

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CARINA SANTOS CORDEIRO

**MODULAÇÃO DAS CITOCINAS *IL-6* E *TGF- β* APÓS O TRATAMENTO DE
CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA COM 4-NEROLIDILCATECOL**

PATOS DE MINAS – MG
SETEMBRO DE 2020

CARINA SANTOS CORDEIRO

**MODULAÇÃO DAS CITOCINAS *IL-6* E *TGF- β* APÓS O TRATAMENTO DE
CÉLULAS DE CÂNCER DE PRÓSTATA COM 4-NEROLIDILCATECOL**

Monografia apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade Federal de
Uberlândia como requisito final para a obtenção
do título de Bacharel em Biotecnologia

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

**PATOS DE MINAS – MG
SETEMBRO DE 2020**

CARINA SANTOS CORDEIRO

Modulação das citocinas *IL-6* e *TGF- β* após o tratamento de células de câncer de próstata com 4-nerolidilcatecol

Monografia apresentada ao Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia como requisito final para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia

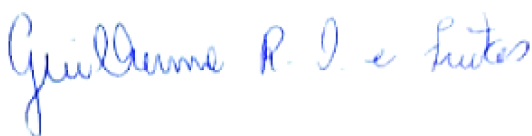
Banca Examinadora:



Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo – UFU campus Patos de Minas
Presidente



Dra. Lara Vecchi - UFU
Membro



Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas – UFU campus Patos de Minas
Membro

Patos de Minas-MG, 29 de setembro de 2020

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, a Profa. Dra. Thaise Gonçalves de Araújo por ter sido uma excelente orientadora e por todas as oportunidades que me foram concedidas durante a iniciação científica.

A Isabella Castro por ter gentilmente me ensinado todos os procedimentos laboratoriais para a realização dos meus experimentos e por ter sido uma co-orientadora, mesmo que não oficialmente, excepcional.

Ao doutorando Douglas Brandão por ter me auxiliado nos experimentos e por ter sido incrivelmente gentil e paciente.

A Profa. Dra. Fabrícia de Matos Oliveira que foi uma das melhores professoras que tive o prazer de encontrar em uma sala de aula e uma das responsáveis por minha permanência no curso.

Ao Prof. Dr. Guilherme Ramos Oliveira e Freitas por ter lecionado uma das melhores e mais interessantes matérias (imunologia) da graduação e por ter aceitado participar da banca da minha defesa.

A todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

A minha família por terem me apoiado durante toda a graduação, me incentivando a sempre seguir em frente.

Aos meus amigos, Thalia, Gabriel e Letícia, por terem me proporcionado alguns dos melhores e mais memoráveis momentos da minha vida. Agradeço por terem sido meu porto seguro durante a estadia em Patos.

A minha amiga, Malu, por ter me apresentado à minha futura carreira e por ter me apoiado desde o momento em que nossa amizade começou.

E, por fim, a mim mesma por nunca ter desistido e por ter aguentado todo o estresse, nervosismo, raiva e tristeza que a graduação proporcionou.

RESUMO

O Câncer de Próstata (CaP) é um problema mundial de saúde pública e o quarto câncer mais comum considerando ambos os sexos. O CaP resistente a castração (CRPC) é um estágio avançado da doença que se desenvolve mesmo após o bloqueio androgênico medicamentoso ou cirúrgico, com pior prognóstico. Os produtos naturais (PNs) vêm sendo amplamente estudados devido as suas propriedades bioativas com atividade antitumoral e anti-inflamatória. O 4-nerolidilcatecol (4-NC) atrai interesse científico, pois apresenta efeito citotóxico em algumas linhagens tumorais. O presente estudo objetivou avaliar o potencial imunomodulatório do 4-NC, principal metabólito secundário obtido da *Photomorphe umbellata*, na linhagem celular PC3, modelo para CRPC. O ensaio de MTT realizado confirmou a atividade citotóxica do composto frente as linhagens tumorais LNCaP e PC3, sendo definida a concentração de 50µM para os experimentos subsequentes. Os transcritos das citocinas *IL-1*, *IL-6* e *TGF-β*, envolvidas no processo inflamatório foram quantificados por meio da técnica de qPCR após tratamento das células PC3 com 4-NC por 48 h. O composto foi capaz de modular a expressão gênica das citocinas *IL-6* e *TGF-β*, com uma diminuição de 40% e 15%, respectivamente, em relação ao controle. No entanto, o 4-NC não apresentou efeito sobre a *IL-1*. Além disso, o composto também não alterou os níveis de nitrito no sobrenadante dessas células. Portanto, os resultados demonstram um perfil imunomodulatório do 4-NC em estágios avançados do CaP, sugerindo sua capacidade de diminuir o processo inflamatório no microambiente tumoral e a progressão da doença.

Palavras-chave: Câncer de próstata. 4-nerolidilcatecol. Citocinas. Imunomodulação.

ABSTRACT

*Prostate cancer (PCa) is a public health problem worldwide and the fourth most common tumor considering both sexes. Castration-resistant PCa (CRPC) is an advanced stage of PCa that develops even after pharmacological or surgical androgenic block, with a worse prognosis. Natural products (PNs) have been widely studied due to their bioactive properties with antitumor and anti-inflammatory activity. 4-nerolidylcatechol (4-NC) attracts scientific interest because it's cytotoxic effect on some tumor strains. The present study aimed to evaluate the immunomodulatory potential of 4-nerolidylcatechol (4-NC), the main secondary metabolite obtained from *Photomorphe umbellata*, in the PC3 (CRPC) cell line. The MTT assay confirmed the cytotoxicity of 4-NC against the LNCaP and PC3 tumor strains, and the concentration of 50 μ M was chosen for further experiments. The transcripts of the cytokines IL-1, IL-6, and TGF- β , involved in the inflammatory process of PCa, were quantified by qPCR after treatment of PC3 cells with 4-NC for 48h. The compound modulated the expression of IL-6 and TGF- β , decreasing the transcripts in 40% and 15%, respectively, when compared to the control. However, 4-NC had no effect on IL-1. In addition, the compound also did not change the levels of nitrite in the supernatant of these cells. Therefore, the results demonstrate an immunomodulatory profile of 4-NC in advanced stages of PCa, capable of decreasing the inflammatory process in the tumor microenvironment and the progression of the disease.*

Keywords: Prostate cancer. 4-nerolidylcatechol. Cytokines. Immunomodulation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4-NC: 4-nerolidilcatecol
ABS: Absorbância
AR: Receptor de andrógeno
AR-V7: Variante 7 do receptor de andrógeno
B2M: Beta-2-microglobulina
CaP: Câncer de próstata
COX: Ciclooxygenase
CRPC: Câncer de próstata resistente à castração
DHT: Dihidrotestosterona
EGF: Fator de crescimento epidérmico
EMT: Transição epitélio-mesenquimal
ERN: Espécie reativa de oxigênio
ERO: Espécie reativa de nitrogênio
GP130: Glicoproteína 130
IC₅₀: Índice citotóxico para 50%
IGF-1: Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IL-1: Interleucina 1
IL-6: Interleucina 6
IL-11: Interleucina 11
INCA: Instituto Nacional de Câncer
iNOS: Óxido nítrico sintase induzível
MMP: Metaloproteinase de matriz
mRNA: RNA mensageiro
NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
NF-κB: Fator de transcrição nuclear kappa B
NO: Óxido nítrico
PCR: Reação em cadeia da polimerase
PN: Produto natural
PSA: Antígeno prostático específico
qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFD: Soro fetal bovino
STAT3: Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3
TGF-β: Fator de crescimento transformante β
TNF-α: Fator de necrose tumoral α
TNM: Tumor-Node-Metastasis
VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
1.1	O surgimento de tumores	8
1.2	O Câncer de Próstata	9
1.2.1	Do diagnóstico ao tratamento	11
1.3	O Câncer de Próstata Resistente à Castração (CRPC)	14
1.4	Produtos Naturais	16
1.5	<i>Pothomorphe umbellata</i>	18
1.5	Modulação imunológica mediada por produtos naturais	19
2	OBJETIVOS	21
2.1	Objetivo geral	21
2.2	Objetivos específicos.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	Obtenção do 4-NC purificado e cultivo das linhagens celulares	22
3.2	Ensaio colorimétrico com MTT	22
3.3	Extração de RNA	23
3.4	Transcrição reversa	24
3.5	Quantificação transcricional relativa por qPCR.....	24
3.6	Quantificação de nitrito	25
3.7	Análises estatísticas.....	26
4	RESULTADOS	26
4.1	Citotoxicidade do 4-NC	26
4.2	Efeito modulatório do 4-NC sobre transcritos de citocinas em células CRPC	27
4.3	Quantificação indireta de óxido nítrico em células PC3	29
5	DISCUSSÃO.....	30
6	CONCLUSÃO.....	34

1 INTRODUÇÃO

1.1 O surgimento de tumores

As células do corpo humano se dividem de forma controlada e ordenada. Durante a fase adulta, esse processo acontece para manter a homeostase do organismo, ao repor células apoptóticas, ou seja, que sofreram morte programada. Quando a proliferação evade aos mecanismos de controle e as células adquirem capacidade invasiva há o desenvolvimento de tumores malignos. Os proto-oncogenes e genes supressores de tumor são os responsáveis por orquestrar todo esse funcionamento. Quando mutados, os oncogenes estimulam o crescimento celular desenfreado, enquanto os genes supressores de tumor perdem a capacidade de conter a proliferação e de ativar a apoptose, conduzindo ao desenvolvimento de massas alteradas molecularmente (MORRIS; CHAN, 2014; ONCOGUIA, 2017).

Além da regulação celular comprometida, as células mutadas podem adquirir novas características ou ativar mecanismos que favorecem a tumorigênese, como o aumento da produção de fatores de crescimento e a angiogênese. Esta consiste no processo pelo qual as células tumorais liberam sinais para a formação de novos vasos sanguíneos, os quais são essenciais no fornecimento de nutrientes ao microambiente tumoral (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000).

As causas para o surgimento do câncer são diversas, podendo ser externas ou internas ao organismo. Os principais fatores externos estão relacionados ao meio ambiente, aos hábitos e estilo de vida; enquanto os internos são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinados e associados à capacidade molecular das células de se defenderem ou corrigir erros decorrentes das agressões externas. Pessoas susceptíveis geneticamente podem estar sujeitas à ação de carcinógenos presentes no meio ambiente, levando ao desenvolvimento de neoplasias. Contudo, mesmo que não haja essa predisposição genética, a constante exposição a estes agentes pode, também, ocasionar essa patologia (INCA, 2018).

Os diferentes tipos de tumores são classificados de acordo com seu local de origem como: os carcinomas, originários de tecidos epiteliais; os sarcomas, os quais se iniciam em tecidos conjuntivos como ossos, músculos e cartilagens; as leucemias, envolvendo células sanguíneas; os linfomas e mielomas que acometem o sistema imunológico e os cânceres do Sistema Nervoso Central, originados a partir dos tecidos cerebrais e da medula espinhal. (ONCOGUIA, 2017; INCA, 2018). Adenocarcinoma é o tipo de câncer que se desenvolve em

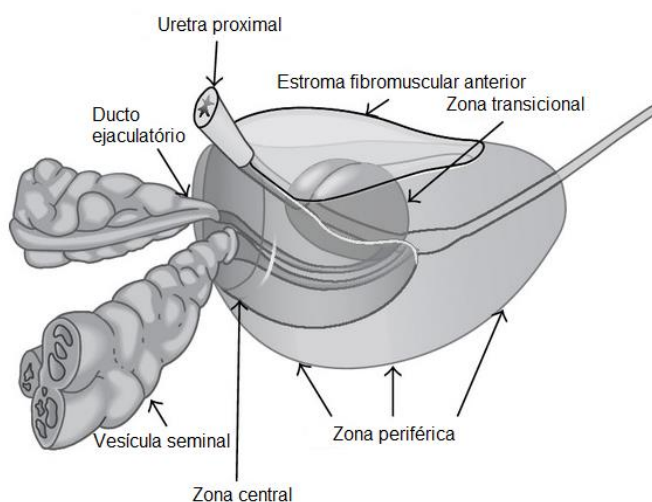
células glandulares secretoras. Os casos de Câncer de Próstata (CaP) são, em sua maioria, assim classificados por se originarem a partir das células responsáveis pela produção do líquido prostático (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016).

