicional da possível utilização desse composto no tratamento de CaP avançado. Por fim, ensaios funcionais acerca da indução de morte celular programada também foram conduzidos e se apresentaram igualmente promissores.

**Figura 5: Análise da proliferação das células prostática RWPE-01, LNCaP e PC3 após tratamento com 4-nerolidilcatecol durante 48 h.** (A) O ensaio foi conduzido em citômetro de fluxo com o 4-NC a 6  $\mu$ M, 65  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 125  $\mu$ M. O tratamento (pico vermelho) foi comparado ao controle com DMSO (pico preto) usando marcação com CFSE. (B) O gráfico mostra a média de fluorescência e a análise estatística de três experimentos independentes em triplicata (n=3). Os dados são expressos como média  $\pm$  DP \* p <0,05; \*\*\* p <0,001.



**Figura 6: Inibição da migração das linhagens celulares prostáticas RWPE-01, LNCaP e PC3.** (A) Imagens representativas das células tratadas com 4-NC (6  $\mu$ M, 65  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 125  $\mu$ M) a 0 h e após 24 h e 48h. As células foram plaqueadas, riscadas com ponteiros de pipeta e fotografadas por microscopia de contraste de fase com aumento de 10x. (B) As comparações acerca da migração celular foram realizadas entre as linhagens celulares e estão apresentadas como médias  $\pm$  DP para três experimentos independentes em triplicata (n=3). \* p <0,05; \*\*\* p <0,001.

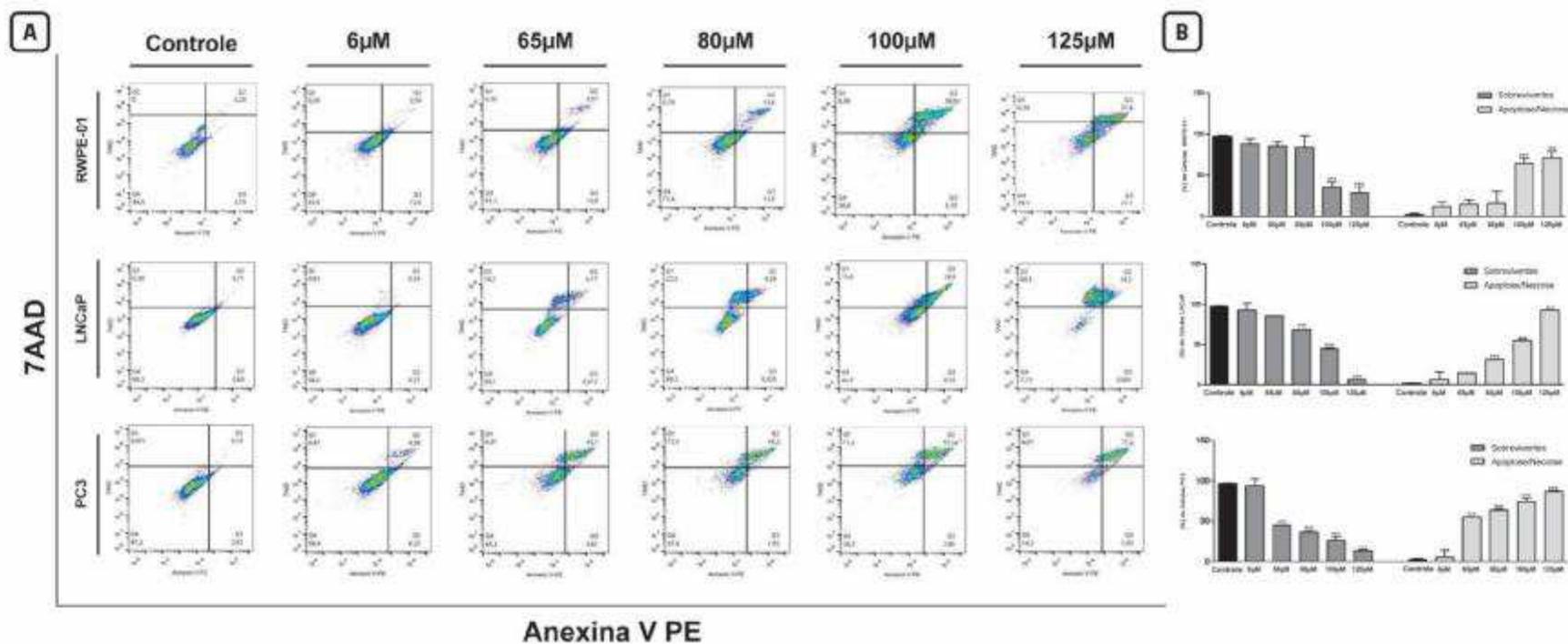


#### **4.4 4-NC induz apoptose e altera PMM de células CRPC**

Como o 4-NC induz a morte de células de melanoma (BROHEM, C.A. *et al.*, 2009; BROHEM, CARLA A. *et al.*, 2012), também foi explorado esse efeito sobre as células de CaP. Os padrões de Anexina V/7AAD foram analisados por citometria de fluxo (Figura 7) e os resultados registrados após 48 horas de tratamento. Como esperado, a resposta foi dose-dependente e o perfil apoptótico divergiu entre as linhagens prostáticas (Figura 7A). Em mais um ensaio funcional, o efeito do 4-NC foi mais seletivo às células tumorais.

Em relação à apoptose tardia, o 4-NC não induziu à morte de nenhuma das linhagens em concentração sub-tóxica (6 $\mu$ M). Contudo, a 65 $\mu$ M, o composto reduziu significativamente a viabilidade da linhagem celular PC3 (Figura 7B), não afetando as demais. A 80 $\mu$ M, as células RWPE-01 apresentaram uma porcentagem de viabilidade de 73,8% (Anexina V/7-AAD), não diferindo do controle com diluente (DMSO). Considerando as células malignas, e comparando-se com o controle, a viabilidade das células PC3 foi de 37,8% ( $p < 0,001$ ) e das LNCaP 68,2% ( $p < 0,001$ ) após tratamento com 4-NC a 80 $\mu$ M. A partir de 100 $\mu$ M, a porcentagem de células RWPE-01 apoptóticas aumentou e diferiu do controle.

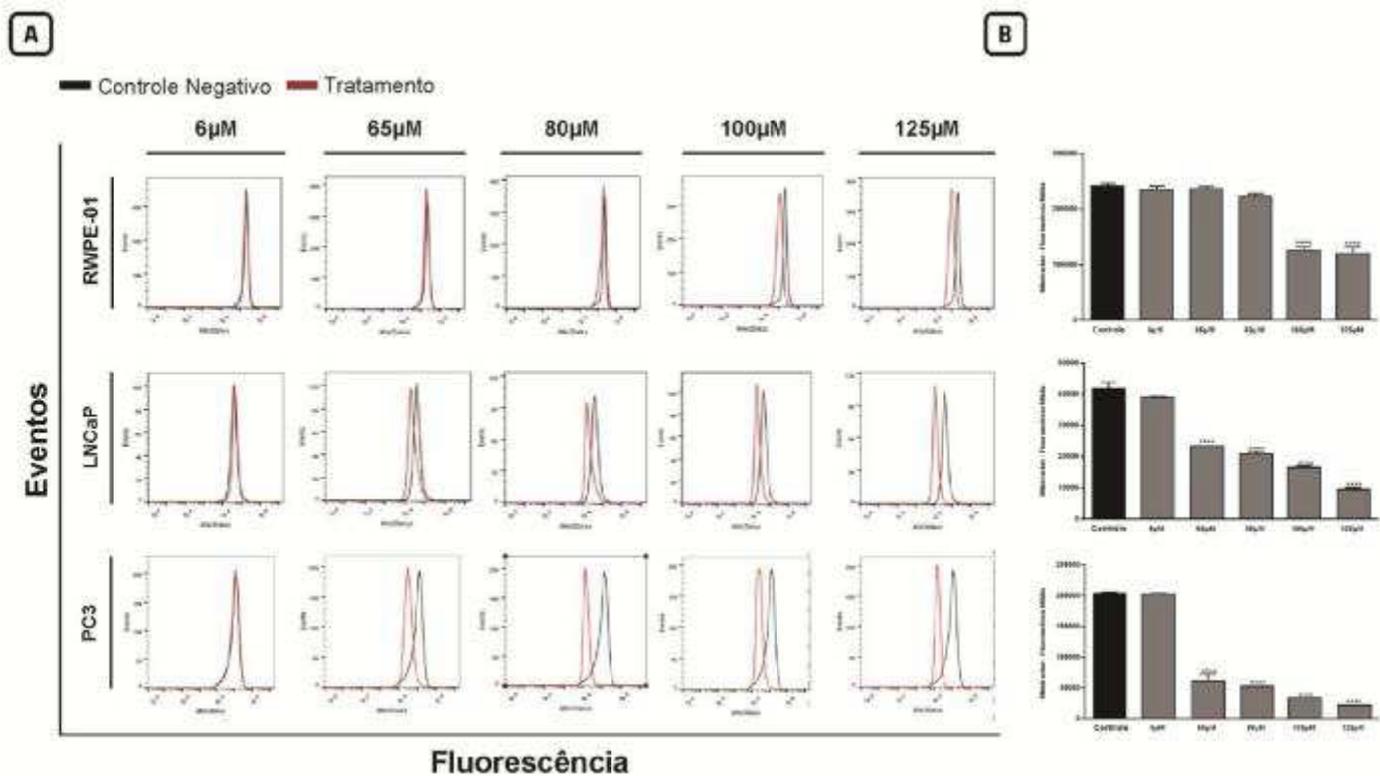
**Figura 7: Indução de apoptose mediada pelo 4-nerolidilcatecol (4-NC) sobre as células prostáticas RWPE-01, LNCaP e PC3.** (A) A análise de citometria de fluxo foi realizada após 48 horas de tratamento com 4-NC a 6  $\mu\text{M}$ , 65  $\mu\text{M}$ , 80  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  e 125  $\mu\text{M}$ . Figuras representativas mostram a marcação com Anexina V e 7-AAD. (B) 4-NC seletivamente induziu a morte da linhagem celular PC3 a 65  $\mu\text{M}$ . Os dados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata (n=3). \* p <0,05; \*\*\* p <0,001.



