



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E**  
**BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE**



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FRAÇÃO**  
**DICLOROMETÂNICA OBTIDA DAS RAÍZES DE *Arrabidaea brachypoda***  
**(DC BUREAU)**

**VERA LUCIA MACIEL SILVA**

**São Luís-MA**

**2022**

**VERA LUCIA MACIEL SILVA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FRAÇÃO  
DICLOROMETÂNICA OBTIDA DAS RAÍZES DE *Arrabidaea brachypoda*  
(DC BUREAU)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Silma Regina Ferreira Pereira  
Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Claudia Quintino da Rocha

**São Luís-MA**

**AGO/2022**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Maciel-Silva, Vera Lucia.

Avaliação da atividade antitumoral da fração  
diclorometânica obtida das raízes de Arrabidaea brachypoda  
Dc Bureau / Vera Lucia Maciel-Silva. - 2022.  
96 f.

Coorientador(a): Claudia Quintino da Rocha.

Orientador(a): Silma Regina Ferreira Pereira.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Rede -  
Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia  
Legal/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,  
2022.

1. Câncer. 2. Microscopia de força atômica. 3.  
Produtos naturais. 4. Quimioterápico. I. da Rocha,  
Claudia Quintino. II. Pereira, Silma Regina Ferreira.  
III. Título.


VERA LUCIA MACIEL SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DA FRAÇÃO  
DICLOROMETÂNICA OBTIDA DAS RAÍZES DE *Arrabidaea brachypoda*  
(DC BUREAU)**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia - Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.


Aprovada em 30 de agosto de 2022

**Banca examinadora**

Documento assinado digitalmente  
 SILMA REGINA FERREIRA PEREIRA  
Data: 30/09/2022 12:23:56-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>


---

Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Silma Regina Ferreira Perreira (Orientadora)  
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente  
 DENISE CRISPIM TAVARES BARBOSA  
Data: 24/04/2023 08:50:14-0300  
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>


---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Denise Crispim Tavares  
Universidade de Franca

Documento assinado digitalmente  
 CRISTINA DE ANDRADE MONTEIRO  
Data: 30/09/2022 19:15:40-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>


---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Cristina de Andrade Monteiro  
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Maranhão

Documento assinado digitalmente  
 MARIA DO DESTERRO SOARES BRANDAO N.  
Data: 05/10/2022 16:43:42-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria do Desterro Brandão Nascimento  
Universidade Federal do Maranhão

Documento assinado digitalmente  
 MARIA CELIA PIRES COSTA  
Data: 06/10/2022 22:37:34-0300  
Verifique em <https://verificador.iti.br>

---

Prof<sup>ª</sup> Dra. Maria Celia Pires Costa  
Universidade Estadual do Maranhão

## AGRADECIMENTOS

Agradeço cada pessoa que de maneira direta ou indireta colaborou para que esse sonho fosse realizado.

Aos meus pais, Josefa Hermília Maciel Silva (*in memorian*) e José Ribamar Silva (*in memorian*), que sempre me incentivaram e propocionaram escola e educação de qualidade. Sem eles, eu não estaria aqui.

Aos meus irmãos, em especial Carlos Augusto e sua esposa Denise Mirins, sempre dispostos a me ajudar nas funções domésticas da nossa residência, possibilitando-me maior dedicação ao doutorado.

Meus especiais agradecimentos a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Silma Regina Ferreira Perreira, orientadora desse projeto, pela oportunidade de aprendizado, pelo apoio, estímulo e paciência na orientação.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Claudia Quintino da Rocha, co-orientadora, pelo seu estímulo e dedicação, sempre me apoiando.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Luciana Alencar, cuja ajuda, foi fundamental na etapa final do doutorado

À Santana Viegas pela companhia, ajuda e incentivo durante toda a minha jornada no LABGEM.

A todos os colegas e amigos do LABGEM, pelo apoio nos experimentos, momentos de descontração e convivência, em especial, Israel Higino, Patrícia Castelo-Branco, Vanessa Moreira e Hugo Alves.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Mayara Ingrid Lima pela disponibilidade e paciência em ouvir meus intermináveis questionamentos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Paula Azevedo, do LIAC, por possibilitar o acesso aos equipments e por estar sempre aberta a ouvir pacientemente as minhas dúvidas.

Ao André Vargas e a Sulayne Araújo do LIAC, pelo apoio na execução dos ensaios e pelas palavras de incentivo ao longo da extensa atividade laboratorial.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Denise Crispim Tavares, do Laboratório de Mutagêneses da Universidade de Franca, pelo estágio desenvolvido e aprendizagem de técnicas, pelas doações de linhagens celulares importantes no desenvolvimento deste trabalho, assim como pelas palavras de apoio. Agradeço também ao Arthur Barcelos pelo empenho em expandir e enviar as linhagens celulares.

Ao Prof. Dr. Luiz Goulart (*in memorian*), Laboratório de Nanobiotecnologia do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pelo estágio em sua instituição e pelas doações de linhagens celulares. E aos amigos do Nanobio, Izabela (Bel), Douglas, Sara e, em especial, a Esther Fernández e a Natassia Correa pela ajuda nas culturas de células.

Ao LABGEM da Universidade Federal do Maranhão, lugar onde desenvolvi meu projeto e que foi fundamental para o meu crescimento na vida acadêmica.

À Universidade Estadual do Maranhão, pela liberação para cursar o doutorado, e aos professores que supriram minha ausência nas disciplinas de minha responsabilidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE e a todos os professores da Rede Bionorte-UFMA.

À FAPEMA pelo auxílio financeiro no desenvolvimento do projeto através de edital UNIVERSAL (00838/17).

Meus sinceros agradecimentos a todos.

*A velinha pequenina devassa a escuridão imensa*

Waldo Viera

MACIEL-SILVA, Vera Lucia. **Avaliação da atividade antitumoral da fração diclorometânica obtida das raízes de *Arrabidaea brachypoda* (DC BUREAU)**. 2022. 93 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

## RESUMO

O câncer afeta milhões de pessoas, representando um dos maiores problemas de saúde pública em todo o mundo. Os tratamentos disponíveis têm vários efeitos adversos e pouca especificidade. Assim, a necessidade de opções terapêuticas mais eficazes, com menor toxicidade e maior especificidade, tem intensificado a busca por novos fármacos. *Arrabidaea brachypoda* é uma planta nativa do Cerrado brasileiro conhecida como “cipó-una”, “santo cipó”, “cervejinha do campo”, popularmente utilizada no tratamento de inflamações em geral, cálculos renais e dores. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial antitumoral da fração diclorometânica (FDCM) obtida de raízes de *A. brachypoda*, cujos componentes são três flavonóides diméricos de estruturas incomuns, denominados braquidinas. A partir do ensaio sulforrodamina B (SRB) foi constatada citotoxicidade da FDCM, sendo esta atividade influenciada pelo soro fetal bovino (SFB). Análise *in silico* demonstrou forte afinidade entre a albumina encontrada no soro e as braquidinas, confirmando o impacto da concentração do SFB na atividade antitumoral da FDCM. Com base nisso, células de câncer de mama (MCF7), colo de útero (HeLa), próstata (DU145), além de células de próstata não tumorais (PNT2), foram mantidas em meio de cultura com SFB 1% e tratadas com diferentes concentrações da FDCM (1 a 8 µg/mL). Os ensaios revelaram valores de IC<sub>50</sub> de 2,77, 2,46, 2,51 µg/mL, e 4,08 µg/mL para MCF7, HeLa, DU145 e PNT2, respectivamente. Análise de genotoxicidade pelo ensaio cometa revelou que a FDCM não causa danos ao DNA quando as células tumorais e não tumorais são expostas a ½ IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e dobro IC<sub>50</sub>, por por 3 e 24 horas. Além disso, a FDCM inibiu a formação de colônias (ensaio clonogênico) de células tumorais de modo dependente da concentração ( $r = -0,944$ ,  $p < 0,05$ ), sendo essa inibição quase total em células HeLa e MCF7 expostas aos seus respectivos IC<sub>50</sub>. Adicionalmente, tratamentos com 2,5 µg/mL e 1,25 µg/mL inibiram significativamente a formação de colônias DU145 em 87,3 e 39,2%, respectivamente. A migração celular foi avaliada pelo ensaio *wound healing*, sendo observado redução da mobilidade celular de DU145 ( $r = -0,751$ ,  $p < 0,05$ ), enquanto não houve efeito na linhagem não tumoral PNT2. Análise por Microscopia de Força Atômica (MFA) revelou alterações ultraestruturais (buracos) nas superfícies da membrana nuclear de células DU145 tratadas com FDCM. Adicionalmente, observamos uma correlação positiva entre rugosidade da membrana celular e concentração da fração ( $r = 0,857$ ,  $p < 0,05$ ), sendo de  $7,9 \pm 0,43$  nm para células não tratadas,  $11,6 \pm 1,42$  nm e  $15,37 \pm 3,9$  para células tumorais expostas a 2,5 µg/mL e 1,25 µg/mL,



respectivamente. Todos esses achados suportam a atividade antitumoral da FDCM e sugerem que a indução de alterações ultraestruturais na membrana celular pode ser um dos mecanismos de ação das braquidinas.

**Palavras-chave:** câncer; quimioterápico; produtos naturais; microscopia de força atômica.

MACIEL-SILVA, Vera Lucia. **Evaluation of antitumor activity of dichloromethane fraction obtained from roots of *Arrabidaea brachypoda* (DC BUREAU)**. 93 f. Thesis (PhD in Biotechnology) – Federal University of Maranhão, São Luís, MA-Brasil, 2022.

### ABSTRACT

Cancer affects millions of people, representing one of the biggest public health problems worldwide. Available treatments have several adverse effects and little specificity. Thus, the need for more effective therapeutic options, with less toxicity and greater specificity, has intensified the search for new drugs. *Arrabidaea brachypoda* is a native plant of the Brazilian Cerrado known as "cipó-una", "santo cipó", "ervejinha do campo", popularly used in the treatment of inflammation, kidney stones and pain. Our main aim was to evaluate the antitumor potential of the dichloromethane fraction (DCMF) obtained from *A. brachypoda* roots, whose components are three dimeric flavonoids of unusual structures, called brachydins. Sulforhodamine B assay results revealed DCMF cytotoxicity, and the impact of fetal bovine serum (FBS) on this activity. *In silico* analysis showed strong affinity between serum albumin and brachydins, confirming the impact of FBS concentration on the antitumor activity of DCMF. Based on this, cancer cells from breast (MCF7), cervix (HeLa), prostate (DU145), as well as non-tumor prostate cells (PNT2), were maintained in culture medium with 1% FBS and treated with different DCMF concentrations (1 to 8 µg/mL). Assays revealed IC<sub>50</sub>'s of 2.77, 2.46, 2.51 µg/mL and 4.08 µg/mL for MCF7, HeLa, DU145 and PNT2, respectively. Genotoxicity analysis by the comet assay revealed that DCMF does not cause DNA damage when both tumor and non-tumor cells are exposed to ½ IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> and double IC<sub>50</sub> for 3 and 24 hours. In addition, DCMF inhibited colony formation (by clonogenic assay) of tumor cells in a concentration-dependent manner ( $r = -0.944$ ,  $p < 0.05$ ), with almost total inhibition in HeLa and MCF7 cells exposed to their respective IC<sub>50</sub>. Additionally, treatments with 2.5 µg/mL and 1.25 µg/mL significantly inhibited DU145 colony formation by 87.3 and 39.2%, respectively. Cell migration was evaluated by the wound healing assay, which revealed reduced mobility of DU145 cells ( $r = -0.751$ ,  $p < 0.05$ ), whereas there was no effect on the PNT2 cell line. Atomic Force Microscopy (AFM) analysis revealed ultrastructural changes (holes) on the nuclear membrane surfaces of DCMF-treated DU145 cells. Additionally, there was a positive correlation between cell membrane roughness and fraction concentration ( $r = 0.857$ ,  $p < 0.05$ ), with  $7.9 \pm 0.43$  nm for untreated cells, and  $11.6 \pm 1.42$  nm and  $15.37 \pm 3.9$  for tumor cells exposed to 2.5 µg/mL and 1.25 µg/mL, respectively. All these findings support the antitumor activity of DCMF and suggest that the induction of ultrastructural changes in the cell membrane may be one of the mechanisms of action of brachydins.

**Keywords:** cancer; chemotherapy; natural products; atomic force microscopy.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - O papel dos genes e do ambiente no desenvolvimento do câncer .....	18
<b>Figura 2</b> - Dano ao DNA e mecanismos de reparo. Vários tipos de agentes causam diferentes tipos de dano no DNA .....	24
<b>Figura 3</b> - Diagrama esquemático dos princípios de funcionamento do microscópio de força atômica .....	31
<b>Figura 4</b> - Estrutura básica de flavonoide .....	32
<b>Figura 5</b> - <i>Arrabidaea brachypoda</i> .....	37
<b>Figura 6</b> - Estrutura dos química dos principais compostos isolados de <i>A. brachypoda</i> .....	38
<b>Figura 7</b> - Delineamento dos experimentos <i>in vitro</i> para avaliação da atividade antitumoral da FDCM .....	40
<b>Figura 8</b> - Viabilidade de células tumorais tratadas com FDCM (1, 5, 10 e 20 µg/mL) por 48 horas em meio de cultura suplementado com SFB (1, 5 e 10%) .....	50
<b>Figura 9</b> - Interação tridimensional entre cada flavonóide dimérico (braquidina A, braquidina B e braquidina C) e BSA .....	52
<b>Figura 10</b> - Viabilidade celular e escore de danos ao DNA observadas em células da próstata tratadas com FDCM .....	54
<b>Figura 11</b> - Formação de colônias e migração celular em linhagens celulares tumorais e não tumorais de próstata tratadas com FDCM.....	56
<b>Figura 12</b> - Imagens de microscopia de força atômica da superfície da membrana nuclear de células prostáticas com e sem tratamento com FDCM e a análise quantitativa da rugosidade celular. ....	57
<b>Figura 13</b> - Gráficos de dispersão 3D entre migração, formação de colônias e rugosidade de acordo com os tipos de células. ....	58

## LISTA DE TABELAS E QUADRO

<b>Quadro 1</b> - Principais características biológicas do câncer .....	19
<b>Tabela 1</b> - Ensaio <i>in vitro</i> , métodos, linhagens celulares e condições experimentais utilizadas para avaliar a atividade antitumoral da FDCM .....	42
<b>Tabela 2</b> - Análise da docagem molecular entre cada braquidina (A, B e C) e BSA .....	51

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1 OBJETIVO GERAL.....	15
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	17
2.1 CÂNCER .....	17
2.1.1 <b>Principais características biológicas do câncer</b> .....	18
2.1.1.1 Desbloqueio da plasticidade fenotípica .....	21
2.1.1.2 Microbiomas polimórficos .....	21
2.1.1.3 Senescência celular .....	22
2.1.1.4 Reprogramação epigenética não mutacional .....	23
2.1.2 <b>Genotoxicidade e câncer</b> .....	23
2.1.3 <b>Terapias anticâncer</b> .....	25
2.1.3.1 Antimetabólicos .....	26
2.1.3.2 Alquilantes .....	26
2.1.3.4 Inibidores da topoisomerase .....	26
2.1.3.5 Inibidores do fuso mitótico .....	25
2.2 <b>MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO UTILIZADOS EM BUSCA DE NOVAS DROGAS ANTITUMORAIS</b> .....	27
2.2.1 <b>Ensaio de viabilidade celular</b> .....	27
2.2.2 <b>Ensaio de genotoxicidade</b> .....	28
2.2.3 <b>Teste de clonogenicidade</b> .....	28
2.2.4 <b>Teste de migração celular</b> .....	29
2.2.5 <b>Microscopia de força atômica como ferramenta de análise biológica</b> .....	29
2.3. <b>FLAVONOIDES COMO AGENTES ANTITUMORAIS</b> .....	31
2.3.1 <b>Flavonoides e antiproliferação celular</b> .....	33
2.3.2 <b>Flavonóides e Estresse Oxidativo</b> .....	33
2.3.3 <b>Flavonóides e Apoptose</b> .....	34
2.3.4 <b>Flavonóides como anti-inflamatório</b> .....	35
2.3.5 <b>Flavonóides e angiogênese</b> .....	35
2.3.6 <b>Flavonóides e membrana celular</b> .....	35
2.4 <b>ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE <i>Arrabidaea brachypoda</i></b> .....	37
2.5 <b>BRAQUIDINAS</b> .....	38

<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	39
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	39
3.2 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA DE <i>A. brachypoda</i> .....	40
3.2.1 Obtenção do material vegetal .....	40
3.2.2 Obtenção do extrato e fração diclorometânica.....	40
3.2.3 Preparação da fração e determinação de concentrações para os ensaios <b>biológicos <i>in vitro</i></b> .....	41
3.3 LINHAGENS CELULARES TUMORAIS E NÃO TUMORAL .....	41
3.4 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS .....	42
3.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR .....	43
3.6 DOCAGEM MOLECULAR .....	44
3.7 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE (ENSAIO DO COMETA <i>IN VITRO</i> ) .....	45
3.8 ENSAIO CLONOGÊNICO .....	46
3.9 ENSAIO <i>WOULD HEALING</i> .....	47
3.10 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) .....	48
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	49
<b>4 RESULTADOS</b> .....	49
4.1 SFB AFETA A CITOTOXICIDADE DCMF .....	49
4.2 DOCAGEM MOLECULAR .....	50
4.3 FDCM APRESENTA ATIVIDADE ANTITUMORAL .....	52
4.4 FDCM NÃO CAUSA DANOS NO DNA .....	53
4.5 FDCM REDUZ A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS .....	55
4.6 FDCM REDUZ A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS .....	55
4.7 FDCM INDUZ ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM CÉLULAS TUMORAIS .....	56
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	61
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	63
<b>ANEXO I</b> .....	81
<b>ANEXO II</b> .....	93

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico para um grupo de doenças caracterizadas pelo crescimento desordenado e contínuo das células, resultando na formação de tumores e na aquisição da capacidade de invadir tecidos e órgãos (BASKAR *et al.*, 2014). É considerado uma das principais causas de morte e importante barreira para o aumento da expectativa de vida em todos os países do mundo. O aumento da incidência dessa doença é devido a vários fatores, incluindo envelhecimento, crescimento da população, mudanças nos padrões reprodutivos que acompanham a urbanização e o crescimento econômico, além de tabagismo, alimentação não saudável, ingestão de bebidas alcoólicas, radiação, infecções, sedentarismo, exposição ocupacional a agentes cancerígenos (DABEA ALSHAMMARI *et al.*, 2019).

Em todo o mundo, cerca de 19,3 milhões de novos casos (18,1 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) e quase 10 milhões de mortes por câncer (9,9 milhões excluindo câncer de pele não melanoma) ocorreram em 2020. A estimativa é de 28,4 milhões de casos em 2040, um aumento de 47% em relação a 2020 (SUNG *et al.*, 2021). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Gomes Alencar da Silva (INCA) estima para o triênio 2020-2022 a ocorrência de 625 mil novos casos de câncer para cada ano (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma), sendo que o câncer de pele não melanoma permanece como o mais incidente na população (177 mil casos novos), seguido pelos cânceres de mama e próstata, com 66 mil cada (INCA, 2019)

Em relação a terapêutica, cirurgia e radioterapia são considerados os agentes mais eficazes para cânceres locais e não-invasivos, mas são pouco efetivos ou ineficientes quando o câncer se espalha por todo o corpo (metástase). O uso de medicamentos contra o câncer (quimioterapia, hormônios e terapias biológicas) é a escolha atual para o tratamento de cânceres metastáticos, uma vez que eles são capazes de atingir todos os órgãos do corpo através da corrente sanguínea. As drogas quimioterápicas são baseadas em compostos tóxicos que inibem principalmente a rápida proliferação das células tumorais, mas infelizmente, apresentam uma série de efeitos colaterais indesejáveis, limitando assim as opções de tratamento (PÉREZ-HERRERO; FERNÁNDEZ-MEDARDE, 2015). A crescente incidência de câncer, associado aos problemas de múltiplos efeitos colaterais e resistência inerentes aos agentes quimioterápicos clássicos, torna cada vez mais urgente a busca por novos compostos com efeitos antitumorais (JAFARI *et al.*, 2022).

As plantas servem não apenas como medicamentos brutos, de venda livre e nutracêuticos, mas também como recursos naturais para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos, os quais podem ser usados para o tratamento de várias doenças, dentre as quais, câncer (ATANASOV *et al.*, 2021; BEUTLER, 2019). O Brasil apresenta a maior diversidade vegetal do mundo, apresentando assim um grande potencial para a descoberta de novos medicamentos (HERVOUET; VALLETTE; CARTRON, 2010; ROSA *et al.*, 2021).

Há relatos de uso popular e do potencial biológico descritos na literatura para espécies do gênero *Arrabidaea*, típicas do Cerrado brasileiro (ALCERITO *et al.*, 2002) e em particular de extratos e frações extraídos de *Arrabidaea brachypoda*, tais como antripanosoma (DA ROCHA *et al.*, 2014), antileishmania (ROCHA, *et al.*, 2018), anti-inflamatória (SALGADO *et al.*, 2020) e antimicrobiana (DE SOUSA ANDRADE *et al.*, 2020). Além de constatações de atividades antitumorais da fração hidroetanólica (SERPELONI *et al.*, 2020) e seus compostos (braquidinas) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021; NUNES *et al.*, 2020); da fração hidrometanólica e braquidinas isoladas destas (DE LIMA *et al.*, 2022).

Diante do exposto, nesta tese de doutoramento em Biodiversidade e Biotecnologia, investigamos o potencial antineoplásico de uma planta da rica biodiversidade brasileira. Para isso, foram realizados ensaios *in vitro* em três linhagens tumorais e em uma linhagem controle, usando ferramentas biotecnológicas robustas e consolidadas na literatura científica. Nossa pesquisa foi baseada em achados prévios de outros autores que sugeriam atividade antitumoral de braquidinas isoladas e de outras frações extraídas de diferentes partes da planta. Assim, este trabalho é inédito em investigar a fração diclorometano (FDCM), extraída da raiz da planta, cujos componentes são três braquidinas (A, B e C). A possibilidade de identificarmos uma fração com atividade antitumoral, sem a necessidade de isolar compostos ou princípios ativos, é de grande interesse na busca de fármacos biologicamente eficazes e com menor custo de produção. Assim, com possibilidade de gerar um produto importante para a sociedade que ainda se depara com grandes desafios no tratamento do câncer. Além disso, buscamos agregar dados para entender os possíveis mecanismos de ação da FDCM. Os resultados apresentados são promissores, tanto para melhor compreender os possíveis mecanismos de ação dos componentes da fração, quanto na perspectiva de realização de ensaios pré-clínicos *in vivo*.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antitumoral da FDCM, rica em flavonoides diméricos raros, extraída da raiz de *Arrabidaea brachypoda* e buscar estabelecer um possível mecanismo de sua ação.



## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade citotóxica da FDCM em linhagens tumorais e não tumoral humanas.

Avaliar o efeito genotóxico da FDCM em linhagens tumorais e não tumoral humanas.

- Avaliar o efeito clonogênico da FDCM em linhagens tumorais e não tumoral humanas;

- Avaliar a ação da FDCM sobre a migração de linhagens tumorais e não tumoral humanas;

- Investigar, em nível de nanoescala, através da microscopia de força atômica, possíveis alterações morfológicas nas linhagens tumorais e não-tumoral humanas após tratamento com a FDCM.

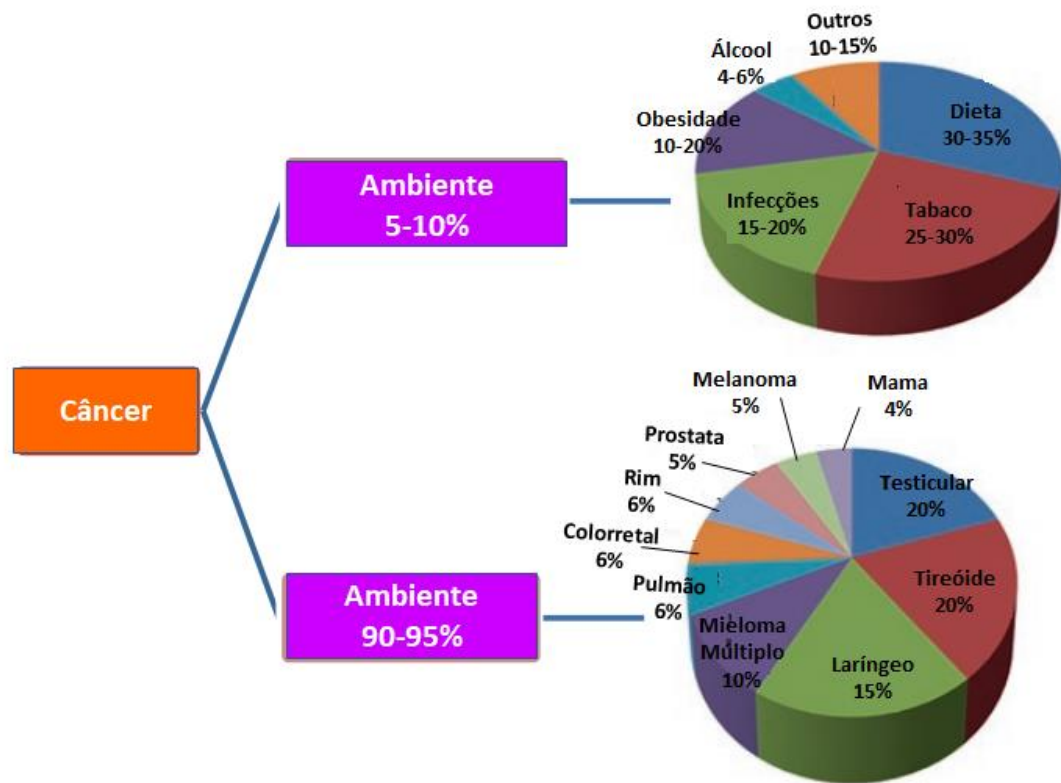
## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 CÂNCER

O câncer surge a partir de alterações genéticas e epigenéticas que permitem que as células se proliferem em excesso e escapem de mecanismos que normalmente controlam sua sobrevivência e migração (SEVER; BRUGGE, 2015). Esse processo é complexo e abrange múltiplas etapas, envolvendo muitos genes, em especial aqueles que regulam a estabilidade e reparo do DNA e a proliferação celular. Os principais genes envolvidos nesse processo são os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (GST). Os proto-oncogenes estimulam o crescimento celular, impedem a diferenciação e a morte celular, enquanto os GST são antiproliferativos, ou seja, têm como função o controle negativo da divisão das células (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A desregulação de proto-oncogenes e GST são componentes chave da carcinogênese. A ativação e a inativação de proto-oncogenes e GST, devido a mutações em um ou ambos, pode levar ao crescimento e proliferação descontrolada de células que, além de não terem as alterações genéticas reparadas, ainda acumulam novas mutações, o que caracteriza o micromambiente tumoral como altamente heterogêneo (RAYAN; RAIYN; FALAH, 2017).