1.2 O Câncer de Próstata

A próstata é uma glândula componente dos sistemas reprodutivo e urinário masculino. Seu tamanho se assemelha ao de uma noz em homens mais jovens, crescendo a partir dos 40-50 anos. Tem como principal função a produção e secreção do líquido prostático; importante componente do sêmen (CANADIAN CANCER SOCIETY, 2020) O tecido epitelial que constitui o órgão apresenta três tipos celulares: as células basais, luminas secretoras e as neuroendócrinas. Acredita-se que todas são capazes de originar a doença, sendo os tumores com histologia de células neuroendócrinas os menos frequentes (HURWITZ, 2015; LEE; SHEN, 2015).

A glândula prostática (Figura 1) está localizada abaixo da bexiga e é dividida em quatro áreas: zona periférica, que representa a maior porção da próstata e é o local de origem da maioria dos tumores; zona transicional, região que envolve a uretra e cresce de acordo com o avanço da idade; zona central, situada atrás da zona transicional e ao redor do ducto ejaculatório; e o estroma fibromuscular anterior, constituído por músculo e tecido fibroso sem a presença de elementos glandulares, sendo raramente local de origem do CaP (CANADIAN CANCER SOCIETY, 2020).

Figura 1: Anatomia da próstata.



Fonte: Adaptado de Bhavsar e Verma (2014).

Mundialmente, o CaP é o quarto tipo de câncer mais frequente considerando ambos os sexos, atrás apenas dos cânceres de pulmão, mama e colo (GLOBOCAN, 2018). No Brasil, é o segundo mais incidente na população masculina, após o câncer de pele não-melanoma (INCA, 2020). Além disso, é a quinta maior causa de morte relacionada à doença no mundo (PERNAR et al, 2018). A baixa sobrevida é associada ao quadro clínico positivo para metástase, em que há a disseminação de células malignas do tecido original para um novo sítio distante, sendo que lesões osteoblásticas são as primeiras identificadas (HUDSON; KULP; LOOTS, 2013). O CaP, em sua maioria, é de crescimento lento e assintomático, com diagnóstico tardio quando a doença já se encontra avançada (IP et al., 2011). O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima, para o Brasil, 65.840 casos novos de CaP para cada ano do triênio 2020-2022, correspondendo a um risco estimado de 62,95 casos novos a cada 100 mil homens. As regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste são detentoras dos maiores índices da doença, com valores estimados de 65,29/100 mil homens, 63,94/100 mil homens e 62,00/100 mil homens, respectivamente. O aumento no número de casos decorre dos programas públicos de conscientização populacional, do processo de urbanização e da evolução dos métodos de rastreio e diagnóstico (DAMIÃO; FILHO, 2010).

O CaP pode ser considerado uma doença da terceira idade, uma vez que 80% dos casos diagnosticados acontecem em homens acima dos 65 anos (DANIYAL et al., 2014). Segundo Gupta et al. (2015) a idade média dos afetados é 68 anos. Apesar da idade avançada ser um dos principais fatores de risco, não somente idosos são acometidos pela doença. Homens abaixo dos 55 anos também podem ser diagnosticados. Adicionalmente, são associados a esse tumor o histórico familiar e a etnia.

Homens com parentes de primeiro grau diagnosticados apresentam um risco duas vezes maior de também desenvolverem a doença (BARRY; SIMMONS, 2017). Contudo, apenas 9% dos pacientes são diagnosticados com câncer hereditário, definido por três ou mais familiares afetados; pela presença da doença em 3 gerações sucessivas ou, no mínimo, por possuírem dois familiares diagnosticados com CaP antes dos 55 anos (RHODEN E AVERBECK, 2010). Mutações no gene *BRCA2* (*BRCA2 DNA repair associated*) também estão envolvidas com o desenvolvimento de CaP hereditário, inclusive associadas com piores prognósticos e maior instabilidade genômica (PAGE et al., 2019). É importante ressaltar que a falta de um histórico familiar não exclui o risco de desenvolver a doença. Tumores associados a fatores ambientais sem a presença de predisposição genética, definidos como esporádicos, são considerados os mais comuns (RHODEN E AVERBECK, 2010).

Com relação à etnia, a incidência do CaP em homens de ascendência africana é quase o dobro em relação a europeus e asiáticos, sendo a taxa de mortalidade também elevada. As

justificativas incluem as questões socioeconômicas, genéticas e até mesmo anatômicas, uma vez que a maioria dos afrodescendentes apresentam lesões na região anterior da próstata, dificultando a biópsia do tecido e seu diagnóstico precoce (MCGINLEY; TAY; MOUL, 2015). Já a menor taxa de incidência dessa neoplasia é observada em homens asiáticos (REBBECK, 2017). Entretanto, a ocidentalização dos costumes tem influenciado essa realidade. Sabe-se que o consumo de carne e laticínios aumentam o risco de desenvolvimento do CaP (DANIYAL et al., 2014).

1.2.1 Do diagnóstico ao tratamento

De acordo com a *American Cancer Society* (2017), a taxa de mortalidade por CaP diminui 3% por ano desde 1999. De fato, a maioria (92%) dos casos de CaP vem sendo identificada em estágio loco-regional, o que aumenta a taxa de sobrevivência dos pacientes (CREMERS et al., 2010). Alguns dos principais métodos de detecção são o exame digital retal da próstata, a dosagem sérica do antígeno prostático específico (PSA) e a biópsia guiada por ultrassonografia transretal (RHODEN; AVERBECK, 2010).

O exame digital retal (toque retal) é um método de diagnóstico que avalia, clinicamente, o tamanho, consistência, nodularidade e assimetria da próstata (CUPP; OESTERLING, 1993). Segundo Fang, Faerber e Samadder (2017), a *American Cancer Society*, assim como a *American Urological Association*, recomendam a utilização do exame de toque retal em conjunto com a dosagem do PSA em homens a partir dos 50 anos.

O PSA é uma serina protease produzida pela glândula prostática e utilizada como marcador de triagem para o CaP (AGRAWAL; KARAN, 2017). São quantificados os níveis séricos do antígeno, classificados como normais quando se encontram abaixo de 4 ng/ml, podendo variar com a idade e etnia. Entretanto, valores abaixo do mencionado não excluem a presença de lesões. Cerca de 15% dos homens com o PSA inferior à 4 ng/mL são diagnosticados com a doença (ONCOGUIA, 2017). Além disso, as controvérsias também decorrem da inespecificidade do marcador. Homens com hiperplasia prostática benigna (HPB) e/ou prostatites também apresentam níveis elevados de PSA (DIMAKAKOS; ARMAKOLAS; KOUTSILIERIS, 2014). Estes aumentam com o crescimento da próstata, característica presente tanto no câncer quanto em alterações não malignas (AGRAWAL; KARAN, 2017). Portanto, ainda se torna necessária a busca de marcadores mais específicos e que possam diagnosticar de forma mais precisa os tumores no órgão.

Já na biópsia guiada por ultrassonografia transretal, há a excisão de amostras de tecido da próstata para análises microscópicas. A indicação desse procedimento é determinada com base no nível do PSA associado ao exame de toque retal suspeito para lesão maligna (TURNER, 2011). Após confirmação, tumores prostáticos são estadiados e prognosticados a partir do estudo histopatológico do tecido, permitindo-se estabelecer a extensão da doença e o grau de diferenciação celular. Esses dois aspectos são definidos pelo TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) e Escore de Gleason, respectivamente (FILHO; DAMIÃO, 2010).

No sistema TNM, a categoria T descreve o sítio e tamanho do tumor primário, a N indica se os linfonodos regionais foram afetados e a M revela a presença ou não de metástase a distância (UICC, 2018) (Tabela 1). O Escore de Gleason estima o grau de diferenciação das células transformadas. Estas apresentam cinco padrões diferentes. Quanto mais próximo de 1, mais as células se assemelham às normais. O escore é dado a partir da soma dos dois padrões predominantes no tecido examinado, variando entre 2, menos agressivo, a 10 o mais agressivo. (RHODEN; AVERBECK, 2010; PROSTATE CANCER FOUNDATION, 2018)

Tabela 1: Sistema TNM (*Tumor-Node-Metastasis*) (2002) para classificação do câncer de próstata.

Aspecto avaliado	Descrição
T: Tumor primário	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor não palpável ou visível por método de imagem
T1a	Tumor em achado histológico incidental (5% ou menos de tecido ressecado)
T1b	Tumor em achado histológico incidental (> 5% do tecido ressecado)
T1c	Tumor identificado por biópsia prostática
T2	Tumor confinado à próstata
T2a	Tumor envolve metade de um lobo ou menos
T2b	Tumor envolve mais da metade de um lobo, mas não ambos os lobos
T2c	Tumor envolve ambos os lobos
T3	Tumor que se estende através da cápsula prostática
T3a	Extensão extracapsular (uni ou bilateral)
T3b	Tumor invade vesícula seminal
T4	Tumor é fixo ou invade estruturas adjacentes (que não as vesículas seminais): colo da bexiga, esfíncter externo, reto, músculos do assoalho pélvico ou parede pélvica
N: Linfonodos regionais	
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em linfonodos regionais

M: Metástases à distância

MX	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância
M1a	Linfonodos não regionais
M1b	Ossos
M1c	Outros sítios

Fonte: (RHODEN; AVERBECK, 2010)

A escolha da estratégia de tratamento considera o estágio do tumor, a localização, as condições de saúde do paciente e os possíveis efeitos colaterais (FILHO; DAMIÃO, 2010). Rotineiramente são utilizadas a cirurgia, radioterapia, a terapia hormonal e a quimioterapia (INCA, 2018).

A cirurgia mais comumente realizada para o tratamento do CaP é a prostatectomia radical, que consiste na retirada da próstata e alguns tecidos próximos, incluindo as vesículas seminais. Outros tipos de cirurgias são: a ressecção transuretral da próstata, caracterizada pela retirada de parte do órgão através da uretra, com a finalidade de aliviar problemas urinários causados pelo aumento da glândula e a criocirurgia, a qual utiliza o congelamento para destruir células anormais. Procede-se também a dissecação de linfonodos pélvicos a fim de se definir a presença de metástases linfonodais (CANADIAN CANCER SOCIETY, 2018).

A radioterapia externa e a braquiterapia são tratamentos locais que utilizam feixes de radiação ionizante direcionados para a região do tumor previamente delimitada, para não comprometimento de tecidos adjacentes. O tratamento externo é feito com doses fracionadas de radiação, o que possibilita a regeneração de células normais atingidas. Na braquiterapia ou radioterapia interna, as fontes de radiação utilizadas são internas, implantadas permanentemente ou temporariamente próximas ao tumor (VANNESTE et al., 2016).

Na quimioterapia, medicamentos anticancerígenos são utilizados para destruir as células tumorais. Por ser um tratamento sistêmico, células normais também são afetadas. Pode ser curativa, se utilizada para obtenção total do controle do tumor; adjuvante, quando realizada para eliminar células tumorais remanescentes após a cirurgia; neoadjuvante, adotada para reduzir o tamanho do tumor; e paliativa, utilizada para alívio de sintomas e melhora na qualidade de vida do paciente, sem finalidade curativa. Sua administração é feita, geralmente, por via intravenosa (ONCOGUIA, 2018).

Apesar de ser uma das atuais opções de tratamento para o CaP metastático, a quimioterapia pode causar efeitos colaterais como alopecia (queda de cabelo), inflamações na

boca, infecções e até mesmo hemorragias. Os medicamentos utilizados no procedimento afetam células que se dividem rapidamente, fazendo com que células da medula óssea, do revestimento da boca e intestino e dos folículos pilosos também sejam atingidas. Além disso, dependendo do fármaco utilizado, reações alérgicas severas podem ser desencadeadas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016). Portanto, a busca por novos medicamentos menos agressivos à saúde e com menos efeitos colaterais é de suma importância na tentativa de melhora da qualidade de vida de pacientes com esse quadro clínico.

Terapias focais também podem ser adotadas para o combate ao CaP, principalmente em pacientes com quadro de risco baixo ou moderado. A crioterapia consiste na utilização de baixas temperaturas para induzir a destruição do tumor. A terapia fotodinâmica, utiliza fármacos fotossensibilizantes que se acumulam nas células cancerosas e, após ativação por ondas específicas de luz, se associam ao oxigênio causando danos (LECORNET et al., 2010). Já a ablação intersticial a laser induz a necrose coagulativa do tecido pelo aquecimento localizado da próstata por um laser infravermelho de fibra acoplada (NATARAJAN et al., 2016).