A apoptose também é induzida pela via mitocondrial (FU *et al.*, 2018). Este mecanismo intrínseco foi mensurado, no presente estudo, pela alteração no PMM. A perda de PMM foi avaliada pela diminuição da fluorescência detectada por citometria de fluxo após 48 horas de tratamento (Figura 8).

Os resultados sugeriram que as células de CaP (LNCaP e PC3) tratadas com 4-NC tiveram seu PMM comprometido (comparado ao controle), exceto em concentrações sub-tóxicas (6 $\mu$ M) de 4-NC (Figura 8A). O efeito foi mais proeminente foi verificado para as células PC3, a partir de 65 $\mu$ M de 4-NC (Figura 8B). A redução da fluorescência foi detectada nas células RWPE-01 apenas quando tratadas com 100 $\mu$ M e 125 $\mu$ M do composto. Nós confirmamos, por dois ensaios independentes, que o 4-NC alterou os mecanismos celulares envolvidos diretamente com a tumorigênese, especialmente com a apoptose, promovendo a morte de células CRPC.

**Figura 8: Potencial de membrana mitocondrial (PMM) das células RWPE-01, LNCaP e PC3 tratadas com 4-nerolidilcatecol (4-NC).** (A) O PMM interna ( $\Delta\psi_m$ ) foi avaliado por citometria de fluxo após tratamento com 4-NC (6  $\mu$ M, 65  $\mu$ M, 80  $\mu$ M, 100  $\mu$ M e 125  $\mu$ M) por 48h. O tratamento (pico vermelho) foi comparado ao controle (pico preto). (B) O gráfico mostra a análise de três experimentos independentes em triplicata (n=3) expressos como média  $\pm$  DP. O 4-NC reduziu significativamente o PMM das células PC3. \* p < 0,05; \*\*\* p < 0,001.

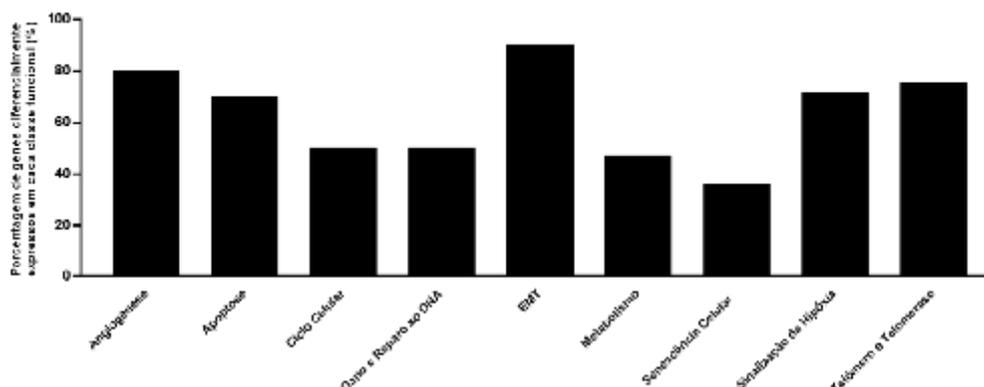


#### 4.5 Modulação da expressão gênica mediada por 4-NC em células PC3

Considerando nossa hipótese de que o 4-NC pode alterar o perfil transcricional das células CRPC (PC3), investigamos quais genes foram modulados após o tratamento usando o *Cancer Pathway Finder Array* (Qiagen). Diferentes biomarcadores foram avaliadas após o tratamento de células PC3 com 80 $\mu$ M de 4-NC por 48 horas. Células não tratadas foram usadas como controle. Consideramos os genes que foram regulados 2,0 vezes positivamente ou negativamente nas células tratadas em comparação com o controle (Figura 9).

Dentre os 84 genes, relacionados a diferentes vias, 55 (65%) apresentaram um perfil de expressão alterado, destacando a complexidade da resposta celular ao tratamento. Os padrões de transcrição indicaram o potencial do 4-NC em modular várias capacidades tumorais relacionadas à progressão tumoral e angiogênese, além de apoptose, ciclo celular e metabolismo (BROHEM, C.A. *et al.*, 2009; BROHEM, CARLA A. *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2018). De fato, 80% dos genes relacionados à angiogênese foram *up* ou *down* regulados. Já para o mecanismo de transição epitélio-mesenquimal 90% dos alvos quantificados mudaram seu perfil de expressão após o tratamento. Nossos resultados abrem novos caminhos para melhor compreender os efeitos do 4-NC em células CRPC.

**Figura 9: Genes diferencialmente expressos em resposta ao 4-nerolidilcatecol (4-NC) em células PC3 de câncer da próstata resistentes a castração (CRPC) em comparação com células não tratadas.** A porcentagem de genes diferencialmente expressos em cada biomarcador foram regulados pelo menos 2,0 vezes positivamente ou negativamente após o tratamento com 80 $\mu$ M de 4-NC. EMT: Transição Epitélio-mesenquimal.



## 5 DISCUSSÃO

Os PNs têm sido uma das grandes fontes de novos compostos biologicamente ativos (BUENZ; VERPOORTE; BAUER, 2018). Estima-se que cerca de metade dos agentes farmacológicos modernos são de origem natural (CHEUKA *et al.*, 2016). De fato, a diversidade estrutural de seus princípios ativos ampliam a aplicação clínica desses fitoquímicos, transpondo a heterogeneidade de doenças complexas como o câncer (BUENZ; VERPOORTE; BAUER, 2018), além de mitigar os efeitos adversos do tratamento convencional ou mesmo oferecer benefícios à saúde e maior eficácia e seletividade; superando drogas rotineiramente utilizadas (MITRA; DASH, 2018).

