



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

GABRIELA DA SILVA GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE SUBSTÂNCIAS
NATURAIS PURAS E O QUIMIOTERÁPICO DOCETAXEL EM MODELOS
CELULARES DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

UBERLÂNDIA - MG

2020

GABRIELA DA SILVA GUIMARÃES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE SINÉRGICA ENTRE COMPOSTOS
NATURAIS PUROS E O QUIMOTERÁPICO DOCETAXEL EM MODELOS
CELULARES DE CÂNCER DE PRÓSTATA**

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

Orientadora: Dra. Thaise Gonçalves de Araújo

UBERLÂNDIA - MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

G963a
2020

Guimarães, Gabriela da Silva, 1996

Avaliação da atividade sinérgica entre compostos naturais puros e o quimoterápico docetaxel em modelos celulares de câncer de próstata [recurso eletrônico] / Gabriela da Silva Guimarães. - 2020.

Orientadora: Thaise Gonçalves de Araújo.

Dissertação (mestrado profissional) - Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.5004>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Genética. I. Araújo, Thaise Gonçalves de, 1984, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umuarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902
Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica			
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico - 03/2020 - PPGGB.			
Data:	Dezoito de dezembro de dois mil e vinte	Hora de início:	08:00H	Hora de encerramento:
Matrícula do Discente:	11822GBI004			
Nome do Discente:	Gabriela da Silva Guimarães			
Título do Trabalho:	Avaliação da atividade sinérgica entre substâncias naturais puras e o quimioterápico docetaxel em modelos celulares de 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.			

Aos dezoito dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, às 08:00 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Thaise 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 Dr (a). Thaise Gonçalves de Araújo apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, 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 a 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 **Vivian Alonso Goulart, Membro de Comissão**, em 18/12/2020, às 08:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Presidente**, em 18/12/2020, às 09:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ademar Alves Da Silva Filho, Usuário Externo**, em 18/12/2020, às 10:57, 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, informando o código verificador **2419648** e o código CRC **7DCD716D**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e meu irmão, por todo apoio, suporte e amor. O incentivo de vocês foi e é o combustível de minhas conquistas, serei eternamente grata por fazer parte dessa família. Amo vocês.

Agradeço a Antonielle, a irmã que a vida me deu, por todo cuidado, mimos, ajuda com experimentos, companhia, amor e principalmente por ser minha família aqui e me dar outra família. Tudo teria sido extremamente mais difícil sem você.

Obrigada a minha família, incluindo avós, tios, primos, por todo amor e torcida, vindos na forma de almoços de domingo e orações. A trajetória se torna mais leve tendo tanto amor e suporte de pessoas maravilhosas.

Agradeço ao Rodolfo pela companhia durante essa jornada, por trazer calmaria e sossego ao meu coração quando precisei e por todo amor e carinho que acompanham sua presença.

Agradeço a todos os meus amigos, especialmente ao Anderson, Marcos, Jéssica, Gleiriane, Khézia pela compreensão da minha ausência quando necessário e pela torcida durante todo o processo.

Agradeço a minha orientadora Thaise pelo suporte, incentivo, paciência e presença constante durante todo o desenvolvimento dessa dissertação. Obrigada pelo exemplo de profissional que é e por toda dedicação ao nosso grupo de pesquisa.

Agradeço aos meus irmãos de laboratório, Sara, Isabella, Antonielle e Douglas pelas ajudas com experimentos e suporte técnico quando necessário. Sou muito grata pela oportunidade de conhecer cada um de vocês.

Agradeço a toda família do Laboratório de Nanobiotecnologia, especialmente ao professor Luiz Ricardo, as técnicas Natássia e Luciana, Fernanda, Emília, Mariana, Luiz Gabriel e Lara. É um orgulho fazer parte de uma equipe com profissionais tão éticos e competentes.

Agradeço ao professor Ademar e sua equipe por disponibilizarem os compostos utilizados neste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	vi
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer: aspectos gerais e dados epidemiológicos	1
1.2. Aspectos clínicos relacionados ao CaP	3
1.3. A complexidade molecular do CRPC.....	8
1.4. Estratégias para o tratamento do CRPC.....	11
1.5. Produtos naturais no tratamento do CaP	14
1.6. A importância do sinergismo para o tratamento do CaP	18
2 OBJETIVOS	21
2.1. Objetivo Geral	21
2.2. Objetivos Específicos	21
3 METODOLOGIA	22
3.1. Obtenção dos compostos e linhagens celulares	22
3.2. Citotoxicidade.....	22
3.3. Análises de Interação	23
3.4. Ensaio de Apoptose/Necrose	24
3.5. Marcadores de EMT	25
3.6. Análises Estatísticas.....	25
4 RESULTADOS.....	26
4.1. Efeito do 4-NC, PTL e DOC sobre células prostáticas	26

4.2. Avaliação dos efeitos sinérgicos entre os compostos 4-NC, PTL e DOC sobre linhagens tumorais prostáticas	28
4.3. Indução de apoptose pela combinação do 4-NC e DOC em células CRPC	34
4.4. Promoção de autofagia mediada pelo tratamento do 4-NC e DOC em células CRPC	36
4.5. Citometria de fluxo de marcadores moleculares de EMT em linhagem CRPC .	38
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÃO	45

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1 Representação da próstata humana.....	4
Figura 2 Estratégias terapêuticas para tratamento do Câncer de Próstata.....	7
Figura 3 Principais mecanismos associados ao câncer de próstata resistente a castração (CRPC) responsáveis pela contínua sinalização da via do receptor de andrógeno (AR).....	9
Figura 4 Mecanismos de ação dos produtos naturais Partenolido (PTL - azul) e 4-nerolidilcatecol (4-NC – amarelo)	16
Figura 5 Efeito citotóxico de diferentes compostos sobre células prostáticas.....	27
Figura 6 Relação dose x efeito (Fa) referente à interação entre os compostos 4-NC (4-nerolidilcatecol) e DOC (Docetaxel) com representação do valor médio do Índice Combinatório (CI).....	30
Figura 7 Viabilidade celular relativa ao tratamento combinado do 4-NC (4-nerolidilcatecol) e do quimioterápico DOC (Docetaxel) por 48 horas.....	32
Figura 8 Indução de apoptose mediada pela combinação sinérgica de 30,76 μ M 4-NC com 3,41 μ M de DOC sobre as células prostáticas RWPE-01 (não-tumorigênica) e PC3 (tumoral resistente à castração).....	35
Figura 9 Presença de autofagossomos em células PC3 induzidos pelo tratamento com 30,76 μ M de 4-NC (4-nerolidilcatecol) e 3,41 μ M do quimioterápico DOC (Docetaxel) por 48 horas.....	37
Figura 10 Análise em citometria de fluxo de marcadores moleculares relacionados à Transição Epitelio Mesenquimal na linhagem PC3.....	39

Tabela 1 Doses necessárias dos compostos 4-NC (4-nerolidilcatecol), PTL (Partenolido) e DOC (Docetaxel) para inibir 50% da viabilidade (IC_{50}) das linhagens prostáticas não tumorigênica RWPE-01, tumoral hormônio responsiva LNCaP e tumoral resistente à castração PC3.....28

Tabela 2 Efeito antiproliferativo apresentado em % da combinação entre os compostos 4-NC (4-nerolidilcatecol) e DOC (Docetaxel) após 48 horas de tratamento da linhagem PC3.....31

LISTA DE ABREVIATURAS

4-NC	4-nerolidilcatecol
7AAD	7-Amino-Actinomycin
Abs	Absorbância
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AKT	Proteína Quinase B
Akt	Proteína Quinase B
APCs	Células Apresentadoras de Antígenos
AR	Receptores de Andrógeno
AR-V	Receptores de Andrógeno Variantes de Splicing
ATCC	American Type Culture Collection
BRCA2	Breast Cancer 2
CaP	Câncer de Próstata
CRPC	Câncer de Próstata Resistente a Castração
CSC	Células-tronco do Câncer
CYP17	Enzima 17R-hidroxilase-17,20-liase do citocromo P450
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
DHEA	Desidroepiandrosterona
DHT	Di-hidrotestosterona
DMAPT	Dimetilaminopartenolido
DOC	Docetaxel
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EMT	Transição Epitélio-mesenquimal
ERD	Exame Retal Digital
ERK	Quinase Regulada por Sinal Extracelular
FDA	Food and Drug Administration
FGFs	Fatores de Crescimento de Fibroblastos
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
HGF	Fator de Crescimento de Hepatócitos
Hh	Notch e Hedgehog
HIF1 α	Fator Induzível por Hipóxia 1 α
HOXB13	Homeobox B13

HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
IC	Índice Combinatório
IC ₅₀	Índice Citotóxico para 50%
IL-6	Interleucina 6
JAK	Proteínas Janus Quinase
LBD	Domínio de Ligação C-Terminal
LH	Hormônio Luteinizante
LHRH	Hormônio Liberador do Hormônio Luteinizante
mCRPC	CRPC metastático
mTOR	Alvo de Rapamicina em Mamíferos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
NF-κB	Fator Nuclear-κB
NIP	Neoplasia Intraepitelial Prostática
NIPPAN	Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais
NTD	Domínio N-terminal
PAP	Fosfatase Ácida Prostática
PN	Produto Natural
PSA	Antígeno prostático-específico
PTL	Partenolido
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SRC	Co-ativadores de receptores esteroides
TGFβ	Fator de Crescimento Transformador β
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral
TNM	Tumor Node Metastasis
TPA	Terapia de Privação de Andrógenos

RESUMO

O câncer de próstata (CaP) é um tumor altamente incidente no mundo, curável quando detectado em estágios iniciais, mas pode evoluir para uma forma mais grave, que refrata ao tratamento de privação androgênica, denominada CaP resistente a castração (CRPC). Para esses pacientes são utilizados quimioterápicos como o Docetaxel (DOC), o qual também causa efeitos colaterais e pode não ser eficaz devido à resistência desenvolvida pelos pacientes. Nesse cenário, produtos naturais (PNs) se destacam, uma vez que estas substâncias são importantes fontes de novos fármacos antitumorais. Contudo, torna-se necessário também o uso de tratamentos combinados, uma vez que o sinergismo entre drogas permite aumentar a ação terapêutica, reduzir a dose administrada, atenuar a resistência e combater múltiplas subpopulações de células. No presente estudo foi avaliado o efeito das combinações entre os PNs 4-nerolidilcatecol (4-NC) e Partenolido (PTL) e o DOC frente a linhagens prostáticas RWPE-01 (não tumorigênica), LNCaP (tumorigênica sensível a andrógeno) e PC3 (CRPC) utilizando o método Chou-Talalay. Para o PTL, nenhuma das combinações se mostrou sinérgicas. Já a interação entre 4-NC e DOC demonstrou efeito sinérgico para as células CRPC PC3 após 48 horas de tratamento, sendo antagonista para a LNCaP. A combinação sinérgica permitiu a redução da concentração de DOC, com citotoxicidade e indução da apoptose superiores aos tratamentos com os compostos isolados. Além disso, quando o 4-NC foi coadministrado com DOC foi verificado um aumento significativo na expressão de proteínas associadas ao fenótipo epitelial, controlando a transição epitélio-mesenquimal. Os achados no presente estudo sugerem que a combinação do composto natural 4-NC aliado a doses reduzidas do quimioterápico DOC pode representar uma estratégia promissora para o tratamento do CRPC. Entretanto, estudos adicionais são necessários para a comprovação de sua eficácia e segurança em modelos animais.

Palavras -chave: Sinergismo, Câncer de Próstata Resistente a Castração, 4-nerolidilcatecol, Docetaxel, Produtos Naturais.

ABSTRACT

Prostate cancer (CaP) is a highly incident tumor in the world, curable when detected in early stages, but it can evolve into a more severe form, which refracts to the androgen deprivation treatment, called castration-resistant CaP (CRPC). For these patients, chemotherapy drugs such as Docetaxel (DOC) are used, which also causes side effects and may not be effective due to the resistance developed by the patients. In this scenario, natural products (PNs) stand out, since these substances are important sources of new antitumor drugs. However, it is also necessary to use combined treatments, since the synergism between drugs allows to increase the therapeutic action, reduce the administered dose, attenuate resistance and combat multiple subpopulations of cells. In the present study, the effect of combinations between PNs 4-nerolidylcatechol (4-NC) and Parthenolide (PTL) and DOC against prostatic strains RWPE-01 (non-tumorigenic), LNCaP (androgen-sensitive tumorigenic) and PC3 (CRPC) using the Chou-Talalay method. For PTL, none of the combinations were shown to be synergistic. The interaction between 4-NC and DOC demonstrated a synergistic effect for CRPC PC3 cells after 48 hours of treatment, being antagonistic for LNCaP. The synergistic combination allowed the reduction of the DOC concentration, with cytotoxicity and apoptosis induction superior to the treatments with the isolated compounds. In addition, when 4-NC was co-administered with DOC, there was a significant increase in the expression of proteins associated with the epithelial phenotype, controlling the epithelial-mesenchymal transition. The findings in the present study suggest that the combination of the natural compound 4-NC combined with reduced doses of the chemotherapeutic DOC may represent a promising strategy for the treatment of CRPC. However, additional studies are needed to prove its efficacy and safety in animal models.

Keywords: Synergism, Castration-Resistant Prostate Cancer, 4-nerolidylcatechol, Docetaxel, Natural Products.

1 INTRODUÇÃO

1.1. Câncer: aspectos gerais e dados epidemiológicos

Câncer é um termo que designa um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento rápido e desregulado de células, em um desbalanço entre proliferação e morte celulares. A malignidade é definida pela capacidade destas células de invadir tecidos adjacentes e/ou se estabelecerem em outros órgãos, conduzindo à formação das metástases. Os tumores malignos podem se desenvolver em praticamente todas as regiões do organismo, o que caracteriza sua diversidade anatômica, histológica e molecular (WHO, 2019).

A etiopatologia do câncer ainda é pobemente compreendida. Contudo, alguns fatores de risco já se encontram estabelecidos ou em estudo quanto à sua relação com a incidência da doença como a idade, características genéticas e exposições a carcinógenos (CAO; GIOVANNUCCI, 2016; GRAHAM; SOTTORIVA, 2017; LEWANDOWSKA *et al.*, 2019; WIERZEJSKA, 2015). Atualmente, o câncer é considerado um grave problema de saúde pública. Segundo os últimos dados da Organização Mundial da Saúde (2019), é a segunda principal causa de morte no mundo com um número estimado de 9,6 milhões de óbitos em 2018. Após o câncer de pele não melanoma, os tumores de pulmão, próstata, colorretal, estômago e fígado são os mais comuns em homens; enquanto mama, colorretal, pulmão, colo do útero e câncer de tireoide são mais incidentes em mulheres.

Uma das possíveis justificativas para números tão alarmantes, mesmo após décadas de estudos e grandes avanços em inovações médicas e tecnológicas, é a heterogeneidade do ambiente tumoral. As células que compõem uma neoplasia maligna apresentam enorme plasticidade e capacidade de se adaptarem, driblando mecanismos de reparo, escapando à resposta imunológica e desenvolvendo estratégias para refratar aos tratamentos adotados. Nesse contexto, é de extrema importância compreender a biologia tumoral e a ação molecular de medicamentos, na construção de esquemas terapêuticos mais eficazes (JÖGI *et al.*, 2012; NABI; LE, 2018; WOLCHOK, 2018).

Mundialmente, o câncer de próstata (CaP) é o segundo mais frequentemente diagnosticado em homens (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020; WCRF, 2020) com 1,3 milhões de casos em 2018, representando 7,1% de todos os tumores no sexo masculino. A maior incidência ocorre na Europa (35,2% dos casos) e na Ásia (23,3%) (BRAY *et al.*, 2018; RAWLA, 2019). Dados globais também apontam que o CaP é a quinta causa mais comum de

morte por câncer, totalizando 358.989 óbitos em 2015. As maiores taxas de mortalidade estão entre as populações do Caribe e da África Central e Meridional, enquanto as menores são observadas na Ásia, particularmente na Ásia Oriental e Sul-Central (BRAY *et al.*, 2018; PERNAR *et al.*, 2018).

Para o Brasil, estimam-se 65.840 casos novos de CaP para cada ano do triênio 2020-2022. Este ocupa a primeira posição de incidência no país em todas as regiões brasileiras (não considerando o câncer de pele não melanoma), com um risco estimado, para cada 100 mil homens, de 72,35 na Região Nordeste; de 65,29 na Região Centro-Oeste; de 63,94 na Região Sudeste; de 62,00 na Região Sul; e de 29,39 na Região Norte. Em 2017, ocorreram 15.391 óbitos pela doença no Brasil, o equivalente a 15,25/100 mil homens (INCA, 2020).

O CaP é uma doença complexa e multifatorial e, portanto, desafiadora quanto à compreensão dos mecanismos moleculares associados ao seu surgimento e à sua progressão. Quanto aos fatores de risco, o mais bem estabelecido é a idade. De fato, a chance de se desenvolver a doença aumenta significativamente a partir dos 50 anos e a média da idade no diagnóstico é de 66 anos (HEIDEGGER *et al.*, 2019; INCA, 2020; MALINOWSKI *et al.*, 2019).

A etnia também se enquadra como fator de risco. Em populações com diversas etnias, a interação distinta entre fatores genéticos pode contribuir para a ocorrência de mutações que contribuem para o início e a progressão de cânceres agressivos (TAN; PETROVICS; SRIVASTAVA, 2018). Estudos demonstram que homens afro-americanos têm incidência da doença 1,7 vezes maior e taxa de mortalidade 2,4 vezes superior aos americanos de origem caucasiana (DESANTIS *et al.*, 2016).

O histórico familiar (pais de primeiro grau diagnosticados pela doença) é um fator relevante na tomada de decisões para o acompanhamento do CaP. Estima-se que 5% a 10% dos casos de CaP podem ser considerados hereditários (GIRI; BEEBE-DIMMER, 2016). Apesar da influência do componente familiar, a identificação da base genética do CaP permanece desafiadora e ainda pouco compreendida. Contudo, mutações nos genes *homeobox* B13 (*HOXB13*) e *breast cancer 2* (*BRCA2*) são, frequentemente, associados ao risco do desenvolvimento precoce da doença e à alta taxa de mortalidade em uma parcela dos casos (EWING *et al.*, 2012; NAROD *et al.*, 2008).

Por fim, hábitos pessoais como sedentarismo; dieta rica em gordura de origem animal e carne vermelha; menor consumo de frutas, vegetais e vitaminas; altas taxas glicêmicas e obesidade estão correlacionados com a ocorrência da doença. Também se destacam a presença

de processos inflamatórios crônicos, assim como a exposição a produtos químicos e a radiações ionizantes (RAWLA, 2019). Contudo, alguns comportamentos contribuem para a redução do risco ao CaP, sobretudo aqueles que envolvem frutas e vegetais incorporados à alimentação. Foi demonstrado que uma dieta rica em brócolis previne o surgimento do CaP evidenciando o efeito protetor dos vegetais da família Brassicaceae (brócolis, couve de Bruxelas, couve-flor, couve e nabos) (JOSEPH *et al.*, 2004). Similarmente, o risco diminuído foi observado com o consumo de soja, chá verde e tomate (FUJIKI *et al.*, 1998; VAN BREEMEN; PAJKOVIC, 2008).

Portanto, aprofundar as pesquisas para o entendimento do CaP é importante, considerando o funcionamento do órgão e seus aspectos moleculares para que, assim, seja possível melhor compreender a etiologia da doença e reverter a curva ascendente de diagnósticos e número de mortes. Além disso, investigar o papel dos produtos naturais (PNs) na sua prevenção e tratamento é igualmente relevante, uma vez que os efeitos benéficos desses compostos vêm sendo sistematicamente estudados e comprovados (FONTANA *et al.*, 2020).

1.2. Aspectos clínicos relacionados ao CaP

A próstata é uma glândula pélvica localizada abaixo da bexiga urinária e em frente ao reto. O órgão normal de um adulto mede cerca de 6 cm e pesa aproximadamente 20 gramas, sendo constituído por células estromais e epiteliais. A glândula é dividida em zonas, quais sejam: periférica, central, de transição e anterior. A uretra atravessa o centro da próstata e, por isso, doenças relacionadas ao aumento do órgão normalmente desencadeiam sintomas urinários (Figura 1) (LEE; AKIN-OLUGBADE; KIRSCHENBAUM, 2011). As células estromais podem modular a diferenciação do epitélio e são muito importantes para a homeostase prostática (CHARAS; VARGAS; ZELEFSKY, 2018).

A próstata é responsável pela secreção e armazenamento de uma ampla gama de produtos do líquido seminal, o qual fornece aos espermatozoides condições de sobrevivência e viabilidade durante e após a ejaculação. O controle da diferenciação e da atividade do órgão depende de fatores hormonais, imunológicos, alimentares, genéticos e de interações entre células, destas com o estroma e com a matriz extracelular (LEE; KOZLOWSKI; GRAYHACK, 1997).