A terapia hormonal tem como finalidade o bloqueio da sinalização androgênica. No CaP, o objetivo é impedir que as células malignas sejam estimuladas pela testosterona. Não é um tratamento com fins curativos, causando apenas diminuição do tamanho ou do crescimento do tumor para aliviar sintomas e melhorar a qualidade de vida do paciente. As principais estratégias são: a privação de andrógeno com a diminuição dos níveis de testosterona e o bloqueio dos receptores androgênicos para reduzir a resposta celular. Os procedimentos incluem a castração cirúrgica (orquiectomia) ou a supressão farmacológica (NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CANCER (UK), 2014; CASTILLEJOS-MOLINA; GABILONDO-NAVARRO, 2016; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Embora a terapia hormonal seja uma alternativa de tratamento, a maioria dos pacientes que passam por esse procedimento evolui para o CaP resistente à castração (CRPC). Nos indivíduos com esse quadro clínico as células cancerosas continuam se dividindo mesmo com os baixos níveis de testosterona (DRAZER; STADLER, 2016).

1.3 O Câncer de Próstata Resistente à Castração (CRPC)

Os andrógenos são essenciais para o crescimento, desenvolvimento e funcionamento da glândula prostática. Durante a puberdade, por exemplo, os níveis de testosterona aumentam rapidamente, estimulando a próstata e as vesículas seminais para que adquiram o tamanho adulto. Outro hormônio responsável pelo crescimento do órgão é a dihidrotestosterona (DHT),

originada a partir da redução da testosterona pela 5 α -redutase. O DHT possui maior afinidade com o tecido prostático em relação ao seu precursor, e sua ligação ao receptor de andrógeno (AR) ativa a transcrição de genes envolvidos na proliferação de células prostáticas e na produção de PSA.

O CaP metastático sensível à hormônios é majoritariamente tratado com a terapia de privação androgênica ou terapia hormonal, objetivando a diminuição da testosterona circulante. Embora a supressão desse hormônio contenha a progressão da lesão, as células transformadas eventualmente se tornam resistentes ao tratamento, ocasionando o agravamento da doença. O quadro de CRPC é identificado por níveis elevados de PSA ou por exames de imagem que mostram a progressão da doença mesmo com a testosterona abaixo de 50ng/dL (MANSINHO et al., 2018). O PSA é utilizado como indicador para o CRPC por sua transcrição ser dependente de andrógeno e sua superexpressão revela, portanto, a adaptação da sinalização androgênica tumoral. A constante ativação do eixo androgênico é mediada por diversos mecanismos, tais como: biossíntese intratumoral de hormônios; superexpressão do receptor e mudanças conformacionais, variantes de splicing e mutações no gene *AR* (PENNING, 2014). Destes, a superexpressão do AR é a mais frequentemente observada. Os níveis elevados do receptor hipersensibilizam células do CaP, as quais respondem a baixas concentrações de testosterona, resistindo ao tratamento (COUTINHO et al., 2016).

O AR é um receptor nuclear, pertencente à família dos fatores de transcrição, ativado por hormônios andrógenos. Sua estrutura proteica é constituída por um domínio N-terminal (domínio de transativação transcripcional), um domínio de ligação ao DNA, uma região dobradiça e um sítio ativo. Quando estimulado, promove a ativação de genes responsáveis pela proliferação das células do CaP (WADOSKY; KOOCHKPOUR, 2017). Mutações no gene *AR* são identificadas em cerca de 5-30% dos tumores avançados. Essas se concentram majoritariamente no sítio ativo e no domínio de transativação. Mutações somáticas nessas regiões são responsáveis por algumas das características adquiridas pelo CRPC como: ligação irregular aos andrógenos, alteração no recrutamento de componentes da maquinaria transcripcional, atribuição de propriedades agonistas aos antagonistas do receptor, melhora na estabilidade proteica e retenção nuclear, e aumento na resposta ao DHT (COUTINHO et al., 2016).

Estima-se que 10-20% dos pacientes com CaP progridem para o quadro de CRPC em até 5 anos após a realização do diagnóstico (DRAZER; 2016). Embora medicamentos como acetato de abiraterona, enzalutamida, cabazitaxel, radio-223 e sipuleucel-T sejam alternativas para o tratamento, anteriormente realizado apenas com docetaxel e controle hormonal, uma

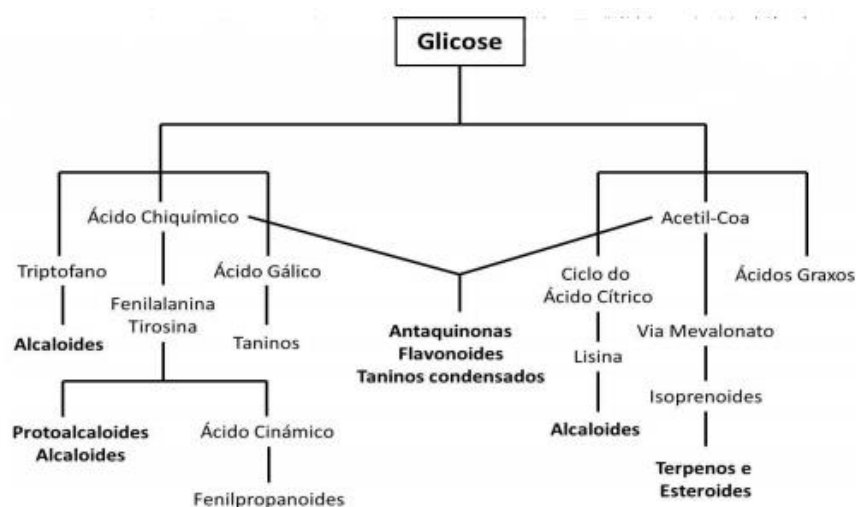
parcela dos acometidos já possui ou desenvolve, rapidamente, resistência. A taxa de sobrevivência, nesses casos, varia em média de 12 a 27 meses, o que evidencia a importância da descoberta de novos tratamentos para pacientes com esse quadro clínico grave (NUNZIO et al., 2018).

1.4 Produtos Naturais

As plantas e os microrganismos são responsáveis pela produção de substâncias químicas denominadas Produtos Naturais (PNs), que, apesar de não serem essenciais à sobrevivência desses indivíduos, conferem a estes alguns benefícios, potencialmente associados à resistência contra fatores ambientais e ao ataque de patógenos. As várias combinações de PNs em espécies vegetais são responsáveis por características peculiares, como o cheiro e o sabor nas frutas, por exemplo. Esses compostos podem variar entre gêneros ou, até mesmo, dentro de uma mesma espécie (SOUZA; RIBEIRO; COGO, 2006; FIRN, 2010).

Os PNs, também chamados de metabólitos secundários, não somente são importantes para as plantas, mas também à saúde humana. Sua vasta bioatividade se deve às estruturas diversas desses compostos. Algumas das principais moléculas fitoquímicas incluem policetídeos, peptídeos não ribossomais, terpenos, alcalóides, aminoglicosídeos e nucleosídeos (TANG et al., 2016). A classificação dos PNs é feita de acordo com suas origens biosintéticas (Figura 2). Os terpenos, por exemplo, são originados pela via do mevalonato e os alcalóides sintetizados a partir da tirosina e do triptofano, provenientes da via do ácido chiquímico (O'CONNOR, 2015).

Figura 2: Biossíntese de metabólitos secundários.



Fonte: (KLEIN, 2015).

A humanidade usufrui dos PNs desde a antiguidade, principalmente de plantas com propriedades medicinais. Um dos maiores exemplos é a papoula (*Papaver somniferum*), cujas folhas eram utilizadas por seu potencial analgésico conhecido desde o Império Romano e que, a partir do século XIX, deu origem à morfina. Outro exemplo significativo é o salgueiro (*Salix alba*), do qual as cascas foram utilizadas, por muito tempo, para combater dores e febre, posteriormente compondo a aspirina (PIMENTEL et al., 2015). Em relação ao câncer, diversos quimioterápicos utilizados no tratamento da doença são derivados de produtos naturais. Os alcaloides da vinca (vinblastina e vincristina), isolados da *Catharanthus roseus*, e os taxanos pectitaxel e docetaxel, obtidos respectivamente da *Taxus brevifolia* e *Taxus baccata*, são alguns dos fármacos disponíveis atualmente (CRAGG et al., 2015).

Portanto, as plantas foram e continuam sendo amplamente utilizadas no tratamento de doenças (CHALLINOR; BODE, 2015). Nesse contexto, a biodiversidade é peça-chave para a descoberta de PNs com aplicabilidade farmacológica. O Brasil se destaca por possuir uma das maiores biodiversidades do planeta. Cerca de 13% de todas as espécies catalogadas são de origem brasileira. Além disso, é o segundo país com o maior número de espécies endêmicas em valores absolutos, colocando-o entre os 17 países megadiversos do mundo (PIMENTEL et al., 2015). De fato, a maioria dos fármacos disponíveis atualmente é derivada de PNs. Aproximadamente 87% dos antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossupressores e antineoplásicos são de origem natural (BRITO; BERENGER; FIGUEIREDO, 2017).

Embora os PNs de origem vegetal com propriedades antineoplásicas sejam amplamente estudados, algumas desvantagens dificultam sua ascensão industrial. Os desafios na obtenção desses compostos, relacionados à complexidade na síntese das moléculas e à baixa biodisponibilidade, resultam na limitação da compreensão e domínio de seus efeitos terapêuticos. No entanto, a baixa toxicidade e a considerável biocompatibilidade são algumas das características responsáveis pelo crescente interesse dos pesquisadores atuais por essa área de pesquisa e inovação (HUFFMAN; SHENVI, 2019; WANG et al., 2020).

Quanto ao CaP, de acordo com Kallifatidis, Hoy e Lokeshwar (2016) alguns PNs apresentam ação inibitória das vias de sinalização relacionadas à doença, sendo o AR um dos alvos. Para evitar o avanço do CaP, os PNs podem impedir a síntese de andrógenos através da inibição de enzimas responsáveis pela formação de testosterona e DHT, além de bloquear sinais de crescimento e diminuir a atividade do fator de transcrição nuclear kappa B (NF-kB). Segundo os autores, vários compostos naturais capazes de combater a progressão do CaP já foram identificados, entre estes as isoflavonas de soja (principalmente genisteína), ácido

elegíaco e elagitaninos de extrato de romã, vitaminas D, L-selenometionina, polifenóis do chá verde, curcumina e licopeno.

1.5 *Pothomorphe umbellata*

Pothomorphe umbellata é uma planta arbustiva que cresce em regiões úmidas com pouca incidência solar, apresentando floração e frutificação durante todo o ano. É popularmente conhecida como pariparoba ou caapeba, sendo típica da mata atlântica e presente desde a Amazônia até o sul do Brasil (LOPES et al., 2013; VALLE et al., 2013).

De acordo com Sponchiado et al. (2007), o primeiro registro do gênero *Pothomorphe* no Brasil foi realizado por um padre português em um manuscrito de centenas de páginas, em que constava a fórmula do medicamento conhecido como Triaga Basilica. Os jesuítas utilizaram sementes, raízes e cascas do gênero para desenvolverem compostos com finalidade curativa, principalmente para envenenamentos e picadas de animais peçonhentos. Posteriormente, suas propriedades farmacológicas foram sistematicamente estudadas, com atividades antitumoral, anti-inflamatória, analgésica e fotoprotetora descritas (VALLE et al., 2013).

Figura 3: *Pothomorphe umbellata*.

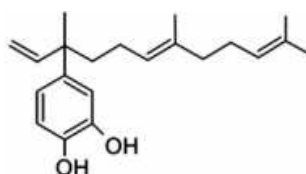


Fonte: <https://ala-bie.sibbr.gov.br/ala-bie/species/275573>

A população brasileira utiliza as folhas da pariparoba na forma de chá, suco ou emplasto para combater a gonorreia e inflamações internas (como tosses e bronquites), e externas (como em escoriações ou queimaduras), além de serem utilizadas também como vermicidas. O chá com suas folhas e raízes é empregado em doenças do fígado, baço e rim. Essa planta também é explorada como artigo decorativo (BARDELLI; KIRIZAWA; SOUSA, 2008).