Contudo, ainda permanece crítica a validação de espécies potencialmente promissoras (MCCHESENEY; VENKATARAMAN; HENRI, 2007). Nesse cenário, avanços biotecnológicos têm permitido a evolução dos bioensaios, ampliando a capacidade em se caracterizar estruturas puras e obter seus compostos majoritários (BUENZ; VERPOORTE; BAUER, 2018; DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015). Muitos PNs já transpuseram a pesquisa básica e foram ou ainda são utilizados como quimioterápicos (CRAGG; NEWMAN, 2013; CRAGG; PEZZUTO, 2016). A versatilidade de suas estruturas moleculares tem se apresentado como base para a síntese de diferentes medicamentos (FEITELSON *et al.*, 2015; HASANPOURGHADI; PANDURANGAN; MUSTAFA, 2018), otimizando suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas (BUENZ; VERPOORTE; BAUER, 2018; BALUNAS; KINGHORN, 2005). Os metabólitos pioneiros vincristina e vimblastina são alcaloides extraídos da espécie *Catharanthus roseus*, a partir dos quais foram desenvolvidos análogos semi-sintéticos para sua maior eficácia e estabilidade contra linfoma e câncer de ovário. O taxol, obtido da espécie *Taxus brevifolia*, é um dos mais recentemente utilizados no tratamento oncológico. Seus derivados incluem o paclitaxel para o tratamento de câncer de pulmão, mama e ovário e o docetaxel, um análogo semi-sintético, amplamente prescrito em casos de CaP, câncer de mama sarcoma e Kaposi (NEWMAN, D. J. AND CRAGG, 2012). PNs, portanto, são a fonte primária e clinicamente efetiva para a busca de novas drogas e estruturas com mecanismos únicos de ação para o tratamento de neoplasias (NEWMAN, D. J. AND CRAGG, 2012), superando, sobretudo, o quadro de resistência aos quimioterápicos (FEITELSON *et al.*, 2015).

O cerrado brasileiro merece especial atenção na bioprospecção de PNs, devido à sua biodiversidade e conseqüente rica composição fitoquímica (CARDOZO *et al.*, 2018; RIBEIRO, D. A. *et al.*, 2014). O estresse hídrico e os ataques de inimigos naturais culminam com a produção de moléculas bioativas para a manutenção da homeostase da planta (BAILÃO *et al.*, 2015). Estas incluem CFs, os quais apresentam atividade antioxidante, antiinflamatória e antitumoral já descritas (BAILÃO *et al.*, 2015; CARDOZO *et al.*, 2018; DE QUEIROZ *et al.*, 2015; MIMICA-DUKIC *et al.*, 2008; SIQUEIRA *et al.*, 2012). No presente estudo, dez espécies encontradas no cerrado brasileiro foram coletadas e suas amostras fracionadas com diferentes solventes orgânicos. As plantas avaliadas foram de diversas famílias evidenciando múltiplas potencialidades na seleção dessas moléculas bioativas. Além disso, diferentes solventes extratores, com polaridades distintas, foram utilizados na busca por uma maior variedade de metabólitos secundários. De fato, a atividade antitumoral de metabólitos secundários naturais já foi descrita para o CaP (BALUNAS; KINGHORN, 2005; BROHEM, CARLA A. *et al.*, 2012; CHOI; LIM; HONG, 2010; CRAGG; NEWMAN, 2013; CRAGG; PEZZUTO, 2016; IMRAN *et al.*, 2019).

Portanto, em nosso *screening* inicial, foi possível mensurar a citotoxicidade de diferentes compostos, permitindo, ao final, a seleção de uma espécie particularmente promissora e que apresentou um composto capaz de suprimir mecanismos oncogênicos. Nosso estudo realizou a investigação inédita da citotoxicidade de extratos de *P. umbellata* em três linhagens de células prostáticas e análises mecanísticas mediadas por seu composto, o 4-NC, no CaP.

Extratos de *P. umbellata* foram avaliados previamente e sua citotoxicidade descrita para linhagens de câncer de mama, ovário, melanoma, leucemia, pulmão, útero e rins, (DA SILVA *et al.*, 2009; SACOMAN *et al.*, 2008). No presente trabalho, das três frações testadas (clorofórmica, hidrometanólica e hexânica), a hexânica se mostrou mais efetiva, agindo seletivamente sobre as linhagens tumorais CRPC. O 4-NC, um CF purificado desta extrato, foi primeiramente isolado por Kijjoa e colaboradores em 1980 (KIJJOA, A. *et al.*, 1980). Os CFs abrangem um vasto espectro de metabólitos majoritários e muitos estão associados ao bloqueio da proliferação de células tumorais (FEITELSON *et al.*, 2015). Estudos já comprovaram o potencial quimiopreventivo e quimioterápico dessas moléculas, sobretudo, contra o CaP (FEITELSON *et al.*, 2015; ATANASOV *et al.*, 2015). O potencial citotóxico, antiproliferativo e apoptótico da curcumina contra linhagens LNCaP, PC3 e DU-145,

com ação mais efetiva contra as PC3 já foi descrito. A curcumina atuou na supressão de oncogenes, de genes anti-apoptóticos e na cascata envolvendo a EMT (CHOI; LIM; HONG, 2010; JORDAN *et al.*, 2016). Chendil e colaboradores também demonstraram que a curcumina radiosensibiliza células PC3 (CHENDIL *et al.*, 2004). Em CRPC, Imran e colaboradores comprovaram que a luteolina e a quercetina modulam a EMT e angiogênese (IMRAN *et al.*, 2019). No CaP o resveratrol atua como potente inibidor do ciclo celular e indutor da apoptose (FEITELSON *et al.*, 2015). A quercetina é outro exemplo bem sucedido de CF, com potencial antiangiogênico, antiproliferativo, antioxidante e antiinflamatório (YANG *et al.*, 2016).

Quanto ao 4-NC, sua ação antioxidante já foi demonstrada, apresentando atividades antimalárica, inseticida e inibitória de miotoxinas (NÚÑEZ *et al.*, 2005; PAULIQUEVIS *et al.*, 2015; SACOMAN *et al.*, 2008; SPONCHIADO *et al.*, 2014). Em melanoma, uma neoplasia agressiva e pouco responsiva às terapias convencionais, esse composto induziu a apoptose, a parada do ciclo celular em G1 e inibiu a invasão das células transformadas (BROHEM, C.A. *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2018). Congruentemente, em nosso estudo, o 4-NC mediou um efeito citotóxico, antiproliferativo e pró-apoptótico em células CRPC (PC3); ainda não descritos na literatura. O CaP é uma doença heterogênea em termos de grau, ploidia, padrões moleculares, expressão de oncogenes/supressores tumorais e características hormonais (HOANG *et al.*, 2017; NWOSU *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2018). Tumores CRPC evidenciam os desafios inerentes ao tratamento do CaP, ao refratarem à terapia de privação hormonal, mantendo a sinalização androgênica constantemente ativada (RYCAJ *et al.*, 2016). Para esses pacientes as alternativas de contenção da progressão tumoral são incipientes, o que justifica sua sobrevida média de 14 a 16 meses (NAKAZAWA; PALLER; KYPRIANOU, 2017). Novos compostos derivados de PNs têm demonstrado notável eficácia contra tumores não responsivos à terapia convencional, evidenciando a potencialidade desses agentes no desenho de protocolos terapêuticos personalizados (TRENDOWSKI, 2015). De fato, CFs como quercetina, curcumina e luteolina, têm se apresentado capazes de conter a promoção e progressão do CaP (FEITELSON *et al.*, 2015; IMRAN *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2016). Em nosso estudo também sugerimos o 4-NC como promissor.

Os resultados aqui apresentados demonstraram a capacidade do 4-NC em reduzir a viabilidade das células neoplásicas (PC3 e LNCaP) de forma significativa, especialmente após 48h de tratamento. Nesse contexto, nossos dados evidenciam que

o 4-NC é igualmente efetivo no CaP. Seu efeito foi mais expressivo sobre a linhagem mais agressiva (PC3) com um IC<sub>50</sub> de 95,5 µM e IS>2,0 quando comparada à RWPE-01. Ademais, o composto também apresentou ação antiproliferativa reduzindo a formação de colônias das células CRPC. A proliferação do CaP é inicialmente dependente de andrógenos, sendo contida com o bloqueio hormonal. Em pacientes refratários, há uma reprogramação molecular, com a amplificação de receptores, presença de mutações, ocorrência de *splicing* alternativos e a superexpressão de oncogenes que sinalizam para a proliferação contínua (ASANGANI *et al.*, 2014). A inibição da proliferação também foi avaliada por análise citométrica com a marcação por CFSE. Além disso, o ensaio de *wound healing* mensurou a capacidade migratória das células. Em ambos experimentos, o 4-NC se mostrou efetivo sobre a linhagem CRPC.