O processo da carcinogênese resulta da interação entre as causas internas, tais como mutações somáticas ou hereditárias, modificações epigenéticas e alterações a nível hormonal e/ou imunitário, e as causas externas (DARWICHE, 2020). Apenas cerca de 5% dos cânceres são causados por fatores hereditários, isto significa que cerca de 95% dos casos de câncer têm suas raízes no meio ambiente e no estilo de vida (KATYAL; SHARMA, 2019). Os fatores de estilo de vida incluem tabagismo, dieta, álcool, exposição ao sol, poluentes ambientais, infecções, estresse, obesidade e sedentarismo (DABEA ALSHAMMARI *et al.*, 2019) (Figura 1). Nos dois casos, o dano genético ocorre em genes que afetam o equilíbrio de vários processos biológicos como angiogênese, crescimento celular, proliferação, apoptose, invasão e metástase (KATERJI; DUERKSEN-HUGHES, 2021).

Figura 1 - O papel dos genes e do ambiente no desenvolvimento do câncer



Modificado de KATYAL, SHARMA 2019

### 2.1.1 Principais características biológicas do câncer

As células cancerosas apresentam diversas características que as diferenciam das células normais e que lhes conferem habilidades que promovem seu crescimento e sua sobrevivência. De acordo com Hanahan e Weinberg (2011) oito características são consideradas capacidades funcionais adquiridas: sinalização proliferativa sustentada, insensibilidade aos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogênese, invasão e metástase, reprogramação do metabolismo celular e escape da resposta imunológica. Há ainda duas características denominadas habilitantes que fornecem os meios pelos quais as células tumorais desenvolvem as características funcionais acima elencadas: a instabilidade genômica e a inflamação promotora de tumor (Quadro 1) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; LABANI-MOTLAGH; ASHJA-MAHDAVI; LOSKOG, 2020).

**Quadro 1** - Principais características biológicas do câncer

<b>Sinalização proliferativa sustentada</b>	A proliferação desenfreada das células tumorais é sustentada por variados fatores: produção de seus próprios ligantes de fatores de crescimento aos quais respondem; desregulando a sinalização do receptor através da elevação das proteínas receptoras na superfície das células cancerígenas, entre outros.
<b>Evitação de supressores de crescimento</b>	Células cancerosas contornam programas de regulação da proliferação celular inativando genes supressores (TP53 e RB1), perdendo completamente esses genes ou por meio de mutações de perda de função do gene..
<b>Resistência à morte celular</b>	Células tumorais desenvolvem uma variedade de estratégias para limitar ou contornar a apoptose. A mais comum é a perda da função supressora de tumor TP53. Alternativamente, há o aumento na expressão de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) e regulação negativa de fatores pró-apoptóticos (Bax, Bim, Puma).
<b>Imortalidade replicativa</b>	Com o tempo, as células somáticas perdem a capacidade de se dividir e entram em um estado de senescência, devido ao encurtamento progressivo dos telômeros, consequência da inativação da telomerase. Contrariamente, células tumorais mantem a expressão da telomerase e reativam os telômeros, promovendo assim sua sobrevivência e tumorigênese.
<b>Indução da angiogênese</b>	Células tumorais apresentam a capacidade de induzir a criação de novos vasos sanguíneos, a partir dos já existentes em resposta a sinais químicos, possibilitando suprimento de nutrientes e oxigênio necessários para o desenvolvimento do tumor, além de favorecer metástases.

<b>Ativação de invasão e metástase</b>	Invasão e metástase são processos decorrentes de vários eventos, como: afrouxamento do contato entre as células tumorais, degradação da matriz extracelular (MEC), transição epitélio- mesenquimal (TEM), alteração na fixação das células tumorais aos novos componentes da MEC e migração das células tumorais.
<b>Reprogramação do metabolismo celular</b>	Células tumorais precisam de muita energia para crescer rapidamente, deste modo reprogramam as vias de aquisição e metabolismo de nutrientes para atender às demandas bioenergéticas, biossintéticas, resultando em uma independência funcional e manutenção das principais características do câncer.
<b>Evitação de destruição imunológica</b>	Células cancerosas escapam do sistema imune por diversos mecanismos, tais como: regulação negativa ou perda de antígenos tumorais; imunossupressão, em que os tumores suprimem as respostas imunes ou os produtos tumorais secretados; mascaramento do antígeno.
<b>Inflamação crônica</b>	Em uma resposta inflamatória normal do sistema imune, as células imunes atuam eliminando e/ou neutralizando invasores estranhos. No entanto, no microambiente tumoral, células imunes antitumorais podem ser alteradas passando a atuar como células imunes promotoras de tumor, que secretam fatores que permitem o crescimento e a metástase do tumor.
<b>Instabilidade genômica</b>	Devido à proliferação descontrolada das células cancerosas, há uma tendência crescente de alterações genômicas e mutações, as quais podem ocasionar danos em múltiplos genes que regulam a divisão celular e a supressão tumoral. A instabilidade do genoma gera as anormalidades genéticas necessárias para as características típicas do câncer.

Recentemente Hanahan (2022) sugeriu novas características que futuramente podem ser incorporadas como componentes dos *hallmarks* do câncer: desbloqueio da plasticidade fenotípica, microbiomas polimórficos, senescência celular e reprogramação epigenética não mutacional.

#### 2.1.1.1 Desbloqueio da plasticidade fenotípica

No processo embrionário, a organogênese e organização das células em tecidos são acompanhados pela diferenciação terminal, e parada do crescimento (HANAHAN, 2022). Dessa forma, a diferenciação celular final é antiproliferativa e constitui um impedimento ao processo neoplásico. Embora seja uma característica marcante da diferenciação embrionária, essa plasticidade celular também tem sido amplamente observada em células adultas terminalmente diferenciadas diante de estresses fisiológicos e patológicos crônicos, funcionando como mecanismo de adaptação ou regeneração tecidual. Por outro lado, também pode predispor os tecidos à transformação cancerosa (YUAN; NORGDAL; STANGER, 2019). Assim, a plasticidade fenotípica é uma capacidade que permite várias interrupções na diferenciação celular, como: (i) desdiferenciação de estados maduros para progenitores, (ii) diferenciação bloqueada (terminal) de estados de células progenitoras e (iii) transdiferenciação em diferentes linhagens celulares (HANAHAN, 2022).

Perekatt et al. (2018) relataram que a ativação da via WNT pode conduzir a desdiferenciação e a formação de adenoma em células epiteliais intestinais diferenciadas após a perda concomitante do fator de transcrição SMAD4 no adulto. Köhler et al. (2017) em estudo de rastreamento de linhagem de melanomas induzidos por BRAF, concluíram que estes se originaram de melanócitos pigmentados maduros que sofreram desdiferenciação durante o curso da tumorigênese. Estudos de ganho e perda de função em um modelo de zebrafish de melanoma induzido por BRAF demonstraram que a superexpressão do fator de transcrição de desenvolvimento SOX10 bloqueia a diferenciação de células progenitoras neurais em melanócitos, permitindo a formação de melanomas dirigidos por BRAF (KAUFMAN *et al.*, 2016).

#### 2.1.1.2 Microbiomas polimórficos

Há uma percepção crescente de que os ecossistemas criados por bactérias e fungos residentes (microbiomas) têm um impacto profundo na saúde e na doença (THOMAS *et al.*, 2017). Estudos de associação em manipulação humana e experimental em modelos de camundongos com câncer constataram microrganismos particulares, principalmente, bactérias,

que podem ter efeitos protetores ou deletérios no desenvolvimento do câncer, progressão maligna e resposta à terapia (HELMINK *et al.*, 2019). Além do microbioma intestinal amplamente estudado, outros microbiomas de tecidos distintos, bem como o microbioma do tumor, estão implicados na modulação da aquisição - tanto positiva quanto negativamente (HANAHAN, 2022).

Estudos envolvendo transplantes fecais de pacientes portadores de tumores de cólon em camundongos receptores predispostos a desenvolver câncer de cólon, descrevem a presença de microbiomas protetores do câncer e promotores de tumores, envolvendo espécies bacterianas específicas, que podem modular a incidência e a patogênese de tumores de cólon (SEARS; GARRETT, 2014). Conexões entre o microbioma e o câncer também tem sido exploradas em outros órgãos (WILLIS; GABALDÓN, 2020). Tem sido sugerido que bactérias orais, podem converter etanol no carcinógeno acetaldeído (KURKIVUORI *et al.*, 2007) ou regular citocinas e outras moléculas pró-inflamatórias, levando a inflamação crônica que pode estar envolvido na carcinogênese e que as toxinas bacterianas também podem afetar as vias de sinalização celular ou danificar o DNA (TUOMINEN; RAUTAVA, 2021). Estudos recentes indicam que muitos microrganismos estão envolvidos no desenvolvimento do câncer de ovário (NENÉ *et al.*, 2019; XIE *et al.*, 2017).

#### 2.1.1.3 Senescência celular

A senescência celular é uma forma usualmente irreversível de parada proliferativa da célula. A senescência pode ser induzida nas células por uma variedade de condições, incluindo estresses microambientais, como privação de nutrientes, danos ao DNA, danos a organelas, exaustão replicativa, superexpressão de oncogenes ou tratamento com quimioterápicos (BIRCH; GIL, 2020; LEE; SCHMITT, 2019). A senescência celular é considerada um mecanismo de proteção contra a neoplasia, por meio da qual as células cancerosas são induzidas a sofrer senescência (LEE; SCHMITT, 2019). Existem diversos exemplos apresentando benefícios protetores da senescência na limitação da progressão maligna (HE; SHARPLESS, 2017; KOWALD; PASSOS; KIRKWOOD, 2020); no entanto existem também evidências descrevendo que, em certos contextos, as células senescentes estimulam o desenvolvimento de tumores e a progressão maligna (WANG, BOSHI; KOHLI; DEMARIA, 2020).

Estudos demonstram que células senescentes secretam uma coleção de fatores pró-inflamatórios denominados, coletivamente, de fenótipo secretor associado a senescência (SASP). Estes SASP são capazes de potencializar vários aspectos da tumorigênese, incluindo

proliferação, metástase e imunossupressão (WANG, BOSHI; KOHLI; DEMARIA, 2020). Há relatos que células cancerosas senescentes em diferentes sistemas experimentais demonstraram contribuir para a sinalização proliferativa, evitando a apoptose, induzindo angiogênese, estimulando a invasão e metástase e suprimindo a imunidade do tumor (FAGET; REN; STEWART, 2019). Ruhland et al. (2016) demonstraram que fibroblastos senescentes na pele envelhecida recrutam células imunes inatas, que são imunossupressoras de respostas imunes antitumorais adaptativas ancoradas por linfócitos T CD8 e estimuladoras do crescimento de tumores cutâneos.

#### 2.1.1.4 Reprogramação epigenética não mutacional

O avanço da identificação de mutações em todo o genoma de células tumorais humanas levou ao entendimento de que mutações em genes que organizam, modulam e mantêm a arquitetura da cromatina, ou seja, regulam a expressão gênica, são cada vez mais detectadas e funcionalmente associadas a características do câncer. Há ainda a reprogramação do genoma que envolve apenas mudanças epigeneticamente reguladas na expressão gênica, que pode ser denominada “reprogramação epigenética não mutacional” (HANAHAN, 2022).

Existem evidências de que modificações epigenéticas contribuem para a modulação do tumor pelo microambiente tumoral, da heterogeneidade tumoral, e regulação de células estromais do microambiente tumoral (BAYLIN; JONES, 2016; DARWICHE, 2020). Por exemplo: no câncer os genes supressores de tumor têm suas regiões promotoras comumente hipermetiladas (PFEIFER, 2018); proto-oncogenes são comumente hipometilados em vários tipos de câncer (LU *et al.*, 2020); metilação desregulada de Bcl-2 e bax foi observada no glioblastoma multiforme resultando em ruptura da apoptose (HERVOUET; VALLETTE; CARTRON, 2010); padrão de metilação do DNA do genoma das células neoplásicas diferente daquele das células normais; genomas de câncer são tipicamente hipermetilados em ilhas CpG em genes específicos e hipometilados em elementos repetitivos de DNA (KALARI; PFEIFER, 2010).

### 2.1.2 Genotoxicidade e câncer

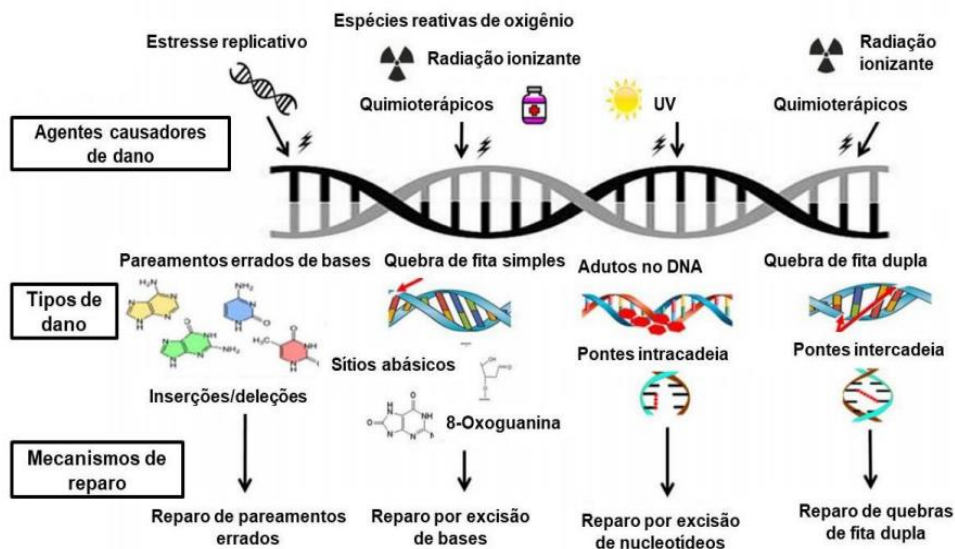
A integridade do DNA fundamental para a sobrevivência e manutenção da homeostase celular, mantida pela replicação precisa e reparo adequado. O dano ao DNA é definido como alterações químicas e físicas na dupla hélice do DNA que são derivadas de origens endógenas ou exógenas, prejudicando a função e a integridade do material genético (HELENA *et al.*, 2018; KATERJI; DUERKSEN-HUGHES, 2021). Danos endógenos ao DNA, originados de



processos metabólicos internos, incluem danos causados por espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), que podem causar a oxidação de bases nitrogenadas e quebra no DNA; incorporação errônea de bases durante a replicação, a interconversão de bases por desaminação e a perda de bases por depurinação (HELENA *et al.*, 2018). Danos exógenos ao DNA, originados de processos ambientais externos, podem ser de natureza física (radiação ionizante e ultravioleta solar), poluentes ambientais presentes no ar, água e alimentos, ou biológica, tais como como vírus, bactérias e outros parasitas (CHATTERJEE; WALKER, 2017).

Genotoxicidade se refere a qualquer mudança deletéria no material genético, independentemente do mecanismo pelo qual a mudança é induzida (SHAH, 2012). Na maioria dos casos, a genotoxicidade leva a mutações em várias células, que podem levar a disfunções celulares, desde câncer até uma ampla variedade de doenças (HELENA *et al.*, 2018). Se o DNA danificado for reparável, durante os *checkpoints* do ciclo celular, ocorre a correção dos danos, sendo mantida a integridade do genoma e a sobrevivência da célula. Se a extensão do dano for irreparável, as células contendo DNA danificado são direcionadas para apoptose, prevenindo a proliferação de células mutantes. Caso os mecanismos de reparo do DNA não ocorram de forma eficiente ou a morte celular não seja desencadeada, as mutações são fixadas e outras novas surgem, levando à transformação da célula (HELENA *et al.*, 2018; JACKSON; BARTEK, 2009) (Figura 2).

Figura 2 - Dano ao DNA e mecanismos de reparo. Vários tipos de agentes causam diferentes tipos de dano no DNA.



Adaptado de Helena *et al.*, 2018.

### 2.1.3 Terapias anticâncer

Várias modalidades terapêuticas podem ser aplicadas para o tratamento de neoplasias, como cirurgia para remoção do tumor, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia, vacinas contra o câncer, terapia hormonal, terapia fotodinâmica e transformação de células-tronco (IQBAL *et al.*, 2017). Cada modalidade de tratamento apresenta vantagens e desvantagens, sendo as vezes necessária a combinação de tratamentos para produzir resultados mais efetivos (D'ERRICO; MACHADO; SAINZ, 2017).

A técnica cirúrgica pode levar a remoção de tumores com eficácia se não houver metástase (ALMEIDA *et al.*, 2005). A radioterapia (geralmente raios gama, radioisótopos como cobalto-60 e raios-X) é comumente usada em conjunto com a cirurgia. Nesses casos radiações de alta energia interrompem a divisão celular e bloqueiam sua capacidade de proliferar, devido ao dano no material genético. Se feito antes da cirurgia, a radioterapia é administrada para diminuir o tumor; se for administrada após a cirurgia, as radiações destruirão as células tumorais remanescentes e reduzirão a recidiva do câncer (ABBAS; REHMAN, 2018). A radiação ionizante é utilizada para agir sobre as células de rápido crescimento, e uma vez que as células tumorais têm um déficit em genes reparadores do DNA, elas ficam mais vulneráveis a radiação mais intensa (D'ERRICO; MACHADO; SAINZ, 2017).

A quimioterapia como tratamento para o câncer teve início na década de 1940 (BASAK *et al.*, 2021). O princípio central da quimioterapia baseia-se na utilização de substâncias cujo alvo principal são células com altos índices de replicação. Dentro das células, esses compostos induzem danos ao DNA, impedindo ou modificando processos relacionados à replicação e síntese de proteínas. Uma grande desvantagem dos quimioterápicos comumente usados é sua alta toxicidade inespecífica, principalmente em tecidos saudáveis de rápida proliferação, desencadeando uma ampla variedade de efeitos adversos tanto precoces quanto tardios (KHAZIR *et al.*, 2014; REUVERS; KANAAR; NONNEKENS, 2020). Essas desvantagens limitam o uso de drogas antitumorais, uma vez que diminuem a qualidade de vida dos pacientes. Apesar disso, a quimioterapia ainda é um dos tratamentos mais utilizados para todos os tipos de câncer e em todas as fases da progressão do tumor (RAYAN; RAIYN; FALAH, 2017).

Os quimioterápicos quanto ao mecanismo de ação podem se divididos em: antimetabólicos, alquilantes, inibidores da telomerase, inibidores do fuso mitótico, e outras substâncias com propriedades mistas ou com efeitos ainda não bem elucidados (CHOUDHARI *et al.*, 2020; IQBAL *et al.*, 2017).

### 2.1.3.1 Antimetabólicos

Quimioterápicos antimetabólitos são agentes antineoplásicos ciclo específicos que interferem nas vias biossintéticas essenciais, perturbando a síntese de DNA/RNA ou causando a formação de quebras de fita de DNA por inibição de enzimas específicas (diidrofolato redutase, ribonucleotídeo redutase e DNA polimerase) ou incorporação de falsos análogos estruturais de pirimidina/purina ao DNA. Como exemplos, cita-se a gencitabina (efeitos adversos: mielossupressão, elevações das enzimas hepáticas e pneumonite intersticial), metotrexato (efeitos adversos mielossupressão, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade), fluorouracil - 5-FU (efeitos adversos: disfunção cardíaca, leucopenia, alopecia, colite e neutropenia) (NUSSBAUMER *et al.*, 2011; SARDER *et al.*, 2015).

### 2.1.3.2 Alquilantes

Os alquilantes são os quimioterápicos mais comumente usados no tratamento contra o câncer. Atuam adicionando um grupo alquila à molécula de DNA, induzindo quebra de suas fitas e impedindo sua replicação. Como por exemplos, cita-se: carboplatina (efeitos adversos: trombocitopenia, granulocitopenia, anemia, neuropatia periférica e dor vascular leve), cisplatina (efeitos adversos: mielossupressão, nefrotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e vômitos), ciclofosfamida (efeitos adversos: mielossupressão, neutropenia, anemia e trombocitopenia, infertilidade) (BASAK *et al.*, 2021; QUE *et al.*, 2016).

### 2.1.3.3 Inibidores da topoisomerase

Atuam inibindo as atividades das topoisomerasas, enzimas envolvidas na replicação do DNA. Uma vez inibidas, ocorre a quebra das fitas do DNA, o que por sua vez, leva a parada da divisão celular. Temos como exemplo: irinotecano (efeitos adversos: neutropenia, neuropatia sensorial e diarreia) e doxorrubicina (efeitos adversos: cardiotoxicidade, neuropatia, hepatotoxicidade, alopecia, mielossupressão, neutropenia, anemia), etoposídeo (efeitos adversos: neuropatia, leucopenia, trombocitopenia, alopecia e anemia) (MOUKHARSKAYA; VERSCHRAEGEN, 2012; SEITER, 2005) e

### 2.1.3.4 Inibidores do fuso mitótico

Quimioterápicos inibidores do fuso mitótico que atuam interferindo no sistema de microtúbulos, afetando a mitose celular e perturbando a forma e a motilidade da célula. Neste grupo, estão os taxanos (docetaxel e paclitaxel), cujos efeitos adversos são neuropatia mielossupressão, deficiência hepática, e hipersensibilidade, entre outros (FLORIAN;

MITCHISON, 2016; HO; MACKEY, 2014); alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) apresentando como efeitos adversos a mielossupressão, neurotoxicidade, hipertensão, alopecia e toxicidade pulmonar) (MARTINO *et al.*, 2018).

Há ainda outros agentes quimioterápicos que são caracterizados por mecanismos de ação não homogêneos, incluindo-se nessa classe algumas enzimas (l-asparaginase), inibidores de proteassoma (bortezomibe), inibidores de tirosina quinase (imatinibe e erlotinibe) e antibióticos (bleomicina, actinomicina D e antraciclina) (CERSOSIMO, 2006).

## 2.2 MÉTODOS DE INVESTIGAÇÃO UTILIZADOS EM BUSCA DE NOVAS DROGAS ANTITUMORAIS

Os ensaios *in vitro* fornecem uma abordagem inicial na triagem de candidatos a medicamentos contra o câncer. Uma ampla gama de ensaios *in vitro* foi desenvolvida para avaliar as características da célula neoplásica, tais como viabilidade e proliferação celular, apoptose, senescência celular, invasão e migração, estresse oxidativo e efeitos antioxidantes, expressão de genes e proteínas, angiogênese e alterações genômicas. A seleção de um ensaio ou técnica em particular depende dos objetivos da pesquisa (EDIRIWEERA; TENNEKOON; SAMARAKOON, 2019). Aqui abordaremos apenas os ensaios utilizados nesta tese.

### 2.2.1 Ensaio de viabilidade celular

Viabilidade celular é definida como o número de células viáveis em uma amostra, sem distinção entre células que estão em divisão ativa ou quiescentes. Os ensaios de viabilidade visam medir parâmetros de manutenção e sobrevivência celular (MÉRY *et al.*, 2017), e permitem definir limites de concentrações da droga a serem usados nos ensaios de avaliação do potencial antitumoral e seus possíveis mecanismos de ação.

O ensaio sulforrodamina B (SRB) é um método colorimétrico utilizado para medir a citotoxicidade induzida por drogas em culturas de células, desenvolvido para uso no programa de descoberta de drogas anticâncer, do Instituto Nacional do Câncer (NCI). SRB é um corante aminoxanteno rosa brilhante que sob condições levemente ácidas se liga eletrostaticamente e pH dependente a resíduos de aminoácidos básicos de proteínas em células fixadas pelo ácido tricloroacético (TCA). Após a ligação com a SRB, o corante ligado é solubilizado em condições básicas e a absorbância da SRB é mensurada através de um espectrofotômetro. Uma vez que a ligação da SRB é estequiométrica, a quantidade de corante extraído de células pigmentadas é diretamente proporcional à massa total de proteína e, portanto, relaciona-se a intensidade de

marcação à quantidade de células viáveis presentes (SHOEMAKER, 2006; SKEHAN *et al.*, 1990).