O 4-nerolidilcatecol (4-NC) (Figura 4) é um fenilpropanoide presente na pariparoba e representa o metabólito secundário majoritariamente caracterizado dessa planta. Desperta interesse por possuir propriedades antioxidantes, quimiopreventivas, antitumorais, antifúngicas, citotóxicas e antimaláricas, além de apresentar capacidade de induzir a apoptose em alguns tipos celulares. Entretanto o 4-NC pode apresentar fatores limitantes para sua utilização, como sua instabilidade sob a luz e à temperatura (CORTEZ et al., 2015; VALLE et al., 2013).

Figura 4: Estrutura química do 4-nerolidilcatecol.



Fonte: (BENFICA et al., 2017).

Como agente antitumoral, o 4-NC age principalmente como pró-apoptótico. Ainda não está totalmente elucidado por quais mecanismos esse composto induz a morte celular, porém estudos com células leucêmicas demonstraram que esta é promovida pela inibição da ciclina D1, conduzindo à parada do ciclo celular em G0/G1 (BENFICA et al., 2017). Os efeitos citotóxicos do 4-NC já foram testados contra algumas linhagens celulares tumorais como a MCF-7 (mama), B16 (melanoma), HCT-8 (adenocarcinoma ileocecal humano), CEM (leucemia) e HL-60 (leucemia) (CUNHA et al, 2013).

1.5 Modulação imunológica mediada por produtos naturais

Células e outros componentes do sistema imune estão naturalmente presentes na próstata. Acredita-se que o órgão possua um importante papel na defesa do sistema reprodutor masculino, eliminando patógenos e agentes estranhos provenientes da bexiga e da uretra. A resposta imunológica mediada pela próstata resulta em um processo inflamatório no qual há o aumento considerável de células de defesa na região. Embora seja um processo inerente ao organismo, a inflamação do tecido prostático influencia no desenvolvimento e progressão do CaP (SFANOS et al., 2017).

A alta concentração de células e citocinas pro-inflamatórias no microambiente tumoral pode causar danos genéticos com a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, além de favorecer a angiogênese, a replicação e diferenciação celulares, e inibir a

apoptose, ocasionando a progressão da doença (TEWARI et al., 2018). Algumas citocinas, como a IL-6 e o TGF- β , estão envolvidas nesses processos e atuam na ativação de diferentes vias transduccionais relacionadas a carcinogênese (TORREALBA et al., 2017).

A IL-6, além de participar na resposta imunológica, promove o crescimento celular em alguns tecidos e estimula o desenvolvimento de tumores, como o CaP e o câncer de mama. Esta citocina realiza suas funções por meio de um complexo receptor membranar constituído pelo receptor α de IL-6 (IL-6R α) e pela glicoproteína 130 (gp130). Para o início da transdução de sinal, a IL-6 se liga primeiro ao IL-6R α e então o complexo formado se liga a moléculas de gp130, as quais sofrem dimerização gerando o sinal intracelular (BOURAOUI et al., 2008). Acredita-se que a IL-6 pode contribuir no crescimento tumoral mesmo em condições de privação hormonal. Além disso, a associação com o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), conhecido por inibir a apoptose em alguns tipos de neoplasias incluindo a de próstata, pode ampliar os efeitos estimulatórios desta citocina no microambiente tumoral (CULIG; PUHR, 2018).

Já o TGF- β é um importante regulador da proliferação, desenvolvimento e diferenciação de células epiteliais. Embora também atue em outros processos essenciais como a angiogênese e a cicatrização, sua ação pode promover a tumorigênese. A via de sinalização desta citocina ocorre a partir de sua ligação aos receptores de serina/treonina quinase T β RII e T β RI, respectivamente, induzindo a formação de um complexo heterotetramérico composto por duas moléculas de cada receptor. O complexo formado ativa T β RI quinase, através da fosforilação de T β RI por T β RII, fazendo com que proteínas SMAD (homólogas da proteína de drosófila Mad “Mothers Against Decapentaplegic” e da proteína Sma de *Caenorhabditis elegans*) sejam fosforiladas e translocados para o núcleo. As SMADs se associam com a SMAD4 e proporcionam a regulação da expressão de alguns genes efetores. A superexpressão do TGF- β e seus receptores está correlacionada com a progressão, metástase e mau prognóstico de diversos tumores em humanos (HAMIDI et al., 2017; TORREALBA et al., 2017; JOHNSON et al., 2012).

Algumas enzimas também estão envolvidas em processos inflamatórios, como a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), responsável pela formação de altos níveis de óxido nítrico (NO). Este atua em mecanismos de sinalização intracelular e no surgimento de espécies reativas de oxigênio durante o estresse oxidativo. Além disso, o NO é capaz de induzir dano celular, aumentar a angiogênese, reduzir a apoptose, suprimir o sistema imunológico e causar mutações genéticas (SERVATO, 2016).

Nesse contexto, os PNs podem ser uma possível solução para doenças com características inflamatórias por modularem esse perfil de citocinas e quimiocinas. São capazes de controlar a resposta imunológica de maneira pleiotrópica, com ação tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (WANG et al., 2018). Fenilpropanoides e seus polifenóis derivados são exemplos de PNs com teor modulatório, uma vez que apresentam propriedades anti-inflamatória e antioxidante. Fenilpropanoides são capazes de diminuir os níveis de mediadores inflamatórios não proteicos, como os radicais livres. São também capazes de inibir a atividade da maioria das enzimas pró-inflamatórias como a iNOS, a ciclooxigenase (COX) e a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) oxidase. Além disso, promovem a modulação da resposta regulada pelo NF- κ B, levando a uma diminuição na expressão de citocinas que necessitam desse fator de transcrição, como a IL-6, IL-1 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (KORKINA et al., 2011).

Portanto, tendo em vista a alta incidência de CaP no mundo, a ineficácia de medicamentos frente a resistência da doença ao tratamento, principalmente para os pacientes que apresentam quadros clínicos avançados, e os recorrentes efeitos colaterais dos fármacos utilizados, faz-se necessário o desenvolvimento de novos medicamentos capazes de combater o tumor, sejam estes administrados isoladamente ou combinados aos rotineiramente utilizados. O 4-NC é uma alternativa promissora, uma vez que possui propriedades antitumorais e anti-inflamatórias. Contudo, sua capacidade de modular citocinas pro-inflamatórias associadas a progressão do CaP ainda não foi descrita na literatura.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o padrão de expressão de citocinas pró-inflamatórias após o tratamento de linhagens celulares prostáticas com o 4-NC.

2.2 Objetivos específicos

- Definir a concentração ótima de 4-NC para o tratamento de linhagens celulares prostáticas;
- Tratar as linhagens tumorais LNCaP e PC3 e a não tumoral RWPE com 4-NC purificado;
- Quantificar os transcritos dos genes *IL-1*, *IL-6* e *TGF- β* na linhagem PC3 antes e após tratamento com o 4-NC.
- Quantificar os níveis de nitrito (NO_2) em sobrenadante de cultura de células PC3 tratadas com 4-NC;
- Definir o efeito modulatório do 4-NC sobre a linhagem tumoral prostática.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do 4-NC purificado e cultivo das linhagens celulares

O 4-NC purificado do extrato hexânico das partes aéreas de *P. umbellata* foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho da Universidade Federal de Juiz de Fora. Para o estudo foram cultivadas três linhagens celulares prostáticas: (i) RWPE, não tumorigênica, mantida em meio de cultivo de queratinócitos enriquecido com 5ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF-Gibco) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de extrato de pituitária (Gibco); (ii) LNCaP, tumoral hormônio-dependente, cultivada em meio RPMI 1640 (Sigma Aldrich) e (iii) PC3, tumoral resistente à castração, também mantida em meio RPMI 1640. Todos os meios de cultivo foram suplementados com soro fetal bovino (Gibco) a 10% e 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Cultilab) e as células incubadas a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO_2 . Os meios de cultura foram trocados em dias alternados até que as células atingissem aproximadamente 80% de confluência, quando, então, os experimentos foram realizados.

3.2 Ensaio colorimétrico com MTT

Para avaliar a citotoxicidade do 4-NC purificado das partes aéreas de pariparoba e definir sua concentração nos tratamentos, realizou-se o ensaio colorimétrico com MTT (3-(4,5-dimetil-tiazol)-2,5-difenil brometo de tetrazólico – Sigma Aldrich) com as três linhagens celulares descritas anteriormente. Em placas de 96 poços, foram semeadas 3×10^4 células em

cada poço, que, após confluírem na superfície de cultivo, foram tratadas com o 4-NC nas concentrações 6,0 µM; 12,5 µM; 25 µM; 50 µM; 65 µM; 80 µM; 100 µM; 125 µM e 150 µM por 48 horas. Também foram incluídos no estudo o controle com diluente (DMSO) e o controle com apenas meio de cultura. Todo o experimento foi realizado em triplicata. Após a incubação, foram adicionados aos poços 10 µl de MTT diluído a 5 mg/mL em tampão fosfato salino (PBS) e mantido por 4 horas. Em seguida, foram adicionados 50 µl de solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 20%/N-dimetil-formamida 50% por 16 horas. Por fim, realizou-se a leitura da absorbância no espectrofotômetro (Multiskan GO) a um comprimento de onda de 570 nm, e posteriormente, o cálculo de viabilidade celular para determinação da melhor concentração de tratamento do 4-NC conforme a fórmula F1.

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

Abs tratamento = Absorbância do tratamento com 4-NC

Abs ctrl = Absorbância do controle (apenas meio de cultura)

Abs DMSO = Absorbância do controle com diluente (DMSO)

O índice citotóxico para 50% (IC₅₀) foi calculado por regressão não linear utilizando-se o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). A partir do ensaio de MTT foi definida a concentração de 50 µM do 4-NC para os experimentos posteriores.

3.3 Extração de RNA

Objetivando definir o papel do 4-NC em células de CRPC, a linhagem PC3 foi tratada com 50 µM do 4-NC e o RNA total extraído utilizando-se o Trizol Reagent® (Invitrogen), de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Células não tratadas também foram mantidas e seu RNA total extraído. A qualidade do RNA total foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% e por leituras espectrofotométricas a 260 e 280 nm. A eletroforese foi realizada por 1 hora a 100 volts, utilizando-se como tampão de corrida TBE (45 mM Tris-borato, pH 8,3 e 1 mM EDTA) 0,5 X. O gel foi corado com GelRed 1X (Amersham) e visualizado por luz ultravioleta (sistema de vídeo documentação ImageSystem – VDS, Amersham Biosciences). Posteriormente, o material foi armazenado à -80°C para as análises moleculares.

3.4 Transcrição reversa

A síntese do cDNA foi realizada a partir de 1 µg de RNA total, o qual foi adicionado a uma solução com 10 U de inibidor de RNase (Invitrogen), 40 U de MMLV-RT (Invitrogen), 1X de Tampão da MMLV-RT (Invitrogen), 200 µM de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP e dCTP) (Sigma) e 126 pmoles de oligonucleotídeos hexâmeros (Invitrogen). O volume final de cada reação foi completado para 20 µl com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC-Sigma Aldrich). A solução final foi incubada em termociclador SimpliAmp Thermal Cycler (Applied Biosystems) a 37°C por 1 hora e aquecida a 95°C por 5 minutos para desnaturação do híbrido RNA-cDNA e para inativação da enzima MMLV-RT. Reações controle foram preparadas apenas com os reagentes para a verificação de possíveis contaminantes exógenos. O cDNA resultante foi estocado a -20°C.

3.5 Quantificação transcricional relativa por qPCR

As quantificações transcricionais relativas dos mRNAs codificantes para *IL1*, *IL6* e *TGF-β* foram realizadas por PCR em Tempo Real (qPCR). As amostras foram amplificadas em duplicatas de três ensaios independentes categorizadas em tratadas com 50 µM do 4-NC e não tratadas. O gene Beta-2-microglobulina (*B2M*) foi utilizado como referência. As reações foram preparadas com SYBR®Green PCR Core Reagents (Applied Biosystems) contendo: master mix, H₂O de injeção, primers e 2,0 µL de cDNA (1:2) para um volume final de 10 µl.