Em termos simples, a progressão do câncer resulta do desbalanço entre a proliferação e morte celulares (KYPRIANOU, 2012). Células tumorais dependentes de andrógeno são sensíveis aos mecanismos apoptóticos. As CRPC evadem à essa sinalização, em decorrência de um funcionamento molecular alterado, bloqueando a expressão de genes envolvidos na prevenção da morte celular em condições de privação androgênica e superexpressando marcadores anti-apoptóticos (DENMEADE; LIN; ISAACS, 1996; NAKAZAWA; PALLER; KYPRIANOU, 2017). Além disso, a eficácia de um composto antineoplásico depende de sua capacidade em intervir em diferentes marcas malignas, inibindo a proliferação e induzindo a apoptose.

No presente estudo, a morte celular foi mensurada pela externalização do receptor fosfatidilserina, o qual sinalizada para os eventos apoptóticos iniciais (ELMORE, 2007). Já a integridade da membrana foi avaliada pela marcação com 7AAD, o qual intercala ao DNA de células lisadas. Os dados apresentados evidenciam a indução de apoptose tardia após tratamento das células CRPC com 4-NC a partir de 65µM. O 4-NC também apresentou esse efeito em células leucêmicas e de melanoma (BROHEM, C.A. *et al.*, 2009; BROHEM, CARLA A. *et al.*, 2012) (BENFICA *et al.*, 2017a). Além de demonstrar ação quimioprotetora à genotoxicidade induzida pelo quimioterápico ciclofosfamida (VALADARES *et al.*, 2007).

O ensaio de funcionalidade mitocondrial reforçou o papel do 4-NC sobre a viabilidade de células PC3. A mitocôndria exerce um papel chave na sobrevivência e morte celulares. A perda da integridade de sua membrana e a consequente liberação do citocromo c para o citoplasma são eventos associados ao mecanismo intrínseco da

apoptose (BROHEM, CARLA A. *et al.*, 2012; MAJNO; JORIS, 1995) e este foi ativado em células CRPC após tratamento com o 4-NC. A partir de 65µM observou-se uma intensa despolarização da membrana mitocondrial corroborando o papel desse CF no controle do CaP avançado.

De fato, o estudo mecanístico, sobretudo em modelos celulares de CRPC é necessário devido ao quadro de quimiorresistência apresentado pelos pacientes. A atividade inibitória do 4-NC frente ao CRPC é, portanto, inédita e nosso estudo representa um passo crucial na validação de novas estratégias para seu tratamento, seja isoladamente ou associada a outros medicamentos. Sugerimos, portanto, a avaliação do sinergismo do 4-NC com outros medicamentos, uma vez que diferentes compostos podem atuar em mecanismos oncogênicos distintos, combatendo, assim, múltiplas marcas tumorais; superando a resistência terapêutica (BALUNAS; KINGHORN, 2005; CRAGG; NEWMAN, 2013; FEITELSON *et al.*, 2015).

Interessante salientar que o efeito citotóxico após tratamento com 4-NC foi inferior ao observado para o extrato hexânico. Lopes e colaboradores (2013) também relataram esse comportamento, ao comparar o extrato etanólico de *P. umbellata* com o 4-NC (LOPES *et al.*, 2013). Amostras vegetais são heterogêneas e o sinergismo de seus constituintes pode exacerbar suas atividades. Além disso, os produtos purificados carecem de modificações que aumentam sua estabilidade. O 4-NC é uma molécula fotossensível e passível de rápida oxidação (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015; KHAN, 2018; LOPES *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2018). Contudo, é evidente a ação do 4-NC em células CRPC, tornando necessário avaliar seu sinergismo com outros compostos e promover modificações químicas ou nanoformulações que contribuam para sua atividade antitumoral. Conhecer seus mecanismos também se mostra relevante, para assim definir as melhores estratégias de tratamento.

Estudos têm evidenciado que a atividade antitumoral de PNs encontra-se associada à capacidade dessas moléculas em modular diferentes vias oncogênicas (MITRA; DASH, 2018; ZHENG *et al.*, 2016; ZHOU, Y. *et al.*, 2016). Portanto, após comprovação por meio das análises funcionais da capacidade do 4-NC em reduzir a agressividade das linhagens neoplásicas prostáticas, investigamos seu mecanismo de ação em células PC3. A análise de um *array* com 84 alvos permitiu a visualização de genes diferencialmente expressos em células CRPC tratadas com o 4-NC. Os resultados obtidos comprovaram e respaldaram os ensaios funcionais com a alteração de 70% dos genes relacionados com a cascata apoptótica. Nossos dados confirmaram

os já previamente apresentados, em que o 4-NC demonstrou ação pró-apoptótica em linhagens quimioresistentes de melanoma, regulando positivamente o gene BCL2L11, o qual codifica uma proteína denominada BIM, descrita como importante mediadora da indução de morte celular (HUANG; FU, 2015; SOH *et al.*, 2017). Além disso, estudos prévios também descreveram a capacidade do 4-NC de induzir p53, promover o estresse do retículo endoplasmático (RE), ativando, assim, a via intrínseca de morte celular (OLIVEIRA *et al.*, 2018). Genes relacionados ao ciclo celular também se mostraram diferencialmente expressos. A divisão celular é um evento amplamente regulado por quinases e ciclinas (LAPENNA; GIORDANO, 2009). Estudos prévios realizados em linhagens leucêmicas tratadas com o 4-NC forneceram indícios de que a sua interferência no ciclo celular envolve a inibição da ciclina D1, resultando na parada do ciclo celular e indução apoptótica (BENFICA *et al.*, 2017b; CORTEZ *et al.*, 2015).

Interessantemente, o 4-NC alterou, de forma intrigante, a expressão de genes relacionados à EMT e angiogênese. EMT é um processo fenotípico crítico que confere capacidade migratória e invasiva às células tumorais. No CaP, esse fenômeno é mediado por andrógeno, cujo eixo de regulação encontra-se continuamente ativo em CRPC (NAKAZAWA; PALLER; KYPRIANOU, 2017). Neste há um preocupante quadro de comprometimento ósseo e resistência à apoptose (HUANG; FU, 2015; WANG *et al.*, 2018), além da redução da expressão de E-caderina e superexpressão de N-caderina, Vimentina, Metaloproteinases da matriz (MMP) e Fibronectina (JEON; LEE, 2017). Estudos prévios comprovaram a redução da expressão de MMP após tratamento de células de melanoma com o 4-NC (BROHEM, C.A. *et al.*, 2009; BROHEM, CARLA A. *et al.*, 2012). Nossos dados evidenciam a importância de se investigar a ação desse composto sobre a EMT no CaP, sobretudo em CRPC, uma vez que a dinâmica do microambiente desses tumores encontra-se alterada afetando células imunes e endoteliais (NOURI *et al.*, 2014).

Em nosso *array* o 4-NC também modulou genes associados à angiogênese, a qual encontra-se intimamente associada à cascata metastática (NISHIDA *et al.*, 2006). A angiogênese é responsável pela neovascularização, sob estímulo do Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) secretado pelas células tumorais (NISHIDA *et al.*, 2006; RANKIN; NAM; GIACCIA, 2016; VIALARD; LARRIVÉE, 2017). Nesse contexto, o 4-NC poderia ser associado ao docetaxel, pois sua ação antiangiogênica conduziria a uma maior absorção do quimioterápico, em um efeito sinérgico que necessita ser avaliado.

Por fim, a hipóxia é também uma característica importante para a promoção da metástase, ao regular a EMT e a angiogênese, reprogramando o metabolismo celular (RANKIN; NAM; GIACCIA, 2016). O desequilíbrio na distribuição do oxigênio se dá pela vascularização anormal (KARSY *et al.*, 2016; RANKIN; NAM; GIACCIA, 2016), em um microambiente que conduz à letalidade da doença. A capacidade do 4-NC em interferir nessas três vias convergentes suportam sua importância para o tratamento do CRPC. Assim, o presente trabalho apresenta, de forma inédita, o 4-NC como uma possível estratégia terapêutica a ser explorada no CaP, tendo em vista sua seletividade e especificidade sobre as linhagens tumorais, em especial sobre a mais agressiva, PC3, sendo capaz de modular vias de sinalização chave em CRPC.