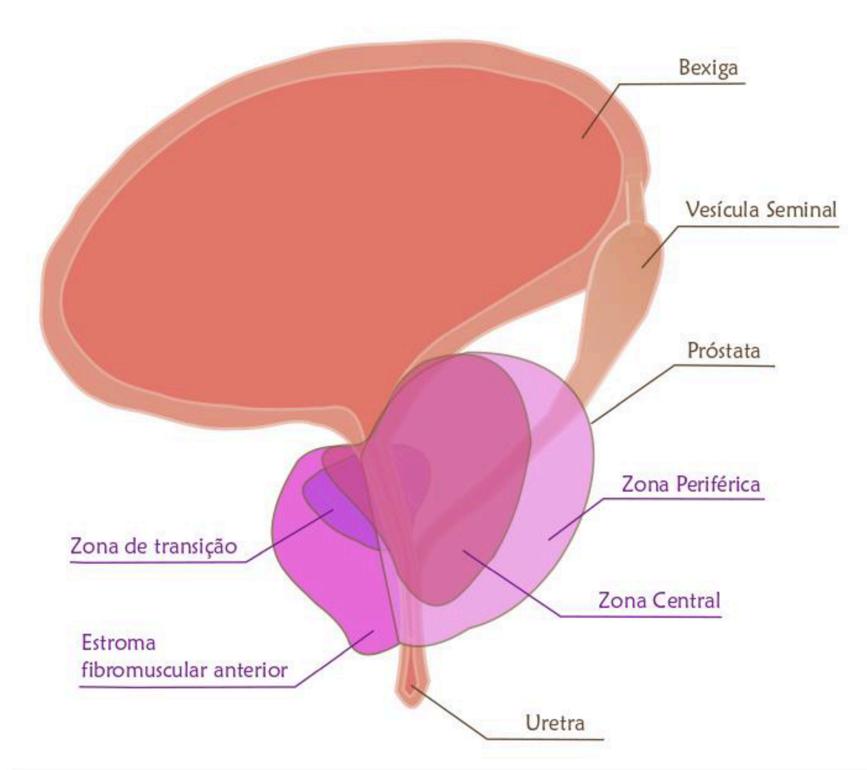


Figura 1 Representação da próstata humana. A próstata é localizada abaixo da bexiga e em frente ao reto, sendo subdividida em diferentes zonas (periférica, central, de transição e anterior).

Os andrógenos têm sido apontados como o fator mais significativo para a homeostase da próstata madura, além de serem importantes também no desenvolvimento embrionário. São responsáveis por direcionar a proliferação epitelial, ramificação dos ductos e diferenciação das células (VILAMAIOR; TABOGA; CARVALHO, 2006). A di-hidrotestosterona (DHT), variante hidroxilada da testosterona, possui alta afinidade aos receptores de andrógeno (AR) e, portanto, é o principal esteroide atuante na glândula. Outros hormônios, como os estrógenos, os glicocorticoides, a prolactina e a insulina, também são relacionadas à fisiopatologia prostática (TABOGA; LEITE VILAMAIOR; GÓES, 2009).

Mudanças nos mecanismos regulatórios do crescimento da próstata podem conduzir a um aumento de seu tamanho (NOVARA *et al.*, 2006). Quando não maligno, esse quadro caracteriza a Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) que ocorre quase exclusivamente na zona de transição. Cerca de 90% dos homens com 70 a 80 anos apresentam evidências histológicas desta doença (BARGHASH ALANAZI *et al.*, 2017). A HPB é raramente fatal quando tratada adequadamente. Seus sintomas incluem esvaziamento insuficiente da bexiga, retenção urinária, instabilidade do detrusor, infecção do trato urinário, hematúria e falência renal (LEPOR, 2018; LU *et al.*, 2019).

A inflamação também é relacionada à ocorrência e progressão do CaP, uma vez que o dano causado ao tecido por uma inflamação pode levar a uma atrofia inflamatória proliferativa (SHOJI *et al.*, 2018), a qual favorece o desenvolvimento de doenças malignas, como a Neoplasia Intraepitelial Prostática (NIP). Esta se assemelha aos tumores prostáticos em níveis bioquímicos, genéticos e fenotípicos, sendo, portanto, considerada um estado pré-maligno (CHISTIAKOV *et al.*, 2018; PACKER; MAITLAND, 2016).

Em seu estágio inicial, o CaP pode ser assintomático ou apresentar sintomas semelhantes à HPB como esvaziamento insuficiente da bexiga, retenção urinária, infecção do trato urinário e hematuria. Quando avançado, são também registradas falência renal e dor nas costas, uma vez que o esqueleto axial é o primeiro foco metastático. Neste estágio, a sobrevida do paciente é comprometida, o que não acontece caso o CaP seja diagnosticado precocemente (LEPOR, 2004; RAWLA, 2019), com uma taxa de sobrevida de até 96% (ALLEMANI *et al.*, 2015).

O diagnóstico é baseado no exame retal digital (ERD), em que é avaliado o crescimento do órgão por meio do toque na região do reto paralela à próstata. Também são dosados os níveis séricos do antígeno prostático-específico (PSA). Esta protease é produzida principalmente pelas células epiteliais da glândula e seus valores são considerados normais quando abaixo de 4 ng/ml. Nesse contexto, o PSA total em uma concentração de 4-10 ng/mL representa um risco relativo de câncer, enquanto acima de 10 ng/mL indica pacientes com alto risco. Apesar de ser um importante método diagnóstico, níveis elevados de PSA também podem indicar prostatites ou HPB. Portanto, o diagnóstico preciso e definitivo depende do estudo histopatológico da lesão. As biópsias são examinadas quanto à presença de células tumorais e estadiadas a partir da avaliação do tamanho da lesão, comprometimento de tecidos vizinhos, linfonodos e órgãos distantes (sistema TNM – *Tumor Node Metastasis*) e de acordo com a escala de Gleason, que avalia o grau de diferenciação das células malignas (MALINOWSKI *et al.*, 2019; MOTTET *et al.*, 2017).

Para a definição do tratamento a ser implementado contra o CaP, é necessário considerar, com atenção, o estadiamento da doença, a idade e as comorbidades do paciente. Em pacientes com baixo risco de progressão é adotada a vigilância ativa, com a realização de exames regulares, como ERD uma vez ao ano, dosagem de PSA total a cada seis meses e biópsias de um a cada três anos, objetivando acompanhar a evolução da doença. Em casos menos graves, é aplicada a espera vigiada, na qual o acompanhamento do paciente também é realizado, porém com menos procedimentos invasivos como a biópsia (HERDEN;

WEISSBACH, 2018).

Quando o tumor progride, a primeira conduta inclui terapias locais, como prostatectomia (remoção total ou parcial da próstata) e/ou radioterapia. Caso haja recorrência, normalmente manifestada com o aumento dos níveis de PSA, é iniciada a terapia de privação de andrógenos (TPA), em que a produção de testosterona pelos testículos é diminuída ou eliminada cirurgicamente (orquiectomia) ou pela ação de drogas específicas (HIGANO, 2010; MOTTET *et al.*, 2017).

A testosterona é um hormônio androgênico sexual que desempenha um papel crucial na maturação de tecidos reprodutivos masculinos, como testículos e próstata, e no desenvolvimento de caracteres sexuais secundários, como aumento do tônus muscular, crescimento e maturação dos ossos e crescimento do pelo corporal. Portanto, níveis insuficientes de testosterona em homens podem ocasionar fragilidade e perda óssea (MOORADIAN; MORLEY; KORENMAN, 1987). Por outro lado, a presença de altos níveis do hormônio é associada ao crescimento da próstata tanto em estado normal, como neoplásico (YASSIN *et al.*, 2019).

Nas células prostáticas a testosterona é convertida em DHT pela 5- α -redutase. A DHT, então, se liga e ativa o AR presente na superfície celular ou no citoplasma. O AR dimeriza e é translocado para o núcleo, onde se liga aos promotores de genes-alvo, regulando-os (GELMANN, 2002). Desta forma, o AR coordena o funcionamento celular ao modular a expressão de genes responsáveis pela mediação dos efeitos fisiológicos dos andrógenos (GUO *et al.*, 2009; TAKAYAMA; INOUE, 2013), como a síntese de proteínas, (incluindo o PSA), o metabolismo lipídico e o crescimento do órgão (FUJITA; NONOMURA, 2019). Assim, a TPA se baseia na dependência hormonal da próstata, de modo que a ablação da testosterona compromete a cascata de sinalização e, consequentemente, a evolução do tumor (FENG; HE, 2019).

A TPA (Figura 2) inclui diferentes compostos como agonistas de LHRH (hormônio liberador do hormônio luteinizante), que se ligam aos receptores de LHRH na hipófise, estimulando a produção de LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante), reduzindo o estímulo do hipotálamo sobre a glândula hipófise o que ocasiona o bloqueio da produção da testosterona. Já os antagonistas de LHRH agem ligando-se aos receptores de LHRH na glândula pituitária, reduzindo os níveis de LH e FSH por bloqueio competitivo. A privação de andrógenos ainda pode acontecer por meio de drogas conhecidas como antiandrogênicos que impedem a ação destes hormônios em seus receptores, isto é,

impossibilitam a ligação da DHT ao AR. Os principais medicamentos utilizados como primeira geração de antiandrogênicos são bicalutamida, flutamida e nilutamida (Figura 2) (DELLIS; PAPATSORIS, 2017; FUJITA; NOMOMURA, 2019; SARANYUTANON *et al.*, 2020; SINGLA; GHANDOUR; RAJ, 2019).

Contudo, pacientes podem refratar ao bloqueio hormonal e a sinalização androgênica permanece ativa. Essa forma avançada e grave da doença é conhecida como CaP resistente a castração (CRPC), usualmente metastático e fatal. Nestes casos, a estratégica terapêutica deve ser modificada e normalmente passam a ser administrados quimioterápicos (docetaxel e cabazitaxel) e/ou antiandrogênicos de segunda geração (abiraterona, enzalutamida, apalutamida e darolutamida) (RICE; MALHOTRA; STOYANOVA, 2019).

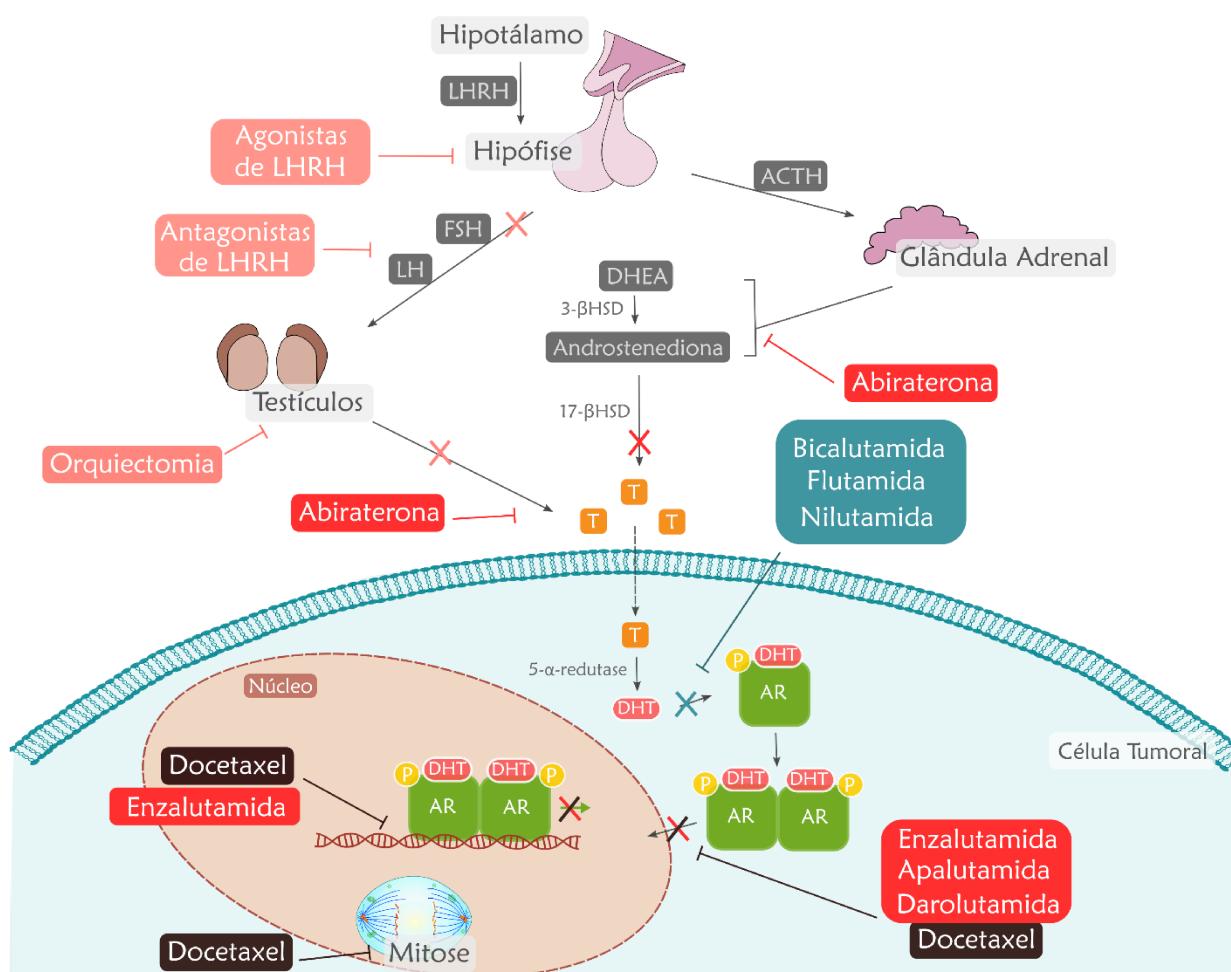


Figura 2 Estratégias terapêuticas para tratamento do Câncer de Próstata. A terapia de privação de andrógenos (TPA) inclui a castração cirúrgica (orquiectomia) ou a administração de diferentes drogas, como agonistas e antagonistas de LHRH, que reduzem o estímulo do hipotálamo sobre a hipófise e provocam a diminuição dos níveis de LH e FSH por bloqueio competitivo, respectivamente. Também pode ser utilizado antiandrogênicos de primeira geração (azul), que impedem a ligação da DHT ao AR. Os principais são bicalutamida, flutamida e nilutamida. Quando o quadro evolui para CRPC, são administrados antiandrogênicos de segunda geração (vermelho). A abiraterona, inibe a biossíntese de andrógenos em células testiculares, glândulas adrenais (produtora

de precursores de testosterona, como a androstanediona e a desidroepiandrosterona) e no tecido tumoral da próstata. A enzalutamida, apalutamida e darolutamida impedem a translocação do AR para o núcleo. Para tratamento do CRPC a quimioterapia também é uma opção. O modo de ação do quimioterápico docetaxel (preto) envolve a hiperestabilização dos microtúbulos, impedindo a progressão da mitose (paralisada em metáfase) e o bloqueio da translocação e atividade do AR. LHRH, hormônio liberador do hormônio luteinizante; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo estimulante; DHEA, desidroepiandrosterona; T, testosterona; DHT, dihidrotestosterona; AR, receptor androgênico; ACTH, hormônio adrenocorticotrófico.

1.3. A complexidade molecular do CRPC

A evolução para CRPC, especialmente para a forma metastática, desafia a oncologia e ainda representa a principal causa de mortes por CaP. Entender os mecanismos envolvidos na resistência às terapias aplicadas, que dribla a privação de andrógenos, é essencial para o desenvolvimento de novas estratégias e desenhos terapêuticos (FUJITA; NOMONURA, 2019).

Para tentar elucidar os mecanismos pelos quais o CRPC se instaura, foram propostos dois modelos. O modelo de seleção defende que subclones de células tumorais com graus variados de dependência à andrógenos estão presentes, mesmo antes do início da TPA. Nesse caso, a progressão para CRPC ocorre, principalmente, por meio da multiplicação destes clones previamente resistentes e que são selecionados pela pressão das condições de baixos níveis hormonais. Por outro lado, o modelo de adaptação propõe que as células de CaP dependentes de andrógenos sofrem adaptações genéticas ou epigenéticas para se adequarem ao ambiente de depleção de andrógenos, conferindo resistência à TPA e, consequentemente, a evolução para o CRPC (ZONG; GOLDSTEIN, 2013).

No modelo de adaptação, diversos eventos moleculares são associados ao desenvolvimento da resistência à andrógenos apresentada pelo CRPC, como a sinalização cruzada entre vias de transdução que ativam o AR, mutações no gene que codifica o AR, variantes de AR produzidas por *splicing* alternativo, superexpressão do receptor, alteração na biossíntese de andrógenos e mudanças dos cofatores do AR (Figura 3) (SCHALKEN; FITZPATRICK, 2015).

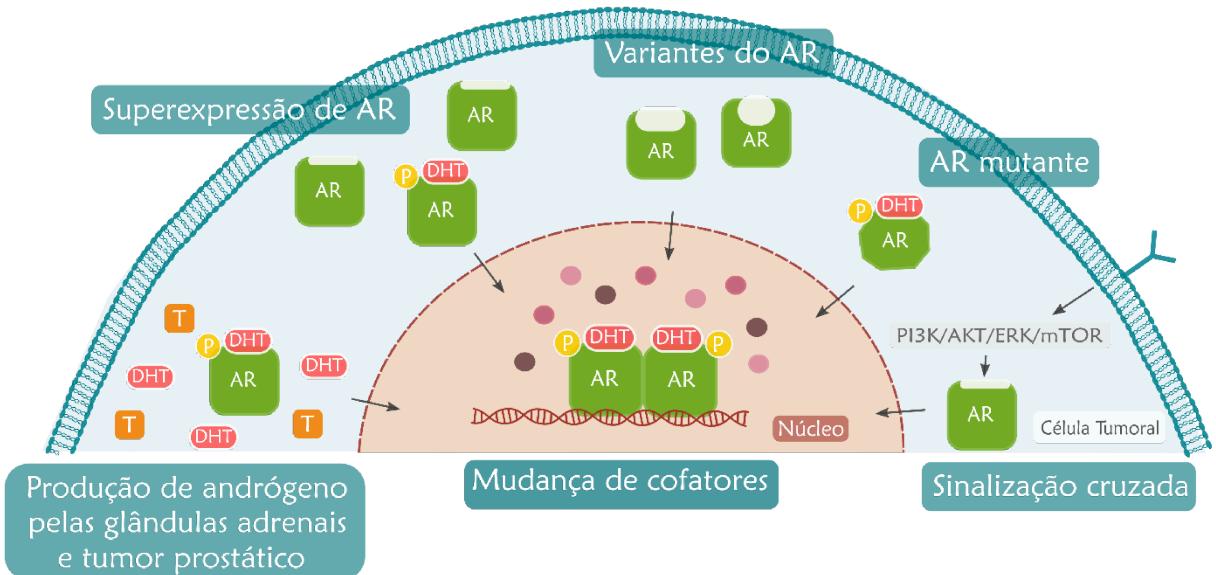


Figura 3 Principais mecanismos associados ao câncer de próstata resistente à castração (CRPC) responsáveis pela contínua sinalização da via do receptor de andrógeno (AR). T, testosterona; DHT, di-hidrotestosterona. (SCHALKEN; FITZPATRICK, 2015).

O AR encontra-se envolvido com a progressão do CaP e, por conseguinte, direta ou indiretamente ao CRPC. Esse receptor é uma estrutura modular com três principais domínios funcionais: domínio N-terminal (NTD) codificado pelo exon 1, domínio de ligação ao DNA (DBD) codificado pelos exons 2 e 3 e domínio de ligação C-terminal (LBD) codificado pelos exons 4-8 (MCEWAN, 2004). Em condições normais, a testosterona e, mais ativamente, o DHT se ligam ao LDB promovendo a translocação do AR para o núcleo, onde o receptor regula a transcrição gênica (GELMANN, 2002) (TAKAYAMA; INOUE, 2013). Após a TPA, em um paciente com CRPC, a sinalização androgênica é continuamente ativada, promovendo o avanço da doença.

Vias diferentes à canônica do AR podem ativar ou inibir moléculas de sinalização *downstream* ou genes-alvo comuns ao mecanismo androgênico. A ativação cruzada entre as vias pode levar à fosforilação do AR e de seus correguladores e, assim, estimular sua atividade. Fatores de crescimento e as vias IL6/STAT3, PI3K, proteína quinase B (AKT), quinase regulada por sinal extracelular (ERK) e alvo de rapamicina em mamíferos (mTOR), estimulam a expressão de genes-alvo do AR, mesmo na ausência de andrógenos (Figura 3) (HEINLEIN; CHANG, 2004; SCHALKEN; FITZPATRICK, 2015).

Adicionalmente, mutações na sequência gênica codificante para AR podem conduzir à inespecificidade do receptor. A alteração T878A, por exemplo, permite a ação da progesterona, estrógeno, flutamida, bicalutamida e enzalutamida como agonistas de AR e, portanto,

ativadores da sinalização que conduz ao CRPC (FUJITA; NONOMURA, 2019; TAPLIN *et al.*, 1995). Além disso, variantes de *splicing* (AR-V) são associadas ao CRPC. Nesse processo os *exons* de um transcrito primário são clivados em locais distintos no RNA mensageiro recém-sintetizado, gerando diferentes transcritos do mesmo pré-mRNA. Em duas décadas, 20 variantes do AR foram identificadas, a maioria truncada na região C terminal e, consequentemente, sem o LDB. Portanto, são passíveis de ativação sem a presença do andrógeno (CAO; ZHAN; DONG, 2016; FUJITA; NONOMURA, 2019).

A superexpressão do AR também já foi descrita em pacientes com CRPC. O aumento exacerbado na expressão do receptor no citoplasma permite a sensibilização das células tumorais mesmo com reduzidos níveis hormonais (LINJA *et al.*, 2001). A ação do receptor, seja em tecidos normais ou tumorais, é dependente de cofatores. Nesse contexto, coativadores permitem a abertura da cromatina coordenada pelo AR em sítios específicos (AGOULNIK *et al.*, 2005). Os co-ativadores de receptores esteroides (SRC), por exemplo, apresentam atividade acetiltransferase, e são capazes de promover a ligação ao promotor e estimular o início da transcrição dos genes alvo do AR. Foram associados à progressão do CaP os SRC-1, SRC-2 (TIF-2, GRIP-1, NcoA2) e SRC-3 (AIB) (CHANDRASEKAR *et al.*, 2015; WANG; CARROLL; BROWN, 2005; XU; WU; O'MALLEY, 2009).