O ensaio SRB por ser independente do metabolismo celular, não mostra interferência nos compostos avaliados, diferentemente do ensaio MTT (brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio), cujo princípio é a redução metabólica do sal tetrazólio de cor amarela em cristais de formazan de coloração arroxeadada. (SHOEMAKER, 2006; VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

### **2.2.2 Ensaio de genotoxicidade**

A identificação de possíveis efeitos genotóxicos durante o processo de triagem de agentes anticancer é importante para a avaliação risco/benefício quando de seu uso potencial em humanos (DOPPALAPUDI *et al.*, 2012). Segundo Mishima (2017), a terapia anticâncer atual pode ser uma das fontes exógenas mais importantes de exposição a agentes genotóxicos nos EUA, Japão e Europa.

O ensaio cometa é uma metodologia sensível que avalia e quantifica danos no DNA de células individuais, a partir da eletroforese do DNA em gel (SINGH *et al.*, 1988). A técnica consiste na incorporação de amostras de células a um gel de agarose, seguido de tratamento com solução de lise a fim de remover membranas celulares e proteínas, mantendo apenas o nucleóide (cromatina nuclear sem o envoltório nuclear). O material genético é submetido a uma corrente elétrica e, uma vez que o DNA tem carga negativa, seus fragmentos se deslocam em direção ao ânodo, formando uma cauda que varia de tamanho conforme a extensão do dano (fragmentação do DNA) ocorrido. Por outro lado, o material genético intacto/não fragmentado permanece estático (cabeça de cometa). Neste método, células com maior quantidade de danos no DNA apresentam migração mais rápida durante a eletroforese. Assim, a extensão do dano é avaliada pelo deslocamento do DNA (cauda do cometa) em relação ao nucleóide (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; KARLSSON, 2010)

### **2.2.3 Teste de clonogenicidade**

Células tumorais apresentam habilidade de proliferação ilimitada e podem invadir os limites dos tecidos circundantes. Essa capacidade das células neoplásicas de migrar para fora de seu nicho original (metástase), uma das principais causas da agressividade do câncer, está relacionada a maioria das mortes dos pacientes (SOMCHAI *et al.*, 2020). Considerando que metástase é basicamente uma população de células clonais resultantes da proliferação de uma

única célula cancerosa disseminada (NICCO *et al.*, 2022), na triagem de candidatos a drogas antineoplásicas, essas capacidades (proliferação e migração) devem ser avaliadas.

O ensaio clonogênico ou de formação de colônias determina a capacidade de sobrevivência de células individuais se reproduzirem, formando colônias (com pelo menos 50 células), após tratamento com determinado composto ((FRANKEN *et al.*, 2006), com período de incubação de 1 a 3 semanas, dependendo da linhagem celular, o que equivale a pelo menos seis divisões celulares para formar clones suficientemente grandes para serem visíveis a olho nu. As colônias devem ser fixadas, coradas e contadas. Sendo uma metodologia que simula o crescimento e a recorrência de tumores após o tratamento com quimioterapia, o ensaio fornece uma plataforma de descoberta de drogas para compostos que bloqueiam esses processos (GOMES *et al.*, 2022). É considerado o padrão ouro para determinar a falência reprodutiva em células previamente submetidas a tratamento, além de verificar a duração dos efeitos do tratamento (BRASELMANN *et al.*, 2015; MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005).

#### **2.2.4 Teste de migração celular**

A migração celular é um processo vital no qual as células precisam se ajustar e alcançar sua localização correta em um determinado ambiente para desempenhar seu papel biológico. A desregulação desta atividade pode levar a processos patológicos, como inflamação e metástase do câncer (BAHAR; YOON, 2021).

O ensaio *wound healing* é um dos testes mais utilizados na avaliação do impacto de uma substância na mobilidade celular, principalmente devido à sua simplicidade na configuração experimental e na análise dos dados no pós-processamento (SOMCHAI *et al.*, 2020). Este teste se baseia na observação de que, após a criação de um espaço artificial em uma cultura celular em monocamada confluyente, as células na borda desse espaço migrarão em direção à abertura para fechar a fenda até que novos contatos célula-célula sejam estabelecidos. A análise é feita a partir da captura de imagens no início do teste (tempo zero) e em intervalos regulares para observar o fechamento do espaço criado para determinar a taxa de migração celular (WU, JIA-SHUN *et al.*, 2021).

#### **2.2.5 Microscopia de força atômica como ferramenta de análise biológica**

Desde sua invenção em 1986, a MFA é um dos métodos mais importantes para o estudo de imagem das superfícies de objetos em resoluções nanométricas (CHANG *et al.*, 2012; NIKITAEV *et al.*, 2021). Os métodos de triagem de novas drogas *in vitro* acima relatados são

amplamente utilizados, no entanto estes não são sensíveis o suficiente para fornecer informações em nível de nanoescala sobre as estruturas micro-morfológicas que participam das interações entre as células tumorais e os potenciais medicamentos anticâncer, assim como não possibilitam discriminar possíveis micro-mudanças na superfície da membrana celular em resposta aos tratamentos (DUFRENE *et al.*, 2017; WANG, JINYI *et al.*, 2009).

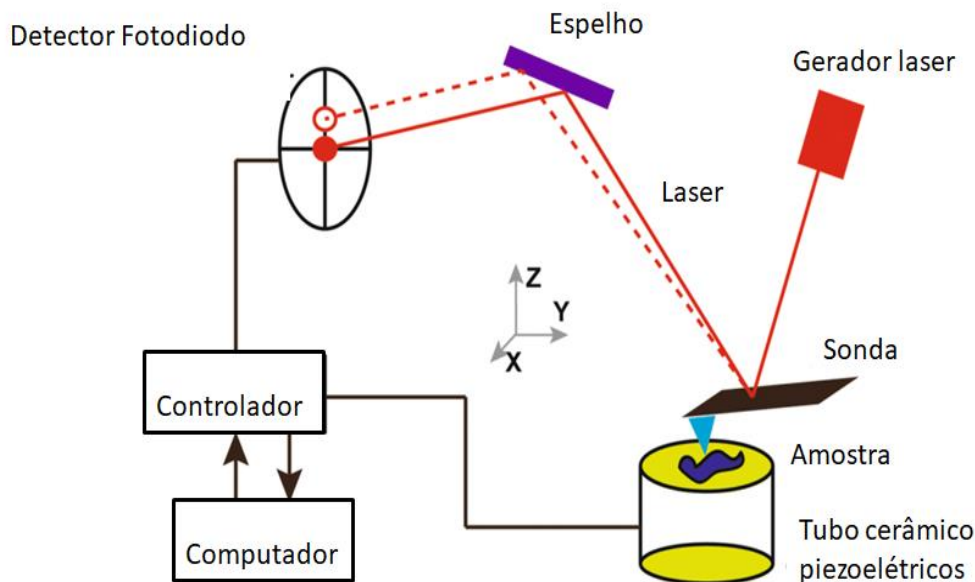
Sabe-se que as células, sob estímulos externos ou quaisquer modificações biológicas, apresentam alterações de propriedades físico-químicas que afetam diretamente os processos fisiológicos (NIKITAEV *et al.*, 2021). Por exemplo, durante a invasão e metástase de células tumorais, a adesão entre as células é reduzida, e a forma e a dureza das células mudam de acordo com o ambiente circundante, a fim de atender as atividades fisiológicas das próprias células neoplásicas (MALANDRINO; KAMM; MOEENDARBARY, 2018; MIERKE, 2020).

Atualmente, a maioria dos estudos relacionados a drogas anticâncer e seus efeitos inibitórios nas células cancerosas são baseados nas suas propriedades bioquímicas. No entanto, as propriedades fisiológicas das células tumorais fazem com que suas propriedades mecânicas sejam diferentes daquelas das células normais. Assim considera-se preponderante estimar o efeito de drogas anticâncer com potenciais de alterar as propriedades morfológicas e mecânicas das células (HUNG; TSAI, 2015; LAL; RAMACHANDRAN; ARNSDORF, 2010).

Pi *et al.* (2016) verificaram que o flavonoide quercetina induziu apoptose em células HepG2 através da interrupção do ciclo celular e interrupção do potencial de membrana das mitocôndrias. Por meio de observações de alta resolução, constataram que o tratamento com quercetina aumentou o tamanho das partículas e a rugosidade da superfície celular de HepG2, além ocasionar maior rigidez da membrana. Também usando quercetina, mas em células de câncer de bexiga T24, Adami *et al.*, (2021) relataram redução da viabilidade e proliferação como resultado de apoptose. Alterações observadas por MFA, como aumento da rugosidade, agregação de proteínas de membrana e aumento da rigidez após o tratamento com quercetina foram compatíveis com apoptose. Exposição de células de câncer de esôfago (KYSE-150) com oridonina, fitoterápico tradicionalmente usado na China, inibiu a proliferação e provocou apoptose induzida pela superprodução de ROS (PI *et al.*, 2015). Com base em imagens de alta resolução por MFA, os autores constataram que o tratamento com oridonina induziu alterações morfológicas e ultraestruturais, como aumento da altura e da rugosidade da membrana celular, além de alterações da rigidez celular.

A microscopia de força atômica (MFA) baseia-se na varredura da superfície de uma amostra por meio de uma ponta piramidal integrada em um cantilever flexível. A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantilever se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação. Na parte superior da haste há um espelho que reflete a luz de um feixe de laser, o qual passa por uma lente e incide sobre um fotodetector (fotodiodo) de quatro quadrantes, que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do cantilêver. À medida que a ponteira varre a amostra, os diferentes tipos de características morfológicas encontrados sobre a superfície fazem com que a interação mude. As variações das interações são os fatores que provocam diferentes deflexões, que captadas no detector, armazenadas e processadas por um computador, são então transformadas em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais (DENG *et al.*, 2018) (Figura 1).

Figura 3 - Diagrama esquemático dos princípios de funcionamento do microscópio de força atômica.



Adaptado de Deng *et al.*, 2018

### 2.3 FLAVONOIDES COMO AGENTES ANTITUMORAIS

Estudos sobre produtos naturais para prevenção do câncer levaram a descoberta de mais de 3000 medicamentos com propriedades antitumorais. Estima-se que entre 1981 e 2019, aproximadamente 25% de todos os medicamentos anticâncer recém-aprovados estavam relacionados a produtos naturais. Medicamentos como paclitaxel, vimblastina ou vincristina, irinotecano, camptotecina, são exemplos importantes de medicamentos obtidos de produtos

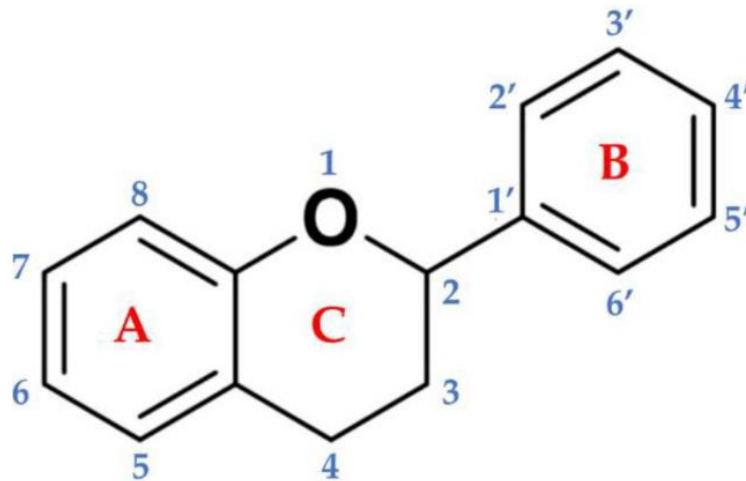


naturais derivados de plantas e que são utilizados clinicamente no tratamento de diferentes tipos de tumor (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Flavonoides são uma classe de metabólitos secundários amplamente distribuídos na natureza, presentes em quase todas as plantas terrestres (XIANG *et al.*, 2020) e em ambientes marinhos (FERDOUS; BALIA YUSOF, 2021; MARTINS *et al.*, 2019). Até agora, cerca de 8.000 flavonoides diferentes foram descritos, sendo produzidos essencialmente para proteger as plantas de danos externos, incluindo fatores bióticos e abióticos (MUTHA; TATIYA; SURANA, 2021).

Estruturalmente, os flavonoides englobam um grupo de compostos fenólicos complexos. Possuem baixo peso molecular, com uma estrutura central com quinze carbonos consistindo em dois anéis aromáticos com seis átomos de carbono (A e B) e um heterocíclico oxigenado que contém três átomos de carbono (C), como mostrado na Figura 4. Podem ocorrer na forma livre (agliconas) ou conjugada a açúcares (glicosídeos) (FORNI *et al.*, 2021).

Figura 4 - Estrutura básica de um flavonoide



Adaptado de FORNI *et al.* (2021).

Variações na substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, tais como: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas; e substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides. Essa diversidade de padrões estruturais faz com que os flavonoides sejam reconhecidos como uma fonte rica de compostos com potenciais propriedades biológicas (KUMAR; PANDEY, 2013; RAVISHANKAR *et al.*, 2018). Diversas pesquisas têm revelado que estes compostos exibem uma grande ação sobre os sistemas biológicos, sendo responsáveis

por uma variedade de atividades farmacológicas como, antioxidante, anti-inflamatório, antiviral, cardioprotetora e antitumoral (FORNI *et al.*, 2021; SANDU; BÎRSĂ; BAHRIN, 2017).

Os flavonóides exercem uma ampla variedade de efeitos antitumorais: eles modulam as atividades das enzimas de eliminação de ROS, participam da interrupção do ciclo celular, induzem apoptose, autofagia, suprimem a proliferação e invasão de células cancerosas, atuam na modulação de inflamação e imunidade (KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020; ULLAH *et al.*, 2020).

### **2.3.1 Flavonoides e antiproliferação celular**

Pesquisas demonstram que flavonóides exibem efeitos antiproliferativos por meio de múltiplos mecanismos moleculares que envolvem a modulação da apoptose associada à parada do ciclo celular, como descrito por ZHANG *et al.* (2018). Esses autores observaram que flavonóides derivados de *Tephrosia kirilowii* inibiram a proliferação celular em uma variedade de linhagens tumorais humanas, por meio da parada do ciclo celular na fase G2/M, indução de apoptose e autofagia. Resultados equivalentes foram relatados por Tavsan e Kayali (2019) testando o efeito de apigenina, luteolina e miricetina em células de câncer de ovário. Clemente-Soto *et al.* (2019) trabalhando com quercetina, mostraram indução de apoptose através do mecanismo de ativação de p53 em células de câncer cervical e gástrico. Sun *et al.* (2018) descreveram que a fisetina pode inibir a proliferação, migração e inibição de linhagens celulares de carcinoma mamário humano, interferindo na via de sinalização PI3K/Akt/mTOR. Alguns flavonóides, também mostraram efeito antitumoral induzindo autofagia em células tumorais, tais como a pelargonidina, cuja ação em células de osteosarcoma, desencadeou, além da autofagia, a parada do ciclo celular G2/M (CHEN, YONGGANG *et al.*, 2018), assim como a apigenina em células do câncer papilar da tireoide (ZHANG, LI *et al.*, 2015).

### **2.3.2 Flavonóides e Estresse Oxidativo**

O estresse oxidativo é um fenômeno causado por um desequilíbrio entre a produção e o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade de um sistema biológico de desintoxicar esses produtos reativos (PIZZINO *et al.*, 2017). As EROS são usadas para nomear radicais de oxigênio (como radicais hidroxila e radicais superóxido) e vários outros produtos não radicais de oxigênio, como peróxido de hidrogênio, que causam danos oxidativos. As EROS exibem efeitos benéficos regulando a sinalização intracelular e a homeostase; no entanto, em níveis elevados, podem ocasionar danos em proteínas, lipídios e DNA, que podem levar ao

aparecimento e/ou progressão de várias doenças (FORNI *et al.*, 2021; KONTOMANOLIS *et al.*, 2020).

A atividade antioxidante dos flavonóides pode ser direta por meio do sequestro de radicais livres ou quelando íons metálicos (CHERRAK *et al.*, 2016), enquanto os efeitos indiretos estão relacionados à ativação de enzimas antioxidantes, supressão de enzimas pró-oxidantes e estimulação da produção de enzimas antioxidantes e enzimas de desintoxicação. Como agentes pró-oxidantes, os flavonoides agem por inibição de vias de sinalização de proliferação, supressão de citocinas pró-inflamatórias, apoptose e ativação de autofagia. Ambas as atividades antioxidantes e pró-oxidantes estão envolvidas nos efeitos anticancerígenos dos flavonóides (KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020; XI *et al.*, 2022).

Flavonoides apigenina e a luteolina induziram a apoptose e a parada do ciclo celular em linhas de células de câncer de mama por meio da via Akt/FOXO3a como resultado da remoção de EROS (LIN *et al.*, 2015). Wu *et al.* (2019) descreveram que os flavonóides de *Ziziphora clinopodioides* protegeram células endoteliais de veias do cordão umbilical (HUVEC) contra a lesão induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como resultado do aumento da capacidade antioxidante e apoptose. Catequinas e procianidinas do cacau induziram danos no DNA e apoptose em células epiteliais de câncer de ovário devido às suas propriedades pró-oxidantes (TAPARIA; KHANNA, 2016). Estudos mostraram que a quercetina reduziu a proliferação de células HepG2 de carcinoma hepatocelular mediado pela redução de EROs intracelulares (JEON *et al.*, 2019), por outro lado aumentou a produção de EROS e o número de células apoptóticas no câncer gástrico humano AGS (SHANG *et al.*, 2018) e em células do câncer de mama humano (WU, QIU *et al.*, 2019).

### 2.3.3 Flavonóides e Apoptose

Um das características das células tumorais é a capacidade de evitar a cascata apoptótica, escapando da morte celular programada (apoptose). Flavonóides são capazes de induzir apoptose por vários mecanismos, como: neutralização de EROS, regulação negativa de moléculas antiapoptóticas (Bcl-2 e Bcl-xL, survivina, etc) e aumento da expressão de moléculas pró-apoptóticas (caspases Bad, Bax, etc) (ABOTALEB *et al.*, 2018; KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020). Genisteína induziu a morte apoptótica em células de adenocarcinoma de cólon através da ativação da via da caspase-3 nos níveis transcricional, proteico e enzimático (SHAFIEE *et al.*, 2016) e pela via de sinalização apoptótica intrínseca inibindo a fosforilação de Akt em células de câncer colo retal (QIN *et al.*, 2016). O isoflavonóide daidzeína promoveu a liberação do citocromo c das mitocôndrias, levando à ativação das caspases 7 e 9 e também alterou a relação Bax/Bcl-2 em células de câncer de mama (JIN *et al.*, 2010).

### 2.3.4 Flavonóides como anti-inflamatórios

A inflamação crônica leva ao desenvolvimento do tumor, modulando a transformação celular, sobrevivência, proliferação, invasão, metástase e vias de angiogênese (KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020). Flavonóides demonstraram ação anti-inflamatória via regulação de células imunes, modificando a expressão de vários genes pró-inflamatórios relacionados a citocinas, lipoxigenase, óxido nítrico sintases ciclooxigenase, além de suas características antioxidantes como a eliminação de EROS (KOPUSTINSKIENE *et al.*, 2020; YAHFOUFI *et al.*, 2018). Em linhagens celulares de câncer de mama MCF7, genisteína exerceu influência na expressão de genes relacionados à inflamação (PONS *et al.*, 2019). A naringenina inibiu a migração de células de câncer de mama através da modulação das vias de sinalização inflamatória e apoptótica (ZHAO *et al.*, 2019), além de suprimir a migração e invasão de células de glioblastoma devido à inibição das atividades de ERK e p38 (CHEN, YEN-YU *et al.*, 2019).

### 2.3.5 Flavonóides e angiogênese

A angiogênese é o processo de crescimento de novos capilares, sendo para a maioria dos tumores malignos, o processo inicial de metástase tumoral. Flavonóides inibem a angiogênese e a metástase através da regulação de múltiplas vias de sinalização. Eles regulam a expressão de VEGF, metaloproteinasas de matriz (MMPs), EGFR e inibem as vias de sinalização NF $\kappa$ B, PI3-K/Akt e ERK1/2 (SUBBARAJ; KUMAR; KULANTHAIVEL, 2021). Kim (2017) relatou que a miricetina reduziu significativamente a angiogênese em linhagens celulares HUVEC ao inibir as vias de sinal, como Akt/PI3K/mTOR. Luo *et al.* (2009) verificaram que kaempferol inibiu a angiogênese e a expressão de VEGF em células de câncer de ovário humano através de vias dependentes de HIF (Akt/HIF) e independentes de HIF (ESRRA). Chen *et al.* (2019) verificaram que Epigallocatequina 3 galato (EGCG) também reduziu a angiogênese inibindo as vias de sinalização VEGF, endoglin/smad1 em células HUVEC.

### 2.3.6 Flavonóides e membrana celular

A membrana plasmática é um importante regulador da função celular, desempenhando papéis importantes nos processos fisiológicos das células, como transdução de sinal, transporte celular, conversão de energia, reconhecimento de superfície celular, sobrevivência celular e diferenciação, sendo sua integridade vital na sobrevivência celular (AMMENDOLIA; BEMENT; BRUMELL, 2021; LUCIO; LIMA; REIS, 2010).

A entrada de qualquer molécula na célula ocorre a partir da membrana plasmática, assim as interações de membrana de uma molécula terão uma grande influência em seus mecanismos de ação. Deste modo, as atividades biológicas de uma molécula decorrem do seu modo de interação com os componentes da membrana, bem como sua localização e tempo de residência na membrana celular (SELVARAJ *et al.*, 2015). Fatores presentes tanto no ambiente extra quanto intracelular podem induzir rupturas químicas ou físicas na membrana plasmática, as quais podem ocasionar morte celular ou alterar amplamente a paisagem intracelular por meio de vazamento citosólico e exposição ao ambiente externo (AMMENDOLIA; BEMENT; BRUMELL, 2021).

A atividade biológica dos flavonoides está relacionada com a sua estrutura molecular e depende do número e local de fixação dos grupos funcionais (por exemplo, grupos hidroxilo) na molécula, como da possibilidade de interagir com uma membrana biológica, tendo seus efeitos explicados por sua ligação ou interferência com enzimas, receptores, transportadores e sistemas de transdução de sinal (SELVARAJ *et al.*, 2015; TSUCHIYA, 2010; WŁOCH *et al.*, 2021).

Os flavonóides são capazes de interagir com membranas celulares e penetrar mais ou menos profundamente em seus sítios hidrofóbicos ou interfásicos, dependendo da hidrofilicidade e/ou hidrofobicidade. Assim, aqueles hospedados na membrana podem influenciar em suas propriedades biofísicas (microviscosidade, potencial transmembranar) e nanomecânicas (elasticidade, fluidez e permeabilidade) alterando o arranjo dos constituintes da membrana responsáveis pela transdução do sinal celular, a regulação do metabolismo e da atividade biológica (MANDIĆ *et al.*, 2019a; POKLAR ULRIH *et al.*, 2010; TARAHOVSKY *et al.*, 2014).

Vários trabalhos sugerem uma relação entre as interações da membrana e as atividades biológicas dos flavonóides, tais como Saha *et al.* (2020), que sugerem que posicionamento de compostos (morin, fisetina e apigenina) na membrana lipídica pode afetar suas propriedades antioxidantes. Pawlikowska-Pawlega *et al.*, (2018) constataram que o lensosídeo A $\beta$  pode exercer seu efeito benéfico sobre as células através de sua intercalação e interações com membranas, Ajdžanović *et al.* (2013) propõem que a genisteína teria efeito antimetástico em células de câncer de próstata devido a diminuição da fluidez da membrana; Sanver *et al* (2016) relata que a interação entre quercetina e a superfície da membrana celular durante processos bioquímicos pode influenciar suas propriedades como agentes antivirais e anticancerígenos.

## 2.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA ESPÉCIE *Arrabidaea brachypoda*

Diversas atividades biológicas são atribuídas a espécies do gênero *Arrabidaea*. Entre elas, podemos citar: bactericida de *A. chica* (MAFIOLETI *et al.*, 2013); anti-tripanosoma de *A. triplinervia* (LEITE *et al.*, 2006) e *A. chica* (CORTEZ DE SÁ *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2014); antifúngica de *A. Chica* (BARBOSA *et al.*, 2008) e *A. brachypoda* (ALCERITO *et al.*, 2002); vermícida de *A. pulchra* (ALVARENGA *et al.*, 2012); antiviral de *A. samyoides* (BRANDÃO *et al.*, 2010); antioxidante de *A. patellifera* (MARTIN *et al.*, 2008) e *A. chica* (SIRAICHI *et al.*, 2013); anti-inflamatória de *A. chica* (MICHEL *et al.*, 2015); além de atividade antitumoral de *A. chica* (MICHEL *et al.*, 2015; TAFFARELLO *et al.*, 2013).

*A. brachypoda* (sinonímia *Fridericia platyphylla*) (Figura 6) é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, conhecida no Brasil como “cervejinha do campo”, “cipó-una” ou “tintureiro”. É um arbusto, com 1 a 2 metros de altura, abundantemente ramificado, com ramos cilíndricos, estriados, glabros, com lentículas, com folhas simples e flores róseo-roxas em inflorescências terminais (ALCERITO *et al.*, 2002).

Figura 5 - *Arrabidaea brachypoda*



Fonte: da ROCHA *et al.* 2017.