## 5 CONCLUSÃO

O presente estudo se baseou na premissa de que PNs são essenciais para a bioprospecção de compostos biologicamente ativos. Nossos resultados apresentaram extratos de uma espécie encontrada no cerrado brasileiro, *P. umbellata*, seletivamente citotóxico à linhagem CRPC (PC3). De sua fração hexânica foi purificado o 4-NC, um CF que demonstrou atividades citotóxica, anti-proliferativa e pró-apoptótica sobre as células PC3. Quanto as vias moduladas nesta linhagem, após tratamento, houve redução na expressão de genes associados à EMT, angiogênese e hipóxia. Nossos resultados sugerem o 4-NC como potencial agente antitumoral para CRPC. Estudos adicionais para a investigação da ação molecular desse composto são necessários, além de ensaios pré-clínicos em modelos animais para sua validação farmacológica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGATI, G. *et al.* Functional roles of flavonoids in photoprotection: New evidence, lessons from the past. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 72, p. 35–45, nov. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583204>>. Acesso em: 14 jun. 2019.
- ANDRADE, A. F. *et al.* *In vitro* cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity assessment of *Solanum lycocarpum* hydroalcoholic extract. *Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 11, p. 2786–2790, 9 nov. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880209.2016.1175022>>. Acesso em: 2 abr. 2019.
- ARO, A. A. *et al.* Arrabidaea chica extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the Achilles tendon. *Injury*, v. 44, n. 7, p. 884–892, 1 jul. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002013831200366X>>. Acesso em: 11 abr. 2019.
- ASANGANI, I. A. *et al.* Therapeutic targeting of BET bromodomain proteins in castration-resistant prostate cancer. *Nature*, v. 510, n. 7504, p. 278–82, 12 jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24759320>>. Acesso em: 2 jun. 2019.
- ATANASOV, A. G. *et al.* Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances*, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.08.001>>.
- BAILÃO, E. F. L. C. *et al.* Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 10, p. 23760–83, 9 out. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26473827>>. Acesso em: 1 jun. 2019.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, n. 5, p. 431–441, 2005.
- BARBASTEFANO, V. *et al.* Vernonia polyanthes as a new source of antiulcer drugs. *Fitoterapia*, v. 78, n. 7–8, p. 545–551, 1 dez. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X0700189X>>. Acesso em: 3 abr. 2019.
- BASSANI, V. L. *et al.* Semi-preparative isolation and purification of phenolic compounds from *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. by high-performance counter-current chromatography. *Phytochemical Analysis*, v. 30, n. 2, p. 182–192, 2018.
- BASTOS, V. A. F. *et al.* 3D Cell-SELEX: Development of RNA aptamers as molecular probes for PC-3 tumor cell line. *Experimental Cell Research*, v. 341, n. 2, p. 147–156, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.01.015>>.
- BEHRENS, M. D.; TELLIS, C. J. M.; CHAGAS, M. DO S. Arrabidaea chica (Humb. & Bonpl.) B. Verlot (Bignoniaceae). *Revista Fitos*, v. 7, n. 4, p. 236–244, 2012.

BENFICA, P. L. *et al.* 4-Nerolidylcatechol: apoptosis by mitochondrial mechanisms with reduction in cyclin D1 at G0/G1 stage of the chronic myelogenous K562 cell line. *Pharmaceutical biology*, v. 55, n. 1, p. 1899–1908, dez. 2017a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28644062>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

BENFICA, P. L. *et al.* 4-Nerolidylcatechol: apoptosis by mitochondrial mechanisms with reduction in cyclin D1 at G0/G1 stage of the chronic myelogenous K562 cell line. *Pharmaceutical Biology*, v. 55, n. 1, p. 1899–1908, 23 jan. 2017b. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13880209.2017.1311351>>. Acesso em: 19 abr. 2019.

BROHEM, C. A. *et al.* Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. *Toxicology in Vitro*, v. 23, n. 1, p. 111–119, 1 fev. 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233308002749>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

BROHEM, C. A. *et al.* Proteasome inhibition and ROS generation by 4-nerolidylcatechol induces melanoma cell death. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 25, n. 3, p. 354–369, 1 maio 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-148X.2012.00992.x>>. Acesso em: 19 abr. 2019.

BUENZ, E. J.; VERPOORTE, R.; BAUER, B. A. The Ethnopharmacologic Contribution to Bioprospecting Natural Products. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 58, n. 1, p. 509–530, 6 jan. 2018. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-pharmtox-010617-052703>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

CARINI, J. P.; KLAMT, F.; BASSANI, V. L. Flavonoids from *Achyrocline satureioides*: Promising biomolecules for anticancer therapy. *RSC Advances*, v. 4, n. 7, p. 3131–3144, 2014.

CHAN, S. C.; LI, Y.; DEHM, S. M. Androgen Receptor Splice Variants Activate Androgen Receptor Target Genes and Support Aberrant Prostate Cancer Cell Growth Independent of Canonical Androgen Receptor Nuclear Localization Signal. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 23, p. 19736–19749, 1 jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22532567>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

CHANDRASEKAR, T. *et al.* Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Translational Andrology and Urology*, v. 4, n. 3, p. 365, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26814148>>. Acesso em: 26 maio 2019.

CHEN, Y. *et al.* Genetic association analysis of the RTK/ERK pathway with aggressive prostate cancer highlights the potential role of CCND2 in disease progression. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 1–14, 2017.

CHENDIL, D. *et al.* Curcumin confers radiosensitizing effect in prostate cancer cell line PC-3. *Oncogene*, v. 23, n. 8, p. 1599–1607, 26 fev. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14985701>>. Acesso em: 6 jun. 2019.

CHEUKA, P. M. *et al.* The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 22, n. 1, 31 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28042865>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

CHOI, H. Y.; LIM, J. E.; HONG, J. H. Curcumin interrupts the interaction between the androgen receptor and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in LNCaP prostate cancer cells. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, v. 13, n. 4, p. 343–349, 3 dez. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/pcan201026>>. Acesso em: 6 jun. 2019.

CORTÉS-ROJAS, D. F. *et al.* Bioactive compounds in *Bidens pilosa* L. populations: A key step in the standardization of phytopharmaceutical preparations. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 23, n. 1, p. 28–35, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000100>>.

CORTEZ, A. P. *et al.* 4-Nerolidylcatechol analogues as promising anticancer agents. *European Journal of Pharmacology*, v. 765, p. 517–524, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.024>>.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>>.

CRAGG, G. M.; PEZZUTO, J. M. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Medical Principles and Practice*, v. 25, n. Suppl 2, p. 41, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26679767>>. Acesso em: 4 abr. 2019.

DA SILVA, V. V. *et al.* Photoprotective effect of *Pothomorphe umbellata* on UVB radiation-induced biomarkers involved in carcinogenesis of hairless mouse epidermis. *Cutaneous and Ocular Toxicology*, v. 28, n. 2, p. 54–60, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19263261>>. Acesso em: 19 abr. 2019.

DAI, C.; HEEMERS, H.; SHARIFI, N. Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, v. 7, n. 9, p. a030452, 1 set. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28389515>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

DAMBER, J.-E.; AUS, G. Prostate cancer (Review). *Lancet*, v. 371, n. 9625, p. 1710–1721, 2008.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochemistry Reviews*, v. 14, n. 2, p. 299–315, 2015.