Finalmente, mesmo durante a TPA, baixos níveis do hormônio ainda circulam no organismo na forma de androstenediona e desidroepiandrosterona (DHEA), ambas produzidas na glândula adrenal, estimuladas pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), liberado pela hipófise. As células prostáticas podem converter esses androgênios em testosterona, por meio das enzimas 3 β -hidroxisteróide desidrogenase, que converte a DHEA em androstenediona, e 17 β -hidroxisteróide desidrogenase, que converte androstenediona em testosterona. No CRPC, há, portanto, um aumento na expressão destas enzimas de conversão, mantendo a sinalização hormonal ativa. Além disso, células CRPC também podem sintetizar níveis significativos de andrógenos *de novo* a partir do colesterol, tornando-se independentes até mesmo da sinalização adrenal (HAKKI; BERNHARDT, 2006; LATULIPPE *et al.*, 2002; MONTGOMERY *et al.*, 2008).

Associadas a esses mecanismos, e, portanto, ao CRPC encontram-se diferentes marcas de agressividade tumoral como o aumento da hipóxia, angiogênese exacerbada e ativação do processo de transição epitelio-mesenquimal (EMT). Todas contribuindo para o quadro de metástase. Hipóxia é a redução dos níveis normais de oxigênio no microambiente tumoral (MOVSAS *et al.*, 2000). Esta baixa concentração conduz ao desenvolvimento de novos vasos

sanguíneos, aumentando a irrigação do local, o que caracteriza a angiogênese (VERGIS *et al.*, 2008).

A EMT está relacionada ao aumento da plasticidade celular, em que células tumorais perdem características epiteliais e adquirem fenótipo mesenquimal, ou seja, tornam-se migratórias e passíveis de se estabelecerem em outros órgãos (capacidade metastática). As células epiteliais são conectadas umas às outras por junções aderentes, desmossomos, junções comunicantes e oclusivas e à membrana basal subjacente por meio de hemidesmossomos. Expressam, portanto, intregrinas, E-caderina e citoqueratinas. Células mesenquimais, por sua vez, não contêm essas estruturas juncionais, expressando N-caderina e Vimentina (HARRYMAN *et al.*, 2019; SCHIETKE *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2020). É um evento associado à remissão e resistência ao tratamento com docetaxel (DOC) (MARÍN-AGUILERA *et al.*, 2014; PUHR *et al.*, 2012).

Diversos fatores estão relacionados à EMT, incluindo o microambiente tumoral contendo macrófagos associados, adipócitos hipóxicos, fibroblasto, células endoteliais e linfócitos. Nesse nicho são produzidas diferentes moléculas sinalizadoras incluindo fator de crescimento transformador β (TGF β), fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fator de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e leptina. Alterações do microambiente metabólico induzido pelo crescimento rápido do tumor primário também podem promover a ação do fator induzível por hipoxia 1 α (HIF1 α) (WILLIAMS *et al.*, 2019).

A IL-6, uma das moléculas envolvidas na regulação da EMT, é uma citocina inflamatória cujos níveis séricos se elevam em pacientes com CRPC metastático (mCRPC). Correlaciona-se negativamente com a sobrevida do paciente e com a resposta à quimioterapia. Atua por diferentes vias, incluindo JAK/STAT, ERK1/2, MAPK e PI3-K, promovendo a proliferação das células transformadas e inibindo a apoptose (NGUYEN; LI; TEWARI, 2014).

1.4. Estratégias para o tratamento do CRPC

Aproximadamente 20% dos homens com CaP evoluem para CRPC (CHANDRASEKAR *et al.*, 2015), sendo este a segunda causa mais comum de morte relacionada a câncer em homens (ATTARD *et al.*, 2006). Pesquisas relatam que, sem tratamento, o tempo médio de sobrevida para pacientes com CRPC varia de 9,1 a 21,7 meses (HIGANO *et al.*, 2009; KANTOFF *et al.*, 2010; LASSI; DAWSON, 2009).

Nas últimas décadas diversas terapias vêm sendo adotadas na tentativa de controlar o avanço do CRPC (KNUDSEN; KELLY, 2011). Para os casos não metastáticos são utilizadas drogas antiandrogênicas de segunda geração como o acetato de abiraterona, o primeiro desta classe a ser aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) em abril de 2011. Diferentemente dos antiandrogênicos da primeira geração que alvejam o AR, o acetato de abiraterona é um inibidor da biossíntese de andrógenos (Figura 2), tendo como alvo a enzima 17R-hidroxilase-17,20-liase do citocromo P450 (CYP17). A CYP17 catalisa a produção de testosterona e é altamente expressa em células testiculares, nas glândulas adrenais, e no tecido tumoral da próstata. Nesse sentido, sua inibição promove o amplo bloqueio hormonal, mostrando-se mais eficaz no tratamento da doença (RICE; MALHOTRA; STOYANOVA, 2019).

Os demais antiandrogênicos de segunda geração aprovados pela FDA, como a enzalutamida, a apalutamida e a darolutamida representam um aprimoramento da primeira geração, impedindo também a translocação do AR para o núcleo. A enzalutamida, ainda, é capaz de impedir a ligação do AR ao DNA e o recrutamento de coativadores (TRAN *et al.*, 2009) (Figura 2). Esta foi aprovada pra tratamento do mCRPC e pode ser administrada antes e após a quimioterapia (BHATTACHARYA *et al.*, 2015).

Caso a doença consiga superar também a segunda geração de medicamentos outras medidas devem ser adotadas. A imunoterapia tem se destacado. O Sipuleucel-T é um exemplo de terapia imunológica destinada para tratamento de mCRPC sintomático, assintomático ou minimamente sintomático. Trata-se de um agente imunológico celular autólogo utilizado na sensibilização de células apresentadoras de抗ígenos (APCs) que, por sua vez, ativam células T direcionadas contra a fosfatase ácida prostática (PAP), um antígeno altamente expresso em células tumorais da próstata. Um estudo com 512 pacientes demonstrou que o uso de Sipuleucel-T aumentou a sobrevida dos candidatos em 4,1 meses (ANASSI; NDEFO, 2011; KANTOFF *et al.*, 2010; TEO; RATHKOPF; KANTOFF, 2019).

Além da TPA, os quimioterápicos da família dos taxanos como DOC e cabazitaxel também são amplamente utilizados para o tratamento de pacientes com mCRPC. Estes medicamentos bloqueiam o processo mitótico e o tráfico dependente de microtúbulos, sinalizando para a apoptose. Além disso, podem bloquear a translocação nuclear e a atividade do AR (CONTEDUCA *et al.*, 2019). O DOC foi licenciado em 2004 pela FDA para tratamento do mCRPC e até 2010 foi a primeira linha de terapia citotóxica disponível. Estudos demonstraram que, quando associado à TPA, é capaz de aumentar significativamente a

longevidade dos pacientes (JAMES et al., 2016; KYRIAKOPOULOS et al., 2018; MALINOWSKI et al., 2019). Seu mecanismo de ação envolve a hiperestabilização dos microtúbulos. Estes componentes do citoesqueleto são compostos por subunidades repetidas de α-tubulina e β-tubulina, sendo uma estrutura crítica para a regulação da forma celular, transporte de vesículas, tráfego de fatores de transcrição, metabolismo mitocondrial e separação dos cromossomos durante a mitose. As células tratadas com a droga paralisam a divisão celular na metáfase, impedindo a progressão do ciclo, mais especificamente, a separação dos cromossomos, uma vez que os cinetocoros não exibem uma ligação estável aos microtúbulos. Paralelamente, o DOC promove a saída da mitose sem segregação cromossômica adequada, levando à formação de uma célula tetraplóide apoptótica (MIKUŁA-PIETRASIK et al., 2019; WEAVER, 2014).

Esse taxano também conduz à alteração do potencial da membrana mitocondrial interna com a abertura dos poros, aumento da permeabilidade e liberação do citocromo c e do fator indutor de apoptose. Caspases efetoras são ativadas e coordenam a morte celular (BHALLA, 2003). DOC também fosforila e inativa a proteína anti-apoptótica Bcl-2, e para que a desativação ocorra, esta proteína forma um complexo com a enzima c-Raf-1. A c-Raf-1 é um componente central das vias de transdução de sinal estimuladas por vários fatores de crescimento, proteína quinase C e outras proteínas quinases. A ativação do Raf-1 está associada, principalmente, à proliferação e sobrevivência celulares, mas também tem sido relacionada ao processo de apoptose, especialmente quando complexado ao Bcl-2 (BLAGOSKLONNY et al., 1996; MIKUŁA-PIETRASIK et al., 2019)

A utilização de DOC para o tratamento de mCRPC foi implementada após os resultados de dois estudos prospectivos de fase III. O trial TAX 327 selecionou 1.006 pacientes categorizados em diferentes grupos que receberem o tratamento com (i) DOC associado a prednisona a cada três semanas; (ii) DOC semanal ou (iii) mitoxantrona a cada três semanas. Já o trial 99-16 do *Southwest Oncology Group* casualizou 675 pacientes para quimioterapia com DOC associado a estramustina ou mitoxantrona. Em ambos os estudos clínicos, o DOC administrado a cada três semanas promoveu um nítido incremento na sobrevida dos pacientes com CRPC, com um ganho médio de 1,9 a 2,4 meses (PETRYLAK et al., 2004; TANNOCK et al., 2004; TEO; RATHKOPF; KANTOFF, 2019). Entretanto, o DOC é responsável por efeitos adversos como anemia, infecção recorrente, neutropenia, retenção de líquidos, neuropatia sensorial, perda de cabelo, alterações nas unhas, enjoo, diarreia, estomatite/faringite, distúrbios do paladar, vômito, anorexia e fadiga (TANNOCK et al., 2004). Portanto, novas

abordagens voltadas para a descoberta de agentes quimioterápicos são necessárias. Desenhos experimentais que validem a eficácia de novos compostos isolados ou associados a drogas rotineiramente utilizadas são prementes. Aqueles que promovem uma redução na dose desses medicamentos são promissores, uma vez que associam a inovação à eficácia clínica já comprovada.

1.5. Produtos naturais no tratamento do CaP

As plantas constituem a base de antigos costumes da medicina tradicional, com os primeiros registros datados de cerca de 2600 aC, documentando o uso de aproximadamente 1000 substâncias de origem vegetal na Mesopotâmia. Algumas destas, como *Cedrus species* (cedro) e *Papaver somniferum* (papoula), são utilizadas até os dias atuais para o tratamento de diferentes doenças que vão desde resfriados até infecções parasitárias (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Durante um longo período, as plantas medicinais foram empiricamente aplicadas, sem conhecimento científico acerca de suas propriedades farmacológicas ou constituintes ativos (ROCHE, 2006). Apenas no século XIX iniciou-se o estudo racional de medicamentos oriundos de espécies vegetais, graças a Friedrich Sertürner, farmacêutico alemão que isolou um potente analgésico indutor de sono a partir do ópio, o qual chamou de *morfium* (morfina). Ele publicou um artigo completo sobre os processos de isolamento, cristalização e propriedades farmacológicas do composto (ATANASOV *et al.*, 2015).

Desde então, substâncias naturais são utilizadas no tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer, compondo uma área em constante expansão. Compostos naturais como medicamentos oncológicos se destacam, uma vez que são associados a menos efeitos colaterais (GIRI; LAKSHMI NARASU, 2000). Substâncias como o resveratrol, curcumina, taurina e berberina inibem o início, desenvolvimento e progressão de tumores bloqueando a proliferação celular, angiogênese e metástase, modulando o sistema imunológico e processos redox e induzindo a apoptose e autofagia (DUTTA *et al.*, 2019).

Estudos demonstram atividades de diversos compostos naturais contra o CaP, incluindo isoflavonas de soja, ácido elágico e elagitaninos do extrato de romã, polifenóis do chá verde, curcumina, licopeno, vitaminas D e L-selenometionina, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. A curcumina, um pigmento amarelo extraído da *Curcuma longa*, por exemplo, foi capaz de induzir apoptose e autofagia em células CRPC (PC3 e DU145) (YANG *et al.*, 2017) e seus

análogos sintéticos inibiram o crescimento, *in vivo*, de tumores CRPC murinos (MAPOUNG *et al.*, 2019). Esses agentes têm como alvo uma ou mais vias de sinalização desreguladas no CaP, como a via do AR, fator nuclear-κB (NF-κB), sinalização Wnt, proteína quinase B (Akt) e Notch e Hedgehog (Hh) (KALLIFATIDIS; HOY; LOKESHWAR, 2016; SARKAR *et al.*, 2010).

Diversos quimioterápicos são de origem vegetal. A vimblastina e vincristina, por exemplo, são utilizados para tratamento de linfomas e leucemia e foram isoladas da espécie *Catharanthus roseus* (ZHU *et al.*, 2015). A podofilotoxina, um agente derivado de espécies do gênero *Podophyllum*, é usado como quimioterápico contra carcinoma cervical, osteossarcomas, carcinoma nasofaríngeo, câncer de cólon, câncer de mama, CaP e câncer de pulmão (ZHANG *et al.*, 2018). Já o DOC e paclitaxel, utilizados no tratamento do CRPC, foram extraídos das folhas da espécie *Taxus baccata*. Portanto, explorar novas fontes desses produtos se mostra particularmente interessante. De fato, PNs possuem estruturas passíveis de modificações e, se apresentam como a base para a síntese de novos agentes farmacologicamente mais eficazes (MANN, 2002; NEWMAN; CRAGG, 2020).

Um PN interessante foi isolado da espécie vegetal *Pothomorphe umbellata* L. (Piperaceae), denominado 4-nerolidilcatecol (4-NC), formado por uma estrutura de anel catecol acoplado a uma cadeia alifática saturada. Diferentes atividades biológicas já foram atribuídas a esta substância, incluindo antioxidante, quimiopreventivo, antitumoral, citotóxico, antimarialárica e antifúngica (CORTEZ *et al.*, 2015b).

Estudos prévios demonstraram que o efeito citotóxico do 4-NC ocorre por meio da indução de apoptose mediada por mecanismos dependentes de mitocôndria, acúmulo de citocromo c, modulação da ativação de NF-κB e inibição da ciclina D1 (BENFICA *et al.*, 2017; CORTEZ *et al.*, 2015b). Além disso, esse composto é capaz de conter a invasão celular, conduzir as células de melanoma à parada do ciclo celular em G1, inibir a atividade de metaloproteases, induzir a formação de ROS, causar danos ao DNA, aumentar os níveis de p53 (supressor tumoral) e Noxa (proteína pro-apoptótica) e promover o estresse do retículo endoplasmático (Figura 4) (ALVES-FERNANDES *et al.*, 2019; BROHEM *et al.*, 2009). No CaP, nosso grupo de pesquisa demonstrou a capacidade do 4-NC em ativar, em células CRPC, a apoptose, além de inibir o ciclo celular e modular genes associados a EMT, angiogênese e hipoxia (Figura 4) (CORDEIRO, 2019).

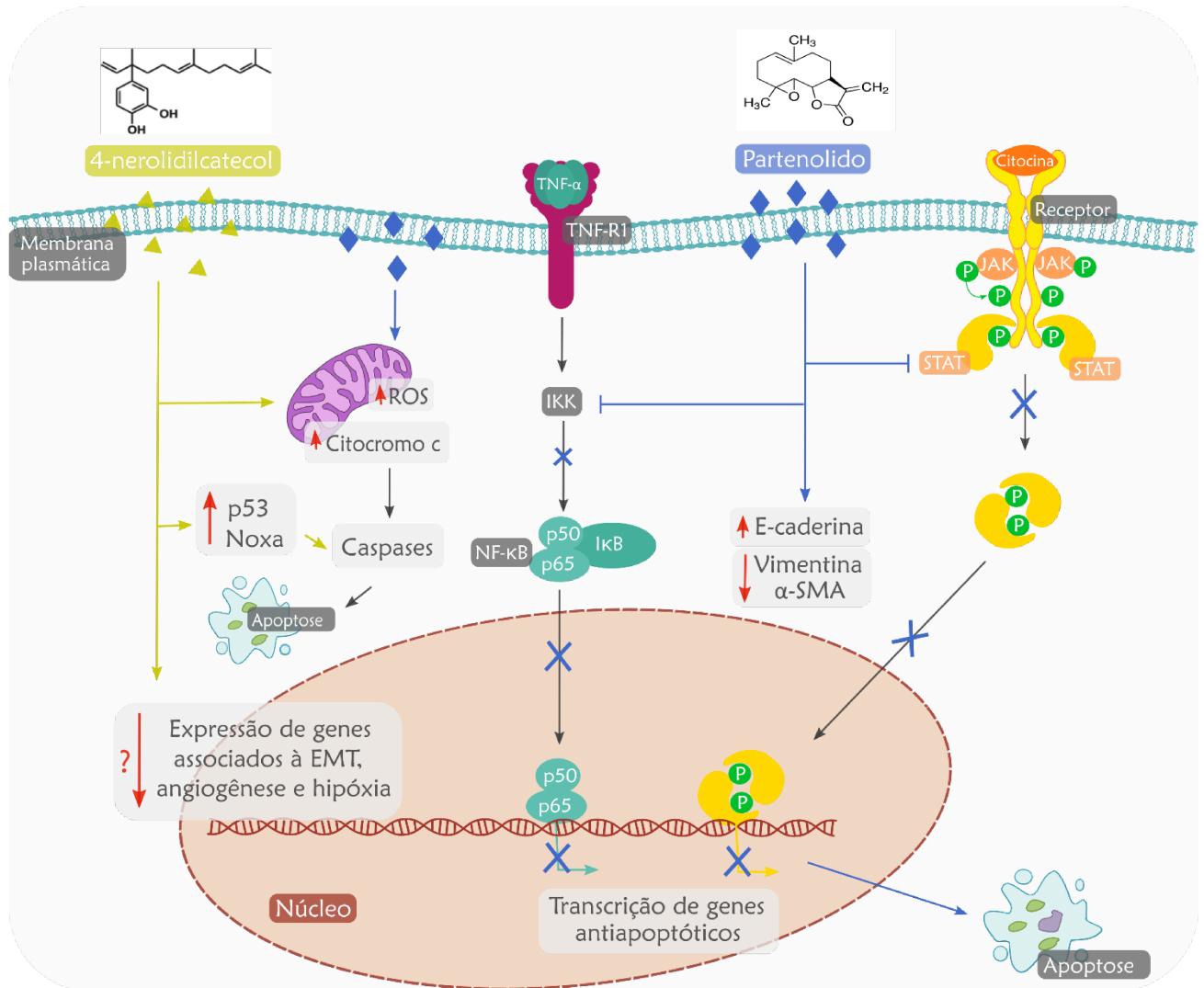


Figura 4 Mecanismos de ação dos produtos naturais Partenolido (PTL - azul) e 4-nerolidilicateol (4-NC – amarelo). O PTL age em vias específicas, com a inibição do NF-κB e redução do nível de proteínas STAT. Várias cascadas de sinalização são afetadas pela inibição de NF-κB e, se tornam, portanto, alvos anti-inflamatórios/anti-proliferativos indiretos do PTL. Os efeitos mediados pelo PTL também estão relacionados à redução nos níveis de formas fosforiladas e ativas das proteínas STAT, interferindo na sinalização JAK-STAT. O PTL ainda aumenta a geração de ROS, induzindo apoptose mediada por caspases, e aumenta a expressão de E-caderina e diminui a de Vimentina e α-SMA, sendo assim, relacionado à modulação do processo de EMT. O efeito citotóxico do 4-NC ocorre é associado à atividade mitocondrial e acúmulo de citocromo c. O 4-NC também induz a formação de espécies reativas de oxigênio, causa danos ao DNA, aumento dos níveis de p53 (supressor tumoral) e Noxa (proteína pro-apoptótica). Estudos recentes sugerem a capacidade do 4-NC em modular genes associados a EMT, angiogênese e hipoxia. ROS, espécies reativas de oxigênio; EMT, transição epitélio-mesenquimal; SMA, actina de músculo liso; TNF, fator de necrose tumoral; TNF-R1, receptor do fator de necrose tumoral 1; IKK, IkB quinase, NFκB, factor nuclear kappa B; JAK, Janus quinase; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição.

Já plantas do gênero *Tanacetum*, da família Asteraceae, são popularmente utilizadas para fins medicinais há séculos, no combate à febre, tratamento de reumatismo e asma (KNIGHT, 1995). As espécies deste gênero possuem diferentes metabólitos secundários, tais como terpenóides, especialmente sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas, triterpenóides,

flavonóides e outros compostos fenólicos (BHAT et al, 2016). Destes, as substâncias biologicamente ativas mais importantes são as lactonas sesquiterpênicas, destacando-se o Partenolido (PTL) (PAREEK et al, 2011). Na década de 70, o PTL foi avaliado quanto à sua ação antitumoral, pela primeira vez, em uma linhagem de papiloma (WIEDHOPF et al, 1973). Desde então, seus efeitos em outras neoplasias malignas vêm sendo estudados, incluindo em culturas celulares de câncer de mama (CARLISI et al, 2016; JAFARI et al, 2018; GE et al, 2019) e de próstata (MENDONCA et al, 2017; HAYASHI et al, 2011).

O PTL é a primeira pequena molécula encontrada que atua seletivamente contra as células-tronco do câncer (CSC), agindo em vias específicas, como a inibição do NF-κB e redução do nível de proteínas STAT (Figura 4) (GHANTOUS et al, 2013). O NF-κB é um membro da família de fatores de transcrição que desempenham um papel central no crescimento cardiovascular, resposta ao estresse e inflamação (BRASIER, 2006). Várias cascatas de sinalização são afetadas pela inibição de NF-κB e se tornam, portanto, alvos anti-inflamatórios/anti-proliferativos indiretos do PTL, com efeitos na plasticidade neuronal e na regeneração, morte e regulação da senescência celular (COSTA PEREIRA et al., 2006; FREUND et al., 2020; JOSEFSSON et al., 2011; MAAHS et al., 2007; MASOUD; LI, 2015; MITTAL; JAISWAL; GOEL, 2015; YARZA et al., 2016).