Após construção das curvas-padrão relativas, as condições foram otimizadas. Estas e as sequências dos *primers* encontram-se descritas na Tabela 2. A eficiência da qPCR (E) foi calculada de acordo com a equação: $E = (10^{-1/\text{slope}} - 1) \times 100$ para validar a quantificação relativa baseada no método de C_q comparativo. A ciclagem iniciou a 95°C por 3 minutos, seguida por 40 ciclos de 15 segundos a 95°C e 30 segundos a 60° C. Essa reação foi seguida por uma curva de dissociação, com o aumento gradual de 0,5°C a cada 15 segundos, variando de 65°C a 95°C. As reações foram conduzidas no aparelho StepOnePlus Real Time PCR Systems (Applied Biosystems) e analisadas em seu software. A quantificação foi realizada pelo método C_q comparativo.

Tabela 2. Condições das reações de qPCR para os genes Interleucina-1 (*IL-1*), Interleucina-6 (*IL-6*), Fator de Crescimento Transformante (*TGF-β*) e Beta-2-microglobulina (*B2M*). Encontram-se descritas as sequências e as concentrações dos oligonucleotídeos iniciadores e o volume de Master Mix utilizados.

Gene	Sequência 5'-3' (Forward/Reverse)	Fragmento amplificado (pb)	Master Mix (μL)	Primer (μM)
<i>IL-1</i>	F -CAGGATATGGAGCAACAAGTGG R -GGGCTTATCATCTTTCAACACGC	136	4,5	0,15
<i>IL-6</i>	F -GATTCCAAAGATGTAGCCGCC R -ATTTTCACCAGGCAAGTCTCCTC	242	4,5	0,25
<i>TGF-β</i>	F -GTACCTGAACCCGTGTTGCTC R -CAGGAATTGTTGCTGTATTTCTGG	108	5,0	0,25
<i>B2M</i>	F -CCTGCCGTGTGAACCATGT R -GCGGCATCTTCAAACCTCC	94	5,0	2,5

Fonte: Autoria própria (2020).

3.6 Quantificação de nitrito

Os níveis de nitrito foram dosados para a mensuração indireta dos níveis de NO em sobrenadante de cultura utilizando o reagente de Griess (Thermo Fisher Scientific®) conforme as recomendações do fabricante. A linhagem PC3 foi novamente cultivada conforme os parâmetros descritos anteriormente, contudo com meio RPMI 1640 sem o indicador vermelho de fenol. Após confluência, as células foram lavadas com PBS 1X e desagregadas enzimaticamente. Estas foram posteriormente semeadas em placas de 96 poços (3×10^4 células/poço) e tratadas com 4-NC na concentração de 50 μM, por 24 e 48 horas. Em seguida ao tratamento, foram coletados, em microtubos independentes, os sobrenadantes dos tratamentos para centrifugação. Em uma nova microplaca foram misturados, em cada poço, 20 μL de reagente Griess; 150 μL da amostra (sobrenadante) e 130 μL de água deionizada. A solução foi incubada durante 30 minutos em temperatura ambiente. Após incubação foi realizada a leitura à 540nm em leitor de microplacas (Robonik® readwell plate). Uma amostra de referência também foi preparada, contendo 20 μL de reagente de Griess e 280 μL de água deionizada. Para a conversão das leituras de absorbância em concentrações de nitrito, foram preparadas soluções de nitrito de sódio (NaNO_2) a 1 μM, 5 μM, 10 μM, 30 μM, 50 μM e 100 μM em solução padrão com água deionizada. A concentração de nitrito foi calculada baseada nos valores observados para a curva padrão.

3.7 Análises estatísticas

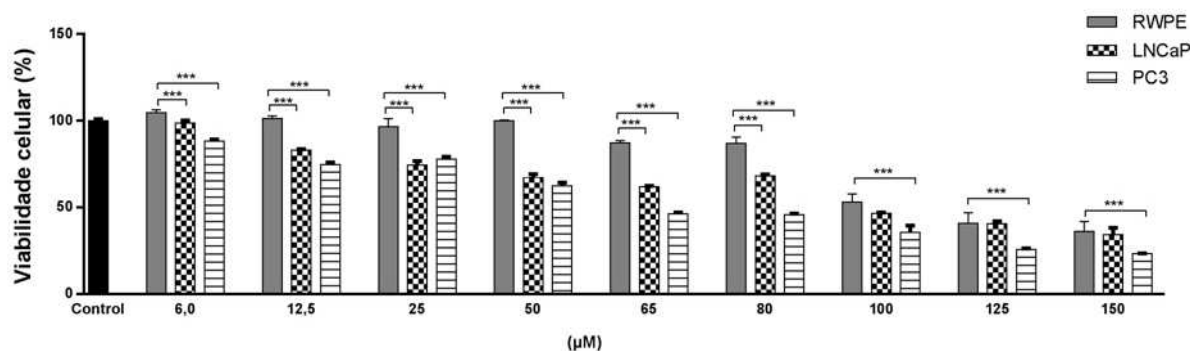
As análises estatísticas dos dados obtidos foram realizadas por meio do software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). O teste t de student foi utilizado para identificar níveis de expressão gênica estatisticamente diferentes entre as amostras tratadas e não tratadas com 4-NC. Este também foi utilizado para avaliar os níveis de nitrito no sobrenadante de cultura da linhagem PC3. Foram considerados estatisticamente significantes valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Citotoxicidade do 4-NC

Por meio do ensaio de MTT foi possível avaliar o efeito citotóxico do 4-NC, assim como determinar a concentração capaz de inibir 50% da viabilidade das linhagens RWPE, LNCaP e PC3. A figura 5 apresenta o efeito dose-dependente do composto e sua maior atividade sobre os modelos celulares de CaP, mesmo na menor concentração de 6 μM . Além disso, a linhagem CRPC (PC3) foi mais sensível ao tratamento em todas as condições. Os valores de IC_{50} foram de 112 μM , 89 μM e 61 μM para as linhagens RWPE, LNCaP e PC3, respectivamente. De fato, a partir de 100 μM , a viabilidade da RWPE foi comprometida (cerca de 52%) e, para as duas últimas concentrações, se manteve abaixo de 50%. Para os ensaios posteriores foi definida a concentração de 50 μM , uma vez que o controle celular não tumorigênico (RWPE) manteve-se viável nestas condições e o 4-NC foi capaz de matar 32% das células LNCaP e 40% das PC3.

Figura 5: Viabilidade das células prostáticas após 48 horas de tratamento com o 4-nerolidilcatecol (4-NC). Foram cultivadas e tratadas as linhagens RWPE (não tumorigênica), LNCaP (tumoral hormônio-dependente) e PC3 (tumoral resistente à castração). O asterisco indica significância estatística de $p < 0,001$. Células tratadas apenas com o diluente Dimetilsulfóxido (DMSO) foram incluídas como controle. Os resultados estão apresentados como Média $\pm$ Desvio Padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata.

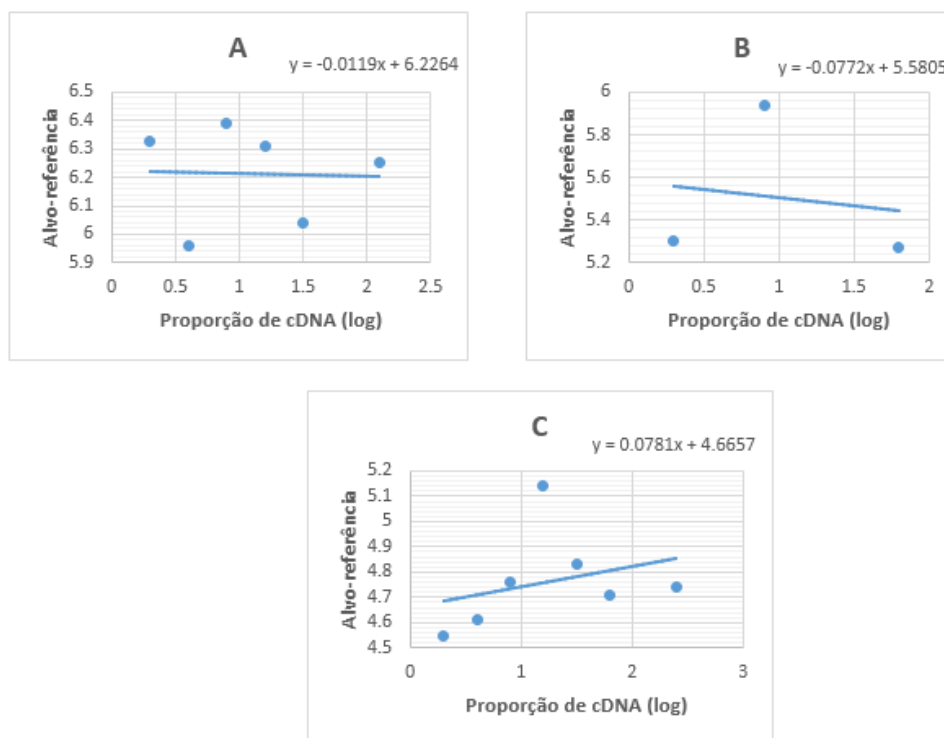


Fonte: Autoria própria (2020).

4.2 Efeito modulatório do 4-NC sobre transcritos de citocinas em células CRPC

Foram quantificados os transcritos dos genes *IL-1*, *IL-6*, *TGF- β* por meio de qPCR semiquantitativa, utilizando o gene *$\beta 2M$* como referência. Conforme as instruções publicadas por Bustin e colaboradores (2009), a eficiência dos ensaios de quantificação foi previamente avaliada pela construção da curva padrão relativa para cada um dos alvos do estudo. A partir da diluição seriada do cDNA, os *slopes* observados foram próximos de -3,32, indicando uma reação com 100% de eficiência. Além disso, o R^2 também foi $\geq 0,98$. A calibração da curva, portanto, garantiu a normalização das amostras com o gene de referência escolhido, como demonstrado na Figura 6.

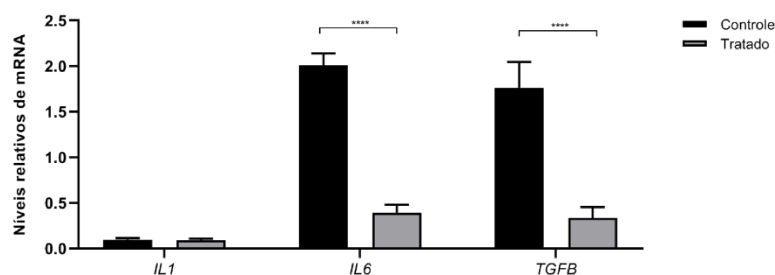
Figura 6: Validação do método Cq comparativo para a quantificação dos transcritos, por qPCR, dos genes Interleucina-1 (*IL-1*), Interleucina-6 (*IL-6*) e Fator de Crescimento Transformante (*TGF-β*). A) Padronização do gene *IL-1*; B) *IL-6*; e C) *TGF-β*. O gene Beta-2-Microglobulina (*B2M*) foi utilizado como referência. O gráfico foi gerado por regressão linear no software Microsoft Excel®.



Fonte: Autoria própria (2020).

Os níveis relativos dos mRNAs das citocinas *IL-1*, *IL-6* e *TGF-β* foram, então, quantificados na linhagem PC3 tratada e não tratada com 4-NC para avaliar a capacidade do composto em modular a resposta inflamatória em células CRPC (Figura 7). Os níveis relativos de *IL-1* não diferiram após o tratamento com 4-NC. Para a *IL-6* foram detectados altos níveis e é possível observar que houve uma redução de 80% na expressão do gene após 48 horas de tratamento da linhagem PC3 com 4-NC, o que indica o maior efeito modulatório do composto em estágios mais avançados da doença. Já para o *TGF-β*, a linhagem CRPC também expressou elevados níveis de mRNA. Após tratamento com 4-NC, a expressão gênica da citocina foi reduzida à 15% em comparação ao controle de células não tratadas, novamente indicando atividade imunomodulatória do composto no CRPC.

Figura 7: Expressão relativa do mRNA das citocinas Interleucina-1 (*IL-1*), Interleucina-6 (*IL-6*) e Fator de Crescimento Transformante (*TGF-β*) na linhagem celular PC3 antes e após tratamento com 50μM de 4-nerolidilcatecol por 48 horas. Os resultados estão apresentados como Média ± Desvio Padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. ****p<0,0001.