DE ARAÚJO, E. R. D. *et al.* Gastroprotective and Antioxidant Activity of *Kalanchoe brasiliensis* and *Kalanchoe pinnata* Leaf Juices against Indomethacin and Ethanol-Induced Gastric Lesions in Rats. *International journal of molecular sciences*, v. 19, n. 5, 24 abr. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29695040>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

DE QUEIROZ, G. M. *et al.* Phytochemical Characterization, Antimicrobial Activity, and

- Antioxidant Potential of *Equisetum hyemale* L. (Equisetaceae) Extracts. *Journal of Medicinal Food*, v. 18, n. 7, p. 830–834, 25 jul. 2015. Disponível em: <<http://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2014.0089>>. Acesso em: 11 abr. 2019.
- DE SOUZA DOS SANTOS, M. C. *et al.* Impact of flavonoids on thyroid function. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 10, p. 2495–2502, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.06.074>>.
- DENMEADE, S. R.; LIN, X. S.; ISAACS, J. T. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *The Prostate*, v. 28, n. 4, p. 251–265, abr. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8602401>>. Acesso em: 2 jun. 2019.
- DOS SANTOS, T. R. *et al.* Cytotoxic potential of selected medicinal plants in northeast Brazil. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/s12906-016-1166-1>>.
- EDWARDSON, D. W. *et al.* Role of Drug Metabolism in the Cytotoxicity and Clinical Efficacy of Anthracyclines. *Current drug metabolism*, v. 16, n. 6, p. 412–26, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26321196>>. Acesso em: 2 jun. 2019.
- ELLIS, T. J.; FIELD, D. L. Repeated gains in yellow and anthocyanin pigmentation in flower colour transitions in the Antirrhineae. *Annals of Botany*, v. 117, n. 7, p. 1133–1140, jun. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27192708>>. Acesso em: 14 jun. 2019.
- EM, A. N. A.; GOULART, L. I. A. Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer Coordenação de Pós-graduação. 2014.
- FANG, J. S.; GILLIES, R. D.; GATENBY, R. A. Adaptation to hypoxia and acidosis in carcinogenesis and tumor progression. *Seminars in Cancer Biology*, v. 18, n. 5, p. 330–337, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18455429>>. Acesso em: 14 jun. 2019.
- FEITELSON, M. A. *et al.* Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. *Seminars in cancer biology*, v. 35 Suppl, n. Suppl, p. S25–S54, dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25892662>>. Acesso em: 3 jun. 2019.
- FONSECA, A. G. *et al.* In Vivo and In Vitro Toxicity Evaluation of Hydroethanolic Extract of *Kalanchoe brasiliensis* (Crassulaceae) Leaves. *Journal of Toxicology*, v. 2018, p. 1–8, 2018.
- FU, C. *et al.* Cistanche tubulosa phenylethanoid glycosides induce apoptosis in Eca-109 cells via the mitochondria-dependent pathway. *Oncology Letters*, v. 17, n. 1, p. 303–313, 29 out. 2018. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.9635>>. Acesso em: 2 jun. 2019.
- GAO, Q. *et al.* Application of Urinary Volatile Organic Compounds (VOCs) for the

diagnosis of Prostate Cancer. *Clinical Genitourinary Cancer*, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1558767319300473>>.

GELMANN, E. P. Molecular Biology of the Androgen Receptor. *Journal of Clinical Oncology*, v. 20, n. 13, p. 3001–3015, 1 jul. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12089231>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

GHOLAMZADEH, H. *et al.* Effect of Reflexology on the Side Effects of Chemotherapy in Cancer Patients : An Integrative Review. n. 098 51, 2019.

GONÇALEZ, E. *et al.* Study of the antitumor potential of *Bidens pilosa* (Asteraceae) used in Brazilian folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 117, n. 1, p. 69–75, 2008.

GRÖNBERG, H. *et al.* Characteristics of Prostate Cancer in Families Potentially Linked to the Hereditary Prostate Cancer 1 (HPC1) Locus. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, v. 278, n. 15, p. 1251, 15 out. 1997. Disponível em: <<http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1997.03550150055035>>. Acesso em: 25 maio 2019.

GROSSMANN, M.; CHEUNG, A. S.; ZAJAC, J. D. Androgens and prostate cancer; pathogenesis and deprivation therapy. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 27, n. 4, p. 603–616, 1 ago. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521690X1300047X?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 4 mar. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21376230>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

HASANPOURGHADI, M.; PANDURANGAN, A. K.; MUSTAFA, M. R. Modulation of oncogenic transcription factors by bioactive natural products in breast cancer. *Pharmacological Research*, v. 128, p. 376–388, fev. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28923544>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

HEEMERS, H. V.; TINDALL, D. J. Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex. *Endocrine Reviews*, v. 28, n. 7, p. 778–808, 1 dez. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17940184>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

HEINLEIN, C. A.; CHANG, C. Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocrine Reviews*, v. 25, n. 2, p. 276–308, 1 abr. 2004. Disponível em: <<https://academic.oup.com/edrv/article/25/2/276/2355261>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

HOANG, D. T. *et al.* Androgen receptor-dependent and -independent mechanisms driving prostate cancer progression: Opportunities for therapeutic targeting from multiple angles. *Oncotarget*, v. 8, n. 2, p. 3724–3745, 10 jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27741508>>. Acesso em: 26 maio 2019.

HUANG, L.; FU, L. Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta pharmaceutica Sinica. B*, v. 5, n. 5, p. 390–401, set. 2015. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26579470>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

HUGGINS, C.; HODGES, C. V. Studies on prostatic cancer. I. The effect of castration, of estrogen and androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 22, n. 4, p. 232–40, [S.d.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4625049>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

IMAI, M. *et al.* Cytotoxic effects of flavonoids against a human colon cancer derived cell line, COLO 201: A potential natural anti-cancer substance. *Cancer Letters*, v. 276, n. 1, p. 74–80, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2008.10.036>>.

IMRAN, M. *et al.* Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, v. 112, n. January, 2019.

IVANOVA, A. *et al.* New furostanol saponins from *Smilax aspera* L. and their in vitro cytotoxicity. *Fitoterapia*, v. 82, n. 2, p. 282–287, 1 mar. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0367326X10002753#bb0025>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

JEON, H.-M.; LEE, J. MET: roles in epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness. *Annals of translational medicine*, v. 5, n. 1, p. 5, jan. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28164090>>. Acesso em: 3 jun. 2019.

JORDAN, B. C. *et al.* Molecular mechanisms of curcumin and its semisynthetic analogues in prostate cancer prevention and treatment. *Life sciences*, v. 152, p. 135–44, 1 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27018446>>. Acesso em: 6 jun. 2019.

KALYANASUNDARAM, R. *et al.* Piperine, a Bioactive Component of Pepper Spice Exerts Therapeutic Effects on Androgen Dependent and Androgen Independent Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE*, v. 8, n. 6, p. e65889, 2013.

KARSY, M. *et al.* The Impact of Hypoxia and Mesenchymal Transition on Glioblastoma Pathogenesis and Cancer Stem Cells Regulation. *World Neurosurgery*, v. 88, p. 222–236, 1 abr. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878875015017362?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 maio 2019.

KHAN, R. A. Natural products chemistry: The emerging trends and prospective goals. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v. 26, n. 5, p. 739–753, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jsps.2018.02.015>>.

KIJJOA, A. ET AL. 4-Nerodyl-cathechol from *Pothomorphe umbellata*. *Planta Medica*, v. 39, p. 85–87, 1980.

KOTECHA, R.; TAKAMI, A.; ESPINOZA, J. L. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of the clinical evidence. *Oncotarget*, v. 7, n. 32, 2016.

KRISHNAMURTI, C.; RAO, SSCC. The isolation of morphine by Serturmer. *Indian Journal of Anaesthesia*, v. 60, n. 11, p. 861, 2016. Disponível em: <<http://www.ijaweb.org/text.asp?2016/60/11/861/193696>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

KUMAR, A.; RIMANDO, A. M.; LEVENSON, A. S. Resveratrol and pterostilbene as a microRNA-mediated chemopreventive and therapeutic strategy in prostate cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1403, n. 1, p. 15–26, 1 set. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/nyas.13372>>. Acesso em: 6 jun. 2019.

KYPRIANOU, N. *Molecular Exploitation of Apoptosis Pathways in Prostate Cancer*. [S.l.]: imperial college press, 2012. v. 5. Disponível em: <<https://www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/p667>>. Acesso em: 2 jun. 2019. (Molecular Medicine and Medicinal Chemistry).

LAPENNA, S.; GIORDANO, A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 8, n. 7, p. 547–566, jul. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19568282>>. Acesso em: 2 maio 2019.

LEE, E. K.; CHO, H.; KIM, C. W. Proteomic analysis of cancer stem cells in human prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 412, n. 2, p. 279–285, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.07.083>>.

LI, H. *et al.* Cell cycle arrest and cell apoptosis induced by Equisetum hyemale extract in murine leukemia L1210 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 144, n. 2, p. 322–327, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.09.015>>.

LI, S. *et al.* Anticancer effect of petroleum ether extract from Bidens pilosa L and its constituent's analysis by GC-MS. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 217, n. August 2017, p. 126–133, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.02.019>>.