Já as proteínas STAT são fatores transpcionais que respondem a citocinas que medeiam diversas funções biológicas, como proliferação celular, diferenciação, transformação e apoptose. Estudos sugerem que os efeitos mediados pelo PTL estão relacionados à redução nos níveis de formas fosforiladas e ativas das proteínas STAT, o que pode ser justificado pelo efeito inibitório do composto na ativação das proteínas Janus quinase (JAK) (Figura 4). Esta via, denominada JAK-STAT é responsável, dentre outras funções, pela transcrição de genes antiapoptóticos (MATHEMA et al., 2012).

Em um estudo anterior, foi avaliado os efeitos do PTL sobre a capacidade das células de CaP em regular a atividade e a osteólise das células ósseas. Foi demonstrado que o PTL inibiu o crescimento *in vitro* de células tumorais prostáticas humanas (LNCaP, PC3 e DU145) e murina (RM1-BT), além de controlar a osteólise ao inibir NF-κB (MARINO et al., 2019a). Além disso, um derivado do PTL, denominado dimetilaminopartenolido (DMAPT), foi desenvolvido para aumentar a biodisponibilidade oral do produto no organismo. O tratamento oral de xenoenxertos de células tumorais prostáticas PC-3 com DMAPT associado a radioterapia, diminuiu significativamente o crescimento do tumor, sugerindo a aplicabilidade do produto como agente de radiosensibilização no tratamento do CaP (MENDONCA et al.,

2017; MOREL *et al.*, 2017). De fato, a inibição de NF-κB também está envolvida no mecanismo de radiosensibilização de linhagens LNCaP, DU145 e PC3 (SUN *et al.*, 2007). Este efeito também pode ser associado à capacidade de PTL em ativar seletivamente a NADPH oxidase e mediar o estresse oxidativo intenso nas células do CaP, aumentando a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e induzindo apoptose (Figura 4) (SUN *et al.*, 2010).

Recentemente, foi demonstrado que o PTL inibe fibrose pulmonar por meio do aumento da expressão de E-caderina e diminuição de Vimentina e α-SMA (Figura 4). Portanto, esses resultados sugerem que o PTL é capaz de aumentar a expressão de marcadores de células epiteliais e diminuir marcadores de células mesenquimais, e, consequentemente modular o processo de EMT (LI *et al.*, 2018).

Portanto, o 4-NC e o PTL são PNs promissores no tratamento do CRPC. Além disso, a compreensão de seus mecanismos permite a elaboração de diferentes estratégias e combinações farmacológicas (MANN, 2002). Nesse contexto, ensaios de sinergismo permitirão explorar novos medicamentos e definir estratégias terapêuticas inéditas para o controle do CRPC.

1.6. A importância do sinergismo para o tratamento do CaP

As combinações de medicamentos são tão antigas quanto o uso de drogas isoladas na tentativa de tratar doenças complexas e controlar seus sintomas e efeitos colaterais. À medida que a ciência e a inovação progridem nos métodos de isolamento e na capacidade química de síntese, as combinações de drogas evoluíram e se tornaram progressivamente sofisticadas (CHOU, 2006). O uso combinatório de medicamentos bloqueia diferentes alvos e múltiplas subpopulações de células e, portanto, interessantes no tratamento de lesões altamente heterogêneas como o CaP. O uso de medicamentos com diferentes mecanismos de ação permite alvejar vias distintas associadas à mesma patologia sendo, portanto, um tratamento mais eficaz. O sinergismo permite: aumentar a eficácia do efeito terapêutico; reduzir a dose administrada evitando toxicidade e minimizar a resistência aos medicamentos (CAESAR; CECH, 2019; CHOU, 2006; GOLDIN; MANTEL, 1957). Nesse contexto, as combinações de medicamentos têm sido amplamente exploradas e se tornaram a principal opção para o tratamento de tumores, infecções crônicas e doenças que comprometem o sistema imunológico, como a AIDS (CHOU, 2010).

Nas últimas décadas muitos estudos focaram na caracterização de efeitos combinatórios em misturas de compostos, porém o conceito preciso de sinergismo ainda não foi estabelecido.

Seus efeitos são definidos como aditivos, antagonistas e sinérgicos. Combinações aditivas são aquelas em que o resultado da interação entre as duas substâncias é a soma de seus efeitos. No antagonismo o efeito obtido é menor do que esperado para a resposta aditiva e no sinergismo a eficácia combinada é maior do que o efeito aditivo (CAESAR; CECH, 2019; EFFERTH; KOCH, 2010). Objetivando retratar quantitativamente o sinergismo entre compostos, o pesquisador Ting-Chao Chou, em conjunto com o professor Paul Talalay, desenvolveram o método Chou-Talalay. Este é baseado na equação de efeito mediano, derivada do princípio da Lei de Ação das Massas. Esta teoria fornece o elo entre uma única e várias entidades, utilizada para descrever fenômenos dinâmicos em química. O resultado do método Chou-Talalay gera um índice combinatório (CI), onde $CI=1$ representa efeito aditivo, $CI>1$ antagonismo e $CI<1$ sinergismo (CHOU, 2006, 2010).

O tratamento de câncer, historicamente, se deu por meio de quimioterápicos, porém com o passar do tempo, a experiência clínica, apoiada em modelos animais, mostrou que os fármacos citotóxicos são mais eficazes quando administrados em combinação, com efeitos aditivos ou sinérgicos (DEVITA; YOUNG; CANELLOS, 1975). A co-administração de medicamentos tem permitido, portanto, superar os mecanismos de resistência em regimes terapêuticos mais seguros e eficazes (AL-LAZIKANI; BANERJI; WORKMAN, 2012).

A primeira experiência bem sucedida com a combinação de fármacos foi alcançada com a co-administração de metotrexato (inibidor do metabolismo do ácido fólico), vincristina (inibidor de tubulina), 6-mercaptopurina (inibidor da síntese de nucleotídeos purina) e o agente esteróide prednisona para tratamento da leucemia linfoblástica aguda infantil (CHABNER; ROBERTS, 2005). Desde então, a combinação de diversas classes de drogas vem sendo estudadas e testadas a fim de encontrar uma terapia combinada racional que solucione os desafios encontrados durante o tratamento do câncer (AL-LAZIKANI; BANERJI; WORKMAN, 2012).

Combinações de medicamentos também é uma realidade para o tratamento do CaP, inclusive associando quimioterápicos a PNs. Piska e colaboradores (2019) demonstraram que o quimioterápico Doxorrubicina em conjunto com a piperlongumina, um alcaloíde extraído de *Piper longum* L. apresentou efeito antiproliferativo e proapoptótico sinérgico na linhagem celular de CaP DU-145 (PISKA *et al.*, 2019). A coadministração de curcumina e DOC foi eficaz na sensibilização de células de CaP ao taxano. Verificou-se uma maior atividade terapêutica com redução de efeitos adversos (BANERJEE *et al.*, 2017; TAN; NORHAIZAN, 2019).

Outras classes de agentes também já foram combinadas com DOC em estudos de fase II em CRPC, incluindo inibidores de tirosina quinase, agentes antiangiogênicos, inibidores de Bcl-2 e análogos de vitamina D com regressão tumoral, diminuição dos níveis de PSA e aumento de sobrevida (GALSKY; VOGELZANG, 2010). As respostas obtidas a partir destes estudos demonstram que estratégias de compostos combinados com o DOC são promissoras, com redução de efeitos adversos e aumento da eficácia do tratamento

Diante disso, a associação do DOC ao 4-NC ou ao PTL pode ser uma estratégia eficaz para o tratamento do CaP. Nossa grupo de pesquisa já demonstrou a capacidade do 4-NC em ativar, em células CRPC, a apoptose, além de inibir o ciclo celular, efeitos possivelmente aditivos ao mecanismo de ação do DOC. O 4-NC se mostrou capaz, também, em modular genes associados a EMT, angiogênese e hipóxia (CORDEIRO, 2019), eventos fortemente relacionados à resistência das células tumorais ao DOC. Portanto, a ação conjunta de DOC e 4-NC pode reverter a agressividade de células CRPC, modulando a EMT. O PTL também já foi associado ao controle da EMT (LI *et al.*, 2018), e possui ação citotóxica em linhagens de CaP por meio da inibição do NF-κB (SUN *et al.*, 2007), sendo potencialmente passível de ser combinado ao 4-NC e DOC, no tratamento do CRPC.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade sinérgica entre as substâncias naturais puras 4-NC e PTL e o quimioterápico DOC no controle de mecanismos oncogênicos associados ao Câncer de Próstata.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos 4-NC, PTL e DOC em linhagens prostáticas;
- Definir o IC₅₀ e a seletividade dos compostos a células tumorais prostáticas;
- Comparar os resultados obtidos com o DOC, um fármaco rotineiramente utilizado no tratamento oncológico.
- Avaliar o efeito sinérgico dos compostos em linhagens prostáticas;
- Determinar o efeito dos tratamentos isolados e sinérgicos na morte celular de células prostáticas;
- Avaliar o efeito do sinergismo em modular a EMT em células CRPC;
- Análise da autofagia dos tratamentos isolados e combinados em células CRPC.

3 METODOLOGIA

3.1. Obtenção dos compostos e linhagens celulares

O 4-NC foi isolado do extrato hexânico das raízes de *P. umbellata* e o PTL isolado do extrato clorofórmico das partes aéreas da espécie *Tanacetum vulgare*, ambos gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho do laboratório de Núcleo de Identificação e Pesquisa de Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Universidade Federal de Juiz de Fora. As substâncias naturais 4-NC e PTL foram diluídas em DMSO. O estudo, atendendo à regulamentação vigente (Lei Federal número 13.123/2015 de Acesso ao Patrimônio Genético), foi registrado sob o número A5BD484. O quimioterápico DOC (Glenmark) foi doado pelo Hospital do Câncer da Universidade Federal de Uberlândia.

As linhagens celulares prostáticas utilizadas nesse estudo foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC), incluindo um modelo não-tumorigênico RWPE-01, uma linhagem tumoral hormônio-dependente LNCaP e uma linhagem de CRPC PC3. As células RWPE-01 foram cultivadas em meio de cultivo de queratinócitos enriquecido com extrato de pituária bovina (1 μ g/mL), EGF humano recombinante (5 ng/mL) e 100 mg/mL do antibiótico Sulfato de Gentamicina. As células 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 as linhagens foram mantidas a 37° C em incubadora úmida com ambiente controlado contendo 5% de CO₂, até atingirem 90% de confluência. Todas foram autenticadas por STR (*Short Tandem Repeats*) e a contaminação por micoplasma foi avaliada mensalmente por PCR, realizada com os sobrenadantes de cada linhagem celular em cultivo.

3.2. Citotoxicidade

A viabilidade das células tratadas com os compostos foi determinada a partir do ensaio de Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), conforme descrito por MOSMANN (1983) com modificações. Após a confluência, as células foram desagregadas enzimaticamente e centrifugadas por 5 min a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1 mL de meio de cultura e contadas utilizando o reagente azul de tripano. Foram, então, semeadas 1,5 x 10⁴ células em cada poço das placas de 96 poços mantidas em meio adequado a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas para aderência. Transcorrido esse período,

os compostos DOC e 4-NC foram adicionados isoladamente em diluição seriada de 200 μ M a 1,562 μ M e o composto PTL de 2000 μ M a 15,62 μ M por 24 e 48 horas. Em cada placa foram incluídos o controle negativo de morte (meio de cultura sem tratamento), o controle do diluente (DMSO) e o branco (poços com apenas o meio de cultura correspondente).

Após cada período de incubação o tratamento foi retirado e 100 μ l de um novo meio com MTT a 5 mg/mL foi adicionado e mantido por 4 horas. Em seguida, foram pipetados 50 μ l de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%/N-dimetil-formamida 50% em cada poço e as placas mantidas por 16 horas, para a metabolização, pelas células vivas, do composto em cristais de formazan. Finalmente, foi realizada a leitura da absorbância (Abs) em espectrofotômetro (*Multiskan GO*) no comprimento de onda de 570 nm. Os valores da viabilidade celular foram expressos em percentagem de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Abs Tratamento} - \text{Abs Branco}}{\text{Abs Controle DMSO} - \text{Abs Branco}} \times 100$$

As doses necessárias para inibir 50% da viabilidade celular (IC₅₀) foram calculadas por regressão não linear utilizando o programa GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

3.3. Análises de Interação

Para a análise de interação (sinergismo, antagonismo ou interações de aditividade) entre o 4-NC, PTL e DOC foi adotado o método Chou-Talalay (CHOU, 2010) com combinações binárias dos compostos em estilo *checkerboard*. Foram realizadas diluições seriadas com sete concentrações de cada substância iniciadas a partir do dobro do valor do IC₅₀ obtido para cada linhagem celular de CaP (LNCaP e PC3) e todas as concentrações foram combinadas entre si. Os efeitos citotóxicos, avaliados pelo método MTT conforme previamente descrito, foram determinados após um período de incubação de 24 e 48 horas. As melhores combinações foram testadas para a linhagem não-tumorigênica RWPE-01, a fim de se verificar a seletividade dos tratamentos.

3.4. Ensaio de Apoptose/Necrose

As linhagens celulares RWPE-01 e PC3 foram semeadas em placas de 6 poços, contendo 5×10^4 células por poço. Os tratamentos, realizados por 48 horas, foram assim definidos: (i) 30,76 μ M de 4-NC; (ii) 3,41 μ M de DOC e (iii) 30,76 μ M 4-NC + 3,41 de DOC conforme os efeitos sinérgicos observados. Foram incluídos no experimento o controle negativo com apenas células (sem tratamento), o controle com diluente (DMSO) e o controle positivo de morte (tratadas com H₂O₂ 6%). Após o tratamento, as placas foram lavadas com PBS 1X, as células desagregadas enzimaticamente e transferidas para novos microtubos. Após uma centrifugação de 5 minutos a 1.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado duas vezes com PBS 1X. Ao final dessa etapa, as células precipitadas foram ressuspensas em Tampão de Ligação para Anexina V (10X) diluído 1:10 em água destilada. Em seguida, foram adicionados em cada tubo 5 μ L de Anexina V-PE e 5 μ L de 7AAD (*7-Amino-Actinomycin*) (Kit AnexinaV/7AAD - BD Pharmingen TM), mantidos por 15 minutos ao abrigo da luz para posterior quantificação da fluorescência em citômetro BD *AccuriCytometers*. Os dados foram analisados utilizando o programa *FlowJo* (Tree Star, Inc) (HERAULT *et al.*, 1999).

3.5 Autofagia

As linhagens RWPE-01 e PC3 foram semeadas em placas de 24 poços contendo 1×10^4 células por poço. Os tratamentos foram definidos de acordo com o ensaio de interação, sendo: (i) 30,76 μ M de 4-NC; (ii) 3,41 μ M de DOC e (iii) 30,76 μ M 4-NC + 3,41 de DOC e realizados por 48 horas.

Após o período de tratamento, foi adicionado o Laranja de Acridina na concentração final de 1 μ g/uL por poço, mantido por 15 min à temperatura ambiente. As células foram, então, lavadas com PBS1X, fixadas com paraformaldeído 4% tamponado com pH 7,2 e lavadas com glicina 0.4%. As fotos das colorações foram capturadas em microscópio óptico de fluorescência (EVOS FL) (THOMÉ *et al.*, 2016).

3.5. Marcadores de EMT

Para analisar a expressão de marcadores epiteliais (EPCAM e E-caderina) e mesenquimais (N-caderina e Vimentina), característicos do processo de EMT, as células da linhagem CRPC PC3 foram semeadas em garrafas T25 contendo 1×10^6 células tratadas com $30,76\mu\text{M}$ de 4-NC; $3,41\mu\text{M}$ de DOC e $30,76\mu\text{M}$ 4-NC + $3,41\mu\text{M}$ de DOC por 48 horas. Após o período de tratamento foram desagregadas enzimaticamente, lavadas com PBS 1X e fixadas e permeabilizadas usando o kit Cytofix/CytopermTM (BD Pharmingen, San Jose, CA, EUA). Subsequentemente, as células foram coradas com anti-CD326-humano (EPCAM) (1:200, *BioLegend*); anti-E-caderina (1:100, *Thermo Fisher Scientific*); anti-N-caderina (1: 100; *Life Technologies*), anti-Vimentina (1:100, *Sigma-Aldrich*). Para controle de isotipo da E-caderina e N-caderina foi utilizado o Alexa FluorTM 546 goat anti-mouse IgG (1:200, *Thermo Fisher Scientific*); para EPCAM o isotipo APC mouse IgG (1:200, *BioLegend*) e para Vimentina o isotipo Alexa FluorTM 488 goat anti-mouse IgG (1:200, *Thermo Fisher Scientific*). A coloração celular foi analisada por citometria de fluxo (Accuri C6, BD Pharmingen) (MOTA *et al.*, 2020).

3.6. Análises Estatísticas

Os dados obtidos foram avaliados utilizando o programa *GraphPad Prism 7* (*GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA). Para cada ensaio, foram conduzidos três experimentos independentes ($n=3$) todos em triplicata e os resultados expressos como média ± desvio padrão. Após confirmação da distribuição normal dos dados, as médias dos diferentes tratamentos foram comparadas pelo teste *one-way* ANOVA seguida pelo pós-teste de Tukey. Foram consideradas diferenças estatisticamente significantes quando $p<0,05$.

Para definição do índice de combinação (CI) entre os compostos foi utilizado o software *CompuSyn* (ComboSyn, Inc., Paramus, NJ), em que $\text{CI} < 1$ foi considerado efeito sinérgico, $\text{CI} = 1$ foi avaliado como efeito aditivo e $\text{CI} > 1$ como efeito antagônico (CHOU, 2006).

4 RESULTADOS

4.1. Efeito do 4-NC, PTL e DOC sobre células prostáticas

Um ensaio inicial de MTT foi realizado para avaliar a citotoxicidade de cada um dos compostos isolados sobre as células prostáticas. A Figura 5A demonstra o comportamento celular após tratamento com o 4-NC, em que se observa a diminuição da viabilidade da linhagem CRPC (PC3) conforme já demonstrado por nosso grupo de pesquisa (CORDEIRO, 2019). De fato, no presente estudo, a linhagem PC3 tratada com 4-NC a 50 μ M por 24 e 48 horas teve sua viabilidade reduzida significativamente quando comparada à linhagem RWPE-01. Contudo, no maior tempo, observou-se também um maior impacto sobre as células não-tumorigênicas.

Para o tratamento com PTL (Figura 5B) foram necessárias concentrações elevadas desse PN para que pudesse ser observada sua citotoxicidade. As células RWPE-01 e PC3 foram sensíveis ao tratamento, sendo as LNCaP pouco responsivas. Estas, mesmo na maior concentração da substância (2000 μ M), apresentou viabilidade de 18,6% após 24 horas.

Já o DOC (Figura 5C) comprometeu a viabilidade das linhagens tumorais apenas nas duas maiores concentrações (100 μ M e 200 μ M) em ambos os tempos de tratamento. Após 48 horas, demonstrou pouca seletividade e, mesmo na menor concentração utilizada, a droga reduziu em 66,6% a viabilidade da linhagem RWPE-01.

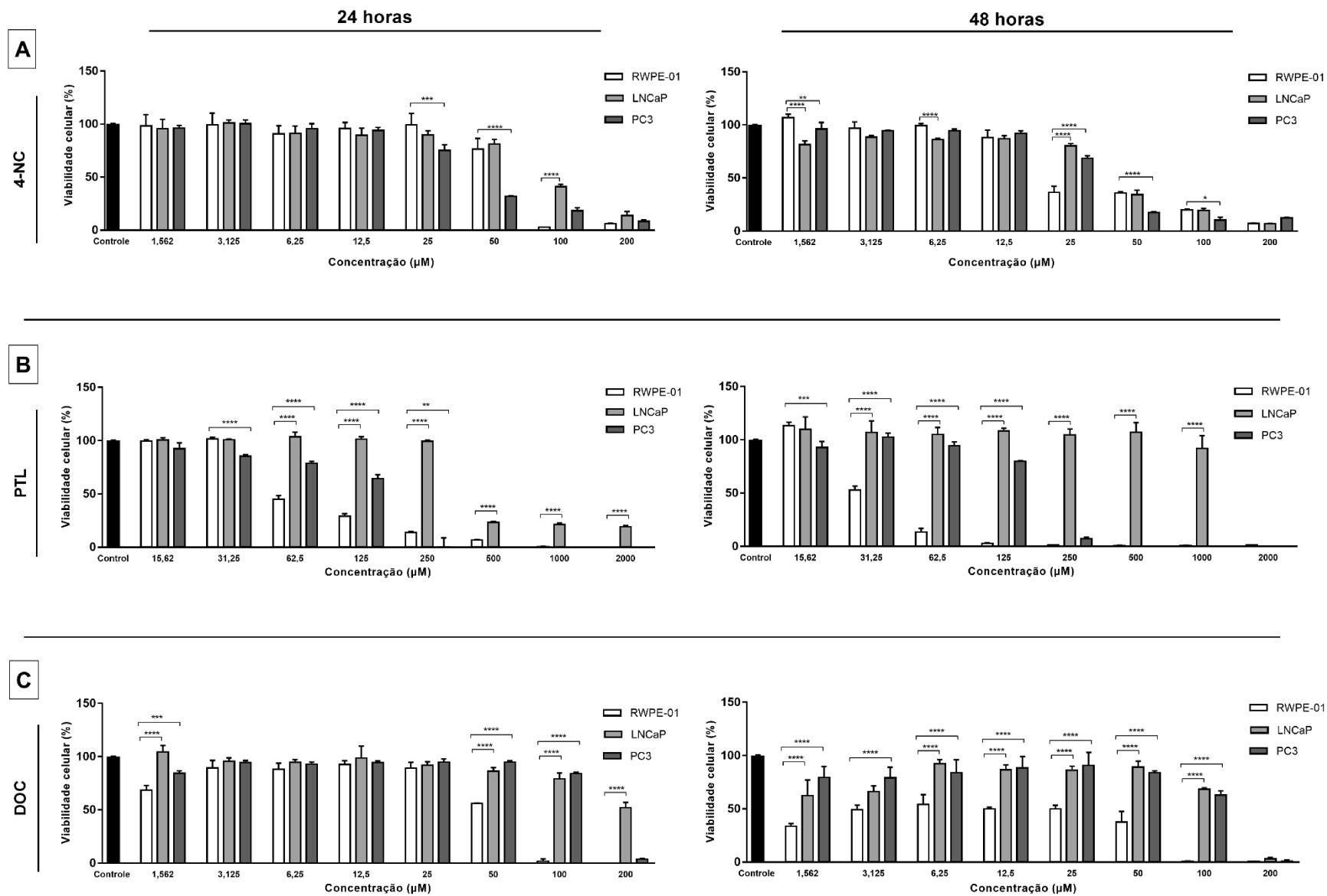


Figura 5 Efeito citotóxico de diferentes compostos sobre células prostáticas. Em (A) tratamento com 4-NC (4-nerolidilcatecol), em (B) com PTL (Partenolido) e em (C) com o quimioterápico DOC (Docetaxel). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente e controle negativo. A linhagem celular não-tumorigênica RWPE-01 e as tumorais LNCaP (hormônio responsiva) e PC3 (resistente à castração) foram tratadas com oito concentrações diferentes por 24 e 48 horas. Os resultados estão apresentados como Média ± Desvio Padrão de três experimentos independentes para cada tratamento ($n=3$) e a significância avaliada pelo teste *one way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,005$, *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

A partir dos dados de viabilidade foi calculado o IC_{50} de cada composto (Tabela 1). Isoladamente, cada um foi mais seletivo à linhagem PC3, quando comparados à LNCaP, destacando-se o PTL. Contudo, a linhagem RWPE-01 também foi sensível aos tratamentos, demandando a necessidade de se expandir desenhos experimentais, alicerçados em ensaios que visam a redução da dose e, consequentemente, da toxicidade associada.