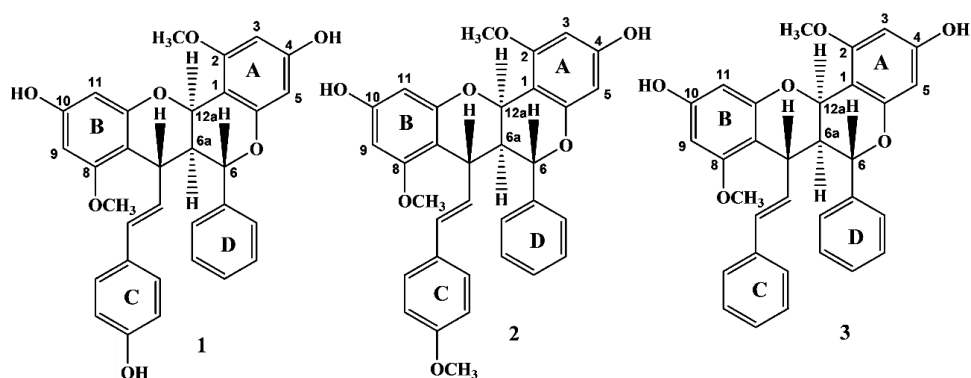
*A. brachypoda* vem sendo utilizada há muito tempo pela medicina popular para o tratamento de cálculos renais e dores em geral (da ROCHA *et al.*, 2011). Alcerito *et al.* (2002) relataram quatro compostos flavonoides extraídos de folhas de *A. brachypoda* com atividade antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum*. Em outro estudo, da Rocha *et al.* (2011) relataram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico isolado da raiz de

*A. brachypoda*, confirmando o potencial farmacológico dessa espécie, sustentando assim seu uso popular no tratamento de dores e inflamações. Além disso, determinaram que flavonoides e triterpenos são os principais constituintes no extrato testado. Avaliando as propriedades anti-inflamatórias do triterpeno olenano dessa mesma espécie, da Rocha et al. (2015). ratificaram o seu efeito anti-inflamatório. Além disso, Brandão *et al.* (2010) relataram atividade antiviral do extrato de caule e de frutas de *A. brachypoda*. Quanto ao potencial antileishmanial de *A. brachypoda*, Pereira et al. (2012) revelaram que as frações hexânica e acetato-etílica das folhas da planta são ativas contra *Leishmania amazonensis*. Na ação antifúngica, Menezes Filho et al. (2021) descreveram o efeito do extrato hidroetanólico floral de *A. brachypoda* em cepas de *Candida*.

## 2.5 BRAQUIDINAS

Da Rocha *et al.* (2014) a partir FDCM do extrato de raízes de *A. brachypoda*, identificaram e caracterizaram três novos compostos, classificados como flavonoides dimericos incomuns, denominados braquidinas A, B e C. Esses flavonóides são compostos por quatro anéis independentes (A, B, C e D) e dois anéis benzopiranos fundidos, com diferentes grupos substituintes no anel C (Figura 6). Os referidos autores relataram atividade tripanocida destes compostos, tanto *in vitro* quanto em modelos *in vivo*, com efeitos menos tóxicos que benznidazol, droga utilizada no tratamento da doença de Chagas.

Figura 6 - Estrutura química dos compostos isolados de *A. brachypoda*.



Legenda: Braquidina A (1), braquidina B (2) e braquidina C (3).

Ação antiulcerogênica de extrato hidroetanólico de raiz dessa mesma planta foi relatada por da Rocha et al. (2017), com atividade equivalente ao lansoprazol, medicamento de primeira escolha na terapia contra úlcera gástrica. Em investigação fitoquímica mais profunda deste extrato, os autores isolaram, além das braquidinas agliconas citadas acima, sete flavonoides

diméricos glicosilados e outros dois compostos descrito pela primeira vez na família Bignoniaceae, sem dados prévios na literatura sobre suas propriedades farmacológicas.

Braquidinas isoladas da FDCM apresentaram ação leishmanicida *in vitro*, porém tal atividade não foi encontrada *in vivo* (ROCHA et al., 2018). Sousa Andrade *et al.* (2020), avaliaram a atividade de extratos etanólico e fração diclorometano, além das moléculas isoladas braquidinas A e B, obtidos das flores de *A. brachypoda* contra as espécies *Staphylococcus aureus*, *Escherchia coli* e *Candida albicans* e constaram que apenas a braquidina B apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*. Salgado *et al.* (2020) verificaram, *in vitro*, a atividade anti-inflamatória da FDCM e seus isolados braquidinas A e B, da raiz de *A brachypoda*, ratificando assim o uso tradicional dessas raízes no tratamento da osteoartrite.

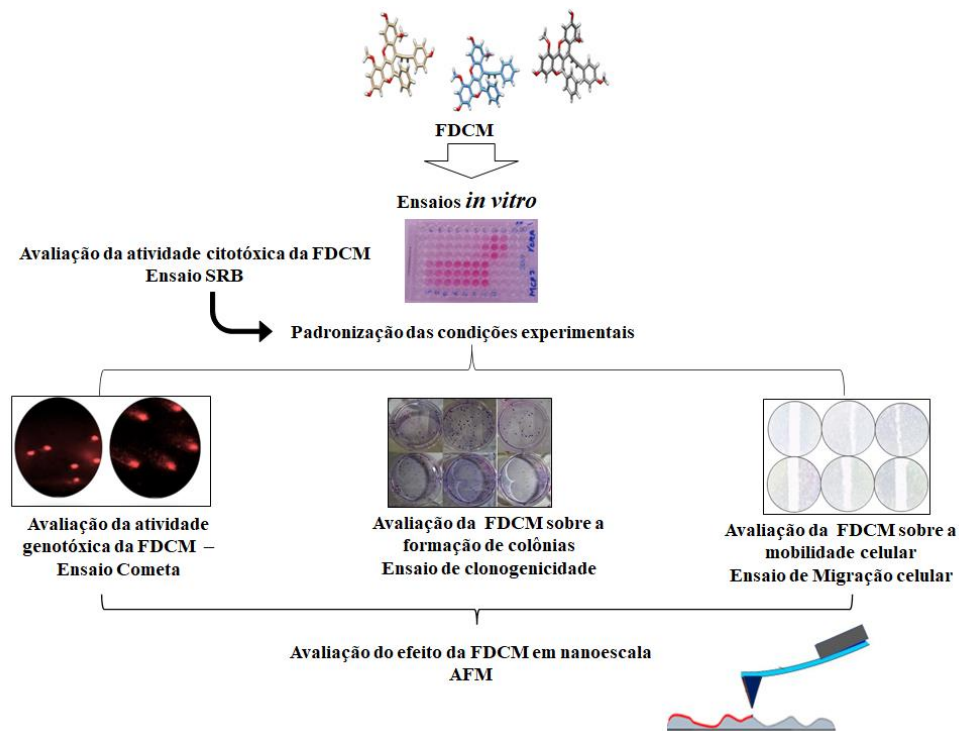
Em continuidade aos estudos do potencial biológico dos extratos contendo braquidinas, assim como seus compostos isolados, foram desenvolvidas pesquisas sobre atividade antitumoral. Serpeloni *et al.* (2020) avaliaram extratos hidroetanólicos brutos das raízes desta espécie e demonstraram uma tendência à citotoxicidade em células de câncer gástrico (ACP02), principalmente por necrose. Os autores também observaram redução na expressão de genes envolvidos na apoptose (BCL-XL e BIRC5) e no controle do ciclo celular (MET). Nunes *et al.* (2020) por sua vez avaliaram as braquidinas (A, B e C) isoladas da FDCM em células de câncer de próstata (PC3), constatando citotoxicidade e redução na proliferação celular. Os autores verificaram que as braquidinas diminuíram a progressão do ciclo celular por meio da indução da expressão de p21, assim como ocasionaram redução da expressão de AKT. Braquidina A também foi avaliada por de Oliveira *et al.* (2022) desta vez em linhagem de câncer de próstata (DU145). Como resultado observaram indução de necrose e apoptose, redução da proliferação celular, porém em concentração acima do IC<sub>50</sub> e redução na capacidade migratória tanto nas células tumorais quanto nas não tumorais.

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL**



Figura 7 - Delineamento dos experimentos *in vitro* para avaliação da atividade antitumoral da FDCM.



Fonte: a autora

## 3.2 OBTENÇÃO DA FRAÇÃO DICLOROMETÂNICA DE *A. Brachypoda*

### 3.2.1 Obtenção do material vegetal

As raízes de *A. brachypoda* foram coletadas em abril de 2017 na Fazenda Sant'Ana da Serra em João Pinheiro, Minas Gerais, Brasil. A planta foi identificada no Herbário José Badine da Universidade Federal de Ouro Preto pela botânica Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Teixeira Braga Messias. Um voucher (n<sup>o</sup> 17.935) foi depositado no Herbário da Universidade Federal de Ouro Preto em Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil. A autorização para coleta e estudos científicos foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o número A451DE4.

### 3.2.2 Obtenção do extrato e da fração diclorometânica

Esta etapa do projeto foi feita em parceria com Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cláudia Quintino da Rocha, do Laboratório de Estudos Avançados em Fitomedicamentos (LEAF), Departamento de Química do Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

As raízes foram secas a 50 °C em estufa por 72 horas e trituradas em moinho de facas. O pó obtido foi extraído com etanol/água (7:3) por meio de percolação exaustiva. Após a extração, o líquido extrator foi evaporado sob pressão reduzida, em temperatura menor que 50 °C. O extrato foi transferido para vidros e posteriormente liofilizados. Em seguida, o extrato etanólico foi diluído em H<sub>2</sub>O e submetido a uma partição líquido-líquido para obtenção das frações diclorometânica e metanol/água.

### **3.2.3 Preparação da fração e determinação de concentrações para os ensaios biológicos *in vitro*.**

A FDCM foi dissolvida em 100% de dimetilsulfóxido (DMSO, Merck®) obtendo-se uma solução-mãe com concentração de 30.000 µg/mL, a partir da qual todas as demais concentrações foram obtidas, diluindo-se esta solução-mãe em meio de cultura. As concentrações foram determinadas em ensaios de viabilidade celular pelo método de sulforrodamina B (SRB), tendo sido testadas concentrações de 1 a 100µg/mL em períodos de 24 e 48 horas.

### **3.3 LINHAGENS CELULARES TUMORAIS E NÃO TUMORAL**

Todas as culturas de células utilizadas neste trabalho são de origem humana, aderentes e com morfologia epitelial. As linhas celulares de câncer de próstata, DU145 (ATCC HTB-81) e carcinoma de mama, MCF7 (ATCC HTB-22), foram adquiridas da *American Type Culture Collection* (ATCC; Manassas, VA, EUA). Células de próstata não tumorigênica PNT2 (ECACC 95012613) foram obtidas da *European Collection of Cell Cultures* (ECACC; Salisbury, UK) e a de carcinoma de colo de útero - HeLa (BCRJ 0100) obtida do Banco de Células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil).

As células MCF7, DU145 e HeLa foram cultivadas em meio DMEM (Gibco; EUA), enquanto as células PNT2 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich; EUA). Todas as células foram suplementadas com soro fetal bovino (SFB) a 10% (Gibco; Brasil) e solução antibiótico-antimicótica a 1% (100X) (Gibco; EUA). As células foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, seguido da observação do crescimento celular com ajuda de microscópio de inversão a cada 24 horas. Quando as células atingiram 70% de confluência, elas foram replicadas para nova garrafa de cultura celular contendo meio de cultura novo. As condições experimentais para cada teste estão discriminadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Ensaios *in vitro*, métodos, linhagens celulares e condições experimentais utilizadas para avaliar a atividade antitumoral da FDCM.

Teste	Método	Linhagem celular	Concentração/tempo de exposição
Efeito do SFB na citotoxicidade da FDCM	Sulforrodamina B (SRB)	HeLa, MCF7	SFB (1, 5 e 10%); FDCM (1, 5, 10 e 20 µg/mL) /48 h
Viabilidade	SRB	PNT2, DU145, HeLa, MCF7	SFB (1%); FDCM (1 a 8 µg/mL); Dox (0,06 to 1 µg/mL) /48 h
Dano ao DNA	Cometa	PNT2, DU145, HeLa, MCF7	SFB (1%); FDCM (IC <sub>50</sub> , ½ IC <sub>50</sub> e 2X IC <sub>50</sub> para cada linhagem celular); Dox (IC <sub>50</sub> para cada linhagem celular) /3 e 24 h
Capacidade reprodutiva	Clonogenicidade	PNT2, DU145, HeLa, MCF7	SFB (1%); FDCM (IC <sub>50</sub> , ½ IC <sub>50</sub> e 2X IC <sub>50</sub> para cada linhagem celular); Dox (IC <sub>50</sub> para cada linhagem celular) /48 h
Mobilidade	Migração celular	PNT2, DU145	SFBS (1%); DCMF (1,25 e 2,5 µg/ mL para ambas as linhagens celulares); Dox (0.1 µg/mL) /24 h
Alterações ultraestruturais	Microscópio de Força Atômica	PNT2, DU145	SFB (1%); FDCM (1,25 e 2,5 µg/mL para ambas as linhagens celulares) /48 h

Legenda - FDCM: fração de diclorometânica Dox: doxorubicina; SFB: soro fetal bovino; a IC<sub>50</sub>: metade da concentração inibitória máxima concentração inibitória semi-máxima; HeLa (BCRJ 0100): linhagem celular de câncer do colo do útero; MCF7 (ATCC HTB-22): linhagem celular de câncer de mama; DU145 (ATCC HTB-81): linhagem celular de câncer de próstata; PNT2 (ECACC 95012613): linhagem celular de próstata não tumoral

### 3.4 PADRONIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS

Considerando a ocorrência de interações entre flavonóides e proteínas do SFB, principalmente albumina (LIU *et al.*, 2010, HU *et al.*, 2012, PAL e SAHA 2014, GREENWELL & RAHMAN 2015, TANG *et al.*, 2017, GENG *et al.*, 2018, FUJII *et al.*, 2019), inicialmente foi investigado o efeito do SFB na atividade citotóxica de FDCM. Assim, testes preliminares foram realizados para verificar o protocolo ideal a ser utilizado nos ensaios de viabilidade celular. Células tumorais HeLa e MCF7 foram expostas a concentrações de FDCM variando de

1 a 100 µg/mL por 24 e 48 horas, onde foi constatado que mais de 90% das células se tornaram inviáveis quando expostas a > 20 µg/mL.

### 3.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Foi utilizado o ensaio de SRB descrito por Skehan *et al.* (1990), com modificações. Células foram plaqueadas a  $1 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços (Kasvi), mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Em seguida, foram lavadas duas vezes com PBS 1X e tratadas com quatro concentrações diferentes da FDCM 1, 5, 10 e 20 µg/mL (200 µL/poço) em meio de cultura contendo três concentrações de SFB, 1, 5 e 10%, por 48 horas. Após o tratamento, as células foram fixadas com ácido tricloracético (TCA) (Sigma-Aldrich; EUA) a 50% por 1 hora a 4°C. Em seguida, as células foram submetidas a quatro lavagens consecutivas com água destilada para a remoção dos resíduos de TCA, meio e SFB e as placas mantidas à temperatura ambiente, até a secagem completa. As células foram então coradas com 50 µL de solução de SRB 0,4% p/v em ácido acético a 1% por 20 minutos em temperatura ambiente. Passado o tempo, as células foram enxaguadas quatro vezes com ácido acético a 1%, para retirada do excesso de corante. As placas foram secas a temperatura ambiente e o corante ligado foi posteriormente eluído com 150 µL de tampão Tris 10 mM frio (pH 10,5). A absorbância foi medida a 540 nm em um leitor de microplacas (Epoch 2 BioTek, EUA). Células não tratadas e células expostas à maior concentração de DMSO no meio de cultura (0,07%) foram usadas como controle negativo e veículo, respectivamente. Todos os testes foram realizados em três experimentos independentes, em triplicata. As absorbâncias das células não tratadas foram consideradas como 100% de viabilidade enquanto as tratadas foram calculadas a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Células Viáveis (\%)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

Após constatada a influência do SFB sobre a atividade da FDCM, foram realizados novos ensaios de viabilidade celular usando o ensaio SRB, conforme descrito acima. Foram testadas células tumorais HeLa, DU145 e MCF7, enquanto PNT2 foi usado como célula não tumoral. Testes pilotos foram realizados para determinar as concentrações finais de FDCM (1, 2, 4, 6 e 8 µg/mL). Células expostas a doxorrubicina (1, 0,5, 0,25, 0,12, 0,06 µg/mL) e DMSO (0,03%) foram usadas como controles positivo e veículo, respectivamente, enquanto as células não tratadas foram o controle negativo.

Após cálculo da porcentagem de células viáveis, os dados obtidos foram utilizados para cálculo da IC<sub>50</sub> a partir da curva dose resposta, utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Calculou-se o índice de seletividade tumoral (IS) por meio da razão entre o valor da IC<sub>50</sub> da fração sobre a linhagem de células não tumorais e o valor da IC<sub>50</sub> da fração sobre a linhagem de células neoplásicas:

$$IS = \frac{IC_{50 \text{ não tumoral}}}{IC_{50 \text{ tumoral}}}$$

### 3.6 DOCAGEM MOLECULAR

A interação molecular entre cada braquidina (A, B e C) e a albumina sérica bovina (BSA) foi investigada por docagem molecular. A análise *in silico* permitiu explorar a energia de ligação livre, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas entre os flavonóides e a BSA. Essas análises foram realizadas usando o AutoDock (AD4) versão 4.2, conforme descrito por Ravi e Kannabiran (2016). A estrutura cristalina molecular da BSA (PDB ID: 3v03) foi obtida do banco de dados de proteínas do Research Collaboratory for Structural Bioinformatics. As três braquidinas (Bra A, Bra B e Bra C) foram preparadas para as simulações de encaixe usando o AutoDock Tools versão 1.5.6 (MORRIS *et al.* 2009).

Na molécula de BSA com resolução de 2,7 Å, a cadeia B da estrutura foi removida para gerar uma estrutura monomérica. Todos os heteroátomos, cofatores, moléculas de água, ligantes naturais (íons cálcio e acetato) e subunidades adicionais foram removidos da estrutura da proteína. Posteriormente, os átomos ausentes e os resíduos terminais da cadeia A foram reparados, e os átomos de hidrogênio polar e as cargas parciais de Gasteiger foram calculados nas estruturas Bra A, Bra B, Bra C e BSA. Os hidrogênios apolares de Bra A, Bra B e Bra C e BSA foram posteriormente fundidos. As dimensões da caixa cúbica ao longo dos eixos X, Y e Z foram 60 × 60 × 60 Å, respectivamente, com um espaçamento de 0,375 Å entre os pontos da grade. O grid box foi centrado no resíduo BSA Trp213, e o algoritmo genético Lamarckiano foi escolhido para buscar as melhores conformações, com 100 execuções para cada braquidina. As coordenadas iniciais da BSA e as interações dos flavonóides diméricos presentes na DCMF foram escolhidas com base no critério da menor conformação de ancoragem do cluster com menor energia e inspeção visual.

### 3.7 AVALIAÇÃO DA GENOTOXICIDADE DA FDCM (ENSAIO DO COMETA *IN VITRO*)

Foi utilizado o ensaio cometa descrito por Singh *et al.* (1988) com algumas modificações. Células DU145, MCF7, HeLa e PNT2 foram semeadas em placas de 24 poços em concentração de  $1 \times 10^5$  células por poço e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas. Após este tempo, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS 1X e em seguida tratadas com três concentrações definidas a partir da IC<sub>50</sub> para cada linhagem celular (IC<sub>50</sub>, dobro do IC<sub>50</sub> e 50% do IC<sub>50</sub>), nas condições descritas na tabela 1. Foram testados também, em cada ensaio, controle positivo (Doxorrubicina), negativo (sem tratamento) e controle de veículo (tratadas com DMSO 0,05%). Antes da realização do ensaio cometa foi verificado a viabilidade celular pelo teste de exclusão por azul de tripan.

#### Procedimento experimental do teste de exclusão por azul de tripan

As células foram homogeneizadas com corante azul de tripan a 0,4% na proporção 1:1 (corante:homogeneizado de células). Essa mistura foi gotejada em uma câmara de Neubauer e avaliada sob microscopia ótica, diferenciando e contando as células coradas (mortas) e as não coradas (vivas). Foram analisadas 100 células de cada grupo experimental e controle, considerou-se o índice mínimo de 70% de células viáveis (TICE *et al.*, 2000).

#### Procedimento experimental do ensaio cometa

Após o período de tratamento, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm. O sobrenadante foi retirado, restando-se aproximadamente 100 µL de suspensão celular em cada tubo. Um volume de 50µL das suspensões celulares de cada tratamento foi adicionado a 200µL de agarose low melting (0,5%) e homogeneizado. Dessa mistura foram retirados 100µL para aplicação em lâminas pré-gelificadas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%). Em seguida, foram cobertas com lamínulas (24x60mm) e mantidas à 4°C, protegidas da luz, por 10 minutos. Foram feitas duas lâminas por tratamento. As lamínulas foram cuidadosamente retiradas e mergulhadas em solução de lise gelada (1% de Triton-X + 10% de DMSO + solução lise estoque: 2,5M NaCl; 100 mM EDTA; 10mM Tris) e mantidas a 4°C protegidas da luz por 2 horas.

Após o processo de lise para rompimento das membranas, as lâminas foram incubadas por 20 minutos com o tampão de eletroforese (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH 13) e posteriormente foram submetidas à eletroforese horizontal sob voltagem de 25 V e corrente

elétrica 300 mA por 30 minutos, em uma cuba contendo o mesmo tampão alcalino. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e colocadas em uma solução de neutralização (Tris/HCl 0,4M pH: 7,5) por 15 minutos. Posteriormente foram deixadas para secar em temperatura ambiente. As lâminas secas foram fixadas com etanol absoluto por 5 minutos.

A coloração foi realizada com 30 µL de brometo de etídio (20 µg/mL) em cada lâmina e cobrindo-a com lamínula (24 x 60mm). Estas foram imediatamente analisadas em microscópio de fluorescência (BX51/BX52-Olympus; Japão), usando filtro de 516-560 nm e barreira de filtro de 590 nm em objetiva de 40X. As células foram classificadas levando-se em consideração tanto o tamanho do nucleóide quanto a quantidade de DNA presente na cauda de acordo com o tamanho em:

Classe 0: nenhum dano, ou seja, nucleóides intactos, sem cauda;

Classe 1: dano pequeno, os nucleóides apresentam um tamanho de cauda inferior ao diâmetro da cabeça;

Classe 2: dano intermediário, os nucleóides apresentam caudas com tamanhos equivalentes a uma vez o tamanho do diâmetro da cabeça;

Classe 3: dano elevado, os nucleóides apresentam caudas com tamanho equivalente a duas vezes o diâmetro da cabeça;

Classe 4: dano máximo.

Duzentos nucleóides foram analisados e as pontuações de danos foram calculadas multiplicando o número de nucleóides em cada classe pelo respectivo valor de classe, usando a equação:

$$Score = \frac{[(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)]}{N}$$

onde n é o valor de cada classe de nucleóide e N é o número total de células.

### 3.8 ENSAIO CLONOGÊNICO

Para avaliar a capacidade da FDCM inibir a formação de colônias foi utilizado o ensaio clonogênico. O protocolo utilizado para o teste segue as orientações de Franken (2006), com algumas modificações.

Para este ensaio as células foram cultivadas em placas de 6 poços, na concentração de 500 células/poço e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas.

Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS 1X, em seguida tratadas com três concentrações diferentes de FDCM (IC<sub>50</sub>, ½ IC<sub>50</sub> e 2X IC<sub>50</sub>) durante 48 horas, sob as condições descritas na tabela 1. Posteriormente o meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS 1X e ressuspensas em 2 mL de meio de cultura fresco. As placas de cultura foram mantidas a 37°C por sete dias, permitindo que as células viáveis crescessem em colônias macroscópicas. Após esse período, o meio foi removido, as células lavadas com PBS 1X e fixadas com uma solução de metanol:ácido acético:água (1:1:8) por 30 minutos. Posteriormente, as células foram coradas com cristal violeta (0,5% p/v) durante 20 minutos. Em seguida foram feitas 3-5 lavagens com água corrente para remoção do excesso de corante, sendo deixadas em temperatura ambiente para secagem total. As células tratadas com doxorrubicina e as células não tratadas foram utilizadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Todos os testes foram realizados em três experimentos independentes, em duplicata. O número de colônias foi quantificado usando um estereomicroscópio (Zeiss; Alemanha), sendo contabilizadas apenas colônias com mais de 50 células. A porcentagem de colônias foi calculada como uma razão entre o número de colônias derivadas de células tratadas e aquelas do controle negativo, multiplicado por 100.

$$\text{N}^{\circ} \text{ de colônias} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de colônias após o tratamento}}{\text{n}^{\circ} \text{ de colônias do controle negativo}}$$

### 3.9 ENSAIO *WOUND HEALING*

Considerando que a FDCM reduziu a viabilidade celular e a formação de colônias em todas as linhagens tumorais, os ensaios de migração celular e a análise por MFA foram realizados utilizando apenas DU145 como linhagem tumoral, uma vez que a linhagem celular não tumoral (PNT2) também é derivada de tecido prostático.