LIU, Q. *et al.* Factors involved in cancer metastasis: a better understanding to “seed and soil” hypothesis. *Molecular Cancer*, v. 16, n. 1, p. 176, 2 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29197379>>. Acesso em: 1 maio 2019.

LONERGAN, P. E.; TINDALL, D. J. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *Journal of carcinogenesis*, v. 10, p. 20, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21886458>>. Acesso em: 16 jun. 2019.

LOPES, A. P. *et al.* Antioxidant and cytotoxic effects of crude extract, fractions and 4-nerolidylcatechol from aerial parts of pothomorphe umbellata L. (Piperaceae). *BioMed Research International*, v. 2013, 2013.

LU, C.; LUO, J. Decoding the androgen receptor splice variants. *Translational andrology and urology*, v. 2, n. 3, p. 178–186, set. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25356377>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

LU, J.; DER STEEN, T. VAN; TINDALL, D. J. Are androgen receptor variants a substitute for the full-length receptor? *Nature Reviews Urology*, v. 12, n. 3, p. 137–144, 10 mar. 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrurol.2015.13>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *The American journal of pathology*, v. 146, n. 1, p. 3–15, jan. 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7856735>>. Acesso em: 19 abr. 2019.

MASSAGUÉ, J.; OBENAU, A. C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. *Nature*, v. 529, n. 7586, p. 298–306, 21 jan. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26791720>>. Acesso em: 7 maio 2019.

MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? *Phytochemistry*, v. 68, n. 14, p. 2015–2022, 1 jul. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942207002920?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

MELO, J. G. *et al.* Cytotoxicity of plants from the Brazilian semi-arid region: A comparison of different selection approaches. *South African Journal of Botany*, v. 113, p. 47–53, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.sajb.2017.07.013>>.

MIMEAULT, M.; BATRA, S. K. Frequent gene products and molecular pathways altered in prostate cancer- and metastasis-initiating cells and their progenies and novel promising multitargeted therapies. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, v. 17, n. 9–10, p. 949–64, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21607288>>. Acesso em: 3 jun. 2019.

MIMICA-DUKIC, N. *et al.* Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants. *Molecules*, v. 13, n. 7, p. 1455–1464, 2008.

MITRA, S.; DASH, R. Natural Products for the Management and Prevention of Breast Cancer. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2018, p. 1–23, 26 fev. 2018. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/8324696/>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

MUNARI, C. C. *et al.* Evaluation of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloid extract in V79 cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 10, p. 3696–3701, out. 2012a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0278691512005066>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

MUNARI, C. C. *et al.* Evaluation of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloid extract in V79 cells. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 10, p. 3696–3701, 1 out. 2012b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691512005066?via%3Dihub>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

MUNARI, C. C. *et al.* In vivo assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloid extract. *PLoS one*, v. 9, n. 11, p. e111999, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25405606>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

MUZ, B. *et al.* The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckland, N.Z.)*, v. 3, p. 83–92, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27774485>>. Acesso em: 3 jun. 2019.

NAKAZAWA, M.; PALLER, C.; KYPRIANOU, N. Mechanisms of Therapeutic

Resistance in Prostate Cancer. *Current oncology reports*, v. 19, n. 2, p. 13, fev. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28229393>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

NASCIMENTO, S. C. DO *et al.* Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2011, p. 1–14, 2011.

NEUWINGER, H. D. *African ethnobotany : poisons and drugs : chemistry, pharmacology, toxicology*. [S.l.]: Chapman & Hall, 1996. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?id=j8ueEmakD0C&pg=PA740&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?id=j8ueEmakD0C&pg=PA740&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false)>. Acesso em: 2 abr. 2019.

NEWMAN , D. J. AND CRAGG, G. M. NIH Public Access. *Journal of Natural Products*, v. 75, n. 3, p. 311–335, 2012.

NIRMA, C. *et al.* Larvicidal activity of isoflavonoids from *Muellera frutescens* extracts against *Aedes aegypti*. *Natural product communications*, v. 7, n. 10, p. 1319–22, out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23156998>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

NISHIDA, N. *et al.* Angiogenesis in cancer. *Vascular health and risk management*, v. 2, n. 3, p. 213–9, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17326328>>. Acesso em: 16 maio 2019.

NOURI, M. *et al.* Androgen-Targeted Therapy-Induced Epithelial Mesenchymal Plasticity and Neuroendocrine Transdifferentiation in Prostate Cancer: An Opportunity for Intervention. *Frontiers in Oncology*, v. 4, p. 370, 23 dez. 2014. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2014.00370/abstract>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

NÚÑEZ, V. *et al.* Inhibitory effects of *Piper umbellatum* and *Piper peltatum* extracts towards myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops* snake venoms: Isolation of 4-nerolidylcatechol as active principle. *Phytochemistry*, v. 66, n. 9, p. 1017–1025, maio 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15896371>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

NWOSU, V. *et al.* Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease. *Human Molecular Genetics*, v. 10, n. 20, p. 2313–2318, 1 out. 2001. Disponível em: <<https://academic.oup.com/hmg/article-lookup/doi/10.1093/hmg/10.20.2313>>. Acesso em: 25 maio 2019.

O'CONNOR, S. E. Engineering of Secondary Metabolism. *Annual Review of Genetics*, v. 49, n. 1, p. 71–94, 23 nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26393965>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

OLIVEIRA, É. A. DE *et al.* ER stress promotes antitumor effects in BRAFi/MEKi resistant human melanoma induced by natural compound 4-nerolidylcatechol (4-NC). *Pharmacological Research*, v. 141, n. December 2018, p. 63–72, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.12.006>>.

PAULA, J. T. *et al.* Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using

CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub>/ethanol/water mixtures as solvents. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 81, p. 33–41, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2013.04.009>>.

PAULIQUEVIS, C. F. *et al.* Atividade insetistática de óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* sobre *Sitophilus zeamais*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 19, n. 12, p. 1192–1196, dez. 2015. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-43662015001201192&lng=pt&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-43662015001201192&lng=pt&tlng=pt)>. Acesso em: 2 abr. 2019.

PERDANA, N. R. *et al.* *The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review The risk factors of prostate cancer and its prevention*. [S.l.: s.n.], 2016. Disponível em: <<http://www.inaactamedica.org/archives/2016/27840359.pdf>>. Acesso em: 9 jun. 2019.

PERES, L. Metabolismo ecundário. p. 1–26, 2012.

RANKIN, E. B.; NAM, J.-M.; GIACCIA, A. J. Hypoxia: Signaling the Metastatic Cascade. *Trends in cancer*, v. 2, n. 6, p. 295–304, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28741527>>. Acesso em: 2 maio 2019.

REBBECK, T. R.; Prostate Cancer Genetics: Variation by Race, Ethnicity, and Geography. v. 27, n. 1, p. 617–632, 2018.

RIBEIRO, A. F. C. *et al.* Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, n. 2, p. 364–373, 2012.

RIBEIRO, D. A. *et al.* Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 155, n. 3, p. 1522–1533, 29 set. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874114005613?via%3Dihub#bib67>>. Acesso em: 25 abr. 2019.

RIVAS, C. *et al.* Ethnicity and the prostate cancer experience: a qualitative metasynthesis. *Psycho-Oncology*, v. 25, n. 10, p. 1147–1156, out. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27416079>>. Acesso em: 9 jun. 2019.

RYCAJ, K. *et al.* Longitudinal tracking of subpopulation dynamics and molecular changes during LNCaP cell castration and identification of inhibitors that could target the PSA&#x2212;/lo castration-resistant cells. *Oncotarget*, v. 7, n. 12, p. 14220–40, 22 mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26871947>>. Acesso em: 2 jun. 2019.

SACOMAN, J. L. *et al.* Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from *Pothomorphe umbellata*. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 41, n. 5, p. 411–415, 2008.

SEYFRIED, T. N.; HUYSENTRUYT, L. C. On the origin of cancer metastasis. *Critical reviews in oncogenesis*, v. 18, n. 1–2, p. 43–73, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23237552>>. Acesso em: 1 maio 2019.

SHAFI, A. A.; YEN, A. E.; WEIGEL, N. L. Androgen receptors in hormone-dependent

and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 140, n. 3, p. 223–238, 1 dez. 2013. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0163725813001496?via%3Dihub>. Acesso em: 9 jun. 2019.