Tabela 1 Doses necessárias dos compostos 4-NC (4-nerolidilcatecol), PTL (Partenolido) e DOC (Docetaxel) para inibir 50% da viabilidade (IC_{50}) das linhagens prostáticas não tumorigênica RWPE-01, tumoral hormônio responsiva LNCaP e tumoral resistente à castração PC3. Os valores foram calculados após 24 e 48 horas de tratamento por regressão não linear.

	Tratamento	RWPE-01	LNCaP	PC3
24 horas	4-NC	51,93 μM	75,25 μM	45,22 μM
	PTL	54,64 μM	380,8 μM	52,91 μM
	DOC	51,75 μM	228,3 μM	126,7 μM
48 horas	4-NC	14,45 μM	43,06 μM	30,76 μM
	PTL	26,82 μM	688,3 μM	163 μM
	DOC	2,795 μM	115,1 μM	109,2 μM

4.2. Avaliação dos efeitos sinérgicos entre os compostos 4-NC, PTL e DOC sobre linhagens tumorais prostáticas

Visando otimizar o controle de células tumorais, especialmente modelos de CRPC, mediado pelos diferentes compostos, incluindo um quimioterápico já utilizado na rotina clínica, realizamos ensaios de interação para, assim, determinar sinergismo seletivo com menores doses sem detimento da eficácia. Tratamentos isolados e binários foram conduzidos por 24 e 48 horas com concentrações definidas a partir do dobro do IC_{50} obtido para as linhagens tumorais, resultando em 49 combinações para cada substância. Os dados foram interpretados pelo

software *CompuSyn* (Figura 6). Essa avaliação permitiu determinar efeitos sinérgicos, aditivos ou antagonistas de acordo com o método Chou-Talalay (CHOU, 2006).

Nas combinações com PTL, tanto para o 4-NC quanto para o DOC, em todos os tempos analisados e nas linhagens LNCaP e PC3, não foi possível observar efeitos superiores aos tratamentos isolados (Figura 6A, 6B) com índices combinatórios superiores a 1 o que sugere prevalência da ação dos compostos isoladamente, sem qualquer benefício antitumoral decorrente de sua interação.

A combinação entre o 4-NC e o quimioterápico DOC apresentou atividades distintas entre as linhagens tumorais tratadas sugerindo um papel singular conforme a evolução da doença. Para a LNCaP (Figura 6A), o 4-NC e DOC não foram sinérgicos nem aditivos com CI médio de 1,26 para 24 horas e 2,07 para 48 horas. Porém, para as células CRPC PC3 (Figura 6B), após 48 horas de tratamento o CI foi 0,90, indicando sinergismo entre os compostos.

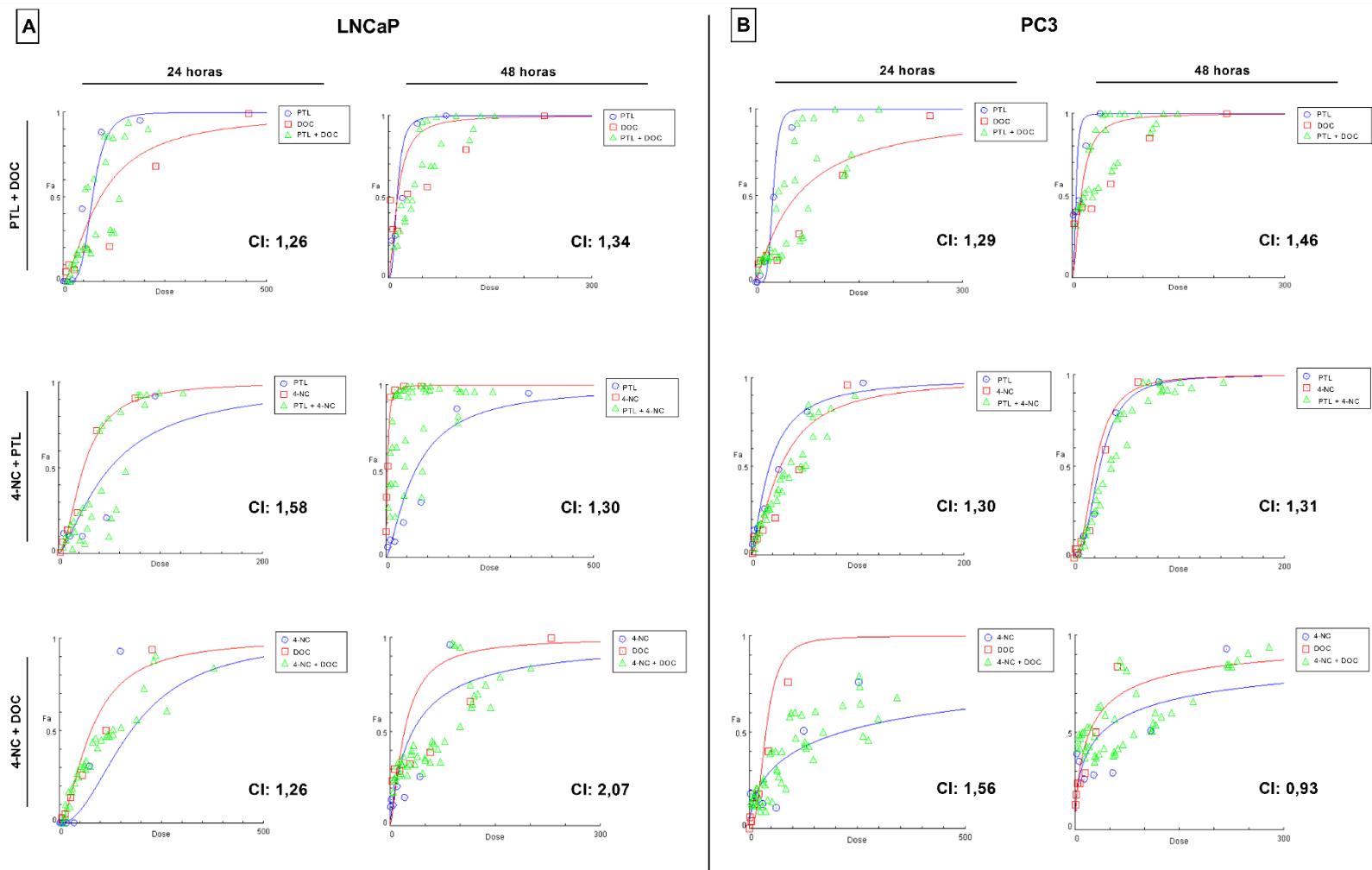


Figura 6 Relação concentração x efeito (Fa) referente à interação entre os compostos 4-NC (4-nerolidilcatecol), Partenolido (PTL) e DOC (Docetaxel) com representação do valor médio do Índice Combinatório (CI). A curva referente à atividade de cada composto isolado está representada em vermelho ou azul e a combinação em pontos verdes. Foram executados três experimentos independentes em triplicata ($n=3$) por 24 e 48 horas nas linhagens prostáticas tumorais LNCaP (A) e PC3 (B). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente e controle negativo. Os tratamentos foram avaliados utilizando o MTT e os resultados analisados pelo algoritmo do método Chou-Talalay.

Considerando que na linhagem PC3 apenas o tratamento concomitante de 4-NC e DOC demonstrou sinergismo, na Tabela 2 está representado o efeito antiproliferativo (% de inibição) observado em cada combinação e o tipo de interação destacada em azul como sinérgica, amarelo como aditiva e vermelho como antagonista. É possível notar que as menores concentrações ($3,41\mu M$, $6,83\mu M$ e $13,65\mu M$) e a maior ($218,4\mu M$) de DOC foram as que se mostraram, de fato, sinérgicas. A menor concentração do DOC ($3,41\mu M$) associada às seis primeiras concentrações de 4-NC demonstraram percentagem de inibição de 25% a 99%.

Tabela 2 Efeito antiproliferativo apresentado em % da combinação entre os compostos 4-NC (4-nerolidilcatecol) e DOC (Docetaxel) após 48 horas de tratamento da linhagem PC3. As combinações sinérgicas ($CI<1$) estão destacadas em azul, as aditivas ($CI=1$) em amarelo e as antagonistas ($CI>1$) em vermelho. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente e controle negativo. Os tratamentos foram avaliados utilizando o MTT e os resultados analisados pelo algoritmo do método Chou-Talalay.

		4-NC						
		0,96 μM	1,92 μM	3,85 μM	7,69 μM	15,38 μM	30,76 μM	61,52 μM
DOC	3,41 μM	25%	30%	34%	49%	75%	99%	95%
	6,83 μM	28%	30%	33%	46%	78%	99%	96%
	13,65 μM	30%	35%	34%	45%	62%	97%	97%
	27,3 μM	35%	38%	37%	39%	42%	57%	70%
	54,6 μM	38%	40%	39%	42%	44%	49%	60%
	109,2 μM	51%	51%	55%	54%	58%	60%	66%
	218,4 μM	85%	84%	85%	84%	87%	91%	94%

Os tratamentos com a maior concentração de DOC conduziram a uma expressiva redução na viabilidade da linhagem PC3. Contudo, os ensaios iniciais já demonstraram a citotoxicidade do quimioterápico à linhagem não-tumorigênica. Portanto, a seletividade das concentrações sinérgicas de 4-NC e DOC foram avaliadas na linhagem não-tumorigênica RWPE-01 após 48 horas de tratamento. Foram incluídas, nesse experimento, apenas as três menores concentrações de DOC ($3,41\mu M$, $6,83\mu M$ e $13,65\mu M$), uma vez que a citotoxicidade da droga à RWPE-01 poderia conduzir a uma diminuição da viabilidade decorrente apenas do tratamento isolado com o quimioterápico. Foram, portanto, realizados tratamentos concomitantes dessas três concentrações de DOC com as sete concentrações do 4-NC utilizadas no ensaio de interação (Figura 7).

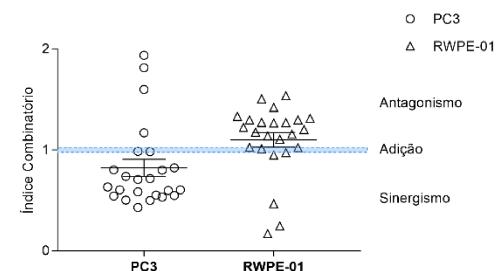
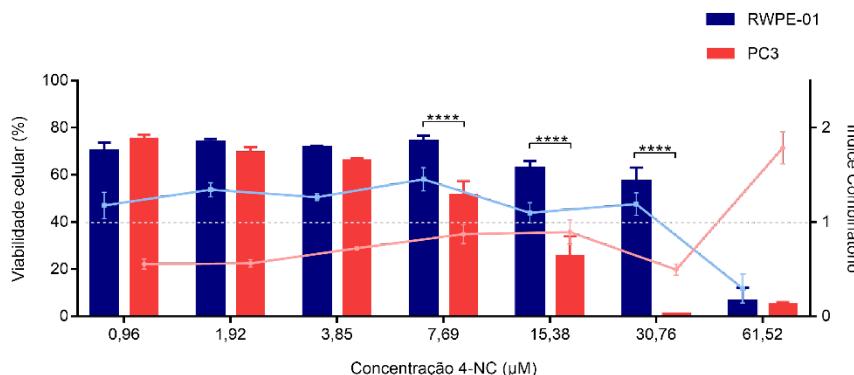
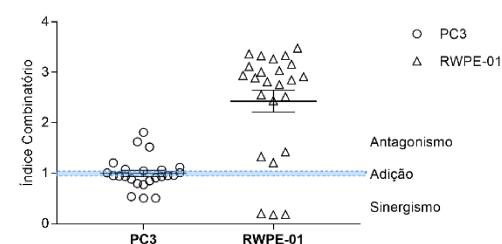
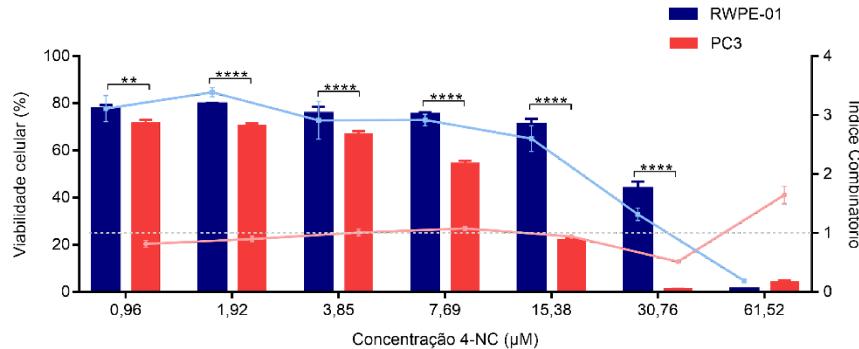
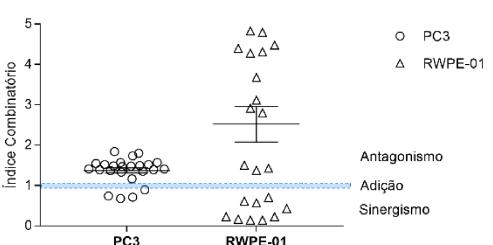
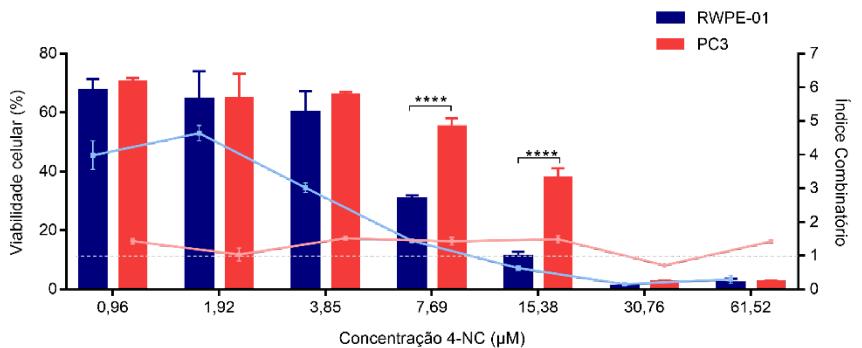
A**4NC + 3,41 μ M DOC****B****4NC + 6,83 μ M DOC****C****4NC + 13,65 μ M DOC**

Figura 7 Viabilidade celular relativa ao tratamento combinado do 4-NC (4-nerolidilcatecol) e do quimioterápico DOC (Docetaxel) por 48 horas. Sete diferentes concentrações do 4-NC (0,48 μ M a 61,52 μ M) foram combinadas a 3,41 μ M (A), 6,83 μ M (B) e 13,65 μ M (C) de DOC. O Índice Combinatório (CI) maior que 1 representa antagonismo entre os compostos, igual a 1 efeito aditivo e menor que 1 sinergismo definido pelo algoritmo do método Chou-Talalay. Os círculos representam CIs individuais em concentrações específicas de 4-NC e DOC em um intervalo de inibição de crescimento de 25-75%. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente e controle negativo. Os resultados estão apresentados como Média \pm Desvio Padrão de três experimentos independentes ($n=3$) realizados em triplicata para cada tratamento avaliado por MTT. ** $p<0,005$, *** $p<0,0001$.

Quando 3,41 μM de DOC foi combinado a 30,76 μM do 4-NC foi evidente a resposta das linhagens PC3 ao tratamento, ao passo que a viabilidade das células RWPE-01 foi mantida, com CI<1 para PC3 e CI>1 para a RWPE-01 (Figura 7A). Apesar de antagonismo expressivo poder conduzir à morte celular (CAESAR; CECH, 2019), isso não ocorreu nos tratamentos realizados evidenciando a capacidade da combinação do tratamento em controlar de maneira específica células CRPC.

Com a concentração de 6,83 μM de DOC já foi possível visualizar o sinergismo contra a linhagem CRPC, acompanhado por uma mudança na dispersão dos valores do CI (Figura 7B). Já a concentração mais alta de DOC (13,65 μM) foi sinérgica às células não-tumorigênicas quando aliada a concentrações mais altas do 4-NC, diminuindo sua viabilidade de forma significativa em combinações que não afetavam a linhagem tumoral (Figura 7C).

Portanto, os efeitos celulares desejados com maior citotoxicidade à linhagem PC3 mantendo a viabilidade da RWPE-01 foi alcançada com 30,76 μM do 4-NC aliado à menor concentração de DOC (3,41 μM). De fato, o aumento nas concentrações de DOC conduziram a uma diminuição da viabilidade da RWPE-01 o que sugere sua prevalência nos efeitos citotóxicos observados na linhagem não-tumorigênica. Importante destacar que os valores 30,76 μM do 4-NC aliado a 3,41 μM de DOC são inferiores ao IC₅₀ dos compostos isolados evidenciando os benefícios do sinergismo no controle do CRPC, conhecido por sua agressividade e capacidade de desenvolver resistência aos tratamentos utilizados (CHANDRASEKAR *et al.*, 2015).

4.3. Indução de apoptose pela combinação do 4-NC e DOC em células CRPC

Um ensaio comparativo de apoptose foi realizado a fim de demonstrar um aumento na morte de células CRPC mediado pela interação sinérgica entre 4-NC e DOC. A marcação de Anexina V foi avaliada, uma vez que a externalização do fosfolipídio de membrana fosfatidilserina é uma das primeiras mudanças que ocorrem durante o processo apoptótico (VAN ENGELAND *et al.*, 1998). As concentrações testadas foram de 30,76 μ M de 4-NC e 3,41 μ M de DOC, sinérgicas no controle da PC3 sem afetar significativamente a viabilidade da RWPE-01. Os compostos foram testados isoladamente e em conjunto, os resultados foram obtidos após 48 horas do tratamento.

Nenhum efeito significativo foi identificado para a linhagem RWPE-01, comparando-se os resultados com o controle de tratamento com apenas diluente (Figura 8A). Para a linhagem PC3, o tratamento isolado com DOC conduziu à morte de 52,9% das células, significativamente superior ao tratamento isolado com 4-NC (com 35,9% de morte). Contudo, a combinação de 4-NC com DOC conduziu à morte de 70,4% das células PC3, o qual se mostrou superior ao tratamento isolado de ambos compostos ($p<0,05$) (Figura 8B).