Foi utilizado o ensaio de *wound healing* descrito por (LIANG; PARK; GUAN, 2007), com modificações. Células DU 145 e PNT2 foram cultivadas em placas de 48 poços a  $1 \times 10^5$  células/poço e mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, por 24 horas, para permitir que as células se fixassem e formassem uma monocamada. Passado o tempo, riscos retos foram feitos na monocamada celular usando ponta de pipeta de 200 µl. O meio de cultura foi removido e as células lavadas com PBS 1X para remover os resíduos celulares. Em seguida as células foram tratadas com 1,25 e 2,5 µg/mL da FDCM e mantidas sob as condições descritas na tabela 1. As lacunas das fendas foram fotografadas nos intervalos de 0 e 24 horas, usando um microscópio invertido Axiovert 200M (Zeiss; Alemanha). A área de fechamento das células



foi medida usando o software ZEN Lite/Blue usando a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de fechamento da fenda} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100$$

onde 0 é a área inicial e t a área após o tempo de incubação (YUE *et al.* 2010). Células tratadas com doxorrubicina e células não tratadas foram usadas como controles positivo e negativo, respectivamente. Todos os testes foram realizados em três experimentos independentes, em triplicata.

### 3.10 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

Neste ensaio as células DU 145 e PNT2 foram cultivadas em placas de 24 poços, na concentração de  $3 \times 10^4$  células/poço e mantidas em estufa a  $37^\circ\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , por 24 horas.. Lamínulas redondas de vidro com diâmetro de 13mm foram previamente adicionadas aos poços para servirem como superfície de fixação das células. Após 24 horas, as células foram tratadas com a FDCM nas concentrações de 1,25 e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  durante 48 horas. Após o período de incubação, o meio foi descartado, as lamínulas contendo as células foram coletadas e lavadas três vezes com PBS 1X. Em seguida, as células foram fixadas com solução de formaldeído 4% por um período de 30 minutos. A solução fixadora foi removida e as células novamente lavadas duas vezes com PBS 1X e secas ao ar para posterior aquisição de imagens e análise ultraestrutural em microscópio de força atômica.

A captura de imagens foi realizada usando lamínulas circulares contendo as células, que foram fixadas no porta-amostras magnético MFA e analisadas por um MFA Multimode 8 (Bruker, CA, EUA) no modo PeakForce Quantitative Nanomechanics (QNM). Sondas Scanasyt Air, com constante de mola nominal cantilever de 0,4 N/m e rádio de ponta de 2 nm, foram usadas em todas as medições. Toda a aquisição de dados foi feita em condições ambientais ( $23^\circ\text{C}$  e 44% de umidade). As imagens topográficas foram adquiridas com pelo menos nove células diferentes para cada grupo amostral (controle e tratamento). Para analisar a nanoestrutura das células, a rugosidade quadrática média ( $R_q$ ) foi calculada nas varreduras de 5  $\mu\text{m}$  obtidas na região central do núcleo celular, conforme a equação abaixo (Dufrêne *et al.* 2017):

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i^2},$$

onde N é o número de pixels e z é a altura de cada pixel.

Foram avaliadas as características morfológicas da superfície da membrana nuclear e a rugosidade.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

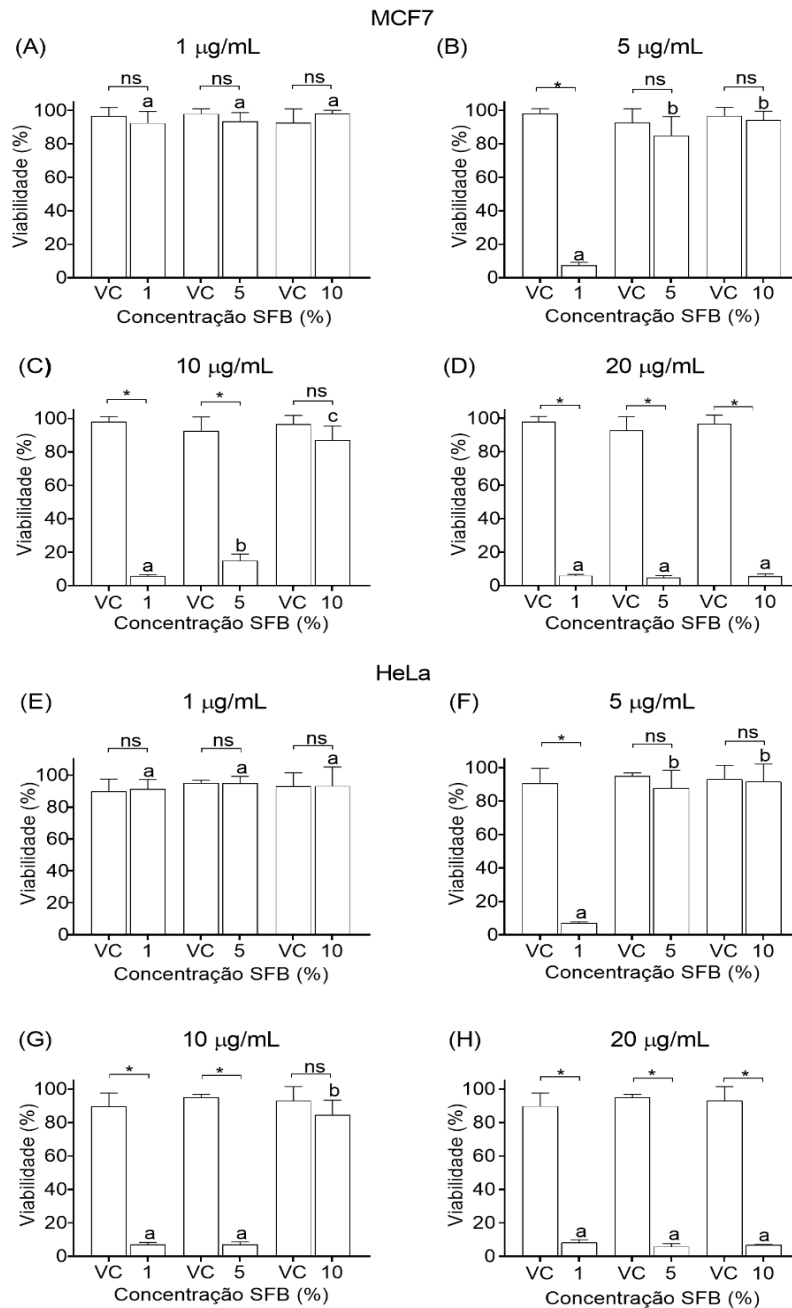
Testes de normalidade foram adotados para determinar se os dados estavam normalmente distribuídos antes da aplicação dos testes estatísticos. Os dados paramétricos foram avaliados por meio de análise de variância unidirecional seguida do teste de comparações múltiplas post hoc de Tukey. No caso dos dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido de Dunn como pós-teste. O teste não paramétrico de Spearman foi utilizado para verificar a correlação entre formação de colônias, taxa de migração e rugosidade. Uma curva de regressão não linear foi usada para medir os dados de viabilidade obtidos do ensaio SRB de uma maneira dependente da dose. Os resultados foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Em todos os casos, os valores foram estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ . As análises estatísticas e os gráficos foram gerados utilizando o programa Prism® do GraphPad versão 6.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 SFB AFETA A CITOTOXICIDADE FDCM

A viabilidade das células MCF7 e HeLa variou de acordo com a proporção de SFB no meio de cultura celular (Figura 8). O tratamento com 5  $\mu\text{g/mL}$  da FDCM reduziu a viabilidade celular em aproximadamente 12 vezes em meio contendo 1% de SFB, em comparação com células mantidas em concentrações mais altas de SFB, para as duas linhagens (Figuras 8B e 8F). Quando ambas as células tumorais foram tratadas com uma concentração mais alta da FDCM (10  $\mu\text{g/mL}$ ), a viabilidade celular foi reduzida em meio com 1 e 5% de SFB, mas não em 10% (Figura 8C e 8G). Quando expostas a 20  $\mu\text{g/mL}$ , houve uma diminuição substancial na viabilidade celular em ambas as linhagens, independentemente da concentração do soro (Figura 8D e 8H), contrastando com o tratamento com a menor concentração de FDCM, na qual não houve efeito significativo (Figuras 8A e 8E).

Figura 8 - Viabilidade de células tumorais tratadas com FDCM (1, 5, 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ ) por 48 horas em meio de cultura suplementado com SFB (1, 5 e 10%).



Legenda - HeLa: câncer do colo do útero. MCF7: carcinoma de mama. FDCM: fração de diclorometânica. CV: controle de veículos. ns: não significativo. Cada valor representa a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes realizados em duplicata usando o ensaio de sulforrodamina B. Letras diferentes ou um asterisco indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) por ANOVA seguido de pós-teste de Dunn.

## 4.2 DOCAGEM MOLECULAR

O estudo de docagem molecular revelou uma forte interação entre os flavonóides diméricos e os resíduos de aminoácidos no sítio ativo Trp-213 da cadeia BSA. Todos os

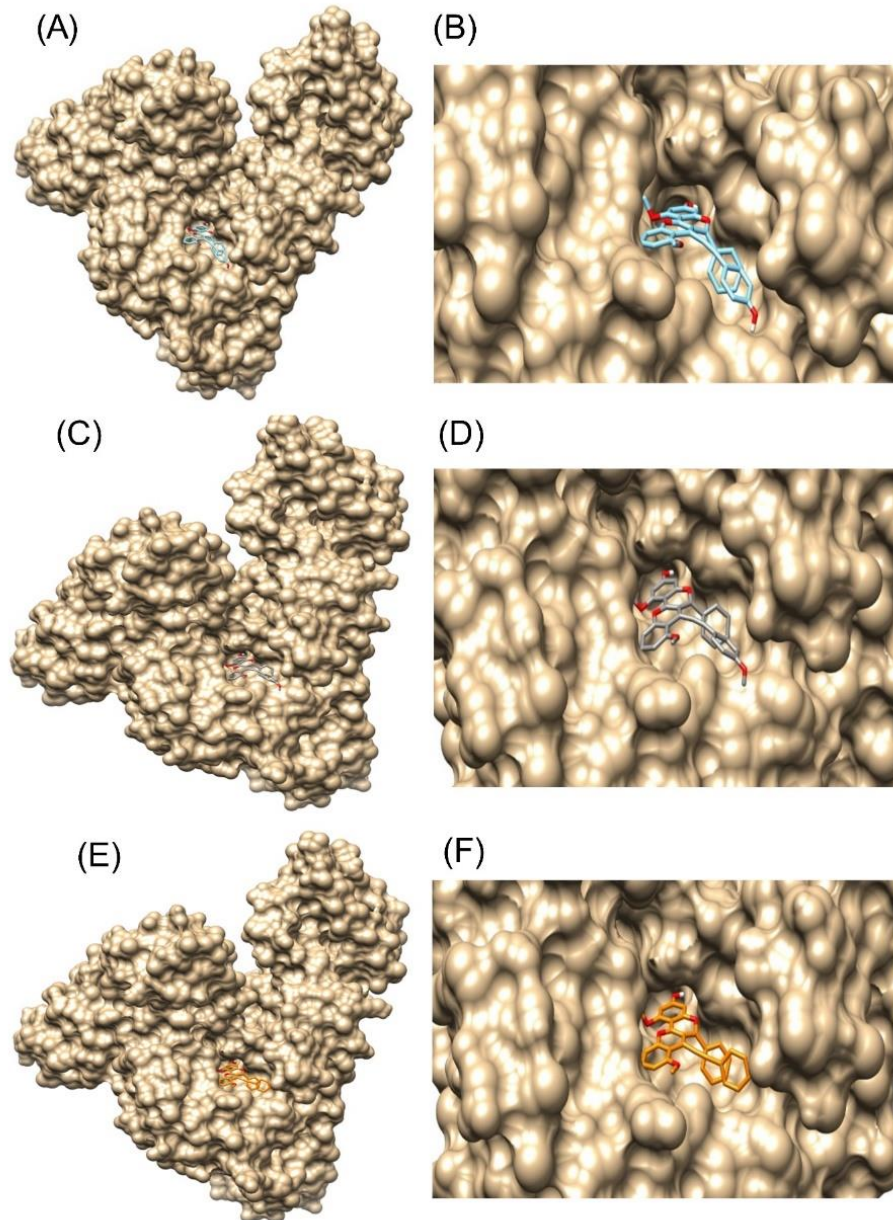
compostos apresentaram altos parâmetros de afinidade com a estrutura da proteína. As braquidinas A e C foram as moléculas que exibiram as interações mais favoráveis, com valores de energia de ligação livre de -7,9 e -7,92 kcal/mol e constantes de inibição de 1,62 e 1,57  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Tabela 2). Além disso, os resultados de interações da Bra A foi superior a Bra B e Bra C, que inclui duas ligações de hidrogênio com resíduos Pro338 e Val292. As conformações espaciais podem ser vistas na Figura 9.

**Tabela 2** - Análise da docagem molecular entre cada braquidina (A, B e C) e BSA.

Ligante/ receptor	$\Delta G_{\text{bind}}$ (Kcal/mol)	Ki ( $\mu\text{M}$ )	Ligações de hidrogênio	Interações hidrofóbicas
Bra A – BSA	-7,9	1,62	Pro338, Val292	Arg198, Arg217, Arg194, Ala290, Glu291, Lys221, Lys294, Trp213, Gln220, Val342, Asp450, Ala341, Pro446, Glu339
Bra B – BSA	-7,37	3,94	Val292	Glu291, Ala290, Lys221, Glu339, Pro336, Arg194, Gln220, Arg217, Arg198, Asp450, Ala341, Val342, Trp213
Bra C – BSA	-7,92	1,57	Val292	Glu291, Ala290, Lis294, Arg194, Lys221, Arg217, Arg198, Pro446, Asp450, Pro338, Gln220, Trp213, Ala341, Val342, Tyr340

Legenda - Bra: braquidina; BSA: albumina bovina sérica;  $\Delta G_{\text{bind}}$ : energia de ligação; Ki: constante de inibição.

Figura 9 - Interação tridimensional entre cada flavonóide dimérico (braquidina A, braquidina B e braquidina C) e BSA.



Legenda - BSA: albumina sérica bovina. Braquidina A é destacada em azul (A e B); Braquidina B em cinza (C e D); braquidina C em amarelo (E e F). A representação molecular de braquidina/BSA foi gerada usando o software UCSF Chimera.

#### 4.3 FDCM APRESENTA ATIVIDADE ANTITUMORAL

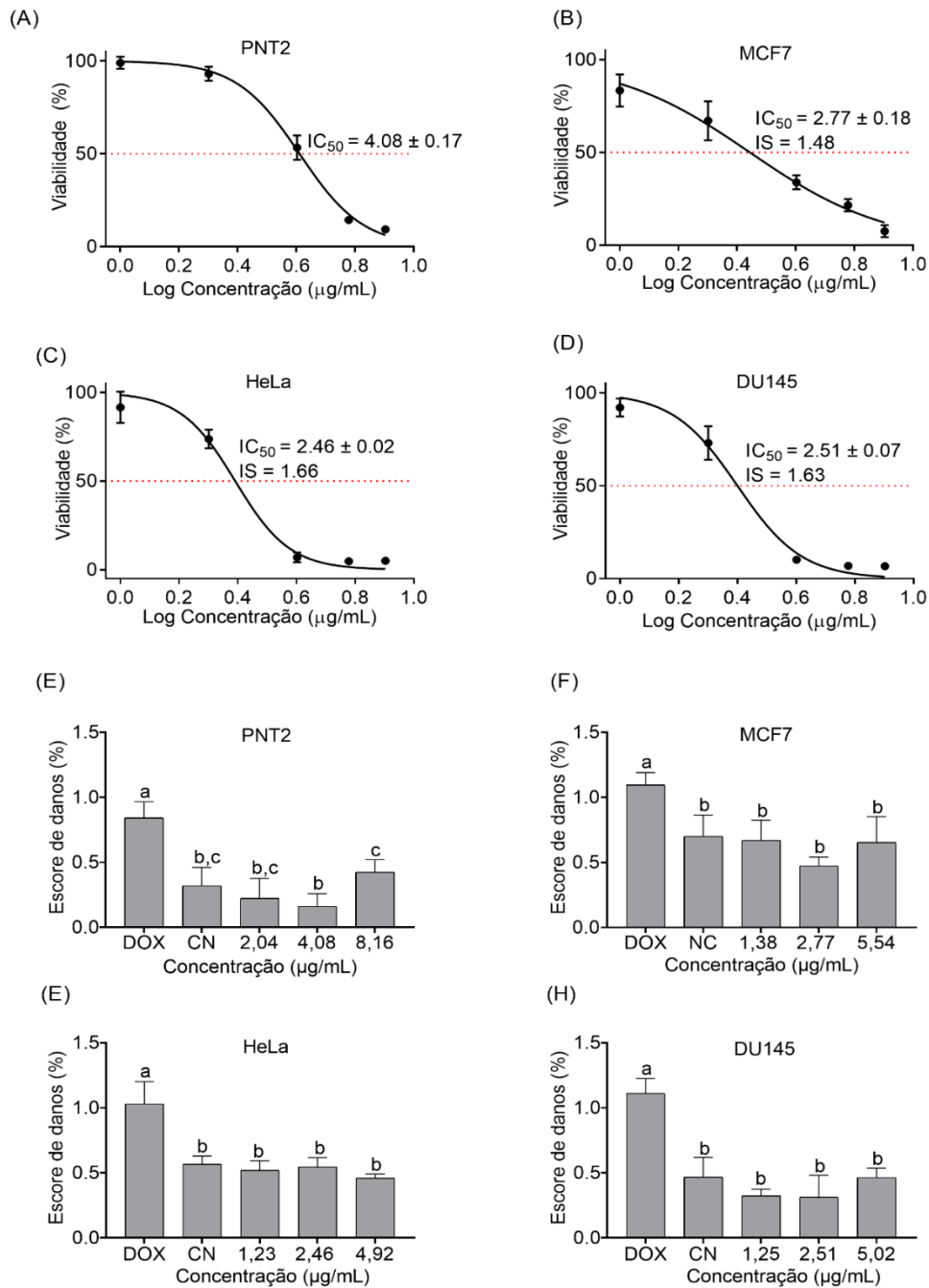
Baseado nos resultados descritos acima foi estabelecido como o protocolo padrão meio de cultura com 1% de SFB para análise da viabilidade celular. A Figura 10 (A-D) apresenta a

IC<sub>50</sub> para cada linhagem de células tumorais (2,77, 2,46 e 2,51 µg/mL para MCF7, HeLa e DU145, respectivamente), bem como para células não tumorais (4,08 µg/mL). A FDCM foi eficaz contra células tumorais, com IS ≥ 1,48. O IS observado para células HeLa foi três vezes maior quando as mesmas células foram tratadas com doxorubicina.

#### 4.4 FDCM NÃO CAUSA DANOS NO DNA

A análise genotóxica das células tumorais e não tumorais tratadas com FDCM ( $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub> e o dobro do IC<sub>50</sub>) por 3 horas (dados não mostrados) e 24 horas (Figura 10 E-H) demonstrou que FDCM não causa danos ao DNA, nas condições experimentais usadas neste estudo.

Figura 10. Viabilidade celular e escore de danos ao DNA observadas em células da próstata tratadas com FDCM.



Legnda - (A D) Curvas de viabilidade dose-resposta para células não tumorais e tumorais tratadas com FDCM por 48 horas. (E–H) Escores de danos ao DNA em células não tumorais e tumorais tratadas com FDCM por 24 horas. PNT2: linhagem celular não tumorigênica da próstata; MCF7: linhagem celular de câncer de mama; HeLa: linhagem celular de câncer do colo do útero; DU145: linhagem celular de câncer de próstata; FDCM: fração de diclorometânica; Dox: doxorubicina; CN: controle negativo; IS: índice de seletividade. A linha tracejada indica a metade da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>). Os valores são a média ± SD de três experimentos independentes. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey. Nota: Os valores de IC<sub>50</sub> de doxorubicina foram  $0,09 \pm 0,02$  (IS = 2,33),  $0,13 \pm 0,05$  (IS = 1,61),  $0,4 \pm 0,001$  (IS = 0,5) e  $0,21 \pm 0,02$  µg/mL para DU145, MCF7, HeLa e PNT2, respectivamente.

#### 4.5 FDCM REDUZ A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DE CÉLULAS

Os resultados mostraram que a FDCM inibiu significativamente o número de colônias das células, de modo dependente da concentração ( $r = -0,944$ ,  $p < 0,05$ ). Quando as células HeLa e MCF7 foram tratadas com  $IC_{50}$  (2,77 e 2,46  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente), elas foram quase completamente inibidas, enquanto, em concentrações mais baixas, diminuíram 25% e 16,4%, respectivamente. Além disso, 2,5  $\mu\text{g/mL}$  e 1,25  $\mu\text{g/mL}$  inibiram significativamente a formação de colônias DU145 em 87,3 e 39,2%, respectivamente. Já PNT2 apresentou redução de apenas 44% a 2,5  $\mu\text{g/mL}$  e um aumento de 92% a 1,25  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 11A e B). Vale ressaltar que não houve formação de colônias quando todas as linhagens celulares foram tratadas com a maior concentração de FDCM ou doxorubicina.

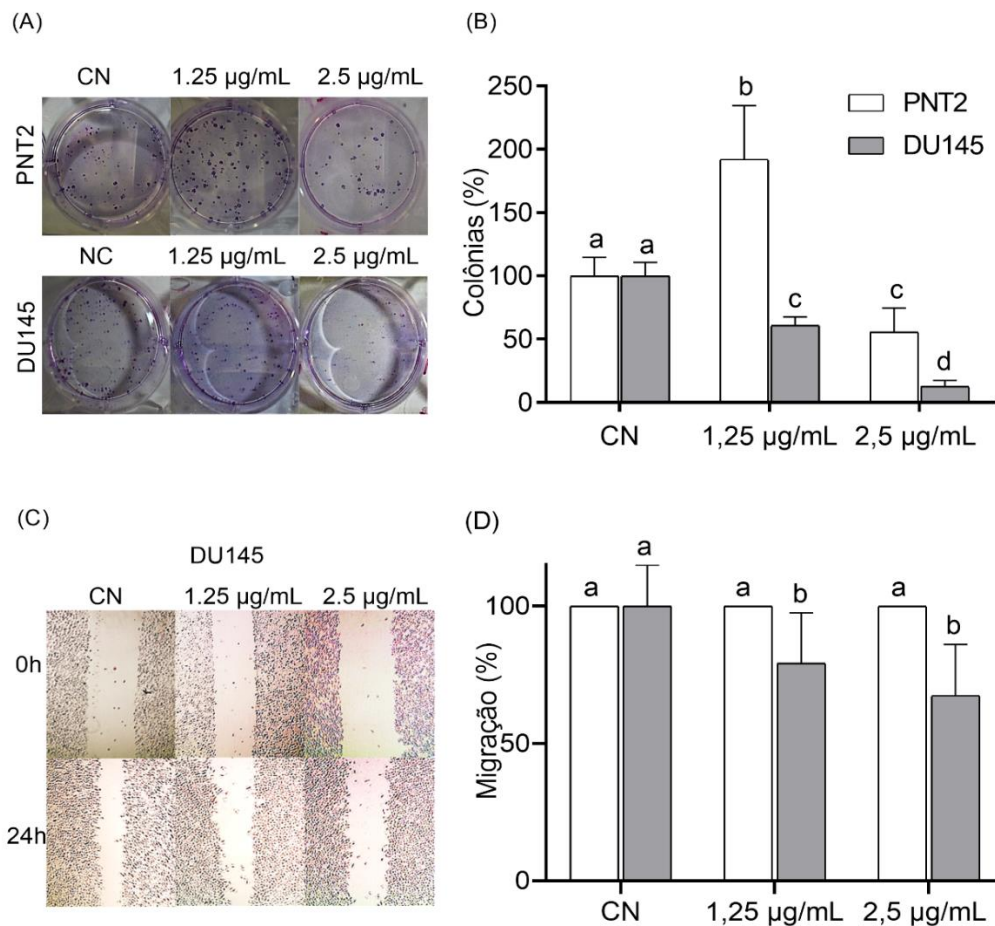
#### 4.6 FDCM REDUZ A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS TUMORAIS

Considerando que a FDCM reduziu a viabilidade celular e a formação de colônias em todas as linhagens tumorais, realizamos ensaios de migração e MFA utilizando apenas DU145, uma vez que a linhagem celular não tumoral também é derivada de tecido prostático (PNT2).

Ao tratar células tumorais com 1,25 e 2,5  $\mu\text{g/mL}$  da FDCM, constatamos uma inibição nas áreas de fechamento de 20,9% e 32,6%, respectivamente em comparação com o controle de células sem tratamento. Sendo essa redução da motilidade celular concentração-dependente ( $r = -0,751$ ,  $p < 0,05$ ). Em contraste, não foi observado nenhum efeito nas células não tumorais (Figura 11C-D). Todos os testes foram realizados em três experimentos independentes, em triplicata.



Figura 11. Formação de colônias e migração celular em linhagens celulares tumorais e não tumorais de próstata tratadas com FDCM.



Legenda - (A) Imagens representativas de um ensaio de formação de colônias em células tumorais e não tumorais da próstata com e sem tratamento com FDCM e (B) a respectiva análise quantitativa. (C) Imagens representativas das lacunas observadas em 0 e 24 horas nas células tumorais da próstata com e sem tratamento com FDCM, usando ensaio *wound healing* e (D) a análise quantitativa das células da próstata. FDCM: fração de diclorometânica. CN: controle negativo. PNT2: linhagem celular não tumoral de próstata. DU145: linhagem celular de câncer de próstata. Os experimentos foram realizados três vezes em duplicata. Letras diferentes significam que há diferença pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ ).