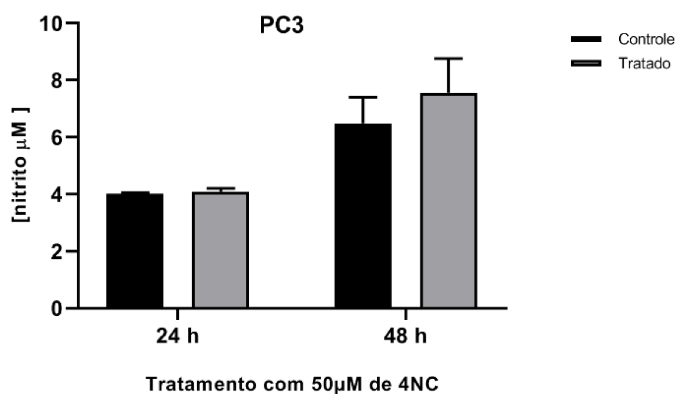


Fonte: Autoria própria (2020).

4.3 Quantificação indireta de óxido nítrico em células PC3

A linhagem PC3 foi cultivada e tratada com 4-NC a fim de avaliar o papel deste composto na síntese de NO. Como demonstrado na Figura 8, não houve diferença na concentração de nitrito entre as células tratadas e não tratadas após 24 e 48 horas. Portanto, apesar de 50μM de 4-NC alterar a viabilidade celular, a produção de nitrito não é modificada, o que evidencia mecanismos adicionais relativos à sua ação em células CRPC que não envolvem a síntese de NO.

Figura 8: Concentração de nitrito em meio de cultura da linhagem PC3 após tratamento com 4-nerolidilcatecol por 24 e 48 horas. Os resultados estão apresentados como Média ± Desvio Padrão de dois experimentos independentes realizados em triplicata.



Fonte: Autoria própria (2020).

5 DISCUSSÃO

O CRPC é um estágio avançado do CaP que se desenvolve mesmo após o bloqueio androgênico medicamentoso ou cirúrgico, sendo caracterizado pelo aumento nos níveis de PSA, com testosterona circulante inferior à 50 ng/dL (CHANDRASEKAR et al., 2015). No CRPC, o eixo androgênico permanece ativado pela síntese de andrógenos no microambiente tumoral por mecanismos alternativos (DONG et al., 2019) e pela superexpressão, mutações e splicing alternativos relacionados ao AR, o que culmina com o quadro de resistência terapêutica (CHANDRASEKAR et al., 2015). Agentes antitumorais utilizados atualmente no tratamento do CRPC têm como alvo o AR. Bicalutamida, flutamida, enzalutamida e apalutamida, por exemplo, são antagonistas capazes de inibir a ligação de andrógenos ao receptor (DONG et al., 2019). No entanto, ainda são alarmantes o número de óbitos relacionados ao CRPC, o que demonstra a ineficácia desses medicamentos (YUAN et al., 2014; WATSON; ARORA; SAWYERS, 2015). Adicionalmente, os glicocorticoides também são aplicados juntamente com os quimioterápicos docetaxel, abiraterona e cabazitaxel em casos de CRPC metastático, uma vez que diminuem a expressão de andrógenos adrenais e os níveis de PSA através da supressão de corticotrofina. Porém, podem estimular células do CaP ao modularem a expressão de citocinas como a IL-6 (PUHR et al., 2018; MODENA et al., 2015). No presente estudo objetivamos avaliar o efeito imunomodulatório do 4-NC no CRPC, utilizando a linhagem celular PC3.

O 4-NC, PN extraído da pariparoba e presente na flora brasileira, tem atraído interesse científico devido à sua bioatividade. Já foi descrito seu efeito citotóxico em linhagens celulares de câncer de mama, intestino, melanoma e leucemia, o que o torna um potencial fenilpropanoide no controle de células malignas (CUNHA et al, 2013). Segundo Bohem et al (2012), o 4-NC é capaz de inibir o proteassoma, além de induzir a apoptose por meio da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), causar danos no DNA e aumentar a expressão do gene supressor de tumor p53 em linhagens de melanoma. Já em células leucêmicas, o 4-NC desencadeia a apoptose através da inibição da ciclina D1 em vias dependentes de mitocôndrias, resultando na parada do ciclo celular em G0/G1 (BENFICA et al., 2017).

Resultados anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram a citotoxicidade do 4-NC em linhagens de CaP, principalmente nas células mais agressivas (PC3). O composto promoveu a morte celular em modelos CRPC através da liberação do citocromo c para o citoplasma, resultado da desestabilização da membrana mitocondrial (CORDEIRO, 2019). No

presente estudo, confirmamos a citotoxicidade do composto frente ao CaP. Contudo, diferentemente de Cordeiro (2019), foi escolhida a concentração de 50 μ M para os ensaios posteriores uma vez que no ensaio de MTT a concentração em questão manteve a linhagem controle (RWPE) viável e foi capaz de eliminar 32% das células LNCaP e 40% das PC3.

A melhor concentração inibitória de um PN sofre variações de acordo com o método de extração escolhido. Pengkumsri et al. (2019) estudaram a influência dos métodos de extração na concentração total de compostos fenólicos em diferentes plantas thailandesas e constataram que o teor de fitoquímicos responsáveis pela bioatividade é fortemente influenciado pelo processo de extração. A percolação e a maceração, por exemplo, são métodos clássicos de extração que podem comprometer a quantidade de metabólitos secundários bioativos, pois necessitam de várias horas para um alto rendimento, podendo ocorrer degradação das moléculas de interesse. Em relação ao 4-NC, o comprometimento de sua composição química pode ser agravado devido a fotossensibilidade do composto (COSTA et al., 2011).

Para definir o papel desse composto fenólico na modulação dos transcritos das citocinas *IL-1*, *IL-6* e *TGF- β* , o mRNA da linhagem PC3 foi extraído antes e após tratamento com 50 μ M de 4-NC. Como referência, foi utilizado o gene *B2M* e a expressão observada pela técnica de qPCR. A qPCR vem sendo amplamente utilizada em pesquisas científicas devido à sua capacidade de identificar e amplificar sequências nucleotídicas específicas, mesmo em pequenas quantidades. O método permite o acompanhamento da reação em cadeia da polimerase em tempo real a partir da geração de gráficos por um software acoplado ao equipamento (HAWKINS; GUEST, 2016). A qPCR é altamente precisa e os *amplicons* passíveis de serem quantificados durante a fase exponencial da reação. Além disso, mudanças fisiológicas na expressão gênica são comumente estudadas por meio da quantificação relativa entre um gene referência e um alvo (GREEN; SAMBROOK, 2018), otimizada com a construção da curva padrão relativa. Citocinas podem ser quantificadas eficientemente por qPCR, pois são proteínas de sinalização transiente, sendo assim, o aumento de seus transcritos está correlacionado com o aumento das moléculas proteicas e a resposta inflamatória (RAYL et al., 2019). Ademais, a validação do método Cq comparativo apresentada nesse estudo possibilitou a quantificação dos alvos propostos.

Avaliar a expressão de citocinas pró-inflamatórias após tratamento com um possível fármaco é relevante, pois a presença dessas pequenas proteínas no microambiente tumoral favorece o surgimento de metástase, comprometendo o prognóstico do paciente (RANI; DASGUPTA; MURPHY et al, 2019). A inflamação persistente gera EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) que a longo prazo podem resultar em crescimento celular desordenado e

instabilidade genômica (TEWARI et al., 2018). As citocinas IL-1 e IL-6 estão entre as principais envolvidas no processo inflamatório da próstata. Acredita-se que a IL-6 auxilia na ativação do AR conduzindo ao quadro de CRPC. Já a IL-1 está relacionada com a evolução de infecções, inflamações e outros processos patológicos (SCHILLACI et al., 2019). Quanto ao TGF- β , é descrito na literatura que sua inibição pode evitar o desenvolvimento de metástase óssea e a progressão do CaP (JIAO et al., 2020).

O presente trabalho avaliou a expressão da citocina IL-1 na linhagem celular PC3 antes e após tratamento com 4-NC. Segundo Xu et al. (2014), a IL-1 induz o desenvolvimento do CaP através da ativação do NF- κ B. Após a citocina se ligar ao seu receptor (IL-1R1), ocorre o recrutamento para o citoplasma da quinase associada ao receptor de IL-1 (IRAK)-1 e do fator associado ao receptor de TNF (TRAF) 6, resultando na ativação do NF- κ B. Consequentemente, este promove a progressão do CaP pela indução de vias de sinalização anti-apoptóticas (XU et al., 2014). No entanto, como pode ser observado na figura 7, a PC3 apresentou níveis baixos dos transcritos de IL-1 e a exposição ao composto não alterou o padrão apresentado pelo grupo controle.

Em contrapartida, nossos resultados demonstraram que após tratamento da linhagem prostática PC3 com 4-NC, houve uma diminuição nos níveis de IL-6. A citocina foi altamente expressa na linhagem tumoral, sofrendo uma redução de 80% em 48h de exposição ao composto. Níveis elevados de IL-6 em tecidos tumorais estão associados à agressividade da doença. Uma das causas é o fato desta citocina ser capaz de ativar o transdutor e ativador de transcrição 3 (STAT3) que, consequentemente, induz a ativação de oncogenes como BCL-2 e Myc (CHETEH et al., 2020).

De maneira similar à IL-6, o TGF- β apresentou elevados níveis de mRNA na linhagem PC3. O tratamento com 4-NC foi capaz de reduzir 15% dos transcritos da citocina em relação ao grupo controle. O TGF- β , em estágios avançados da doença, atua como indutor de metástase a partir de mecanismos autócrinos e parácrinos. É responsável por desencadear o processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT), fazendo com que as células neoplásicas adquiram um fenótipo mais agressivo com características de células mesenquimais e com maior capacidade de adesão (LIU et al., 2019). Além disso, a via de sinalização do TGF- β possui a capacidade de promover a metástase óssea através do aumento na expressão de CXCR4, IL-11 (interleucina-11) e MMP1 (metaloproteinase de matriz 1) (DAI et al., 2017). Wu et al (2015) demonstraram que a inibição de TGF- β diminui a EMT das células cancerosas a partir da redução na expressão de mediadores como a MMP-9 e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

Adicionalmente, reportaram que o silenciamento do TGF- β reduz a expressão de IL-6 em células de CaP.

A associação do 4-NC com outros fármacos pode ser uma alternativa para um tratamento mais eficiente contra o CaP. Estudos propuseram que a IL-6 confere quimioresistência a linhagens CRPC quando expostas a agentes citotóxicos como o decetaxel (DOMINGO-DOMENECH et al., 2006). Várias linhagens celulares tumorais, não somente de CaP, tratadas com esse agente quimioterápico apresentaram aumento na produção de IL-6, diminuindo a eficácia terapêutica (SAKAI et al., 2011). Além disso, a citocina também é capaz de elevar a atividade da via de sinalização do AR através do aumento na expressão gênica e da ativação independente de ligação do receptor (NGUYEN et al., 2014). Essa interferência compromete a ação de inibidores do AR, induzindo resistência a medicamentos como a enzalutamida (LIU et al., 2015). Já em relação ao TGF- β , Liu et al. (2017) demonstraram que a diminuição da expressão da citocina aumenta a eficiência do tratamento à base de enzalutamida por reduzir a ativação do STAT3 e consequentemente a EMT. Entretanto, a utilização do TGF- β como alvo terapêutico em estágios iniciais da doença não seria interessante, pois essa citocina atua como supressora tumoral, controlando a proliferação e crescimento celular (HUANG et al., 2019).

Por fim, analisamos a influência do 4-NC na síntese e concentração de NO presente no sobrenadante das células PC3 a partir da dosagem de nitrito. O NO é uma molécula responsável por mediar a angiogênese, a resposta imunológica e a vasodilatação (POLYTARCHOU et al., 2009). Atua de forma ambígua no processo de carcinogênese, podendo promover ou inibir o crescimento tumoral dependendo de sua concentração no tecido (SEABRA et al., 2018). Nossos resultados apresentaram uma tendência de aumento da concentração de NO na linhagem CRPC cultivada por 48h com o 4-NC. Arora et al. (2018) demonstraram que altos níveis de NO estão associados à inibição do CRPC. Além disso, constataram que a concentração elevada dessa molécula é capaz de regular negativamente a atividade do AR, diminuindo a expressão de genes como o AR-V7. Contudo, ensaios adicionais são necessários para validar o papel do 4-NC na via do NO.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados confirmaram a capacidade citotóxica do 4-NC e demonstraram sua habilidade em modular a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TGF- β na linhagem tumoral PC3. O composto, no entanto, não atuou sobre os transcritos da IL-1, além de não alterar a concentração de NO após tratamento. Estudos adicionais sobre a capacidade imonomodulatória do 4-NC se fazem necessários, principalmente em relação a sua associação com outros fármacos utilizados nas terapias atuais contra o CaP.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, Amit; KARAN, Shailesh Chandra. Serum PSA levels in the Indian population: Is it different? **Medical Journal Armed Forces India**, v. 73, n. 2, p.112-117, abr. 2017. Elsevier BV.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2017**. Atlanta: American Cancer Society; 2017. Disponível em: <<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>> Acesso em: Outubro de 2018

AMERICAN CANCER SOCIETY. **What is Prostate Cancer?** 2016. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/about/what-is-prostate-cancer.html>> Acesso em: Outubro de 2018

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Chemotherapy for Prostate Cancer**. 2016. Disponível em: < <https://www.cancer.org/cancer/prostate-cancer/treating/chemotherapy.html>> Acesso em: Janeiro de 2019.