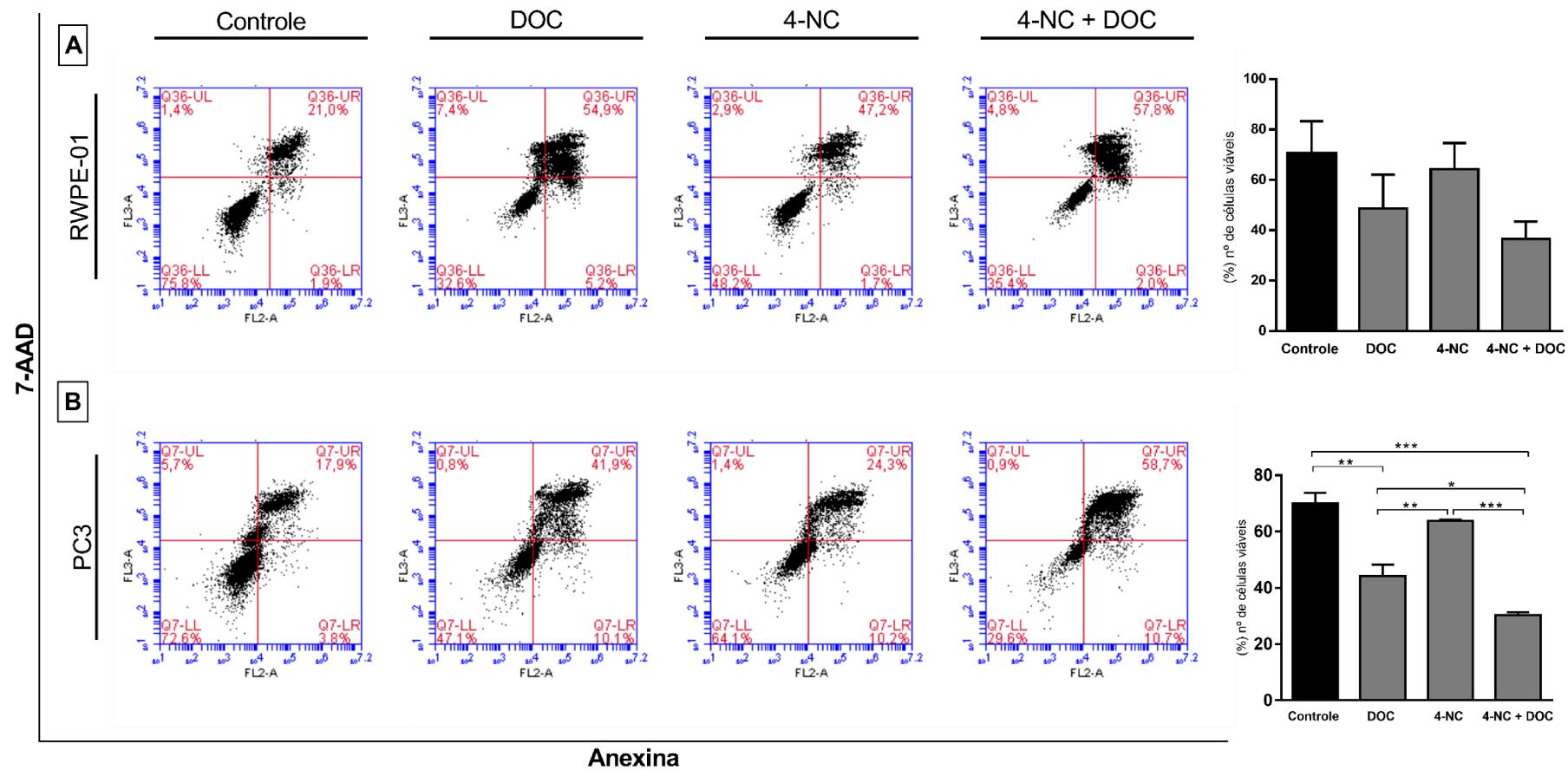


Figura 8 Indução de apoptose mediada pela combinação sinérgica de 30,76 μ M 4-NC com 3,41 μ M de DOC sobre as células prostáticas RWPE-01 (não-tumorigênica) e PC3 (tumoral resistente à castração). A análise de citometria de fluxo foi realizada após 48 horas de tratamento com os compostos isolados e combinados. As figuras representativas mostram a marcação com Anexina V e 7-AAD. Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente e controle negativo. Os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes ($n=3$) realizados em triplicata. A significância foi avaliada pelo teste *one way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. ** $p<0,005$; *** $p<0,001$. 4-NC: 4-nerolidilcatecol; DOC: Docetaxel.

4.4. Promoção de autofagia mediada pelo tratamento do 4-NC e DOC em células CRPC

A autofagia é um processo de degradação intracelular, amplamente distribuído entre os organismos eucariotos, responsável pela degradação de proteínas e organelas envelhecidas. Esse processo é caracterizado morfologicamente por uma célula com núcleo intacto onde os constituintes citoplasmáticos são sequestrados em organelas de dupla membrana denominados autofagossomos que posteriormente se fundem com os lisossomos onde ocorre a degradação do conteúdo que foi autofagocitado pelas hidrolases ácidas. (SHIN; KIM; PARK, 2012). Existem evidências de que a autofagia desempenha um papel importante na regulação da sobrevivência de células malignas (KONDO et al., 2005).

Para avaliar o impacto do tratamento sinérgico entre o composto 4-NC sob a autofagia na linhagem CRPC PC3 foi realizado o ensaio com laranja de acridina para identificação da formação de autofagossomos pelo tratamento com $30,76\mu M$ de 4-NC e $3,41\mu M$ de DOC por 48 horas. A coloração com Laranja de acridina permite a visualização do citoplasma e do núcleo, que fluorescem em verde ao entrar na célula, e ao ficar retido em compartimentos ácidos sua fluorescência torna-se vermelha, (como autofagossomos) que pela promoção de uma mudança metacromática do reagente, que passa a apresentar fluorescência em vermelho brilhante ou laranja-avermelhado (THOMÉ et al., 2016).

As fotos capturadas em microscópio óptico de fluorescência (EVOS FL) permitiram a visualização de células com a presença de autofagossomos ácidos em vermelho (Figura 9) nos tratamentos com os compostos isolados e combinados, indicando a indução de autofagia mediada pelos tratamentos em células PC3.

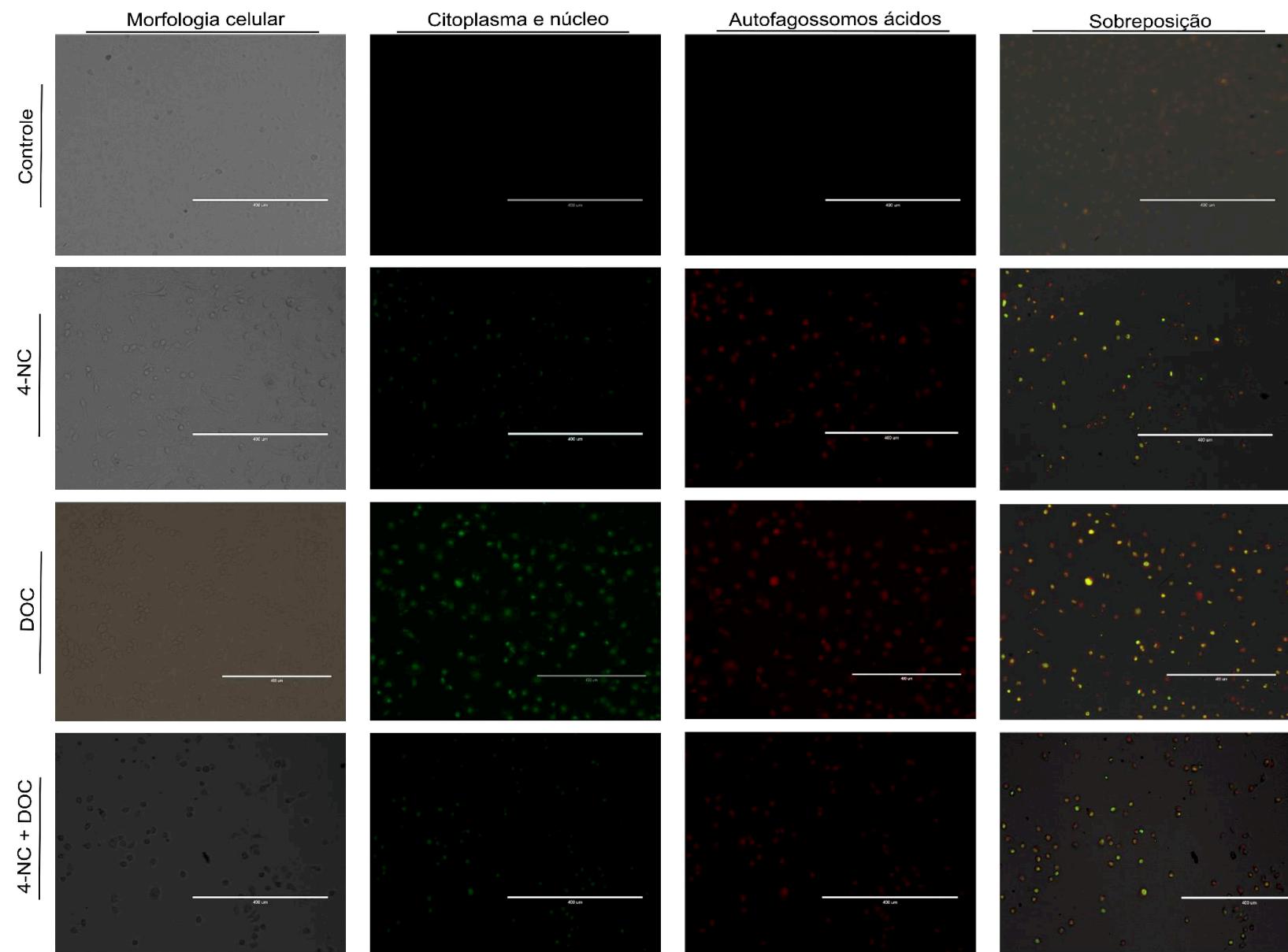


Figura 9 Presença de autofagossomos em células PC3 induzidos pelo tratamento com 30,76 μ M de 4-NC (4-nerolidilcatecol) e 3,41 μ M do quimioterápico DOC (Docetaxel) por 48 horas. Foi utilizada laranja de acridina para a detecção dos autofagossomos. Em verde (GFP), citoplasma e núcleo. Em vermelho brilhante ou laranja-vermelhado (RFP), compartimentos ácidos. Fotos capturadas em microscópio óptico de fluorescência com aumento de 10x.

4.5. Citometria de fluxo de marcadores moleculares de EMT em linhagem CRPC

A EMT é conhecidamente um mecanismo relacionado à invasão e metástase de tumores, incluindo CRPC (LI *et al.*, 2016; SUH *et al.*, 2014). A avaliação da expressão aberrante de seus marcadores sugere alterações estruturais nas células prostáticas com uma transição fenotípica dinâmica em que as células se tornam migratórias e agressivas (LIU *et al.*, 2015). Nesse contexto, a ação sinérgica de compostos terapêuticos se revela essencial em um efeito cooperativo na modulação dessas diferentes moléculas. Portanto, foi realizada a análise por citometria de fluxo dos marcadores epiteliais EPCAM e E-caderina e dos mesenquimais Vimentina e N-caderina após 48 horas de tratamento com a combinação de 30,76 μ M de 4-NC e 3,41 μ M de DOC, comparando-o com os efeitos mediados pelos compostos isolados.

Nota-se que ambos os compostos isolados aumentaram significativamente a expressão de EPCAM (Figura 10A) e E-caderina (Figura 10B) nas células PC3. Contudo, o efeito sinérgico se mostrou evidente, com uma maior expressão de EPCAM no tratamento combinado. Para a E-caderina, 4-NC+DOC aumentou a expressão do marcador comparado ao controle, sem diferença estatística em relação ao tratamento com 4-NC isolado.

Já a Vimentina (Figura 10C) foi modulada positivamente pelo 4-NC e Docetaxel isolados e, interessantemente, teve esse aumento de expressão significativamente diminuído quando o 4-NC foi associado à DOC. Finalmente, para a N-caderina (Figura 10D), não houve diferença estatística para o tratamento combinado quando comparado aos efeitos observados no controle.

Os resultados apresentados evidenciam que a EMT é um mecanismo modulado pela ação sinérgica entre o 4-NC e DOC, o qual promove o aumento da expressão de marcadores epiteliais e controla a transição das células CRPC para um fenótipo mesenquimal.

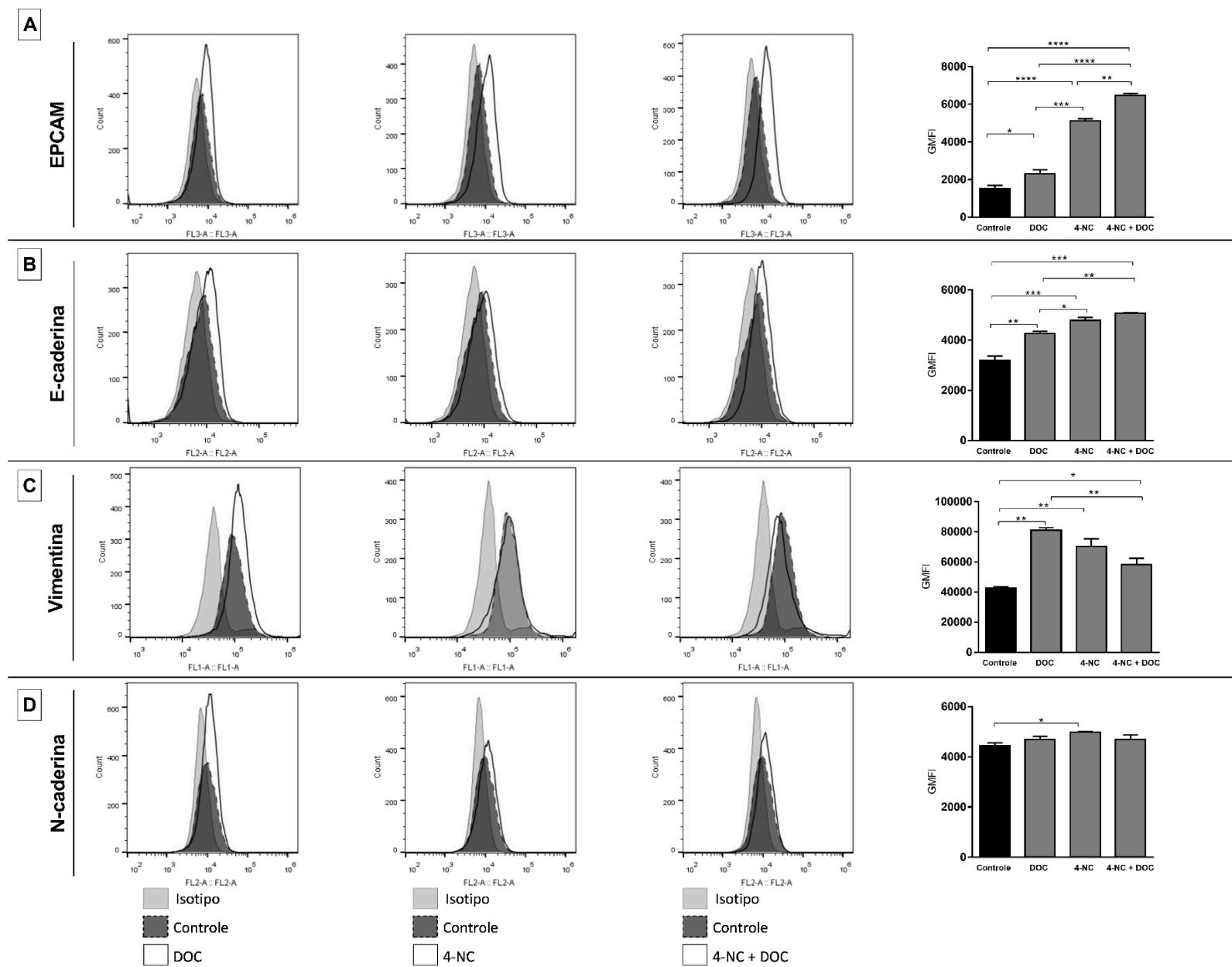


Figura 10 Análise em citometria de fluxo de marcadores moleculares relacionados à Transição Epitélio Mesenquimal na linhagem PC3. O tratamento foi conduzido por 48 horas com 4-NC (4-nerolidilcatecol) e DOC (Docetaxel) isolados e combinados ($30,76\mu M$ 4-NC com $3,41\mu M$ de DOC). Foi realizada uma compensação de valores com a intensidade de fluorescência média geométrica (GMFI) de cada marcador subtraído pelo GMFI do anticorpo secundário equivalente. Foram avaliadas a expressão dos marcadores epiteliais EPCAM (A) e E-caderina (B) e dos marcadores mesenquimais Vimentina (C) e N-caderina (D). Dimetilsulfóxido (DMSO) foi utilizado como diluente e controle negativo. Os resultados estão apresentados como Média \pm Desvio Padrão de três experimentos independentes ($n=3$) realizados em triplicata para cada tratamento. A significância foi avaliada pelo teste *one way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. * $p<0,05$, ** $p<0,005$, *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.

5 DISCUSSÃO

O CaP é o segundo câncer mais frequentemente diagnosticado em homens e representa um problema de saúde pública global. Pode evoluir de uma doença localizada e curável a uma forma grave e letal, caracterizada pela sinalização permanente do eixo androgênico, apesar dos bloqueios químicos e cirúrgicos de sua ativação (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020; WCRF, 2020). Para esses casos de CRPC, o tratamento envolve o uso de quimioterápicos como o Docetaxel. Este taxano, quando associado à TPA, aumenta significativamente a sobrevida dos pacientes (KYRIAKOPOULOS et al., 2018; JAMES et al., 2016). Entretanto, é responsável por efeitos adversos como anemia, infecção recorrente, neutropenia, retenção de líquidos, neuropatia sensorial, perda de cabelo, alterações nas unhas, enjo, diarreia, estomatite/faringite, distúrbios do paladar, vômito, anorexia, fadiga (TANNOCK et al., 2004; MOKBEL; WAZIR; MOKBEL, 2019). Adicionalmente, os quadros de resistência terapêutica comprometem sua eficácia, o que demanda a busca por novos e promissores compostos (CHHABRA et al., 2018). Nesse contexto, PN se destacam no controle do surgimento e progressão do câncer. Fitoquímicos são associados a menos efeitos colaterais (GIRI; LAKSHMI NARASU, 2000), além de serem capazes de inibir a proliferação celular, angiogênese e metástase, modular o sistema imunológico e induzir a apoptose e autofagia (DUTTA et al., 2019).

Contudo, para doenças complexas como o câncer, é imperativa a busca por desenhos terapêuticos alicerçados em sinergismo, com a possibilidade de bloqueio de diferentes alvos alvejando múltiplas subpopulações celulares (CHOU, 2006). Além disso, o sinergismo permite reduzir a dose administrada das drogas e atenuar a resistência aos medicamentos (CAESAR; CECH, 2019; CHOU, 2006; GOLDIN; MANTEL, 1957). No presente estudo, foi demonstrado o efeito sinérgico entre o DOC e o composto natural 4-NC, o qual possui propriedades antitumorais promissoras que necessitam ser amplamente exploradas no tratamento de CRPC.

Em um primeiro momento, foi avaliada a citotoxicidade do 4-NC, PTL e DOC isolados utilizando a linhagem PC3 como modelo para CRPC. Em consonância com dados já publicados, as células CRPC foram sensíveis aos três compostos (CHANDRASEKAR et al., 2015; CORDEIRO, 2019; KAWASAKI et al., 2009). Entretanto, a linhagem não tumorigênica RWPE-01 teve sua viabilidade comprometida, o que evidencia a não-seletividade do tratamento. Esse comportamento foi ainda mais evidente para o DOC. Além disso, foram utilizadas concentrações elevadas de PTL para que as células PC3 respondessem ao tratamento, o que sugere a necessidade de doses farmacologicamente desfavoráveis para a obtenção dos

resultados antitumorais desejados. Nesse contexto, ensaios de sinergismo se mostram interessantes ao possibilitarem redução de dose em desenhos clínicos otimizados para subtipos tumorais agressivos e geneticamente instáveis como o CRPC.

Nossos dados foram, então, analisados utilizando o software CompuSyn, para determinar quantitativamente o efeito líquido da combinação entre 4-NC, PTL e DOC usando a Equação CI, em que $CI < 1$, $= 1$ e > 1 representam interação sinérgica, aditiva e antagônica, respectivamente, conforme o método Chou-Talalay (CHOU, 2006, 2010; ELWAKEEL *et al.*, 2019; ROELL; REIF; MOTSINGER-REIF, 2017).

Para o PTL, nenhuma das combinações se mostrou sinérgica. Estudos demonstram que o DOC induz a atividade do NF- κ B em linhagens de CaP, como PC3 e DU-145, promovendo resistência ao quimioterápico (CODONY-SERVAT *et al.*, 2013; DOMINGO-DOMENECH *et al.*, 2006), por outro lado, o composto PTL age diretamente na inibição desta mesma via, indicada como um dos seus principais mecanismos antitumorais (MARINO *et al.*, 2019b). Portanto, esperava-se que a coadministração desses compostos induzisse à morte das células de CaP. Alguns estudos têm relatado um aumento significativo na sensibilidade de células tumorais ao paclitaxel quando combinado ao PTL (SOHMA *et al.*, 2011). Contudo, nossos resultados evidenciaram a resistência das células PC3 ao PTL e aspectos relacionados à parâmetros de solubilidade podem também ter interferido nos efeitos biológicos observados.

Quanto à ausência de sinergismo com o 4-NC, o mecanismo de ação do 4-NC ainda não está completamente elucidado, porém este já foi relacionado também a modulação do NF- κ B (CORTEZ *et al.*, 2015), de forma semelhante ao PTL. A sobreposição dos mecanismos pode ter resultado na inexistência de uma combinação sinérgica entre os PNs.

Já a interação entre 4-NC e DOC demonstrou efeito sinérgico para as células CRPC PC3 após 48 horas de tratamento, sendo antagônica para a LNCaP. Sugerimos que esta seja uma possível combinação para o tratamento de casos de CaP mais agressivos, não aplicável a tumores responsivos às drogas rotineiramente utilizadas para a privação androgênica.

O tempo de tratamento foi um fator determinante para a visualização dos efeitos na linhagem CRPC, este evento pode ser justificado pela necessidade de um tempo maior para que a modulação dos genes ocorra, assim como a metabolização das substâncias pelas células. O período de tratamento se mostra crucial, uma vez que substâncias com diferentes propriedades físico-químicas demonstram causar diferenças nos perfis de farmacocinética, e estudos já demonstram que a dificuldade em entrar em células tumorais na dose e proporção ideais limita o efeito sinérgico de fármacos combinados (LI *et al.*, 2019).