SHE, T. *et al.* Sarsaparilla ( *Smilax Glabra* Rhizome) Extract Activates Redox-Dependent ATM/ATR Pathway to Inhibit Cancer Cell Growth by S Phase Arrest, Apoptosis, and Autophagy. *Nutrition and Cancer*, v. 69, n. 8, p. 1281–1289, 17 nov. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29111814>. Acesso em: 11 abr. 2019.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2019. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30620402>.

SIQUEIRA, C. F. DE Q. *et al.* Levels of tannins and flavonoids in medicinal plants: evaluating bioprospecting strategies. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, v. 2012, p. 434782, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969842>. Acesso em: 25 abr. 2019.

SOH, S. X. *et al.* A systematic review and meta-analysis of individual patient data on the impact of the BIM deletion polymorphism on treatment outcomes in epidermal growth factor receptor mutant lung cancer. *Oncotarget*, v. 8, n. 25, p. 41474–41486, 20 jun. 2017. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28467813>. Acesso em: 25 abr. 2019.

SOUZA, P. O. DE *et al.* Anticancer activity of flavonoids isolated from *Achyrocline satureioides* in gliomas cell lines. *Toxicology in Vitro*, v. 51, n. April, p. 23–33, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.04.013>.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; VAN STADEN, J. *Biological activities and distribution of plant saponins*. *Journal of Ethnopharmacology*. [S.l.]: Elsevier. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874104002557>. Acesso em: 2 abr. 2019. , 1 out. 2004

SPONCHIADO, E. C. *et al.* In vitro assessment of antimicrobial activity of *Pothomorphe umbellata* extracts against *Enterococcus faecalis*. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*, v. 25, n. 1, p. 64–8, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24748302>. Acesso em: 2 abr. 2019.

STEEG, P. S. Targeting metastasis. *Nature Reviews Cancer*, v. 16, n. 4, p. 201–218, 1 abr. 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/nrc.2016.25>. Acesso em: 7 maio 2019.

STOCKARD, C. R. *et al.* Adenovirus-mediated FLT1-targeted proapoptotic gene therapy of human prostate cancer. *Molecular Therapy*, v. 10, n. 6, p. 1059–1070, 2004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.08.024>.

STRMISKA, V. *et al.* Prostate cancer-specific hallmarks of amino acids metabolism: Towards a paradigm of precision medicine. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on*

*Cancer*, v. 1871, n. 2, p. 248–258, 2019. Disponível em:  
<<https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2019.01.001>>.

TAFFARELLO, D. *et al.* Atividade de extratos DE *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas. *Quimica Nova*, v. 36, n. 3, p. 431–436, 2013.

TAN, M. E. *et al.* Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 36, n. 1, p. 3, 2015. Disponível em:  
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4571323/>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

TAVARES, D. *et al.* Antimutagenic Potential of *Solanum lycocarpum* against Induction of Chromosomal Aberrations in V79 Cells and Micronuclei in Mice by Doxorubicin. *Planta Medica*, v. 77, n. 13, p. 1489–1494, 7 set. 2011. Disponível em:  
<<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0030-1270886>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

TIAN, L.-W. *et al.* Steroidal Saponins from the Genus *Smilax* and Their Biological Activities. *Natural products and bioprospecting*, v. 7, n. 4, p. 283–298, ago. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28646341>>. Acesso em: 11 abr. 2019.

*Tipos de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer.* Disponível em:  
<<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-prostata>>. Acesso em: 1 maio 2019.

TOYANG, N. J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 146, n. 3, p. 681–723, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.01.040>>.

TRENDOWSKI, M. Recent Advances in the Development of Antineoplastic Agents Derived from Natural Products. *Drugs*, v. 75, n. 17, p. 1993–2016, nov. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26501980>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

USLU, M. E. *et al.* Optimization of extraction conditions for active components in equisetum arvense extract. *Romanian Biotechnological Letters*, v. 18, n. 2, p. 8115–8131, 2013.

VALADARES, M. C. *et al.* Protective effects of 4-nerolidylcatechol against genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Food and Chemical Toxicology*, v. 45, n. 10, p. 1975–1978, 1 out. 2007. Disponível em:  
<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691507001561>>. Acesso em: 2 abr. 2019.

VIALLARD, C.; LARRIVÉE, B. Tumor angiogenesis and vascular normalization: alternative therapeutic targets. *Angiogenesis*, v. 20, n. 4, p. 409–426, 28 nov. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10456-017-9562-9>>. Acesso em: 3 jun. 2019.

WADOSKY, K. M.; KOOCHEKPOUR, S. Androgen receptor splice variants and prostate

cancer: From bench to bedside. *Oncotarget*, v. 8, n. 11, p. 18550–18576, 14 mar. 2017a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28077788>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

WADOSKY, K. M.; KOOCHEKPOUR, S. Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. *Oncotarget*, v. 8, n. 11, 14 mar. 2017b. Disponível em: <<http://www.oncotarget.com/fulltext/14537>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

WALLACE, T. J. *et al.* Current approaches, challenges and future directions for monitoring treatment response in prostate cancer. *Journal of Cancer*, v. 5, n. 1, p. 3–24, 2014.

WANG, G. *et al.* Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & development*, v. 32, n. 17–18, p. 1105–1140, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30181359>>. Acesso em: 2 maio 2019.

WENG, C.-J.; YEN, G.-C. Chemopreventive effects of dietary phytochemicals against cancer invasion and metastasis: Phenolic acids, monophenol, polyphenol, and their derivatives. *Cancer Treatment Reviews*, v. 38, n. 1, p. 76–87, 1 fev. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305737211000417?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

WU, C. Y.; CHEN, Y. C. Riboflavin immobilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles carried with n-butylideneephthalide as targeting-based anticancer agents. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, v. 47, n. 1, p. 210–220, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1548473>>.

WU, J. *et al.* Investigation of the extracts from *Bidens pilosa* Linn. var. *radiata* Sch. Bip. for antioxidant activities and cytotoxicity against human tumor cells. *Journal of Natural Medicines*, v. 67, n. 1, p. 17–26, 2013.

WU, W. *et al.* MiR-30a-5p frequently downregulated in prostate cancer inhibits cell proliferation via targeting PCLAF. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, v. 47, n. 1, p. 278–289, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/21691401.2018.1553783>>.

YANG, F. *et al.* Quercetin inhibits angiogenesis through thrombospondin-1 upregulation to antagonize human prostate cancer PC-3 cell growth in vitro and in vivo. *Oncology Reports*, v. 35, n. 3, p. 1602–1610, mar. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26676551>>. Acesso em: 3 jun. 2019.

YANG, H. *et al.* A re-evaluation of the final step of vanillin biosynthesis in the orchid *Vanilla planifolia*. *Phytochemistry*, v. 139, p. 33–46, jul. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28411481>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

ZADRA, G.; PHOTOPOULOS, C.; LODA, M. The fat side of prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1831, n. 10, p. 1518–1532, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.03.010>>.

ZAYNAB, M. *et al.* Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens.

*Microbial Pathogenesis*, v. 124, p. 198–202, nov. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30145251>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

ZEESHAN, R.; MUTAHIR, Z. Cancer metastasis - tricks of the trade. *Bosnian journal of basic medical sciences*, v. 17, n. 3, p. 172–182, 20 ago. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28278128>>. Acesso em: 7 maio 2019.

ZHENG, J. *et al.* Spices for Prevention and Treatment of Cancers. *Nutrients*, v. 8, n. 8, p. 495, 12 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27529277>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

ZHONG, J. *et al.* p300 acetyltransferase regulates androgen receptor degradation and PTEN-deficient prostate tumorigenesis. *Cancer research*, v. 74, n. 6, p. 1870–1880, 15 mar. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24480624>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

ZHOU, L. *et al.* Circulating tumor cells: silent predictors of metastasis. *F1000Research*, v. 6, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28868131>>. Acesso em: 22 maio 2019.

ZHOU, Y. *et al.* Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. *Nutrients*, v. 8, n. 8, p. 515, 22 ago. 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27556486>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

ZIMNA, A.; KURPISZ, M. Hypoxia-Inducible Factor-1 in Physiological and Pathophysiological Angiogenesis: Applications and Therapies. *BioMed research international*, v. 2015, p. 549412, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26146622>>. Acesso em: 14 jun. 2019.