ARORA, Himanshu et al. Alterations of tumor microenvironment by nitric oxide impedes castration-resistant prostate cancer growth. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 115, n. 44, p. 11298-11303, 15 out. 2018. Proceedings of the National Academy of Sciences.

ARORA, Kaveri; BARBIERI, Christopher E. Molecular Subtypes of Prostate Cancer. **Current Oncology Reports**. v. 20, n. 8, p. 1-9, 1 jun. 2018. Springer Science and Business Media LLC.

BARDELLI, Karen Cristina; KIRIZAWA, Mizué; SOUSA, Amélia Vera Guimarães de. O gênero Piper L. (Piperaceae) da Mata Atlântica da Microbacia do Sítio Cabuçu-Proguaru, Guarulhos, SP, Brasil. **Hoehnea**, v. 35, n. 4, p.553-561, 2008. FapUNIFESP (SciELO).

BARRY, Michael J.; SIMMONS, Leigh H. Prevention of Prostate Cancer Morbidity and Mortality. **Medical Clinics of North America**, v. 101, n. 4, p.787-806, jul. 2017. Elsevier BV.

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**. v. 55, n. 1, p.1899-1908, jan. 2017. Informa UK Limited.

BHAVSAR, Anil; VERMA, Sadhna. Anatomic Imaging of the Prostate. **Biomed Research International**. v. 2014, p.1-9, 2014. Hindawi Limited.

BRITO, L.d.C., RANGEL BERENGER, A.L., FIGUEIREDO, M.R., An overview of anticancer activity of *Garcinia* and *Hypericum*. **Food and Chemical Toxicology** (2017).

BUSTIN, Stephen A et al. The MIQE Guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time pcr experiments: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. **Clinical Chemistry**. v. 55, n. 4, p. 611-622, 1 abr. 2009. Oxford University Press (OUP).

CANADIAN CANCER SOCIETY. **What is prostate cancer?** 2018. Disponível em: <<http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/prostate/prostate-cancer/?region=ab>> Acesso em: Outubro de 2018.

CASTILLEJOS-MOLINA, R. A.; GABILONDO-NAVARRO, F. B. Cancer de Próstata. **Salud Publica Mex**. Abril, 2016;58(2):279-84. Disponível em: <https://www.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003636342016000200279&lng=en&nrm=iso&tlng=en> Acesso em: Novembro de 2018

CHALLINOR, Victoria L.; BODE, Helge B. Bioactive natural products from novel microbial sources. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1354, n. 1, p.82-97, set. 2015. Wiley.

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

CHETEH, Emarndeena H. *et al.* Interleukin-6 derived from cancer-associated fibroblasts attenuates the p53 response to doxorubicin in prostate cancer cells. **Cell Death Discovery**. v. 6, n. 1, p. 1-14, 2 jun. 2020. Springer Science and Business Media LLC.

CORDEIRO, Antonielle Oliveira. **Extratos e Substâncias Naturais Promissores para o Tratamento do Câncer de Próstata**. 2019. 58 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2019.

CORTEZ, Alane pereira et al. 4-Nerolidylcatechol analogues as promising anticancer agents. **European Journal of Pharmacology**, v. 765, p.517-524, out. 2015. Elsevier BV.

COUTINHO, Isabel et al. Androgen receptor signaling in castration-resistant prostate cancer: a lesson in persistence. **Endocrine-related Cancer**. v. 23, n. 12, p.179-197, dez. 2016. Bioscientifica.

CRAGG, Gordon M. et al. Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. **Medical Principles And Practice**, v. 25, n. 2, p. 41-59, 17 dez. 2015. S. Karger AG.

CREMERS, R.G.H.M. et al. Prostate cancer: Trends in incidence, survival and mortality in the Netherlands, 1989–2006. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 11, p.2077-2087, jul. 2010. Elsevier BV.

COSTA, Fernanda Steger de Oliveira et al. Impact of ultrasound-assisted extraction on quality and photostability of the *Pothomorphe umbellata* extracts. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 18, n. 5, p. 1002-1007, set. 2011. Elsevier BV.

CULIG, Zoran; PUHR, Martin. Interleukin-6 and prostate cancer: Current developments and unsolved questions. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v. 462, p.25-30, fev. 2018. Elsevier BV.

CUNHA, Carla Rosane Mendanha da et al. 4-Nerolidylcatechol and its synthetic analogues: Antioxidant activity and toxicity evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p.371-378, abr. 2013. Elsevier BV.

CUPP, Michael R.; OESTERLING, Joseph E. Prostate-Specific Antigen, Digital Rectal Examination, and Transrectal Ultrasonography: Their Roles in Diagnosing Early Prostate Cancer. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 68, n. 3, p.297-306, mar. 1993. Elsevier BV.

DAI, Yuhu et al. The TGF- β signalling negative regulator PICK1 represses prostate cancer metastasis to bone. **British Journal of Cancer**. v. 117, n. 5, p. 685-694, 11 jul. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

DANIYAL, Muhammad et al. Epidemiology, Etiology, Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 22, p.9575-9578, 18 dez. 2014. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention.

DE VELASCO, Marco A.; UEMURA, Hirotugu. Prostate cancer immunotherapy. **Current Opinion in Urology**. p.1-10, out. 2017. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

DECORTE, Bart L. Underexplored Opportunities for Natural Products in Drug Discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 20, p.9295-9304, 11 jul. 2016. American Chemical Society (ACS).

DENG, Yuanle et al. The extract from *Punica granatum* (pomegranate) peel induces apoptosis and impairs metastasis in prostate cancer cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p.976-984, set. 2017. Elsevier BV.

DIMAKAKOS, Andreas; ARMAKOLAS, Athanasios; KOUTSILIERIS, Michael. Novel Tools for Prostate Cancer Prognosis, Diagnosis, and Follow-Up. **Biomed Research International**, p.1-9, 2014. Hindawi Limited.

DOMINGO-DOMENECH, J. et al. Interleukin 6, a Nuclear Factor- B Target, Predicts Resistance to Docetaxel in Hormone-Independent Prostate Cancer and Nuclear Factor- B Inhibition by PS-1145 Enhances Docetaxel Antitumor Activity. **Clinical Cancer Research**. v. 12, n. 18, p. 5578-5586, 15 set. 2006. American Association for Cancer Research (AACR).

DONG, Liang et al. Metastatic prostate cancer remains incurable, why? **Asian Journal of Urology**. v. 6, n. 1, p. 26-41, jan. 2019. Elsevier BV.

DRAZER, Michael W.; STADLER, Walter M. The Role of Testosterone in the Treatment of Castration-Resistant Prostate Cancer. **The Cancer Journal**. v. 22, n. 5, p.330-333, 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

FANG, John C.; FAERBER, Gary; SAMADDER, Jewel. Digital rectal examination for prostate cancer screening performed with colonoscopy for colon cancer screening: 2 for the price of 1. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 86, n. 6, p.1147-1150, dez. 2017. Elsevier BV.

FERNANDES, K.s. et al. Antioxidant effect of 4-nerolidylcatechol and α -tocopherol in erythrocyte ghost membranes and phospholipid bilayers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 46, n. 9, p. 780-788, set. 2013. FapUNIFESP (SciELO).

FILHO, Rui de T. F.; DAMIÃO, R. **Câncer de próstata**. Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto. 2010; 9 (Supl. 1):20-27. Disponível em:
<http://revista.hupe.uerj.br/detalhe_artigo.asp?id=249> Acesso em: Outubro de 2018

FIRN, R. Nature's Chemicals: The Natural Products that shaped our world. Capítulo 1. **Oxford University Press**, 2010. ISBN 978-0-19-956683-9.

GIOTI, Katerina; TENTA, Roxane. Bioactive Natural Products against Prostate Cancer: Mechanism of Action and Autophagic/Apoptotic Molecular Pathways. **Planta Medica**, v. 81, n. 07, p.543-562, 15 abr. 2015. Georg Thieme Verlag KG.

GLOBAL CANCER OBSERVATORY (GLOBOCAN): **cancer today**. 2018. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/today>>. Acesso em: Fevereiro de 2020

GOH, C. L. et al. Genetic variants associated with predisposition to prostate cancer and potential clinical implications. **Journal of Internal Medicine**, v. 271, n. 4, p.353-365, 23 mar. 2012. Wiley.

GREEN, M. R, SAMBROOK, J. 2018. Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data. **Cold Spring Harbor Protocols**, 2018(10), pdb.top095000.

GUPTA, Sahil et al. Prostate Cancer: How Young is too Young? **Current Urology**, v. 9, n. 4, p.212-215, 2015. S. Karger AG.

HAMIDI, Anahita et al. TGF- β promotes PI3K-AKT signaling and prostate cancer cell migration through the TRAF6-mediated ubiquitylation of p85 α . **Science Signaling**. v. 10, n. 486, p.1-15, 4 jul. 2017. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

HANAHAN, Douglas; A WEINBERG, Robert. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p.57-70, jan. 2000. Elsevier BV.

HAWKINS, Steve F. C. et al. Multiplex Analyses Using Real-Time Quantitative PCR. **Multiplex Biomarker Techniques**. p. 125-133, 29 nov. 2016. Springer New York.

HUANG, Shuai et al. MiR-582-3p and miR-582-5p Suppress Prostate Cancer Metastasis to Bone by Repressing TGF- β Signaling. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**. v. 16, p. 91-104, jun. 2019. Elsevier BV.

HUDSON, B. D.; KULP, K. S.; LOOTS, G. G. Prostate cancer invasion and metastasis: insights from mining genomic data. **Briefings in Functional Genomics**, v. 12, n. 5, p.397-410, 22 jul. 2013. Oxford University Press (OUP).

HUFFMAN, Benjamin J.; SHENVI, Ryan A. Natural Products in the “Marketplace”: Interfacing Synthesis and Biology. **Journal of the American Chemical Society**. v. 141, n. 8, p.3332-3346, 25 jan. 2019. American Chemical Society (ACS).

HURWITZ, Michael. Chemotherapy in Prostate Cancer. **Current Oncology Reports**. v. 17, n. 10, p.0-10, 28 jul. 2015. Springer Nature.

INSTITUTO ONCOGUIA. Disponível em: < <http://www.oncoguia.org.br/>> Acesso em: Outubro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). 2018. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>> Acesso em: Outubro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: Incidência de cancer no Brasil. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>>. Acesso em: Fevereiro de 2020.

IP, S. et al. **An Evidence Review of Active Surveillance in Men with Localized Prostate Cancer**. Evidence Report/Technology Assessment No. 204. (Prepared by Tufts Evidence-based Practice Center under Contract No. HHSA 290-2007-10055-I.) AHRQ Publicação No. 12-E003-EF. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality. Dezembro 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK83051/>> Acesso em: Outubro de 2018

JIAO, Chenchen *et al.* TGF- β signaling regulates SPOP expression and promotes prostate cancer cell stemness. **Aging**, v. 12, n. 9, p. 7747-7760, 1 maio 2020. Impact Journals, LLC.

JOHNSON, Leonard R. et al. **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. 2012. ISBN 978-0-12-382026-6.

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

KIM, Changmin; KIM, Bonglee. Anti-Cancer Natural Products and Their Bioactive Compounds Inducing ER Stress-Mediated Apoptosis: a review. **Nutrients**. v. 10, n. 8, p. 1-29, 4 ago. 2018. MDPI AG.

KINGSTON, David G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p.496-511, 25 mar. 2011. American Chemical Society (ACS).

KLEIN, Ana P. P. **Estudo fitoquímico das folhas de capimannoni-2 (Eragrostis plana Nees) coletadas no inverno e verão**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2015.