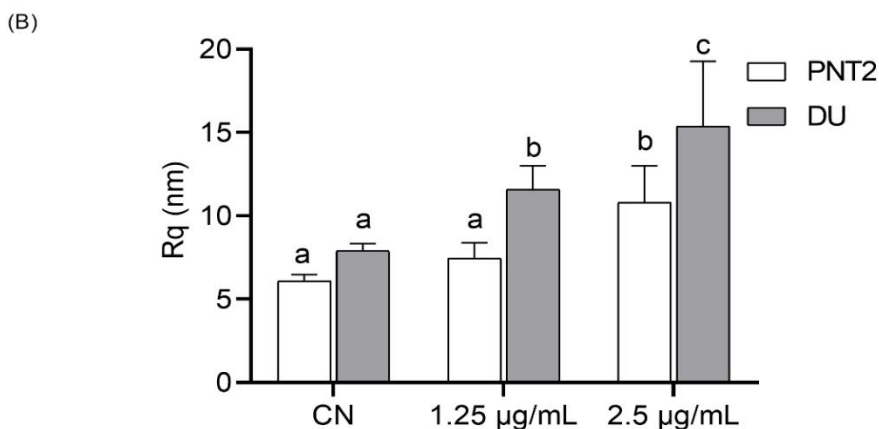
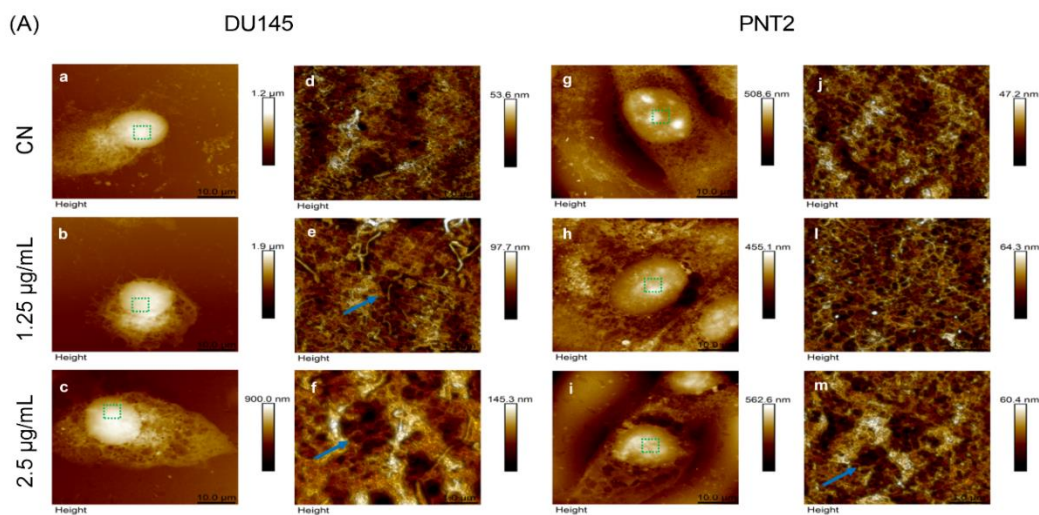
#### 4.7 FDCM INDUZ ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM CÉLULAS TUMORAIS

Células de próstatas tratadas com a FDCM mostraram alterações morfológicas de acordo com a concentração (Figura 12A, células tumorais nas imagens a-f e células não tumorais nas imagens g-m). As alterações ultraestruturais (buracos) nas superfícies da membrana nuclear das células DU145 foram observadas nos tratamentos com 1,25 e 2,5 µg/mL (e-f). Curiosamente, PNT2 tratadas com as mesmas concentrações de FDCM apresentaram menos alterações (imagens l-m). As cores da escala marrom nas imagens representam diferentes

alturas, com claro e escuro denotando a topografia superior e inferior, demonstrando que as diferenças na altura da membrana aumentam com a concentração de FDCM.

Posteriormente, realizamos uma análise quantitativa da rugosidade da célula calculando a rugosidade média quadrática (Rq) da superfície da membrana para medir a nanoestrutura da membrana nuclear. A rugosidade da superfície é estimada a partir dos desvios do perfil do valor z bidimensional medido de uma superfície ideal (Antonio *et al.* 2012). Células DU145 não tratadas apresentaram rugosidade de  $7,9 \pm 0,43$  nm, enquanto as tratadas com FDCM 1,25 e 2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  apresentaram rugosidade de  $11,6 \pm 1,42$  nm e  $15,37 \pm 3,9$  nm, respectivamente, com correlação positiva entre a concentração de FDCM e a rugosidade da célula tumoral ( $r=0,857$ ,  $p < 0,05$ ). Para PNT2, por outro lado, a rugosidade celular aumentou apenas na concentração mais alta (2,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), resultando em um Rq igual a  $10,78 \pm 2,23$  nm (Figura 12B).

Figura 12 - Imagens de microscopia de força atômica da superfície da membrana nuclear de células prostáticas com e sem tratamento com FDCM e a análise quantitativa da rugosidade celular.



Legenda - (A) Imagens de MFA de células da próstata mostrando alterações morfológicas de acordo com a concentração de FDCM. (a–c): morfologia das células tumorais e (d–f): imagens da ultraestrutura da membrana (5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$ ) na região celular correspondente indicada pelo quadro verde. (g–i): morfologia de células não tumorais e (j–m): imagens da ultraestrutura de membrana (5  $\mu\text{m}$  x 5  $\mu\text{m}$ ) na região celular correspondente indicada pelo quadro verde. A seta azul indica os orifícios na superfície da membrana. (B): análise quantitativa da rugosidade celular. PNT2: linhagem celular não tumoral da próstata. DU145: linhagem celular de câncer de próstata. CN: controle negativo. Letras diferentes significam que há diferença pela ANOVA seguida pelo teste de Tukey  $p < 0,05$ .

A formação de colônias, a taxa de migração e a rugosidade foram avaliadas pelo teste não paramétrico de Spearman. Os resultados mostraram uma correlação positiva entre a migração e a capacidade de formação de colônias das células tumorais ( $r = 0,692$ ,  $p < 0,05$ ). Por outro lado, migração e rugosidade foram negativamente correlacionadas ( $r = -0,608$ ,  $p < 0,05$ ). Da mesma forma, a formação de colônias e rugosidade apresentaram correlação inversa ( $r = -0,806$ ,  $p < 0,05$ ). Esses achados sugerem que o FDCM tem um efeito antitumoral dependente da concentração (Figura 13).

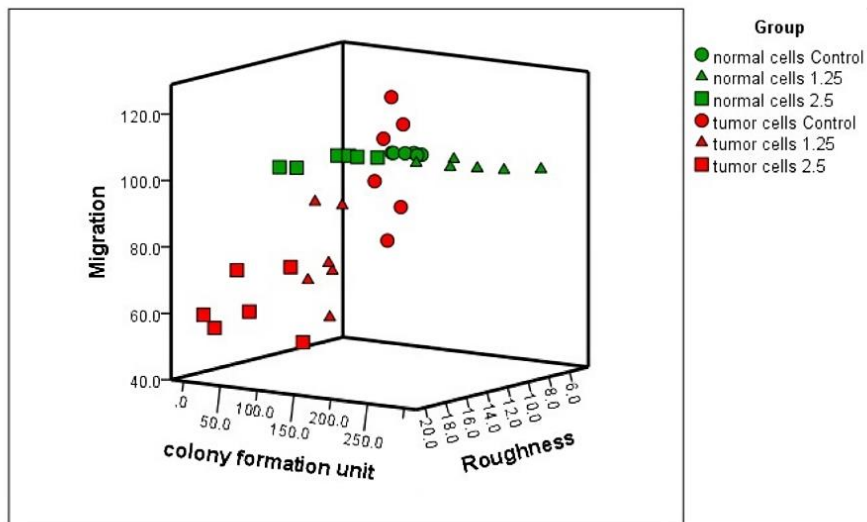


Figura 13 - Gráficos de dispersão 3D entre migração, formação de colônias e rugosidade de acordo com os tipos de células. Os pontos verdes indicam a linhagem celular não tumoral da próstata e os pontos vermelhos indicam a linhagem celular tumoral da próstata.

## 5 DISCUSSÃO

A quimioterapia permanece sendo o tratamento oncológico mais utilizado, apesar de sua alta toxicidade. Nesse contexto, há uma contínua busca por promissores novos agentes anticancerígenos com maior eficácia e menores efeitos colaterais (CHOUDHARI *et al.*, 2020; SIDDIQUI *et al.*, 2022). Considerando esses aspectos, investigamos os efeitos biológicos do FDCM (contendo três flavonóides diméricos) em linhagens de células tumorais. Ressalta-se

que o desenvolvimento de um protocolo robusto é fundamental para evitar resultados falso-negativos ou falso-positivos em ensaios *in vitro*, que são causados principalmente pela interação droga-componente meio. Por exemplo, Ribéreau-Gayon *et al.* (1995), Knöpfel-Sidler *et al.* (2005), e Faheina-Martins *et al.* (2011) relataram o efeito do SFB na atividade citotóxica de extratos vegetais. Estudos recentes atribuíram menor citotoxicidade de flavonóides (FUJII *et al.*, 2019) e saponinas (LIN, YINGJIA *et al.*, 2017) à sua interação com a albumina no SFB. Assim, determinamos as condições ideais para realizar todos os ensaios no presente estudo. Os resultados mostraram que o SFB inibe a atividade citotóxica do FDCM em células tumorais de maneira dependente da concentração. Confirmamos uma forte interação entre os três flavonóides diméricos incomuns e BSA usando docagem molecular, sugerindo que a redução da citotoxicidade pode ser devido à afinidade estrutural da BSA pelos flavonóides, potencialmente reduzindo sua disponibilidade. Com bases nesses dados, realizamos todos os ensaios experimentais *in vitro* (citotoxicidade, genotoxicidade, reprodução celular e migração celular) utilizando células mantidas em meio de cultura suplementado com 1% de SFB.

Em relação à citotoxicidade, o FDCM reduziu significativamente a viabilidade das células tumorais, corroborando estudos anteriores em que a atividade antitumoral foi demonstrada para extratos (SERPELONI *et al.*, 2020) e para cada uma das três braquidinas separadamente (DE OLIVEIRA *et al.*, 2021; NUNES *et al.*, 2020). Recentemente, de Lima *et al.* (2022) descreveram essa capacidade também em braquidinas glicosiladas. Em nosso estudo, o FDCM contendo as três braquidinas apresentou atividade antitumoral com menor IC<sub>50</sub>, sugerindo um efeito sinérgico desses flavonóides raros.

A FDCM também reduziu em quase 90% a formação de colônias tumorais de próstata de forma concentração-dependente, reforçando sua capacidade de controlar a proliferação celular e, conseqüentemente, a progressão tumoral. Da mesma forma, de Oliveira *et al.* (2021) e Lima *et al.* (2022) também relataram o efeito antiproliferativo das braquidinas, mas avaliaram as braquidinas separadamente e por um período mais prolongado. Curiosamente, a menor concentração de FDCM aumentou significativamente a proliferação de células PNT2, enquanto a maior concentração a diminuiu. Várias substâncias apresentam efeitos farmacológicos dose-dependentes ambíguos, sendo que doses baixas têm efeito estimulador e altas doses têm efeito tóxico, fenômeno conhecido como dose-resposta bifásica ou hormese (CALABRESE; BALDWIN, 2002). Futuras pesquisas devem ser desenvolvidas para elucidar esse fenômeno, observado nas células normais expostas a FDCM.

A metástase é uma das principais causas de morte relacionada ao câncer, sendo a migração de células tumorais o passo inicial no processo metastático (WU, JIA-SHUN *et al.*, 2021). Assim, na busca por drogas antineoplásicas, é desejável que drogas potenciais tenham

atividade anti-invasão e anti-metastática (STEEG, THEODORESCU, 2008). Deste modo avaliamos a motilidade celular para determinar a taxa de migração, usando o ensaio *wound healing* (KABAŁA-DZIK et al., 2017). Nossos dados mostraram que FDCM inibiu significativamente a migração de DU145, sem efeito em células não tumorais, corroborando Lima et al. (2022), que obteve resultados semelhantes avaliando braquidinas glicosiladas. Portanto, a FDCM é promissora, pois possui três propriedades antitumorais críticas, ou seja, capacidades citotóxicas, antiproliferativas e antimigratórias, com seletividade contra células tumorais ( $IS > 1,6$ ). Além disso, como não é necessário o processo de isolamento, a FDCM apresenta menores custos de fabricação.

Considerando que vários agentes antitumorais podem atuar induzindo danos ao DNA (GUROVA, 2009; REUVERS; KANAAR; NONNEKENS, 2020), também investigamos se este seria um possível mecanismo envolvido na atividade antitumoral da FDCM. Nosso principal objetivo foi determinar a capacidade da FDCM de causar danos ao DNA em concentrações definidas nos ensaios citotóxicos ( $IC_{50}$ ). Testamos três concentrações ( $IC_{50}$ ,  $\frac{1}{2} IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$ ) dentro de 3 e 24 horas de tratamento. Nossos resultados estão de acordo com outros autores que avaliaram o potencial genotóxico ou mutagênico das braquidinas. Resende et al. (2017) relataram que a FDCM não causou mutações em bactérias, enquanto Nunes et al. (2020) testaram cada braquidina individualmente e não detectaram genotoxicidade. Os quimioterápicos indutores de danos ao DNA mantêm uma posição de destaque entre as estratégias utilizadas no tratamento do câncer. No entanto, geralmente são pouco seletivos, causando uma variedade de efeitos adversos, incluindo um risco aumentado de câncer secundário (REUVERS; KANAAR; NONNEKENS, 2020; WANG, XUAN; ZHANG; CHEN, 2019). Assim, agentes antitumorais que não causem danos ao DNA são de grande interesse, uma vez que a maioria dos efeitos colaterais será reduzida (GUROVA, 2009).

Finalmente, usamos o MFA para demonstrar pela primeira vez, até onde sabemos, o impacto ultraestrutural dos efeitos antitumorais da FDCM em células de câncer de próstata. MFA é uma poderosa ferramenta na técnica de imagem que permite a investigação em escala nanométrica de células e moléculas (DUFRENE et al., 2017; PILLET et al., 2014) e sondar danos induzidos por drogas à morfologia celular (LEKKA; LAIDLER, 2009; WANG, JINYI et al., 2009). Nossa análise revelou um aumento no número de buracos e rugosidade a membrana celular, principalmente em células tumorais, de forma concentração-dependente, corroborando com os efeitos de citotoxicidade, clonogenicidade e migração observados em células tratadas com FDCM. Estudos anteriores demonstraram que flavonóides podem interagir com membranas celulares penetrando seus espaços hidrofóbicos ou interfásicos, reorganizando os elementos da membrana envolvidos na transmissão de sinais, regulação do metabolismo ou

outras funções biológicas (MANDIĆ *et al.*, 2019; ESCRIBÁ *et al.*, 2015; TSUCHIYA, 2010, 2015).

A rugosidade da membrana celular reflete a presença de macromoléculas e seus diversos estados agregados e alterações nessas estruturas causadas pela lesão celular (YEOW; TABOR; GARNIER, 2017). Notavelmente, existem diferenças entre os componentes das membranas das células tumorais e os das células normais, possibilitando parâmetros de rugosidade para diagnóstico e avaliação de estratégias de terapia antitumoral (TAN *et al.*, 2017; WANG, JINYI *et al.*, 2009b). Alterações na rugosidade da membrana foram descritas em células tumorais (WANG, YUHUA *et al.*, 2016), eritrócitos (BUYS *et al.*, 2013) e fibroblastos (CHANG, CHAO-HUNG; LEE; LEE, 2017), que foram associados com anormalidades do citoesqueleto. Recentemente, estudos demonstraram uma associação entre migração, invasão e formação de colônias com alterações no citoesqueleto de actina em células tumorais tratadas com cisplatina (RAUDENSKA *et al.* 2019), equinomicina (Chen *et al.* 2020) e óxido de grafeno (WANG, JING *et al.*, 2020). Considerando a redução da migração e formação de colônias e a maior rugosidade nas células tumorais tratadas com FDCM, sugerimos que a atividade antitumoral pode estar relacionada a alterações nas proteínas do citoesqueleto. No entanto, mais investigações são necessárias para melhor elucidar o mecanismo subjacente à atividade antitumoral da FDCM.

Nas condições experimentais deste estudo, concluímos que a FDCM isolada de raízes de *A. brachypoda* reduz a viabilidade das células tumorais sem causar danos ao DNA. Além disso, a FDCM inibe a proliferação e migração de células tumorais, cujas membranas apresentam alterações ultraestruturais dependentes da concentração. Esses resultados sugerem que a FDCM pode ser um agente anticancerígeno promissor com menor toxicidade para células normais.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram o potencial antitumoral da FDCM, composta de braquidinas A, B e C, extraída da raiz de *A. brachypoda*. Nossos resultados mostraram uma significativa redução na viabilidade das células tumorais humanas DU145, MCF7 e HeLa, sem causar danos ao DNA, redução na capacidade de formação colônias e sua capacidade de migrar em células DU145. Além disso a MFA revelou alterações na ultraestrutura das superfícies da membrana nuclear tumoral, indicando que os flavonoides presentes na FDCM possivelmente atuam por meio da interação com marcadores tumorais específicos na membrana.

Deste modo, nossos achados são promissores no que diz respeito a utilização deste produto natural para a formulação de fármacos que combatam o câncer, uma vez que apresentou atividade em baixa concentração ( $IC_{50}$ ), em diferentes linhagens tumorais, sem causar danos ao DNA. Ressaltamos também o possível menor custo de produção comercial deste potencial antitumoral uma vez que não há necessidade de isolamento de compostos específicos presentes na fração diclorometânica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, Zaigham; REHMAN, Sakina. An Overview of Cancer Treatment Modalities. *Neoplasms*. [S.l.]: InTech, 2018.
- ABOTALEB, Mariam *et al.* Flavonoids in Cancer and Apoptosis. *Cancers*, v. 11, n. 1, p. 28, 28 dez. 2018.
- ADAMI, Bruno Silveira *et al.* Morphological and mechanical changes induced by quercetin in human T24 bladder cancer cells. *Micron*, v. 151, p. 103152, dez. 2021.
- AJDŽANOVIĆ, Vladimir *et al.* Membrane Fluidity, Invasiveness and Dynamic Phenotype of Metastatic Prostate Cancer Cells after Treatment with Soy Isoflavones. *The Journal of Membrane Biology*, v. 246, n. 4, p. 307–314, 16 abr. 2013.
- ALCERITO, Tatiana *et al.* Foliar epicuticular wax of *Arrabidaea brachypoda*: flavonoids and antifungal activity. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, n. 7, p. 677–683, jul. 2002.
- ALMEIDA, Vera Lúcia De *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 118–129, fev. 2005.
- ALVARENGA, Tavane A. *et al.* Evaluation of *Cuspidaria pulchra* and its Isolated Compounds Against *Schistosoma mansoni* Adult Worms. *International Journal of Biotechnology for Wellness Industries*, p. 122–127, 2012.
- AMMENDOLIA, Dustin A.; BEMENT, William M.; BRUMELL, John H. Plasma membrane integrity: implications for health and disease. *BMC Biology*, v. 19, n. 1, p. 71, 13 dez. 2021.
- ATANASOV, Atanas G. *et al.* Natural products in drug discovery: advances and opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 20, n. 3, p. 200–216, 28 mar. 2021.
- BAHAR, Entaz; YOON, Hyonok. Modeling and Predicting the Cell Migration Properties from Scratch Wound Healing Assay on Cisplatin-Resistant Ovarian Cancer Cell Lines Using Artificial Neural Network. *Healthcare*, v. 9, n. 7, p. 911, 19 jul. 2021.
- BARBOSA, Wagner Luiz Ramos *et al.* *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, n. 4, p. 544–548, dez. 2008.
- BASAK, Debasish *et al.* Comparison of Anticancer Drug Toxicities: Paradigm Shift in Adverse Effect Profile. *Life*, v. 12, n. 1, p. 48, 29 dez. 2021.



- BASKAR, Rajamanickam *et al.* Biological response of cancer cells to radiation treatment. *Frontiers in Molecular Biosciences*, v. 1, 17 nov. 2014.
- BAYLIN, Stephen B.; JONES, Peter A. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, v. 8, n. 9, p. a019505, set. 2016.
- BEUTLER, John A. Natural Products as a Foundation for Drug Discovery. *Current Protocols in Pharmacology*, v. 86, n. 1, 26 set. 2019.
- BIRCH, Jodie; GIL, Jesús. Senescence and the SASP: many therapeutic avenues. *Genes & Development*, v. 34, n. 23–24, p. 1565–1576, 1 dez. 2020.
- BRANDÃO, G.C. *et al.* Antiviral activity of Bignoniaceae species occurring in the State of Minas Gerais (Brazil): part 1. *Letters in Applied Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 469–476, out. 2010.
- BRASELMANN, Herbert *et al.* CFAssay: statistical analysis of the colony formation assay. *Radiation Oncology*, v. 10, n. 1, p. 223, 4 dez. 2015.
- BUYS, A., *et al.*, 2013. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovascular Diabetology*, 12 (1), 25.
- BUYS, Antoinette V *et al.* Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovascular Diabetology*, v. 12, n. 1, p. 25, 28 dez. 2013.
- CALABRESE, E J; BALDWIN, L A. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, v. 21, n. 2, p. 91–97, 2 fev. 2002.
- CERSOSIMO, Robert J. Gefitinib: an adverse effects profile. *Expert Opinion on Drug Safety*, v. 5, n. 3, p. 469–479, 13 maio 2006.
- CHANG, Chao-Hung; LEE, Hsiao-Hui; LEE, Chau-Hwang. Substrate properties modulate cell membrane roughness by way of actin filaments. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, p. 9068, 22 dez. 2017.
- CHANG, Kai-Chih *et al.* Atomic force microscopy in biology and biomedicine. *Tzu Chi Medical Journal*, v. 24, n. 4, p. 162–169, dez. 2012.
- CHATTERJEE, Nimrat; WALKER, Graham C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 58, n. 5, p. 235–263, jun. 2017.

- CHEN, Chiao-Yun *et al.* Epigallocatechin-3-gallate inhibits tumor angiogenesis: involvement of endoglin/Smad1 signaling in human umbilical vein endothelium cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 120, p. 109491, dez. 2019.
- CHEN, Mengdan *et al.* Examination of the relationship between viscoelastic properties and the invasion of ovarian cancer cells by atomic force microscopy. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 11, p. 568–582, 6 abr. 2020.
- CHEN, Yen-Yu *et al.* Naringenin inhibited migration and invasion of glioblastoma cells through multiple mechanisms. *Environmental Toxicology*, v. 34, n. 3, p. 233–239, mar. 2019.
- CHEN, Yonggang *et al.* Pelargonidin induces antitumor effects in human osteosarcoma cells via autophagy induction, loss of mitochondrial membrane potential, G2/M cell cycle arrest and downregulation of PI3K/AKT signalling pathway. *Journal of B.U.ON. : official journal of the Balkan Union of Oncology*, v. 23, n. 3, p. 735–740, 2018.
- CHERRAK, Sabri Ahmed *et al.* In Vitro Antioxidant versus Metal Ion Chelating Properties of Flavonoids: A Structure-Activity Investigation. *PLOS ONE*, v. 11, n. 10, p. e0165575, 27 out. 2016.
- CHOUDHARI, Amit S. *et al.* Phytochemicals in Cancer Treatment: From Preclinical Studies to Clinical Practice. *Frontiers in Pharmacology*, v. 10, 28 jan. 2020.
- CLEMENTE-SOTO, Aldo *et al.* Quercetin induces G2 phase arrest and apoptosis with the activation of p53 in an E6 expression-independent manner in HPV-positive human cervical cancer-derived cells. *Molecular Medicine Reports*, 11 jan. 2019.
- CORTEZ DE SÁ, Joicy *et al.* Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of *Arrabidaea chica* Verlot. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 16, n. 1, p. 1, 4 dez. 2015.
- D ANTONIO, Palma *et al.* Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1818, n. 12, p. 3141–3148, dez. 2012.
- D'ERRICO, Gabriele; MACHADO, Heather L.; SAINZ, Bruno. A current perspective on cancer immune therapy: step-by-step approach to constructing the magic bullet. *Clinical and Translational Medicine*, v. 6, n. 1, 3 dez. 2017.
- DA ROCHA, Cláudia Q. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133, n. 2, p. 396–401, jan. 2011.

DA ROCHA, Cláudia Q. *et al.* Oleanane-type triterpenoid: an anti-inflammatory compound of the roots *Arrabidaea brachypoda*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, n. 3, p. 228–232, maio 2015.

DA ROCHA, Cláudia Quintino *et al.* Dimeric Flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and Assessment of Their Anti- *Trypanosoma cruzi* Activity. *Journal of Natural Products*, v. 77, n. 6, p. 1345–1350, 27 jun. 2014.

DA ROCHA, Claudia Quintino *et al.* Gastroprotective effects of hydroethanolic root extract of *Arrabidaea brachypoda*: Evidences of cytoprotection and isolation of unusual glycosylated polyphenols. *Phytochemistry*, v. 135, p. 93–105, mar. 2017.

DABEA ALSHAMMARI, Fawaz *et al.* Population insight of the relationship between lifestyle and cancer: A population-based survey. *AIMS Public Health*, v. 6, n. 1, p. 34–48, 2019.

DARWICHE, Nadine. Epigenetic mechanisms and the hallmarks of cancer: an intimate affair. *American journal of cancer research*, v. 10, n. 7, p. 1954–1978, 2020.

DE LIMA, Carolina A. *et al.* Antiproliferative Activity of Two Unusual Dimeric Flavonoids, Brachyidin E and Brachyidin F, Isolated from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G.Lohmann: In Vitro and Molecular Docking Evaluation. *BioMed Research International*, v. 2022, p. 1–12, 11 fev. 2022.