Dentro da combinação sinérgica encontrada, a associação do 4-NC com as menores concentrações de DOC apresentaram CI abaixo de 1 e foram eficazes e seletivos no controle da linhagem PC3. Altas doses de DOC estão associadas a inúmeros efeitos colaterais que podem impactar na qualidade de vida do paciente (BAKER *et al.*, 2009; HAMDAN *et al.*, 2019) e nossos ensaios de sinergismo alcançaram seu propósito de reduzir substancialmente a dose do quimioterápico, sem detimento da eficácia do tratamento.

O tratamento combinado com DOC vêm sendo amplamente estudado, uma vez que as opções para pacientes com CRPC são limitadas (GALSKY; VOGELZANG, 2010). Esse quimioterápico já foi associado a inibidores de tirosina quinase (LIN *et al.*, 2007; MATHEW *et al.*, 2007), agentes antiangiogênicos (DI LORENZO *et al.*, 2008; PICUS *et al.*, 2011), inibidores de Bcl-2 (CHI *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2009) e análogos da vitamina D (BANERJEE; CHATTERJEE, 2003). Combinações com PN também são promissoras. Sánchez e colaboradores demonstraram que DOC associado à capsaicina (componente ativo de espécies de pimenta) sinergicamente inibiu células de LNCaP e PC3 *in vitro* (SÁNCHEZ *et al.*, 2019). Já outro estudo em fase II avaliou a combinação de curcumina com DOC e prednisona em pacientes com CRPC, o qual aumentou a eficácia do tratamento, aumento da taxa de resposta, tolerabilidade e aceitabilidade do paciente (MAHAMMEDI *et al.*, 2016). Nossos resultados evidenciam que a combinação de DOC com 4-NC pode ser igualmente promissora.

O efeito sinérgico entre 4-NC e DOC foi, ainda, corroborado no ensaio de apoptose em que 30,76 μ M do 4-NC aliado à menor concentração de DOC (3,41 μ M) induziu uma maior percentagem de células PC3 à apoptose sem afetar significativamente a viabilidade da RWPE-01. Em melanoma, o 4-NC induz a parada do ciclo celular em G1, inibe a atividade de metaloproteases e a produção de ROS, aumenta os níveis de p53 (supressor tumoral) e Noxa (proteína pro-apoptótica) e promove o estresse do retículo endoplasmático (ALVES-FERNANDES *et al.*, 2019; BROHEM *et al.*, 2009; CORTEZ *et al.*, 2015b). O acúmulo de citocromo c e inibição da ciclina D1 também são relacionados ao efeito citotóxico do composto (BENFICA *et al.*, 2017; CORTEZ *et al.*, 2015b). No CaP, nosso grupo de pesquisa demonstrou a capacidade desse PN de induzir a apoptose, inibir o ciclo celular e modular genes associados a EMT, angiogênese e hipoxia (CORDEIRO, 2019). O DOC modifica o potencial da membrana mitocondrial interna liberando citocromo c, ativa caspases efetoras e conduz as células à apoptose (BHALLA, 2003). Essa droga promove a hiperestabilização dos microtúbulos, conduzindo a parada do ciclo celular na metáfase, comprometendo a mitose, além de afetar outras funções celulares que dependem da ação dos microtúbulos (MIKUŁA-PIETRASIK *et*

al., 2019; WEAVER, 2014), como a translocação do AR para o núcleo. Portanto, o DOC também inibe a atividade transcrecional do receptor (BAI; ZHANG; DONG, 2019).

A expressão de proteínas associadas à EMT também foi avaliada no presente estudo, de modo que o tratamento sinérgico foi capaz de aumentar significativamente a expressão de marcadores epiteliais quando comparado à ação dos produtos isolados. De fato, a avaliação das interações farmacodinâmicas dos compostos é necessária, uma vez que a combinação pode agir como uma terceira droga, cujo mecanismo pode diferir completamente das substâncias isoladas (CHOU, 2010; ELWAKEEL *et al.*, 2019). É importante ressaltar que dados recentes associaram a EMT a resistência à apoptose (DONGRE; WEINBERG, 2019) e os resultados aqui encontrados evidenciam a importância do tratamento combinado do 4-NC com DOC no controle de células CRPC. Por fim, nosso estudo fornece resultados experimentais baseados em experimentos de combinação *in vitro* demandando extensos estudos *in vivo* e ensaios clínicos subsequentes para comprovação de sua viabilidade e eficácia.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram o sinergismo entre o PN 4-NC e o quimioterápico DOC no controle de células CRPC, com redução de concentração e maior eficácia quando comparado ao tratamento das células com os compostos isolados. O tratamento combinado agiu seletivamente contra células PC3 promovendo apoptose e autofagia. Além disso, houve a modulação de marcadores EMT com o aumento na expressão de proteínas associados ao fenótipo epitelial (EPCAM e E-caderina). Nossos resultados subsidiam testes adicionais em modelos animais para a validação clínica e comprovação da segurança do tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOULNIK, Irina U. et al. Role of SRC-1 in the promotion of prostate cancer cell growth and tumor progression. **Cancer Research**, [S. l.], v. 65, n. 17, p. 7959-7967, 2005. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16140968>. Acesso em: 30 mar. 2020.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-3541>

AL-LAZIKANI, Bissan; BANERJI, Udai; WORKMAN, Paul. Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. [S. l.]: **Nat Biotechnol**, 2012. <https://doi.org/10.1038/nbt.2284>

ALLEMANI, Claudia et al. Global surveillance of cancer survival 1995-2009: Analysis of individual data for 25 676 887 patients from 279 population-based registries in 67 countries (CONCORD-2). **The Lancet**, [S. l.], v. 385, n. 9972, p. 977-1010, 2015.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62038-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62038-9)

ALVES-FERNANDES, Débora Kristina et al. ER stress promotes antitumor effects in BRAFi/MEKi resistant human melanoma induced by natural compound 4-nerolidylcathecol (4-NC). **Pharmacological Research**, [S. l.], v. 141, p. 63-72, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1043661818319716>. Acesso em: 27 mar. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.12.006>

ANASSI, Enock; NDEFO, Uche Anadu. Sipuleucel-T (Provenge) injection the first immunotherapy agent (Vaccine) for hormone-refractory prostate cancer. **P and T**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 197-202, 2011.

ATANASOV, Atanas G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. [S. l.]: Elsevier Inc., 2015.

ATTARD, G. et al. Improving the outcome of patients with castration-resistant prostate cancer through rational drug development. [S. l.]: Nature Publishing Group, 2006.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6603223>

BAI, Shanshan; ZHANG, Bryan; DONG, Yan. Impact of taxanes on androgen receptor signaling. [S. l.]: Wolters Kluwer Medknow Publications, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29900882/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

BAKER, Jackie et al. Docetaxel-related side effects and their management. **European Journal of Oncology Nursing**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 49-59, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19201649/>. Acesso em: 19 nov. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.ejon.2008.10.003>

BANERJEE, Pratik; CHATTERJEE, Malay. Antiproliferative role of vitamin D and its analogs - A brief overview. [S. l.: s. n.]

BANERJEE, Saswati et al. Combinatorial effect of curcumin with docetaxel modulates apoptotic and cell survival molecules in prostate cancer. **Frontiers in Bioscience - Elite**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 235-245, 2017. <https://doi.org/10.2741/e798>

BARGHASH ALANAZI, Abdullah et al. Epidemiology of senile prostatic enlargement

among elderly men in Arar, Kingdom of Saudi Arabia. **Electronic Physician**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 5349-5353, 2017. <https://doi.org/10.19082/5349>

BENFICA, Polyana Lopes 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**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 1899-1908, 2017. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1311351>

BHALLA, Kapil N. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. [S. l.]: **Nature Publishing Group**, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207233>

BHATTACHARYA, Suman et al. Development of enzalutamide for metastatic castration-resistant prostate cancer. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 1358, n. 1, p. 13-27, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26384731>. Acesso em: 4 maio. 2020. <https://doi.org/10.1111/nyas.12846>

BLAGOSKLONNY, Mikhail V. et al. Taxol-induced Apoptosis and Phosphorylation of Bcl-2 Protein Involves c-Raf-1 and Represents a Novel c-Raf-1 Signal Transduction Pathway. **Cancer Research**, [S. l.], v. 56, n. 8, p. 1851-1854, 1996.

BRAY, Freddie et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BROHEM, C. A. et al. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 111-119, 2009. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0887233308002749>. Acesso em: 27 mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.11.004>

CAESAR, Lindsay K.; CECH, Nadja B. Synergy and antagonism in natural product extracts: When 1 + 1 does not equal 2. **Natural Product Reports**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 869-888, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9NP00011A>

CAO, Subing; ZHAN, Yang; DONG, Yan. Emerging data on androgen receptor splice variants in prostate cancer. **Endocrine-Related Cancer**, [S. l.], v. 23, n. 12, p. T199-T210, 2016. <https://doi.org/10.1530/ERC-16-0298>

CAO, Yin; GIOVANNUCCI, Edward L. Alcohol as a Risk Factor for Cancer. **Seminars in Oncology Nursing**, [S. l.], v. 32, n. 3, p. 325-331, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2016.05.012>

CHABNER, Bruce A.; ROBERTS, Thomas G. Chemotherapy and the war on cancer. [S. l.]: **Nat Rev Cancer**, 2005. <https://doi.org/10.1038/nrc1529>

CHANDRASEKAR, Thenappan et al. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). **Translational Andrology and Urology**, [S. l.], v. 4, n. 3, p. 365-380, 2015.

CHARAS, Tomer; VARGAS, Alberto; ZELEFSKY, Michael J. Imaging and anatomic considerations for prostate and pelvic organs contouring. In: **Stereotactic Radiosurgery for Prostate**

Cancer. [S. l.]: Springer International Publishing, 2018. p. 55-73. https://doi.org/10.1007/978-3-319-92453-3_4

CHHABRA, Gagan et al. Prostate cancer chemoprevention by natural agents: Clinical evidence and potential implications. **Cancer Letters**, [S. l.], v. 422, p. 9-18, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29471004/>. Acesso em: 19 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.02.025>

CHI, K. N. et al. Mature results of a randomized phase II study of OGX-011 in combination with docetaxel/prednisone versus docetaxel/prednisone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 27, n. 15_suppl, p. 5012-5012, 2009. https://doi.org/10.1200/jco.2009.27.15_suppl.5012

CHISTIAKOV, Dimitry A. et al. New biomarkers for diagnosis and prognosis of localized prostate cancer. [S. l.]: Academic Press, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.semancer.2018.01.012>

CHOU, Ting Chao. **Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies**. [S. l.: s. n.] Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16968952>. Acesso em: 4 abr. 2020.

CHOU, Ting Chao. **Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method**. [S. l.: s. n.]

CODONY-SERVAT, Jordi et al. Nuclear factor-kappa B and interleukin-6 related docetaxel resistance in castration-resistant prostate cancer. **Prostate**, [S. l.], v. 73, n. 5, p. 512-521, 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23038213/>. Acesso em: 24 nov. 2020. <https://doi.org/10.1002/pros.22591>

CONTEDUCA, Vincenza et al. Plasma androgen receptor in prostate cancer. [S. l.]: MDPI AG, 2019.

CORDEIRO, Antonielle Oliveira. **Extractos e substâncias naturais promissores para o tratamento do câncer de próstata**. 2019. - Universidade Federal de Uberlândia, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/26898>. Acesso em: 4 abr. 2020.

CORTEZ, Alane Pereira et al. **4-Nerolidylcatechol analogues as promising anticancer agents**. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 765, p. 517-524, 2015 a. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26297972/>. Acesso em: 20 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.024>

CORTEZ, Alane Pereira et al. 4-Nerolidylcatechol analogues as promising anticancer agents. **European Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 765, p. 517-524, 2015 b. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299915302004>. Acesso em: 29 maio. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.08.024>

COSTA PEREIRA, Andresa et al. O papel das MMP-2 e-9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide The role of MMP-2 and MMP-9 in the development of squamous cell carcinoma **Revista Brasileira de Cancerologia**. [S. l.: s. n.].

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Natural products: A continuing source of novel

drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, [S. l.], v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>

DELLIS, Athanasios; PAPATSORIS, Athanasios. Therapeutic outcomes of the LHRH antagonists. [S. l.]: **Taylor and Francis Ltd**, 2017. <https://doi.org/10.1080/14737167.2017.1375855>

DESGANTIS, Carol E. et al. Cancer statistics for African Americans, 2016: Progress and opportunities in reducing racial disparities. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 66, n. 4, p. 290-308, 2016. <https://doi.org/10.3322/caac.21340>

DEVITA, VT; YOUNG, RC; CANELLOS, GP. Combination Versus Single Agent Chemotherapy: A Review of the Basis for Selection of Drug Treatment of Cancer. **Cancer**, [S. l.], v. 35, n. 1, 1975. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(197501\)35:1<98::AID-CNCR2820350115>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0142(197501)35:1<98::AID-CNCR2820350115>3.0.CO;2-B)

DI LORENZO, Giuseppe et al. Combination of Bevacizumab and Docetaxel in Docetaxel-Pretreated Hormone-Refractory Prostate Cancer: A Phase 2 Study. **European Urology**, [S. l.], v. 54, n. 5, p. 1089-1096, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18276061/>. Acesso em: 25 nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2008.01.083>

DOMINGO-DOMENECH, Josep et al. Interleukin 6, a nuclear factor- κ B target, predicts resistance to docetaxel in hormone-independent prostate cancer and nuclear factor- κ B inhibition by PS-1145 enhances docetaxel antitumor activity. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 12, n. 18, p. 5578-5586, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17000695/>. Acesso em: 24 nov. 2020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-2767>

DONGRE, Anushka; WEINBERG, Robert A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. [S. l.]: **Nature Publishing Group**, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30459476/>. Acesso em: 24 nov. 2020.

DUTTA, Sayanta et al. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. [S. l.]: **Elsevier Ltd**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.04.012>

EFFERTH, Thomas; KOCH, Egon. Complex Interactions between Phytochemicals. The Multi-Target Therapeutic Concept of Phytotherapy. **Current Drug Targets**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 122-132, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20735354>. Acesso em: 4 abr. 2020. <https://doi.org/10.2174/138945011793591626>

ELWAKEEL, Ahmed et al. Implementation of the Chou-Talalay method for studying the in vitro pharmacodynamic interactions of binary and ternary drug combinations on MDA-MB-231 triple negative breast cancer cells. **Synergy**, [S. l.], v. 8, p. 100047, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.synres.2019.100047>

EWING, Charles M. et al. Germline mutations in HOXB13 and prostate-cancer risk. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 366, n. 2, p. 141-149, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.yuro.2012.06.012>

FENG, Qin; HE, Bin. Androgen Receptor Signaling in the Development of Castration-Resistant Prostate Cancer. [S. l.]: **Frontiers Media S.A.**, 2019.

<https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00858>

FONTANA, Fabrizio et al. Natural Compounds in Prostate Cancer Prevention and Treatment: Mechanisms of Action and Molecular Targets. **Cells**, [S. l.], v. 9, n. 2, 2020.
<https://doi.org/10.3390/cells9020460>

FREUND, Robert R. A. et al. Advances in chemistry and bioactivity of parthenolide. **Natural Product Reports**, [S. l.], 2020. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31763637>. Acesso em: 4 abr. 2020. <https://doi.org/10.1039/C9NP00049F>

FUJIKI, Hirota et al. Cancer inhibition by green tea. In: 1998, **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. [S. l.: s. n.] p. 307-310.
[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00310-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00310-2)

FUJITA, Kazutoshi; NOMURA, Norio. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. **The World Journal of Men's Health**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 288, 2019.
<https://doi.org/10.5534/wjmh.180040>

GALSKY, M. D.; VOGELZANG, N. J. Docetaxel-based combination therapy for castration-resistant prostate cancer. **Annals of oncology** : official journal of the European Society for Medical Oncology, [S. l.], v. 21, n. 11, p. 2135-44, 2010. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351071>. Acesso em: 1 abr. 2020.
<https://doi.org/10.1093/annonc/mdq050>

GELMANN, Edward P. **Molecular biology of the androgen receptor**. [S. l.: s. n.]

GIRI, Archana; LAKSHMI NARASU, M. Production of podophyllotoxin from Podophyllum hexandrum: A potential natural product for clinically useful anticancer drugs. **Cytotechnology**, [S. l.], v. 34, n. 1-2, p. 17-26, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19003377>. Acesso em: 4 abr. 2020. <https://doi.org/10.1023/A:1008138230896>

GIRI, Veda N.; BEEBE-DIMMER, Jennifer L. Familial prostate cancer. **Seminars in Oncology**, [S. l.], v. 43, n. 5, p. 560-565, 2016. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2016.08.001>

GOLDIN, Abraham; MANTEL, Nathan. The Employment of Combinations of Drugs in the Chemotherapy of Neoplasia: A Review. **Cancer Research**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. 635-654, 1957.

GRAHAM, Trevor A.; SOTTORIVA, Andrea. Measuring cancer evolution from the genome. **Journal of Pathology**, [S. l.], v. 241, n. 2, p. 183-191, 2017. Disponível em:
<http://doi.wiley.com/10.1002/path.4821>. Acesso em: 11 mar. 2020.
<https://doi.org/10.1002/path.4821>

GUO, Zhiyong et al. A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth. **Cancer Research**, [S. l.], v. 69, n. 6, p. 2305-2313, 2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3795>

HAKKI, Tarek; BERNHARDT, Rita. CYP17- and CYP11B-dependent steroid hydroxylases as drug development targets. [S. l.]: **Pergamon**, 2006.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.07.006>

HAMDAN, Diaddin et al. Re-exploring immune-related side effects of docetaxel in an observational study: Blood hypereosinophilia. **Cancer Medicine**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 2005-2012, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30854809/>. Acesso em: 19 nov. 2020. <https://doi.org/10.1002/cam4.2062>

HARRYMAN, William et al. Androgen Receptor Dependence. In: **Prostate Cancer: Cellular and Genetic Mechanisms of Disease Development and Progression**. [S. l.: s. n.]. p. 149-170. E-book. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-32656-2_15. Acesso em: 10 jan. 2020.

HEIDEGGER, Isabel et al. Hereditary prostate cancer - Primetime for genetic testing?. [S. l.]: W.B. **Saunders Ltd**, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030573721930146X>. Acesso em: 27 mar. 2020.

HEINLEIN, Cynthia A.; CHANG, Chawnshang. **Androgen receptor in prostate cancer**. [S. l.: s. n.]

HERAULT, Olivier et al. A rapid single-laser flow cytometric method for discrimination of early apoptotic cells in a heterogenous cell population. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 104, n. 3, p. 530-537, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10086791/>. Acesso em: 16 dez. 2020. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2141.1999.01203.x>

HERDEN, Jan; WEISSBACH, Lothar. Utilization of Active Surveillance and Watchful Waiting for localized prostate cancer in the daily practice. **World Journal of Urology**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 383-391, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00345-018-2175-0>

HIGANO, Celestia S. et al. Integrated data from 2 randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trials of active cellular immunotherapy with sipuleucel-T in advanced prostate cancer. **Cancer**, [S. l.], v. 115, n. 16, p. 3670-3679, 2009. <https://doi.org/10.1002/cncr.24429>

HIGANO, Celestia S. Sipuleucel-T: Autologous cellular immunotherapy for metastatic castration-resistant prostate cancer. In: **Drug Management of Prostate Cancer**. [S. l.]: **Springer New York**, 2010. p. 321-327. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-829-4_28

JAMES, Nicholas D. et al. Addition of docetaxel, zoledronic acid, or both to first-line long-term hormone therapy in prostate cancer (STAMPEDE): survival results from an adaptive, multiarm, multistage, platform randomised controlled trial. **The Lancet**, [S. l.], v. 387, n. 10024, p. 1163-1177, 2016. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673615010375>. Acesso em: 29 maio. 2019.

JÖGI, Annika et al. Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. [S. l.]: **Taylor & Francis**, 2012. <https://doi.org/10.3109/03009734.2012.659294>

JOSEFSSON, Emma C. et al. Megakaryocytes possess a functional intrinsic apoptosis pathway that must be restrained to survive and produce platelets. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 208, n. 10, p. 2017-2031, 2011. <https://doi.org/10.1084/jem.20110750>

JOSEPH, Michael A. et al. Cruciferous vegetables, genetic polymorphisms in glutathione S-transferases M1 and T1, and prostate cancer risk. **Nutrition and Cancer**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 206-213, 2004. https://doi.org/10.1207/s15327914nc5002_11

KALLIFATIDIS, Georgios; HOY, James J.; LOKESHWAR, Bal L. Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration-resistant prostate cancer. **Seminars in cancer biology**, [S. l.], v. 40-41, p. 160-169, 2016. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27370570>. Acesso em: 29 maio. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2016.06.003>

KANTOFF, Philip W. et al. Sipuleucel-T immunotherapy for castration-resistant prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 363, n. 5, p. 411-422, 2010. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1001294>

KAWASAKI, Brian T. et al. Effects of the sesquiterpene lactone parthenolide on prostate tumor-initiating cells: An integrated molecular profiling approach. **Prostate**, [S. l.], v. 69, n. 8, p. 827-837, 2009. <https://doi.org/10.1002/pros.20931>

KNUDSEN, Karen E.; KELLY, William Kevin. Outsmarting androgen receptor: Creative approaches for targeting aberrant androgen signaling in advanced prostate cancer. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**, [S. l.], v. 6, n. 3, p. 483-493, 2011. <https://doi.org/10.1586/eem.11.33>

KYRIAKOPOULOS, Christos E. et al. Chemohormonal Therapy in Metastatic Hormone-Sensitive Prostate Cancer: Long-Term Survival Analysis of the Randomized Phase III E3805 CHAARTED Trial. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 36, n. 11, p. 1080, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5891129/>. Acesso em: 29 maio. 2019.