KORKINA, L. et al. Plant Phenylpropanoids as Emerging Anti-Inflammatory Agents. **Mini-reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 10, p.823-835, 1 set. 2011. Bentham Science Publishers Ltd.

LEE, Suk Hyung; SHEN, Michael M. Cell types of origin for prostate cancer. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 37, p.35-41, dez. 2015. Elsevier BV.

LECORNET, Emilie et al. Terapia focal en cáncer de próstata: una potencial estrategia para solucionar el problema del sobretratamiento. **Arch. Esp. Urol.** v. 63, n. 10, p. 845-852, dic. 2010. Disponível em: <http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0004-06142010001000003&lng=es&nrm=iso>. Acesso em: Março de 2019.

LIU, Chengfei et al. Niclosamide suppresses cell migration and invasion in enzalutamide resistant prostate cancer cells via Stat3-AR axis inhibition. **The Prostate**. v. 75, n. 13, p. 1341-1353, 13 maio 2015. Wiley.

LIU, Qiuli et al. Metformin reverses prostate cancer resistance to enzalutamide by targeting TGF- β 1/STAT3 axis-regulated EMT. **Cell Death & Disease**. v. 8, n. 8, p. 1-8, ago. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

LIU, XI et al. IFITM3 promotes bone metastasis of prostate cancer cells by mediating activation of the TGF- β signaling pathway. **Cell Death & Disease**. v. 10, n. 7, p. 1-16, jul. 2019. Springer Science and Business Media LLC.

LOPES, Andrey P. et al. Antioxidant and Cytotoxic Effects of Crude Extract, Fractions and 4-Nerolidylcatechol from Aerial Parts of *Pothomorphe umbellata* L. (Piperaceae). **Biomed Research International**, v. 2013, p.1-5, 2013. Hindawi Limited.

MANSINHO, André et al. Castration-Resistant Prostate Cancer: Mechanisms, Targets and Treatment. **Molecular & Diagnostic Imaging in Prostate Cancer**. p.117-133, 2018. Springer International Publishing.

MCGINLEY, Kathleen F.; TAY, Kae Jack; MOUL, Judd W. Prostate cancer in men of African origin. **Nature Reviews Urology**, v. 13, n. 2 p.99-107, 31 dez. 2015. Springer Nature.

MODENA, Alessandra et al. Metastatic castration-resistant prostate cancer: targeting the mechanisms of resistance to abiraterone acetate and enzalutamide. **Expert Review of Anticancer Therapy**. v. 15, n. 9, p. 1037-1048, jul. 2015. Informa UK Limited.

MORRIS, Luc G. T.; CHAN, Timothy A. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. **Cancer**, v. 121, n. 9, p.1357-1368, 29 dez. 2014. Wiley.

NGUYEN, Daniel P. et al. Inflammation and prostate cancer: the role of interleukin 6 (il-6). **Bju International**. v. 113, n. 6, p. 986-992, jun. 2014. Wiley.

NATARAJAN, Shyam et al. Focal Laser Ablation of Prostate Cancer: Phase I Clinical Trial. **Journal of Urology**, v. 196, n. 1, p.68-75, jul. 2016. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

NATIONAL COLLABORATING CENTRE FOR CANCER (UK). **Prostate Cancer: Diagnosis and Treatment**. NICE Clinical Guidelines, No. 175. Cardiff (UK). 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK247469/>> Acesso em: Outubro de 2018

NUNZIO, Cosimo de et al. Castration-resistance prostate cancer: what is in the pipeline? **Minerva Urologica e Nefrologica**. v. 70, n. 1, p.22-41, jan. 2018. Edizioni Minerva Medica S.p.A.

O'CONNOR, Sarah E. Engineering of Secondary Metabolism. **Annual Review of Genetics**, v. 49, n. 1, p.71-94, 23 nov. 2015. Annual Reviews.

PARK, Sin-aye; SURH, Young-joon. Modulation of tumor microenvironment by chemopreventive natural products. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1401, n. 1, p.65-74, 22 jun. 2017. Wiley.

PAGE, Elizabeth C. et al. Interim Results from the IMPACT Study: evidence for prostate-specific antigen screening in brca2 mutation carriers. **European Urology**, v. 76, n. 6, p. 831-842, dez. 2019. Elsevier BV.

PENGKUMSRI, Noppawat et al. Influence of Extraction Methods on Total Phenolic Content and Antioxidant Properties of Some of the Commonly Used Plants in Thailand. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 22, n. 3, p. 117-126, 1 mar. 2019. Science Alert.

PENNING, Trevor M. Androgen biosynthesis in castration-resistant prostate cancer. **Endocrine-related Cancer**. v. 21, n. 4, p.67-78, 14 maio 2014. Bioscientifica.

PERNAR, Claire H. et al. The Epidemiology of Prostate Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**. v. 8, n. 12, p. 1-18, 8 jan. 2018. Cold Spring Harbor Laboratory.

PIMENTEL, V. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES** 43. p.41-89. Junho de 2015. Disponível em: <https://web.bndes.gov.br/bib/jspui/bitstream/1408/5602/1/RB%2043%20Biodiversidade%20brasileira%20como%20fonte%20da%20inova%C3%A7%C3%A3o_P.pdf> Acesso em: Janeiro de 2019.

POLYTARCHOU, Christos et al. Nitric oxide stimulates migration of human endothelial and prostate cancer cells through up-regulation of pleiotrophin expression and its receptor protein tyrosine phosphatase β/ζ . **International Journal Of Cancer**. v. 124, n. 8, p. 1785-1793, 15 abr. 2009. Wiley.

PROSTATE CANCER FOUNDATION. **Gleason Score and ISUP Grade Group**. 2018. Disponível em: <<https://www.pcf.org/about-prostate-cancer/diagnosis-staging-prostate-cancer/gleason-score-isup-grade/>> Acesso em: Novembro de 2018

PUHR, Martin et al. The Glucocorticoid Receptor Is a Key Player for Prostate Cancer Cell Survival and a Target for Improved Antiandrogen Therapy. **Clinical Cancer Research**. v. 24, n. 4, p. 927-938, 20 nov. 2017. American Association for Cancer Research (AACR).

RANI, Aradhana et al. Prostate Cancer. **The American Journal of Pathology**. v. 189, n. 11, p. 2119-2137, nov. 2019. Elsevier BV.

RAYL, Jeremy M. et al. Development of reverse-transcriptase quantitative PCR assays for detection of the cytokines IL-1 β , TNF- α , and IL-10 in chelonians. **Cytokine**. v. 119, p. 16-23, jul. 2019. Elsevier BV.

REBBECK, Timothy R. Prostate Cancer Genetics: variation by race, ethnicity, and geography. **Seminars in Radiation Oncology**. v. 27, n. 1, p. 3-10, jan. 2017. Elsevier BV.

RHODEN, E. L.; AVERBECK, M. A. Câncer de próstata localizado. **Revista da Associação Médica do Rio Grande do Sul**, v. 54, n.1, p. 92-99, 2010. Disponível em: <http://www.amrigs.com.br/revista/54-01/20-488_cancer_de_prostata.pdf> Acesso em: Novembro de 2018.

SACHDEVA, Naresh et al. Cytokine quantitation: technologies and applications. **Frontiers in Bioscience**. v. 12, n. 8-12, p. 4682, 2007. Frontiers in Bioscience.

SAKAI, Iori et al. Inhibition of tumor growth and sensitization to chemotherapy by RNA interference targeting interleukin-6 in the androgen-independent human prostate cancer PC3 model. **Cancer Science**. v. 102, n. 4, p. 769-775, 11 fev. 2011. Wiley.

SCHILLACI, Orazio et al. Prostate cancer and inflammation: a new molecular imaging challenge in the era of personalized medicine. **Nuclear Medicine and Biology**. v. 68-69, p. 66-79, jan. 2019. Elsevier BV.

SEABRA, Amedea B. et al. Nitric oxide donors for prostate and bladder cancers: current state and challenges. **European Journal of Pharmacology**. v. 826, p. 158-168, maio 2018. Elsevier BV.

SFANOS, Karen S. et al. The inflammatory microenvironment and microbiome in prostate cancer development. **Nature Reviews Urology**. v. 15, n. 1, p.11-24, 31 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC.

SOUZA, S.M.C.; RIBEIRO, W.; COGO, J.C. **Efeito do extrato hidroalcoólico da *Eclipta prostrata* em modelo de inflamação in vivo, induzida pelo veneno da serpente *Bothrops moojeni***. Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2006.

SPONCHIADO JÚNIOR, E.C. et al. Pothomorphe umbellata (Caapeba). **Revista Fitos**, v. 3, n. 01, p. 31-37, out. 2013. ISSN 2446-4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/65>>. Acesso em: Março de 2019.

TANG, Man-cheng et al. Oxidative Cyclization in Natural Product Biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 8, p.5226-5333, 12 dez. 2016. American Chemical Society (ACS).

TEWARI, Ashutosh K. et al. Inflammation and Prostate Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. p.41-65, 2018. Springer International Publishing.

TORREALBA, Norelia et al. Expression of several cytokines in prostate cancer: correlation with clinical variables of patients relationship with biochemical progression of the malignance. **Cytokine**, v. 89, p. 105-115, jan. 2017. Elsevier BV.

TURNER, B. et al. Evidence-based Guidelines for Best Practice in Health Care. **Transrectal Ultrasound Guided Biopsy of the Prostate**. Março, 2011. European Association of Urology Nurses. Disponível em: <https://nurses.uroweb.org/wpcontent/uploads/EAUN_TRUS_Guidelines_EN_2011_LR.pdf> Acesso em: Novembro de 2018

UNION FOR INTERNATIONAL CANCER CONTROL (UICC). **What is TNM?** 2018. Disponível em: < <https://www.uicc.org/resources/tnm>> Acesso em: Novembro de 2018.

VALLE, J.s. et al. Diversidade genética de populações naturais de pariparoba [*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] por RAPD. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 15, n. 1, p.47-53, 2013. FapUNIFESP (SciELO).

VANNESTE, Ben G. L. et al. Prostate Cancer Radiation Therapy: What Do Clinicians Have to Know? **Biomed Research International**, v. 2016, p.1-14, 2016. Hindawi Limited.

WADOSKY, Kristine M.; KOOCHKEKPOUR, Shahriar. Androgen receptor splice variants and prostate cancer: From bench to bedside. **Oncotarget**. v. 8, n. 11, p.18550-18576, 6 jan. 2017. Impact Journals, LLC.

WANG, Kai et al. Natural Products as Targeted Modulators of the Immune System. **Journal of Immunology Research**. v. 2018, p.1-2, 14 nov. 2018. Hindawi Limited.

WANG, Peiqi et al. Natural products as modulator of autophagy with potential clinical prospects. **Apoptosis**, v. 22, n. 3, p.325-356, 17 dez. 2016. Springer Nature.

WANG, Xue-jun et al. Recent advances in natural therapeutic approaches for the treatment of cancer. **Journal of Chemotherapy**. p.1-13, 13 jan. 2020. Informa UK Limited.

WATSON PA, ARORA VK, SAWYERS CL. Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Dec;15(12):701-11.

WILCZYNSKI C, AGRAWAL L (2015) **Testosterone Effects on the Prostate Gland: Review of Pathophysiology and considerations in Prostate Cancer**. *J Fam Med Dis Prev* 1:004

WU, Chun-Te et al. TGF Beta1 Expression Correlates with Survival and Tumor Aggressiveness of Prostate Cancer. **Annals of Surgical Oncology**. v. 22, n. 3, p. 1587-1593, 14 ago. 2015. Springer Science and Business Media LLC.

XU, Hua et al. Genetic Polymorphism of Interleukin-1A (IL-1A), IL-1B, and IL-1 Receptor Antagonist (IL-1RN) and Prostate Cancer Risk. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 15, n. 20, p. 8741-8747, 6 nov. 2014. Asian Pacific Organization for Cancer Prevention.

YANG, Chia-Ping et al. Taxol®: the first microtubule stabilizing agent. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 18, n. 8, p. 1733-1744, 9 ago. 2017. MDPI AG.

YUAN, X et al. Androgen receptor functions in castration-resistant prostate cancer and mechanisms of resistance to new agents targeting the androgen axis. **Oncogene**. v. 33, n. 22, p. 2815-2825, 10 jun. 2013. Springer Science and Business Media LLC.