DE OLIVEIRA, Larissa C. B. *et al.* Aglycone flavonoid brachyidin A shows selective cytotoxicity and antitumoral activity in human metastatic prostate (DU145) cancer cells. *Cytotechnology*, v. 73, n. 6, p. 761–774, 29 dez. 2021.

DE SOUSA ANDRADE, Leila M. *et al.* Antimicrobial activity and inhibition of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. *Microbial Pathogenesis*, v. 140, p. 103935, mar. 2020.

DENG, Xiangying *et al.* Application of atomic force microscopy in cancer research. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 16, n. 1, p. 102, 11 dez. 2018.

DOPPALAPUDI, Rupa S. *et al.* Genotoxicity of the cancer chemopreventive drug candidates CP-31398, SHetA2, and phospho-ibuprofen. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 746, n. 1, p. 78–88, jul. 2012.

DUFRENE, Yves F. *et al.* Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology*, v. 12, n. 4, p. 295–307, 6 abr. 2017a.

EDIRIWEERA, Meran K.; TENNEKOON, Kamani H.; SAMARAKOON, Sameera R. In vitro assays and techniques utilized in anticancer drug discovery. *Journal of Applied Toxicology*, v. 39, n. 1, p. 38–71, jan. 2019.

ESCRIBÁ, Pablo V. *et al.* Membrane lipid therapy: Modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Progress in Lipid Research*, v. 59, p. 38–53, jul. 2015.

FAGET, Douglas V.; REN, Qihao; STEWART, Sheila A. Unmasking senescence: context-dependent effects of SASP in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 19, n. 8, p. 439–453, 24 ago. 2019.

FAHEINA-MARTINS, Glaucia V. *et al.* Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, v. 25, n. 5, p. 290–296, set. 2011.

FAIRBAIRN, Daryl W.; OLIVE, Peggy L.; O'NEILL, Kim L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, v. 339, n. 1, p. 37–59, fev. 1995.

FERDOUS, Umme Tamanna; BALIA YUSOF, Zetty Norhana. Insight into Potential Anticancer Activity of Algal Flavonoids: Current Status and Challenges. *Molecules*, v. 26, n. 22, p. 6844, 13 nov. 2021.

FLORIAN, Stefan; MITCHISON, Timothy J. Anti-Microtubule Drugs. [S.l: s.n.], 2016. p. 403–421.

FORNI, Cinzia *et al.* Flavonoids: A Myth or a Reality for Cancer Therapy? *Molecules*, v. 26, n. 12, p. 3583, 11 jun. 2021.

FRANKEN, Nicolaas A P *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 21 dez. 2006.

FUJII, Yasuyuki *et al.* Elucidation of the Interaction between Flavan-3-ols and Bovine Serum Albumin and Its Effect on Their In-Vitro Cytotoxicity. *Molecules*, v. 24, n. 20, p. 3667, 11 out. 2019.

GENG, Rui *et al.* Influence of Bovine Serum Albumin-Flavonoid Interaction on the Antioxidant Activity of Dietary Flavonoids: New Evidence from Electrochemical Quantification. *Molecules*, v. 24, n. 1, p. 70, 25 dez. 2018.

GOMES, Nathan P. *et al.* A high throughput screen with a clonogenic endpoint to identify radiation modulators of cancer. *Radiat. Res.*, 2022.

GREENWELL, M; RAHMAN, P K S M. Medicinal Plants: Their Use in Anticancer Treatment. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, v. 6, n. 10, p. 4103–4112, 1 out. 2015.

GUROVA, Katerina. New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents. *Future Oncology*, v. 5, n. 10, p. 1685–1704, dez. 2009.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2022.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.

HE, Shenghui; SHARPLESS, Norman E. Senescence in Health and Disease. *Cell*, v. 169, n. 6, p. 1000–1011, jun. 2017.

HELENA, Jolene *et al.* Deoxyribonucleic Acid Damage and Repair: Capitalizing on Our Understanding of the Mechanisms of Maintaining Genomic Integrity for Therapeutic Purposes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, p. 1148, 11 abr. 2018.

HELMINK, Beth A. *et al.* The microbiome, cancer, and cancer therapy. *Nature Medicine*, v. 25, n. 3, p. 377–388, 6 mar. 2019.

HERVOUET, E; VALLETTE, F M; CARTRON, P-F. Impact of the DNA methyltransferases expression on the methylation status of apoptosis-associated genes in glioblastoma multiforme. *Cell Death & Disease*, v. 1, n. 1, p. e8–e8, 14 jan. 2010.

HO, Maria; MACKEY, John. Presentation and management of docetaxel-related adverse effects in patients with breast cancer. *Cancer Management and Research*, p. 253, maio 2014.

HU, Yan-Jun *et al.* Molecular spectroscopic studies on the interaction of morin with bovine serum albumin. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, v. 112, p. 16–22, 2 jul. 2012.

HUNG, Min-Sheng; TSAI, Meng-Feng. Investigating the Influence of Anti-Cancer Drugs on the Mechanics of Cells Using AFM. *BioNanoScience*, v. 5, n. 3, p. 156–161, 26 set. 2015.

INCA. *Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

IQBAL, Javed *et al.* Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v. 7, n. 12, p. 1129–1150, dez. 2017.

JACKSON, Stephen P.; BARTEK, Jiri. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature*, v. 461, n. 7267, p. 1071–1078, 22 out. 2009.

JAFARI, Ameneh *et al.* Clinical Applications and Anticancer Effects of Antimicrobial Peptides: From Bench to Bedside. *Frontiers in Oncology*, v. 12, 23 fev. 2022.

JEON, Ji-Sook *et al.* Regulation of the Intracellular ROS Level Is Critical for the Antiproliferative Effect of Quercetin in the Hepatocellular Carcinoma Cell Line HepG2. *Nutrition and Cancer*, v. 71, n. 5, p. 861–869, 4 jul. 2019.

JIN, S. *et al.* Daidzein induces MCF-7 breast cancer cell apoptosis via the mitochondrial pathway. *Annals of Oncology*, v. 21, n. 2, p. 263–268, fev. 2010.

KABAŁA-DZIK, Agata *et al.* Migration Rate Inhibition of Breast Cancer Cells Treated by Caffeic Acid and Caffeic Acid Phenethyl Ester: An In Vitro Comparison Study. *Nutrients*, v. 9, n. 10, p. 1144, 19 out. 2017.

KALARI, Satish; PFEIFER, Gerd P. Identification of Driver and Passenger DNA Methylation in Cancer by Epigenomic Analysis. [S.l.: s.n.], 2010. p. 277–308.

KARLSSON, Hanna L. The comet assay in nanotoxicology research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 398, n. 2, p. 651–666, 18 set. 2010.

KATERJI, Meghri; DUERKSEN-HUGHES, Penelope J. DNA damage in cancer development: special implications in viral oncogenesis. *American journal of cancer research*, v. 11, n. 8, p. 3956–3979, 2021.

KATYAL, Priya; SHARMA, Shivani. Emerging Alkaloids Against Cancer: A Peep into Factors, Regulation, and Molecular Mechanisms. *Bioactive Natural Products for the Management of Cancer: from Bench to Bedside*. Singapore: Springer Singapore, 2019. p. 37–60.

KAUFMAN, Charles K. *et al.* A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation. *Science*, v. 351, n. 6272, 29 jan. 2016.

KHAZIR, Jabeena *et al.* Role of plants in anticancer drug discovery. *Phytochemistry Letters*, v. 7, p. 173–181, fev. 2014.

KIM, Gi Dae. Myricetin Inhibits Angiogenesis by Inducing Apoptosis and Suppressing PI3K/Akt/mTOR Signaling in Endothelial Cells. *Journal of Cancer Prevention*, v. 22, n. 4, p. 219–227, 30 dez. 2017.

KNÖPFL-SIDLER, F *et al.* Human cancer cells exhibit in vitro individual receptiveness towards different mistletoe extracts. *Die Pharmazie*, v. 60, n. 6, p. 448–54, jun. 2005.

KÖHLER, Corinna *et al.* Mouse Cutaneous Melanoma Induced by Mutant BRAf Arises from Expansion and Dedifferentiation of Mature Pigmented Melanocytes. *Cell Stem Cell*, v. 21, n. 5, p. 679- 693.e6, nov. 2017.

KONTOMANOLIS, EMMANUEL N. *et al.* Role of Oncogenes and Tumor-suppressor Genes in Carcinogenesis: A Review. *Anticancer Research*, v. 40, n. 11, p. 6009–6015, 27 nov. 2020.

KOPUSTINSKIENE, Dalia M. *et al.* Flavonoids as Anticancer Agents. *Nutrients*, v. 12, n. 2, p. 457, 12 fev. 2020.

KOWALD, Axel; PASSOS, João F.; KIRKWOOD, Thomas B. L. On the evolution of cellular senescence. *Aging Cell*, v. 19, n. 12, 9 dez. 2020.

KUMAR, Shashank; PANDEY, Abhay K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *The Scientific World Journal*, v. 2013, p. 1–16, 2013.

KURKIVUORI, Johanna *et al.* Acetaldehyde production from ethanol by oral streptococci. *Oral Oncology*, v. 43, n. 2, p. 181–186, fev. 2007.

LABANI-MOTLAGH, Alireza; ASHJA-MAHDAVI, Mehrnoush; LOSKOG, Angelica. The Tumor Microenvironment: A Milieu Hindering and Obstructing Antitumor Immune Responses. *Frontiers in Immunology*, v. 11, 15 maio 2020.

LAL, Ratnesh; RAMACHANDRAN, Srinivasan; ARNSDORF, Morton F. Multidimensional Atomic Force Microscopy: A Versatile Novel Technology for Nanopharmacology Research. *The AAPS Journal*, v. 12, n. 4, p. 716–728, 19 dez. 2010.

LEE, Soyong; SCHMITT, Clemens A. The dynamic nature of senescence in cancer. *Nature Cell Biology*, v. 21, n. 1, p. 94–101, 2 jan. 2019.

LEITE, João Paulo V. *et al.* Trypanocidal Activity of Triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and Derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 11, p. 2307–2309, 2006.

LEKKA, M.; LAIDLER, P. Applicability of AFM in cancer detection. *Nature Nanotechnology*, v. 4, n. 2, p. 72–72, fev. 2009.

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y; GUAN, Jun-Lin. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nature Protocols*, v. 2, n. 2, p. 329–333, 1 fev. 2007.

- LIN, Chia-Hung *et al.* Flavones inhibit breast cancer proliferation through the Akt/FOXO3a signaling pathway. *BMC Cancer*, v. 15, n. 1, p. 958, 16 dez. 2015.
- LIN, Yingjia *et al.* The interaction of serum albumin with ginsenoside Rh2 resulted in the downregulation of ginsenoside Rh2 cytotoxicity. *Journal of Ginseng Research*, v. 41, n. 3, p. 330–338, jul. 2017.
- LIU, E-Hu; QI, Lian-Wen; LI, Ping. Structural Relationship and Binding Mechanisms of Five Flavonoids with Bovine Serum Albumin. *Molecules*, v. 15, n. 12, p. 9092–9103, 9 dez. 2010.
- LU, Yuanjun *et al.* Epigenetic regulation in human cancer: the potential role of epi-drug in cancer therapy. *Molecular Cancer*, v. 19, n. 1, p. 79, 27 dez. 2020.
- LUCIO, M.; LIMA, J.L.F.C.; REIS, S. Drug-Membrane Interactions: Significance for Medicinal Chemistry. *Current Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 17, p. 1795–1809, 1 jun. 2010.
- LUO, Haitao *et al.* Kaempferol Inhibits Angiogenesis and VEGF Expression Through Both HIF Dependent and Independent Pathways in Human Ovarian Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, v. 61, n. 4, p. 554–563, 17 jul. 2009.
- MAFIOLETI, Luciano *et al.* Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 150, n. 2, p. 576–582, nov. 2013.
- MALANDRINO, Andrea; KAMM, Roger D.; MOEENDARBARY, Emad. In Vitro Modeling of Mechanics in Cancer Metastasis. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, v. 4, n. 2, p. 294–301, 12 fev. 2018.
- MANDIĆ, Lucija *et al.* Enhanced Protection of Biological Membranes during Lipid Peroxidation: Study of the Interactions between Flavonoid Loaded Mesoporous Silica Nanoparticles and Model Cell Membranes. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 11, p. 2709, 1 jun. 2019.
- MARTIN, Frédéric *et al.* Antioxidant C -Glucosylxanthones from the Leaves of *Arrabidaea patellifera*. *Journal of Natural Products*, v. 71, n. 11, p. 1887–1890, 1 dez. 2008.
- MARTINO, Emanuela *et al.* Vinca alkaloids and analogues as anti-cancer agents: Looking back, peering ahead. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 28, n. 17, p. 2816–2826, set. 2018.
- MARTINS, Beatriz T. *et al.* Marine natural flavonoids: chemistry and biological activities. *Natural Product Research*, v. 33, n. 22, p. 3260–3272, 17 nov. 2019.



means of AFM technique. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818 (12), 3141–3148.

MENEZES FILHO, A. C. P.; PORFIRO, A.; CASTRO, F. S. Avaliação do extrato floral de *Fridericia platyphylla* (Cham.) L. G. Lohmann sobre *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e *C. albicans*. *Scientific Electronic Archives*, v. 14, n. 7, p. 53–58, 1 jul. 2021.

MÉRY, Benoite *et al.* In Vitro Cell Death Determination for Drug Discovery: A Landscape Review of Real Issues. *Journal of Cell Death*, v. 10, p. 117967071769125, 1 jan. 2017.

MICHEL, Ana Flávia Ribeiro Machado *et al.* Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 165, p. 29–38, maio 2015a.

MIERKE, Claudia Tanja. Mechanical Cues Affect Migration and Invasion of Cells From Three Different Directions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 8, 17 set. 2020.

MISHIMA, Masayuki. Chromosomal aberrations clastogens vs aneugens. *Frontiers in Bioscience*, v. 9, n. 1, p. 468, 2017.

MORRIS, Garrett M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.

MOUKHARSKAYA, Julia; VERSCHRAEGEN, Claire. Topoisomerase 1 Inhibitors and Cancer Therapy. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 26, n. 3, p. 507–525, jun. 2012.

MUNSHI, Anupama; HOBBS, Marvette; MEYN, Raymond E. Clonogenic Cell Survival Assay. *Chemosensitivity*. New Jersey: Humana Press, [S.d.]. p. 021–028.

MUTHA, Rakesh E.; TATIYA, Anilkumar U.; SURANA, Sanjay J. Flavonoids as natural phenolic compounds and their role in therapeutics: an overview. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 7, n. 1, p. 25, 20 dez. 2021.

NENÉ, Nuno R *et al.* Association between the cervicovaginal microbiome, BRCA1 mutation status, and risk of ovarian cancer: a case-control study. *The Lancet Oncology*, v. 20, n. 8, p. 1171–1182, ago. 2019.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016.

- NICCO, Carole *et al.* Mechanistic target of rapamycin (mTOR) regulates self-sustained quiescence, tumor indolence and late clinical metastasis in a Beclin-1-dependent manner. 2022.
- NIKITAEV, V G *et al.* Application of atomic force microscopy in biology and medicine. *Journal of Physics: Conference Series*, v. 2058, n. 1, p. 012029, 1 out. 2021.
- NUNES, Higor Lopes *et al.* Characterization of the *in vitro* cytotoxic effects of bradydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 83, n. 15–16, p. 547–558, 17 ago. 2020.
- NUSSBAUMER, Susanne *et al.* Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*, v. 85, n. 5, p. 2265–2289, out. 2011.
- PAL, Sandip; SAHA, Chabita. A review on structure–affinity relationship of dietary flavonoids with serum albumins. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 32, n. 7, p. 1132–1147, 3 jul. 2014.
- PAWLIKOWSKA-PAWLEGA, Bozena *et al.* Interaction of a quercetin derivative - lensoside A $\beta$  with liposomal membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1860, n. 2, p. 292–299, fev. 2018.
- PEREIRA, Ivan de Oliveira *et al.* Leishmanicidal activity of different parts from Arrabidaea brachypoda. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 10, n. 1, p. 49–55, 2012.
- PEREKATT, Ansu O. *et al.* SMAD4 Suppresses WNT-Driven Dedifferentiation and Oncogenesis in the Differentiated Gut Epithelium. *Cancer Research*, v. 78, n. 17, p. 4878–4890, 1 set. 2018.
- PÉREZ-HERRERO, Edgar; FERNÁNDEZ-MEDARDE, Alberto. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 93, p. 52–79, jun. 2015.
- PFEIFER, Gerd. Defining Driver DNA Methylation Changes in Human Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 4, p. 1166, 12 abr. 2018.
- PI, Jiang *et al.* Qualitative and Quantitative Analysis of ROS-Mediated Oridonin-Induced Oesophageal Cancer KYSE-150 Cell Apoptosis by Atomic Force Microscopy. *PLOS ONE*, v. 10, n. 10, p. e0140935, 23 out. 2015.
- Pillet, F., Chopinet, L., Formosa, C., and Dague, É., 2014. Atomic Force Microscopy and pharmacology: From microbiology to cancerology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840 (3), 1028–1050.

- PILLET, Flavien *et al.* Atomic Force Microscopy and pharmacology: From microbiology to cancerology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1840, n. 3, p. 1028–1050, mar. 2014.
- PIZZINO, Gabriele *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, p. 1–13, 2017.
- POKLAR ULRIH, Nataša *et al.* Flavonoids and cell membrane fluidity. *Food Chemistry*, v. 121, n. 1, p. 78–84, jul. 2010.
- PONS, Daniel Gabriel *et al.* The phytoestrogen genistein affects inflammatory-related genes expression depending on the ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio in breast cancer cells. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 70, n. 8, p. 941–949, 17 nov. 2019.
- QIN, Jian *et al.* Genistein induces activation of the mitochondrial apoptosis pathway by inhibiting phosphorylation of Akt in colorectal cancer cells. *Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 1, p. 74–79, 2 jan. 2016.
- QUE, Linling *et al.* Activation of Nrf2-ARE signaling mitigates cyclophosphamide-induced myelosuppression. *Toxicology Letters*, v. 262, p. 17–26, nov. 2016.
- RAUDENSKA, Martina *et al.* Cisplatin enhances cell stiffness and decreases invasiveness rate in prostate cancer cells by actin accumulation. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 1660, 7 dez. 2019.
- RAVI, Lokesh; KANNABIRAN KRISHNAN. A Handbook on Protein-Ligand Docking Tool: AutoDock 4. *Journal of the Medical Sciences*, v. 4, p. 28–33, 2016.
- RAVISHANKAR, Divyashree *et al.* Impact of specific functional groups in flavonoids on the modulation of platelet activation. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 9528, 22 dez. 2018.
- RAYAN, Anwar; RAIYN, Jamal; FALAH, Mizied. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. *PLOS ONE*, v. 12, n. 11, p. e0187925, 9 nov. 2017a.
- RAYAN, Anwar; RAIYN, Jamal; FALAH, Mizied. Nature is the best source of anticancer drugs: Indexing natural products for their anticancer bioactivity. *PLOS ONE*, v. 12, n. 11, p. e0187925, 9 nov. 2017b.
- RESENDE, Flávia Aparecida *et al.* In vitro toxicological assessment of Arrabidaea brachypoda (DC.) Bureau: Mutagenicity and estrogenicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 90, p. 29–35, nov. 2017.

- REUVERS, Thom G. A.; KANAAR, Roland; NONNEKENS, Julie. DNA Damage-Inducing Anticancer Therapies: From Global to Precision Damage. *Cancers*, v. 12, n. 8, p. 2098, 28 jul. 2020
- RIBÉREAU-GAYON, Gilles *et al.* Effect of fetal calf serum on the cytotoxic activity of mistletoe (*Viscum album*L.) lectins in cell culture. *Phytotherapy Research*, v. 9, n. 5, p. 336–339, ago. 1995.
- ROCHA, Vinícius *et al.* Antileishmanial Activity of Dimeric Flavonoids Isolated from *Arrabidaea brachypoda*. *Molecules*, v. 24, n. 1, p. 1, 20 dez. 2018.
- RODRIGUES, Igor A. *et al.* *Arrabidaea chica* Hexanic Extract Induces Mitochondrion Damage and Peptidase Inhibition on *Leishmania* spp. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–7, 2014.
- ROSA, CLARISSA *et al.* The Program for Biodiversity Research in Brazil: The role of regional networks for biodiversity knowledge, dissemination, and conservation. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 93, n. 2, 2021.
- RUHLAND, Megan K. *et al.* Stromal senescence establishes an immunosuppressive microenvironment that drives tumorigenesis. *Nature Communications*, v. 7, n. 1, p. 11762, 8 set. 2016.
- SAHA, Sarmistha *et al.* The Interaction of Flavonols with Membrane Components: Potential Effect on Antioxidant Activity. *The Journal of Membrane Biology*, v. 253, n. 1, p. 57–71, 2 fev. 2020.
- SALGADO, Carlota *et al.* In Vitro Anti-Inflammatory Activity in Arthritic Synoviocytes of *A. brachypoda* Root Extracts and Its Unusual Dimeric Flavonoids. *Molecules*, v. 25, n. 21, p. 5219, 9 nov. 2020.
- SANDU, Mariana; BÎRSĂ, Lucian Mihail; BAHRAIN, Lucian Gabriel. Flavonoids – Small Molecules, High Hopes. *Acta Chemica Iasi*, v. 25, n. 1, p. 6–23, 26 jul. 2017.
- SARDER, Amit *et al.* Molecular Basis of Drug Interactions of Methotrexate, Cyclophosphamide and 5-Fluorouracil as Chemotherapeutic Agents in Cancer. *Biomedical Research and Therapy*, v. 2, n. 2, p. 5, 19 jan. 2015.
- SEARS, Cynthia L.; GARRETT, Wendy S. Microbes, Microbiota, and Colon Cancer. *Cell Host & Microbe*, v. 15, n. 3, p. 317–328, mar. 2014.
- SEITER, Karen. Toxicity of the topoisomerase II inhibitors. *Expert Opinion on Drug Safety*, v. 4, n. 2, p. 219–234, 22 mar. 2005.

- SELVARAJ, Stalin *et al.* Influence of membrane lipid composition on flavonoid–membrane interactions: Implications on their biological activity. *Progress in Lipid Research*, v. 58, p. 1–13, abr. 2015.
- SERPELONI, JM *et al.* *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann root extract exerts cytotoxic and antiproliferative effects on gastric tumor cells and downregulates *BCL-XL*, *BIRC5*, and *MET* genes. *Human & Experimental Toxicology*, v. 39, n. 3, p. 338–354, 14 mar. 2020.
- SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal Transduction in Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 5, n. 4, p. a006098–a006098, 1 abr. 2015.
- SHAFIEE, Gholamreza *et al.* Genistein Induces Apoptosis and Inhibits Proliferation of HT29 Colon Cancer Cells. *International journal of molecular and cellular medicine*, v. 5, n. 3, p. 178–191, 2016.
- SHAH, Shaily Umang. Shah, Umang. “Importance of Genotoxicity & S 2 A guidelines for genotoxicity testing for pharmaceuticals : Shaily.” (2012). *Iosr Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, v. 1, n. 2, p. 43–54, 2012.
- SHANG, Hung-Sheng *et al.* Quercetin induced cell apoptosis and altered gene expression in AGS human gastric cancer cells. *Environmental Toxicology*, v. 33, n. 11, p. 1168–1181, nov. 2018.
- SHOEMAKER, Robert H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. 10, p. 813–823, 1 out. 2006.
- SIDDIQUI, Arif Jamal *et al.* Plants in Anticancer Drug Discovery: From Molecular Mechanism to Chemoprevention. *BioMed Research International*, v. 2022, p. 1–18, 2 mar. 2022.
- SINGH, Narendra P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, v. 175, n. 1, p. 184–191, mar. 1988.
- SIRAICHI, Jackeline Tiemy Guinoza *et al.* Antioxidant Capacity of the Leaf Extract Obtained from *Arrabidaea chica* Cultivated in Southern Brazil. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. e72733, 29 ago. 2013.
- SKEHAN, P. *et al.* New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, n. 13, p. 1107–1112, 4 jul. 1990.
- SOMCHAI, Parinyachat *et al.* Novel Analytical Platform For Robust Identification of Cell Migration Inhibitors. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 931, 22 dez. 2020.

- STEEG, Patricia S; THEODORESCU, Dan. Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*, v. 5, n. 4, p. 206–219, 5 abr. 2008.
- SUBBARAJ, Gowtham Kumar; KUMAR, Yasam Santhosh; KULANTHAIVEL, Langeswaran. Antiangiogenic role of natural flavonoids and their molecular mechanism: an update. *The Egyptian Journal of Internal Medicine*, v. 33, n. 1, p. 29, 6 dez. 2021.
- SUN, Xu *et al.* Anti-cancer effects of fisetin on mammary carcinoma cells via regulation of the PI3K/Akt/mTOR pathway: *In vitro* and *in vivo* studies. *International Journal of Molecular Medicine*, 2 maio 2018.
- SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, 4 maio 2021.
- TAFFARELLO, Denise *et al.* Atividade de extratos de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos sobre a proliferação de fibroblastos e células tumorais humanas. *Química Nova*, v. 36, n. 3, p. 431–436, 2013.
- TAN, Loh Teng-Hern *et al.* Targeting Membrane Lipid a Potential Cancer Cure? *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, 23 jan. 2017.
- TANG, Fen *et al.* Fetal bovine serum influences the stability and bioactivity of resveratrol analogues: A polyphenol-protein interaction approach. *Food Chemistry*, v. 219, p. 321–328, mar. 2017.
- TAPARIA, Shruti Sanjay; KHANNA, Aparna. Procyanidin-rich extract of natural cocoa powder causes ROS-mediated caspase-3 dependent apoptosis and reduction of pro-MMP-2 in epithelial ovarian carcinoma cell lines. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 83, p. 130–140, out. 2016.
- TARAHOVSKY, Yury S. *et al.* Flavonoid–membrane interactions: Involvement of flavonoid–metal complexes in raft signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1838, n. 5, p. 1235–1246, maio 2014.
- TAVSAN, Zehra; KAYALI, Hülya Ayar. Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 116, p. 109004, ago. 2019.
- THOMAS, Sunil *et al.* The Host Microbiome Regulates and Maintains Human Health: A Primer and Perspective for Non-Microbiologists. *Cancer Research*, v. 77, n. 8, p. 1783–1812, 15 abr. 2017.