LASSI, Kiran; DAWSON, Nancy A. Emerging therapies in castrate-resistant prostate cancer. [S. l.]: **Curr Opin Oncol**, 2009. <https://doi.org/10.1097/CCO.0b013e32832a1868>

LATULIPPE, Eva et al. Comprehensive gene expression analysis of prostate cancer reveals distinct transcriptional programs associated with metastatic disease. **Cancer research**, [S. l.], v. 62, n. 15, p. 4499-506, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12154061>. Acesso em: 30 mar. 2020.

LEE, C.; KOZLOWSKI, JM; GRAYHACK, JT. Intrinsic and Extrinsic Factors Controlling Benign Prostatic Growth. **The Prostate**, [S. l.], v. 31, n. 2, 1997. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0045\(19970501\)31:2<131::AID-PROS9>3.0.CO;2-Q](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0045(19970501)31:2<131::AID-PROS9>3.0.CO;2-Q)

LEE, Christine H.; AKIN-OLUGBADE, Oluyemi; KIRSCHENBAUM, Alexander. **Overview of Prostate Anatomy, Histology, and Pathology**. [S. l.]: s. n.]

LEPOR, Herbert. Evaluating Men With Benign Prostatic Hyperplasia **REVIEWS IN UROLOGY BLADDER DYSFUNCTION**. [S. l.]: s. n.].

LEPOR, Herbert. Focal Ablation of Prostate Cancer. **Reviews in urology**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 107-111, 2018.

LEWANDOWSKA, Anna Maria et al. Environmental risk factors for cancer - review paper. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 1-7, 2019. <https://doi.org/10.26444/aaem/94299>

LI, Chen et al. GDF15 promotes EMT and metastasis in colorectal cancer. **Oncotarget**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 860-872, 2016. Disponível em: <https://www.oncotarget.com/article/6205/text/>. Acesso em: 13 nov. 2020. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6205>

LI, Ke et al. Docetaxel and doxorubicin codelivery by nanocarriers for synergistic treatment of prostate cancer. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 10, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31920642/>. Acesso em: 16 dez. 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.01436>

LI, Xiao he et al. Parthenolide attenuated bleomycin-induced pulmonary fibrosis via the NF-KB/Snail signaling pathway. **Respiratory Research**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 111, 2018. Disponível em: <https://respiratory-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12931-018-0806-z>. Acesso em: 4 abr. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12931-018-0806-z>

LIN, Amy M. et al. A phase I trial of docetaxel/estravustine/imatinib in patients with hormone-refractory prostate cancer. **Clinical Genitourinary Cancer**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 323-328, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17645829/>. Acesso em: 25 nov. 2020. <https://doi.org/10.3816/CGC.2007.n.011>

LINJA, Marika J. et al. Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. **Cancer Research**, [S. l.], v. 61, n. 9, p. 3550-3555, 2001.

LIU, Chia Hung et al. Berberine inhibits the metastatic ability of prostate cancer cells by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-associated genes with predictive and prognostic relevance. **International Journal of Medical Sciences**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 63-71, 2015. <https://doi.org/10.7150/ijms.9982>

LIU, Glenn et al. An open-label, multicenter, phase I/II study of single-agent AT-101 in men with castrate-resistant prostate cancer. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 15, n. 9, p. 3172-3176, 2009. Disponível em: www.aacrjournals.org. Acesso em: 25 nov. 2020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2985>

LU, Zhi Hua et al. Differentiating Transition Zone Cancers from Benign Prostatic Hyperplasia by Histogram Analysis of Apparent Diffusion Coefficient Maps with Standard and Ultrahigh b-value Diffusion-weighted MR Imaging. **Journal of Computer Assisted Tomography**, [S. l.], v. 43, n. 2, p. 235-241, 2019. <https://doi.org/10.1097/RCT.0000000000000829>

MAAHS, Gerson Schulz et al. Expressão de ciclina D1 e presença de metástase cervical de carcinoma epidermóide de boca. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 93-100, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0034-72992007000100015>

MAHAMMEDI, Hakim et al. The New Combination Docetaxel, Prednisone and Curcumin in Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer: A Pilot Phase II Study. **Oncology (Switzerland)**, [S. l.], v. 90, n. 2, p. 69-78, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26771576/>. Acesso em: 25 nov. 2020. <https://doi.org/10.1159/000441148>

MALINOWSKI, Bartosz et al. Previous, current, and future pharmacotherapy and diagnosis of prostate cancer - A comprehensive review. **Diagnostics**, [S. l.], v. 9, n. 4, 2019. <https://doi.org/10.3390/diagnostics9040161>

MANN, John. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 143-148, 2002. Disponível em:
<http://www.nature.com/articles/nrc723>. Acesso em: 29 maio. 2019. <https://doi.org/10.1038/nrc723>

MAPOUNG, Sariya et al. Cyclohexanone curcumin analogs inhibit the progression of castration-resistant prostate cancer in vitro and in vivo. **Cancer Science**, [S. l.], v. 110, n. 2, p. 596-607, 2019. <https://doi.org/10.1111/cas.13897>

MARÍN-AGUILERA, Mercedes et al. Epithelial-to-mesenchymal transition mediates docetaxel resistance and high risk of relapse in prostate cancer. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 1270-1284, 2014. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24659820>. Acesso em: 6 maio. 2020.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0775>

MARINO, Silvia et al. Pharmacological Inhibition of NF κ B Reduces Prostate Cancer Related Osteoclastogenesis In Vitro and Osteolysis Ex Vivo. **Calcified Tissue International**, [S. l.], v. 105, n. 2, p. 193-204, 2019 a. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30929064>. Acesso em: 4 abr. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00223-019-00538-9>

MASOUD, Georgina N.; LI, Wei. HIF-1 α pathway: Role, regulation and intervention for cancer therapy. [S. l.]: **Chinese Academy of Medical Sciences**, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2015.05.007>

MATHEMA, Vivek Bhakta et al. Parthenolide, a sesquiterpene lactone, expresses multiple anti-cancer and anti-inflammatory activities. **Inflammation**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 560-565, 2012.
<https://doi.org/10.1007/s10753-011-9346-0>

MATHEW, Paul et al. Platelet-derived growth factor receptor inhibition and chemotherapy for castration-resistant prostate cancer with bone metastases. **Clinical Cancer Research**, [S. l.], v. 13, n. 19, p. 5816-5824, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17908974/>. Acesso em: 25 nov. 2020. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-1269>

MCEWAN, I. J. Molecular mechanisms of androgen receptor-mediated gene regulation: structure-function analysis of the AF-1 domain. in: Endocrine-Related Cancer Volume 11 Issue 2 (2004). **Endocrine-Related Cancer**, [S. l.], v. 11, n. 2, p. 281-293, 2004. Disponível em:
<https://erc.bioscientifica.com/view/journals/erc/11/2/15163303.xml>. Acesso em: 3 fev. 2020.
<https://doi.org/10.1677/erc.0.0110281>

MENDONCA, Marc S. et al. DMAPT inhibits NF- κ B activity and increases sensitivity of prostate cancer cells to X-rays in vitro and in tumor xenografts in vivo. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 112, p. 318-326, 2017. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28782644>. Acesso em: 4 abr. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.001>

MIKUŁA-PIETRASIK, Justyna et al. Comprehensive review on how platinum- and taxane-based chemotherapy of ovarian cancer affects biology of normal cells. [S. l.]: **Birkhauser Verlag AG**, 2019.

MITTAL, RD; JAISWAL, Praveen Kumar; GOEL, Apul. Survivin: A molecular biomarker in

cancer. **Indian Journal of Medical Research**, [S. l.], v. 141, n. 4, p. 389, 2015.
<https://doi.org/10.4103/0971-5916.159250>

MONTGOMERY, R. Bruce et al. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: A mechanism for castration-resistant tumor growth. **Cancer Research**, [S. l.], v. 68, n. 11, p. 4447-4454, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18519708>. Acesso em: 30 mar. 2020. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0249>

MOORADIAN, A. D.; MORLEY, J. E.; KORENMAN, S. G. Biological Actions of Androgens. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1-28, 1987. Disponível em: <https://academic.oup.com/edrv/article-lookup/doi/10.1210/edrv-8-1-1>. Acesso em: 4 maio. 2020. <https://doi.org/10.1210/edrv-8-1-1>

MOREL, Katherine L. et al. Parthenolide Selectively Sensitizes Prostate Tumor Tissue to Radiotherapy while Protecting Healthy Tissues In Vivo. **Radiation Research**, [S. l.], v. 187, n. 5, p. 501-512, 2017. <https://doi.org/10.1667/RR14710.1>

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6606682/>. Acesso em: 13 nov. 2020. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MOTA, Sara Teixeira Soares et al. Annexin A1 promotes the nuclear localization of the epidermal growth factor receptor in castration-resistant prostate cancer. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [S. l.], v. 127, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32858191/>. Acesso em: 16 dez. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2020.105838>

MOTTET, Nicolas et al. EAU-ESTRO-SIOG Guidelines on Prostate Cancer. Part 1: Screening, Diagnosis, and Local Treatment with Curative Intent. **European Urology**, [S. l.], v. 71, n. 4, p. 618-629, 2017. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0302283816304705>. Acesso em: 23 maio. 2019.

MOVSAS, B. et al. Increasing levels of hypoxia in prostate carcinoma correlate significantly with increasing clinical stage and patient age: An Eppendorf pO₂ study. **Cancer**, [S. l.], v. 89, n. 9, p. 2018-2024, 2000. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20001101\)89:9<2018::AID-CNCR19>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20001101)89:9<2018::AID-CNCR19>3.0.CO;2-Y)

NABI, Karim; LE, Anne. The intratumoral heterogeneity of cancer metabolism. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. [S. l.]: Springer New York LLC, 2018. v. 1063p. 131-145. E-book. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-77736-8_10. Acesso em: 11 mar. 2020. https://doi.org/10.1007/978-3-319-77736-8_10

NAROD, S. A. et al. Rapid progression of prostate cancer in men with a BRCA2 mutation. **British Journal of Cancer**, [S. l.], v. 99, n. 2, p. 371-374, 2008. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604453>

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. [S. l.]: American Chemical Society, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32162523/>. Acesso em: 16 dez. 2020.

NGUYEN, Daniel P.; LI, Jinyi; TEWARI, Ashutosh K. Inflammation and prostate cancer: The role of interleukin 6 (IL-6). [S. l.]: **Blackwell Publishing Ltd**, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053309>. Acesso em: 6 maio. 2020.
<https://doi.org/10.1111/bju.12452>

NOVARA, Giacomo et al. Inflammation, Apoptosis, and BPH: What is the Evidence? **european urology sup plements**, [S. l.], v. 5, p. 401-409, 2006. Disponível em: www.eu-acme.org. Acesso em: 6 maio. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2006.02.003>

PACKER, John R.; MAITLAND, Norman J. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, [S. l.], v. 1863, n. 6, p. 1238-1260, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.02.016>
<https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.02.016>

PERNAR, Claire H. et al. The Epidemiology of Prostate Cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, [S. l.], v. 8, n. 12, p. a030361, 2018.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a030361>

PETRYLAK, Daniel P. et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 351, n. 15, p. 1513-1520, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15470214>. Acesso em: 1 abr. 2020. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa041318>

PICUS, Joel et al. A phase 2 study of estramustine, docetaxel, and bevacizumab in men with castrate-resistant prostate cancer. **Cancer**, [S. l.], v. 117, n. 3, p. 526-533, 2011. Disponível em: [/pmc/articles/PMC3010428/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC3010428/?report=abstract). Acesso em: 25 nov. 2020.
<https://doi.org/10.1002/cncr.25421>

PISKA, Kamil et al. Synergistic anticancer activity of doxorubicin and piperlongumine on DU-145 prostate cancer cells - The involvement of carbonyl reductase 1 inhibition. **Chemico-Biological Interactions**, [S. l.], v. 300, p. 40-48, 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009279718307683>. Acesso em: 27 mar. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.01.003>

PUHR, Martin et al. Epithelial-to-mesenchymal transition leads to docetaxel resistance in prostate cancer and is mediated by reduced expression of miR-200c and miR-205. **American Journal of Pathology**, [S. l.], v. 181, n. 6, p. 2188-2201, 2012.
<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2012.08.011>

RAWLA, Prashanth. **Epidemiology of Prostate Cancer**. **World Journal of Oncology**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 63, 2019. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6497009/>. Acesso em: 23 maio. 2019.
<https://doi.org/10.14740/wjon1191>

RICE, Meghan A.; MALHOTRA, Sanjay V.; STOYANOVA, Tanya. Second-generation antiandrogens: From discovery to standard of care in castration resistant prostate cancer. **Frontiers in Neurology**, [S. l.], v. 10, n. AUG, 2019. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00801>

ROCHE, Edward B. Drug Discovery. A History By Walter Sneyder. John Wiley & Sons Ltd.,

West Sussex, England. 2005. x + 468 pp. 17 × 24.5 cm. ISBN 0471899801 (Paperback). \$65.00.
Journal of Medicinal Chemistry, [S. l.], v. 49, n. 16, p. 5023-5024, 2006. Disponível em:
<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jm068021c>. Acesso em: 4 abr. 2020.
<https://doi.org/10.1021/jm068021c>

ROELL, Kyle R.; REIF, David M.; MOTSINGER-REIF, Alison A. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy-perspectives from across disciplines. [S. l.]: **Frontiers Research Foundation**, 2017. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28473769/>. Acesso em: 19 nov. 2020.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00158>

SÁNCHEZ, Belén G. et al. Combination of the natural product capsaicin and docetaxel synergistically kills human prostate cancer cells through the metabolic regulator AMP-activated kinases. **Cancer Cell International**, [S. l.], v. 19, n. 1, 2019. Disponível em:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30899201/>. Acesso em: 23 nov. 2020.
<https://doi.org/10.1186/s12935-019-0769-2>

SARANYUTANON, Sirin et al. Therapies targeted to androgen receptor signaling axis in prostate cancer: Progress, challenges, and hope. [S. l.]: **MDPI AG**, 2020.
<https://doi.org/10.3390/cancers12010051>

SARKAR, Fazlul H. et al. Novel targets for prostate cancer chemoprevention. [S. l.]: **NIH Public Access**, 2010. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0074>

SCHALKEN, Jack; FITZPATRICK, John M. Enzalutamide: targeting the androgen signalling pathway in metastatic castration-resistant prostate cancer. **BJU International**, [S. l.], v. 117, p. 215-225, 2015. Disponível em: www.bjui.org. Acesso em: 4 maio. 2020.
<https://doi.org/10.1111/bju.13123>

SCHIETKE, Ruth et al. The lysyl oxidases LOX and LOXL2 are necessary and sufficient to repress E-cadherin in Hypoxia: Insights into cellular transformation processes mediated by HIF-1. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 285, n. 9, p. 6658-6669, 2010.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.042424>

SHOJI, Sunao et al. Novel application of three-dimensional shear wave elastography in the detection of clinically significant prostate cancer. **Biomedical Reports**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 373-377, 2018. <https://doi.org/10.3892/br.2018.1059>

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 7-30, 2020. Disponível em:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.3322/caac.21590>. Acesso em: 11 mar. 2020.
<https://doi.org/10.3322/caac.21590>

SINGLA, Nirmish; GHANDOUR, Rashed A.; RAJ, Ganesh V. Investigational luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) agonists and other hormonal agents in early stage clinical trials for prostate cancer. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, [S. l.], v. 28, n. 3, p. 249-259, 2019. <https://doi.org/10.1080/13543784.2019.1570130>

SOHMA, Itsuro et al. Parthenolide, an NF-κB inhibitor, suppresses tumor growth and enhances response to chemotherapy in gastric cancer. **Cancer Genomics and Proteomics**, [S. l.],

2011.

SUH, Sung Suk et al. FHIT Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) and Metastasis in Lung Cancer through Modulation of MicroRNAs. **PLoS Genetics**, [S. l.], v. 10, n. 10, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25340791/>. Acesso em: 13 nov. 2020. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004652>

SUN, Yulan et al. The radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells is mediated by nuclear factor-κB inhibition and enhanced by the presence of PTEN. **Molecular Cancer Therapeutics**, [S. l.], v. 6, n. 9, p. 2477-2486, 2007. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-07-0186>

SUN, Yulan et al. A NADPH oxidase-dependent redox signaling pathway mediates the selective radiosensitization effect of parthenolide in prostate cancer cells. **Cancer Research**, [S. l.], v. 70, n. 7, p. 2880-2890, 2010. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4572>

TABOGA, Sebastião Roberto; LEITE VILAMAIOR, Patricia Simone; GÓES, Rejane Maira. Modulação androgênica e estrogênica na próstata: uma abordagem em modelos experimentais de roedores com enfoque na biologia estrutural Androgenic and estrogenic modulation in the prostate: an approach in rodent experimental models with emphasis on structu. **Arq Bras Endocrinol Metab**, [S. l.], v. 53, n. 8, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0004-27302009000800007>

TAKAYAMA, Ken-ichi; INOUE, Satoshi. Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression. **International Journal of Urology**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 756-768, 2013. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/iju.12146>. Acesso em: 3 fev. 2020. <https://doi.org/10.1111/iju.12146>

TAN, Bee Ling; NORHAIZAN, Mohd Esa. Curcumin combination chemotherapy: The implication and efficacy in cancer. [S. l.]: **MDPI AG**, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24142527>

TAN, Shyh Han; PETROVICS, Gyorgy; SRIVASTAVA, Shiv. Prostate cancer genomics: Recent advances and the prevailing underrepresentation from racial and ethnic minorities. [S. l.]: **MDPI AG**, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijms19041255>

TANNOCK, Ian F. et al. Docetaxel plus Prednisone or Mitoxantrone plus Prednisone for Advanced Prostate Cancer. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 351, n. 15, p. 1502-1512, 2004. Disponível em: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa040720>. Acesso em: 29 maio. 2019. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa040720>

TAPLIN, Mary Ellen et al. Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 332, n. 21, p. 1393-1398, 1995. <https://doi.org/10.1056/NEJM19950525322101>

TEO, Min Yuen Teo; RATHKOPF, Dana E.; KANTOFF, Philip. Treatment of Advanced Prostate Cancer. **The Annual Review of Medicine**, [S. l.], v. 70, p. 479-499, 2019. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051517-011947>

THOMÉ, Marcos P. et al. Ratiometric analysis of Acridine Orange staining in the study of acidic organelles and autophagy. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 129, n. 24, p. 4622-4632, 2016.

Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27875278/>. Acesso em: 17 nov. 2020.
<https://doi.org/10.1242/jcs.195057>

TRAN, Chris et al. Development of a second-generation antiandrogen for treatment of advanced prostate cancer. **Science**, [S. l.], v. 324, n. 5928, p. 787-790, 2009.
<https://doi.org/10.1126/science.1168175>

VAN BREEMEN, Richard B.; PAJKOVIC, Natasha. Multitargeted therapy of cancer by lycopene. [S. l.]: NIH Public Access, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.016>

VAN ENGELAND, Manon et al. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. [S. l.]: Cytometry, 1998. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9450519/>. Acesso em: 13 nov. 2020.

VERGIS, Roy et al. Intrinsic markers of tumour hypoxia and angiogenesis in localised prostate cancer and outcome of radical treatment: a retrospective analysis of two randomised radiotherapy trials and one surgical cohort study. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 342-351, 2008. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(08\)70076-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(08)70076-7)

VILAMAIOR, Patrícia S. L.; TABOGA, Sebastião R.; CARVALHO, Hernandes F. Postnatal growth of the ventral prostate in Wistar rats: A stereological and morphometrical study. **Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, [S. l.], v. 288, n. 8, p. 885-892, 2006. <https://doi.org/10.1002/ar.a.20363>

WANG, Qianben; CARROLL, Jason S.; BROWN, Myles. Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. **Molecular Cell**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 631-642, 2005. Disponível em:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16137620>. Acesso em: 4 maio. 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2005.07.018>

WEAVER, Beth A. How Taxol/paclitaxel kills cancer cells. [S. l.]: American Society for Cell Biology, 2014. <https://doi.org/10.1091/mbc.e14-04-0916>

WIERZEJSKA, Regina. Coffee consumption vs. cancer risk - a review of scientific data. **Roczniki Państwowego Zakładu Higieny**, [S. l.], v. 66, n. 4, p. 293-8, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26656410>. Acesso em: 16 mar. 2020.

WILLIAMS, Elizabeth D. et al. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 19, n. 12, p. 716-732, 2019.
<https://doi.org/10.1038/s41568-019-0213-x>

WOLCHOK, Jedd. Putting the Immunologic Brakes on Cancer. **Cell**, [S. l.], v. 175, n. 6, p. 1452-1454, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.006>

XU, Jianming; WU, Ray Chang; O'MALLEY, Bert W. **Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor co-activator (SRC) family**. [S. l.: s. n.]

YANG, Chunguang et al. Curcumin induces apoptosis and protective autophagy in castration-resistant prostate cancer cells through iron chelation. **Drug Design, Development and Therapy**, [S. l.], v. 11, p. 431-439, 2017. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S126964>

YANG, Jing et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. [S. l.]: **Nature Research**, 2020.

YARZA, Ramon et al. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling as a therapeutic target for Alzheimer's disease. [S. l.]: **Frontiers Media S.A.**, 2016. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00321>

YASSIN, A. et al. Testosterone, testosterone therapy and prostate cancer. [S. l.]: **Taylor and Francis Ltd**, 2019. <https://doi.org/10.1080/13685538.2018.1524456>

ZHANG, Xu et al. Podophyllotoxin derivatives as an excellent anticancer aspirant for future chemotherapy: A key current imminent needs. [S. l.]: **Elsevier Ltd**, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.11.026>

ZHU, Jianhua et al. Biosynthesis and regulation of terpenoid indole alkaloids in Catharanthus roseus. [S. l.]: **Medknow Publications**, 2015.

ZONG, Yang; GOLDSTEIN, Andrew S. Adaptation or selection - Mechanisms of castration-resistant prostate cancer. [S. l.]: **Nature Publishing Group**, 2013.