- TICE, R. R. *et al.* Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, v. 35, n. 3, p. 206–221, 6 jun. 2000.
- TSUCHIYA, Hironori. Membrane Interactions of Phytochemicals as Their Molecular Mechanism Applicable to the Discovery of Drug Leads from Plants. *Molecules*, v. 20, n. 10, p. 18923–18966, 16 out. 2015.
- TSUCHIYA, Hironori. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food Chemistry*, v. 120, n. 4, p. 1089–1096, jun. 2010.
- TUOMINEN, Heidi; RAUTAVA, Jaana. Oral Microbiota and Cancer Development. *Pathobiology*, v. 88, n. 2, p. 116–126, 2021.
- ULLAH, Asad *et al.* Important Flavonoids and Their Role as a Therapeutic Agent. *Molecules*, v. 25, n. 22, p. 5243, 11 nov. 2020.
- VICHAJ, Vanicha; KIRTIKARA, Kanyawim. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 17 ago. 2006.
- WANG, Boshi; KOHLI, Jaskaren; DEMARIA, Marco. Senescent Cells in Cancer Therapy: Friends or Foes? *Trends in Cancer*, v. 6, n. 10, p. 838–857, out. 2020.
- WANG, Jing *et al.* Graphene oxide inhibits cell migration and invasion by destroying actin cytoskeleton in cervical cancer cells. *Aging*, v. 12, n. 17, p. 17625–17633, 14 set. 2020.
- WANG, Jinyi *et al.* Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, n. 4, p. 721–727, dez. 2009a.
- WANG, Jinyi *et al.* Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 25, n. 4, p. 721–727, dez. 2009b.
- WANG, Xuan; ZHANG, Haiyun; CHEN, Xiaozhuo. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2019.
- WANG, Yuhua *et al.* Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy. *Scanning*, v. 38, n. 6, p. 558–563, nov. 2016.
- WILLIS, Jesse R.; GABALDÓN, Toni. The human oral microbiome in health and disease: from sequences to ecosystems. *Microorganisms*, v. 8, n. 2, p. 308, 2020.

- WŁOCH, Aleksandra *et al.* Interaction of 4'-methylflavonoids with biological membranes, liposomes, and human albumin. *Scientific Reports*, v. 11, n. 1, p. 16003, 6 dez. 2021.
- WU, Jia-shun *et al.* Plasticity of cancer cell invasion: Patterns and mechanisms. *Translational Oncology*, v. 14, n. 1, p. 100899, jan. 2021.
- WU, Qiu *et al.* Correction: Different antitumor effects of quercetin, quercetin-3'-sulfate and quercetin-3-glucuronide in human breast cancer MCF-7 cells. *Food & function*, v. 10, n. 7, p. 4452–4453, 17 jul. 2019.
- WU, Yuche; WANG, Yanming; NABI, Xinhua. Protective effect of Ziziphora clinopodioides flavonoids against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in HUVEC cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 117, p. 109156, set. 2019.
- XI, Xiaomin *et al.* The Biphasic Effect of Flavonoids on Oxidative Stress and Cell Proliferation in Breast Cancer Cells. *Antioxidants*, v. 11, n. 4, p. 622, 24 mar. 2022.
- XIANG, Yiqun *et al.* Investigation of the interactions between flavonoids and human organic anion transporting polypeptide 1B1 using fluorescent substrate and 3D-QSAR analysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1862, n. 5, p. 183210, maio 2020.
- XIE, Xiaohui *et al.* Microbial infection, inflammation and epithelial ovarian cancer. *Oncology Letters*, v. 14, n. 2, p. 1911–1919, ago. 2017.
- YAHFOUFI, Nour *et al.* The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. *Nutrients*, v. 10, n. 11, p. 1618, 2 nov. 2018.
- YANG, Fen *et al.* Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin–organogermanium (IV) complex in MCF-7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 23, n. 20, p. 5544–5551, out. 2013.
- YEOW, Natasha; TABOR, Rico F.; GARNIER, Gil. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 249, p. 149–162, nov. 2017.
- YUAN, Salina; NORGDARD, Robert J.; STANGER, Ben Z. Cellular Plasticity in Cancer. *Cancer Discovery*, v. 9, n. 7, p. 837–851, 1 jul. 2019.
- YUE, Patrick Y. K. *et al.* A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. *Journal of Biomolecular Screening*, v. 15, n. 4, p. 427–433, 5 abr. 2010.
- ZHANG, Hong-Wei *et al.* Flavonoids inhibit cell proliferation and induce apoptosis and autophagy through downregulation of PI3Kγ mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K/ULK



signaling pathway in human breast cancer cells. *Scientific Reports*, v. 8, n. 1, p. 11255, 26 dez. 2018.

ZHANG, Li *et al.* Apigenin induces autophagic cell death in human papillary thyroid carcinoma BCPAP cells. *Food & Function*, v. 6, n. 11, p. 3464–3472, 2015.

ZHAO, Zhenjiang *et al.* Naringenin inhibits migration of breast cancer cells via inflammatory and apoptosis cell signaling pathways. *Inflammopharmacology*, v. 27, n. 5, p. 1021–1036, 2 out. 2019.

## ANEXO I

Artigo publicado na revista publicado na revista *Drug and Chemical Toxicology*.

Qualis: A3.

Fator de Impacto: 3,3



**Drug and Chemical Toxicology**



ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/idct20>

## Unusual dimeric flavonoids (brachydins) induce ultrastructural membrane alterations associated with antitumor activity in cancer cell lines

Vera Lucia Maciel-Silva, Claudia Quintino da Rocha, Luciana Magalhães Rebelo Alencar, Patrícia Valéria Castelo-Branco, Israel Higino de Sousa, Ana Paula Azevedo-Santos, André Alvares Marques Vale, Silvio Gomes Monteiro, Rossy-Eric Pereira Soares, Sulayne Janayna Araujo Guimarães, Jessyane Rodrigues do Nascimento & Silma Regina Ferreira Pereira













To cite this article: Vera Lucia Maciel-Silva, Claudia Quintino da Rocha, Luciana Magalhães Rebelo Alencar, Patrícia Valéria Castelo-Branco, Israel Higino de Sousa, Ana Paula Azevedo-Santos, André Alvares Marques Vale, Silvio Gomes Monteiro, Rossy-Eric Pereira Soares, Sulayne Janayna Araujo Guimarães, Jessyane Rodrigues do Nascimento & Silma Regina Ferreira Pereira (2022): Unusual dimeric flavonoids (brachydins) induce ultrastructural membrane alterations associated with antitumor activity in cancer cell lines, *Drug and Chemical Toxicology*, DOI: [10.1080/01480545.2022.2080217](https://doi.org/10.1080/01480545.2022.2080217)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01480545.2022.2080217>



Published online: 29 May 2022.

## Unusual dimeric flavonoids (brachydins) induce ultrastructural membrane alterations associated with antitumor activity in cancer cell lines

Vera Lucia Maciel-Silva<sup>a,b,c</sup> , Claudia Quintino da Rocha<sup>d</sup> , Luciana Magalhães Rebelo Alencar<sup>e</sup> ,  
Patrícia Valéria Castelo-Branco<sup>b</sup> , Israel Higino de Sousa<sup>b</sup> , Ana Paula Azevedo-Santos<sup>f</sup> ,  
André Alvares Marques Vale<sup>f,g</sup> , Silvio Gomes Monteiro<sup>b</sup> , Rosy-Eric Pereira Soares<sup>b</sup> ,  
Sulayne Janayna Araujo Guimarães<sup>f,g</sup> , Jessyane Rodrigues do Nascimento<sup>h</sup>  and  
Silma Regina Ferreira Pereira<sup>b</sup> 

<sup>a</sup>Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology-Bionorte, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil; <sup>b</sup>Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil; <sup>c</sup>Department of Biology, State University of Maranhão, São Luis, Brazil; <sup>d</sup>Laboratory of Natural Products, Department of Chemistry, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil; <sup>e</sup>Laboratory of Biophysics and Nanosystems, Department of Physics, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil; <sup>f</sup>Laboratory of Immunology Applied to Cancer, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, São Luis, Brazil; <sup>g</sup>Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão, Maranhão, Brazil; <sup>h</sup>Postgraduate Program in Chemistry, São Paulo State University (Unesp), Institute of Chemistry, Araraquara, Brazil

### ABSTRACT

Notwithstanding the advances in molecular target-based drugs, chemotherapy remains the most common cancer treatment, despite its high toxicity. Consequently, effective anticancer therapies with fewer adverse effects are needed. Therefore, this study aimed to determine the anticancer activity of the dichloromethane fraction (DCMF) isolated from *Arrabidaea brachypoda* roots, whose components are three unusual dimeric flavonoids. The toxicity of DCMF was investigated in breast (MCF-7), prostate (DU145), and cervical (HeLa) tumor cells, as well as non-tumor cells (PNT2), using sulforhodamine B (cell viability), Comet (genotoxicity), clonogenicity (reproductive capacity) and wound healing (cell migration) assays, and atomic force microscopy (AFM) for ultrastructural cell membrane alterations. Molecular docking revealed affinity between albumin and each rare flavonoid, supporting the impact of fetal bovine serum in DCMF antitumor activity. The IC<sub>50</sub> values for MCF7, HeLa, and DU145 were 2.77, 2.46, and 2.51 µg/mL, respectively, and 4.08 µg/mL for PNT2. DCFM was not genotoxic to tumor or normal cells when exposed to twice the IC<sub>50</sub> for up to 24 h, but it inhibited tumor cell migration and reproduction compared to normal cells. Additionally, AFM revealed alterations in the ultrastructure of tumor nuclear membrane surfaces, with a positive correlation between DCMF concentration and tumor cell roughness. Finally, we found a negative correlation between roughness and the ability of DCMF-treated tumor cells to migrate and form colonies with more than 50 cells. These findings suggest that DCFM acts by causing ultrastructural changes in tumor cell membranes while having fewer toxicological effects on normal cells.

### ARTICLE HISTORY

Received 6 January 2022  
Revised 13 May 2022  
Accepted 15 May 2022

### KEYWORDS

*Arrabidaea brachypoda*;  
atomic force microscope;  
cell membrane;  
chemotherapy; nat-  
ural products



### Introduction

In 2020, approximately ten million deaths were caused by cancer, and there were 19.3 million new cancer cases worldwide (Sung *et al.* 2021). Despite advances in the development of molecular target-based drugs for cancer treatment, chemotherapy remains the most widely used. However, due to its high toxicity and adverse effects, studies have been searching for more effective and less toxic compounds (Yang *et al.* 2013, Rayan *et al.* 2017). Plant-derived compounds have been identified, such as taxol from *Taxus brevifolia* L., vincristine from *Catharanthus roseus* G. Don, and epipodophyllotoxin from *Podophyllum peltatum* L (Greenwell and Rahman 2015).

*Arrabidaea brachypoda* (D.C.) is a shrub of the Bignoniaceae family found in the Brazilian Cerrado

(neotropical savanna). The *Arrabidaea* genus is a known source of C-glucosyl xanthone, phenylpropanoids, flavonoids, anthocyanidins, allantoin, and triterpenes (Martin *et al.* 2008). Three novel compounds isolated from the dichloromethane fraction (DCMF) of *A. brachypoda* roots were identified as unusual dimeric flavonoids: brachydins A, B, and C (da Rocha *et al.* 2014), for which antinociceptive and anti-inflammatory (da Rocha *et al.* 2011, Salgado *et al.* 2020), antitypanosomal (da Rocha *et al.* 2014), antileishmanial (Rocha *et al.* 2018), and antimicrobial (de Sousa Andrade *et al.* 2020) activities have been reported.

It was recently reported that crude hydroethanolic extracts and the three brachydins separately exhibited antitumor activity (Nunes *et al.* 2020, Serpeloni *et al.* 2020). However, the mechanisms by which these uncommon flavonoids act as

CONTACT Vera Lucia Maciel-Silva  veramaciel11@hotmail.com  Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, Cidade Universitária Dom Delgado, 1966, CEP. 65085-580, São Luis, Brazil

© 2022 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

antitumor agents remain unclear. Furthermore, no data on the antitumor activity of DCMF containing the three brachydins are available. Notable is the fact that the production of fractions, without the need to isolate compounds or active principles, with retained or even additive antitumor properties, introduces an interesting perspective in the search for biologically effective drugs with low production costs.

This study aimed to determine the toxicological effects of DCMF (containing the three brachydins) by evaluating its cytotoxicity, genotoxicity, and capacity to interfere in the proliferation and migration of cancer cells. Additionally, we used atomic force microscopy (AFM) to examine cellular ultrastructural changes to understand better, the potential mechanisms by which these rare dimeric flavonoids act as antitumor agents.

## Materials and methods

### Obtaining DCMF

*A. brachypoda* roots were collected in April 2017 at the Sant'Ana da Serra farm in João Pinheiro, Minas Gerais, Brazil. The plant was identified at the José Badine Herbarium of the Federal University of Ouro Preto by Dr. Maria Cristina Teixeira Braga Messias (Voucher #17.935). The botanical material was deposited in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SisGen #A451DE4).

The extract and fraction were obtained as previously described (da Rocha *et al.* 2014). Briefly, *A. brachypoda* roots were dried and ground in a knife mill. Then, the roots powder was macerated with ethanol/water (7:3). After filtration, the ethanolic extract of the roots was collected and dry-evaporated under reduced pressure (40 °C) to obtain the

crude extract. Then, the ethanolic extract was diluted in H<sub>2</sub>O and subjected to a liquid-liquid partitioning to give dichloromethane and methanol/water. The DCMF was analyzed using the high-performance liquid chromatography photodiode array (HPLC-PDA) detection method. Isolation of the active constituents of the fraction led to the identification of three dimeric flavonoids, brachydins A, B, and C (Figure 1).

### Cell culture

The human prostate cancer cell lines, DU145 (ATCC HTB-81), human breast carcinoma, MCF7 (ATCC HTB-22) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA), and human non-tumorigenic prostate cells, PNT2 (ECACC 95012613) from European Collection of Cell Cultures (ECACC; Salisbury, UK). The human cervical cancer cell line, HeLa (BCRJ 0100), was obtained from the Cell Bank of the Federal University of Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil). MCF7, DU145, and HeLa cells were cultured in DMEM medium (Gibco; USA) medium, while PNT2 cells were grown in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich; USA). All the cells were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco; Brazil) and 1% antibiotic-antimycotic solution (100X) (Gibco; USA). The cells were maintained at 37 °C in a humid atmosphere at 5% CO<sub>2</sub>. Experimental conditions for each test are in Table 1.

### Standardization of experimental conditions

Considering the occurrence of interactions between flavonoids and FBS proteins, mainly albumin (Liu *et al.* 2010, Hu *et al.* 2012, Pal and Saha 2014, Greenwell and Rahman 2015, Tang *et al.* 2017, Genget *et al.* 2018, Fujiet *et al.* 2019), we initially

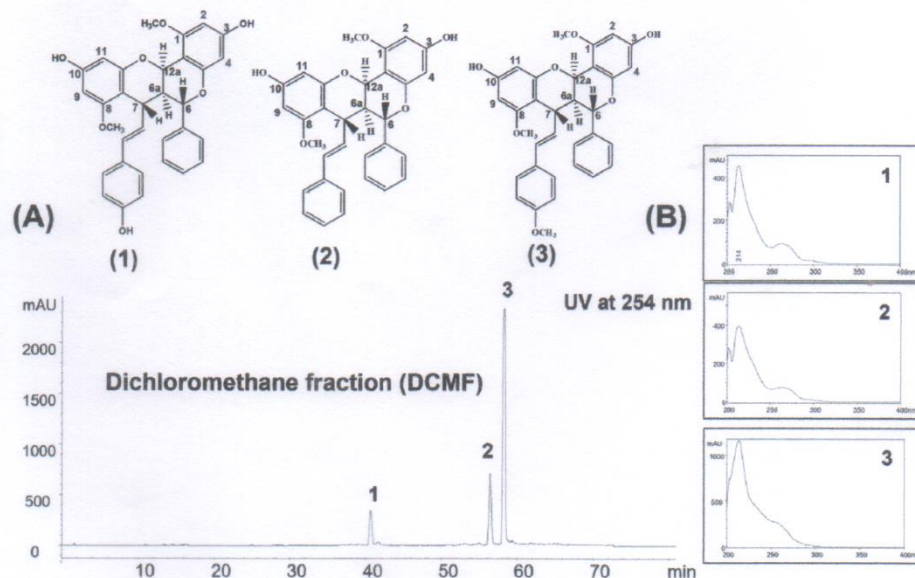


Figure 1. The chemical structure of the DCMF compounds (brachydins A, B, and C) obtained from *A. brachypoda* roots and HPLC-PDA chromatogram. (A) Chemical structure of the main compounds, brachydin A (1), brachydin B (2) and brachydin C (3), and HPLC-PDA chromatogram. (B) UV spectrum of compounds 1–3. DCMF: dichloromethane fraction; HPLC-PDA: high-performance liquid chromatography with photodiode array detection.

Table 1. *In vitro* assays, methods, cell lines and experimental conditions used to evaluate the anti-tumor activity of DCMF.

Assays	Methods	Cell lines	Concentration/time of exposure
Effect of FBS on cytotoxicity of DCMF	Sulforhodamine B assay	HeLa, MCF7	FBS (1%, 5% and 10%); DCMF (1, 5, 10 e 20 µg/mL)/48 h
Cell viability	Sulforhodamine B assay	PNT2, DU145, HeLa, MCF7	FBS (1%); DCMF (1 to 8 µg/mL); Dox (0.06 to 1 µg/mL)/48 h
DNA damage	Comet assay	PNT2, DU145, HeLa, MCF7	FBS (1%); DCMF (IC <sub>50</sub> , 1/2 IC <sub>50</sub> and 2x IC <sub>50</sub> for each cell line); Dox (IC <sub>50</sub> for each cell line)/3 and 24 h
Reproductive ability	Clonogenic assay	PNT2, DU145, HeLa, MCF7	FBS (1%); DCMF (IC <sub>50</sub> , 1/2 IC <sub>50</sub> and 2x IC <sub>50</sub> for each cell line); Dox (IC <sub>50</sub> for each cell line)/48 h
Migration	Wound healing assay	PNT2, DU145	FBS (1%); DCMF (1.25 and 2.5 µg/mL for both cell lines); Dox (0.1 µg/mL)/24 h
Ultrastructural alterations	Atomic Force Microscopy	PNT2, DU145	FBS (1%); DCMF (1.25 and 2.5 µg/mL for both cell lines)/48 h

Abbreviations: DCMF: dichloromethane fraction; Dox: doxorubicin; FBS: fetal bovine serum; IC<sub>50</sub>: half-maximal inhibitory concentration; HeLa (BCR1 0100): cervical cancer cell line; MCF7 (ATCC HTB-22): breast cancer cell line; DU145 (ATCC HTB-81): prostate cancer cell line; PNT2 (ECACC 95012613): non-tumorigenic prostate cell line.

investigated the effect of FBS on the DCMF cytotoxic activity. We carried out the sulforhodamine B colorimetric assay (SRB) as described by Vichai and Kirtikara (2006). Firstly, the DCMF solution was prepared by dissolving 3 mg of DCMF in 100 µL of dimethylsulfoxide -DMSO (Sigma-Aldrich; USA). Preliminary tests were conducted to ascertain the protocol used in the cytotoxicity assays. Initially, the cells were exposed to concentrations ranging from 1.5 to 100 µg/mL of DCMF for 24 and 48 h. As a result, more than 90% of the cells became nonviable when exposed to >20 µg/mL. Consequently, treatments with 1, 5, 10, and 20 µg/mL for 48 h were established. Untreated cells and cells exposed to the highest concentration of DMSO in the culture medium (0.07%) were used as negative and vehicle control, respectively.

Briefly, the cells were plated at  $1 \times 10^4$  cells/well in 96-well plates and incubated for 24 h. Then, the cells were washed twice with PBS 1X and treated with concentrations of DCMF (1, 5, 10, and 20 µg/mL) in medium culture containing different proportions of FBS (1, 5, and 10%) for 48 h. After the treatment, cells were fixed with 50% trichloroacetic acid (Sigma-Aldrich; USA) for 1 h at 4°C, stained for 20 min at room temperature with 50 µL of 0.4% w/v SRB (Sigma-Aldrich; USA) solution in 1% acetic acid, and then rinsed four times with 1% acetic acid. The plates were air-dried, and the bound dye was subsequently eluted with 150 µL of cold 10 mM Tris buffer (pH 10.5). The absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader (Epoch 2 BioTek, USA). The results were expressed as a percentage of untreated control cells. All tests were performed in three independent experiments, in triplicate.

### Molecular docking

The molecular interaction between each bradydin (A, B, and C) and the bovine serum albumin (BSA) was investigated by molecular docking. The *in silico* analysis allowed us to explore the free binding energy, hydrogen bonds, and hydrophobic interactions between the flavonoids and BSA. We performed these analyses using the AutoDock (AD4) version 4.2, as described by Ravi and Krishnan (2016). The molecular crystal-line structure of the BSA (PDB ID: 3v03) was obtained from

the Research Collaboratory for Structural Bioinformatics protein database. The three brachydins (Bra A, Bra B, and Bra C) were prepared for the docking simulations using the AutoDock Tools version 1.5.6 (Morris *et al.* 2009).

In the BSA molecule with 2.7 Å resolution, the B chain of the structure was removed to generate a monomeric structure. All heteroatoms, cofactors, water molecules, natural ligands (calcium and acetate ions), and additional subunits were removed from the protein structure. Subsequently, the A chain's missing atoms and terminal residues were repaired, and polar hydrogen atoms and partial Gasteiger charges were calculated in Bra A, Bra B, Bra C, and BSA structures. The non-polar hydrogens of Bra A, Bra B, and Bra C and BSA were subsequently merged. The dimensions of the cubic box along the X, Y, and Z axes were 60 × 60 × 60 Å, respectively, with a spacing of 0.375 Å between the grid points. The grid box was centered on the BSA Trp213 residue, and the Lamarckian genetic algorithm was chosen to search for the best conformations, with 100 runs for each bradydin. The initial coordinates of the BSA and the interactions of the dimeric flavonoids present in the DCMF were chosen based on the criterion of the lowest docking conformation of the cluster with the lowest energy and visual inspection.

### Cell viability

Cell viability was performed in the HeLa, DU145, and MCF-7 tumor cells using a sulforhodamine B colorimetric assay, as described above. The PNT2 was used as non-tumor cells. A pilot test was carried out to determine the final DCMF concentrations (1, 2, 4, 6, and 8 µg/mL). In addition, cells treated with doxorubicin and DMSO 0.03% were used as positive and vehicle controls, respectively, while untreated cells were the negative control. The absorbance (optical density, OD) of treated and untreated cells were compared to obtain the percentage of viability curve (treated OD/untreated OD × 100%). The tumor selectivity index (SI) was calculated as the ratio of non-tumor to tumor cell lines' IC<sub>50</sub> values. All tests were performed in three independent experiments, in triplicate.

### Genotoxicity analysis

The Comet assay evaluated the genotoxic potential of DCMF (Singh *et al.* 1988, Tice *et al.* 2000). Concentrations were determined based on the  $IC_{50}$  values for each cell line ( $IC_{50}$ ,  $1/2 IC_{50}$ , and  $2 \times IC_{50}$ ). Before performing the comet assay, the trypan blue test was used to ensure cell viability was at least 70% (Tice *et al.* 2000). DU145, MCF7, HeLa, and PNT2 ( $1 \times 10^5$  cells/well) were seeded into a 24-well plate and incubated as described in Table 1. The culture medium was discarded, and the cells were washed with PBS 1X and exposed to three concentrations of DCMF for 3 and 24 h, after which the comet assay was performed. Briefly, the cells were centrifuged for 10 min at 1200 rpm, and 20  $\mu$ L of the pellet was added to 200  $\mu$ L of low-melting point agarose (0.5%). The solution was applied to slides pre-gelled with 1.5% regular agarose. The cells were immersed for 2 h in a cold lysis solution (2.5 M NaCl; 100 mM EDTA; 100 mM Tris; 1% Triton-X; 10% DMSO; pH 10.0). The slides were incubated for 20 min in an electrophoresis buffer (10 M NaOH, 0.2 M EDTA at pH 13), and the electrophoretic run was carried out for a further 20 min (25 V, 0.72 V/cm; 300 mA). Subsequently, the slides were covered with neutralization buffer (0.4 M Tris HCl and pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature, and fixed with absolute ethanol for 5 min. The material was stained with 30  $\mu$ L of ethidium bromide (20  $\mu$ g/mL) and analyzed under a fluorescence microscope (BX51/BX52-Olympus; Japan), using a 516–560 nm filter and 590 nm filter barrier in a 40 $\times$  objective.

The DNA damage was visually classified according to the fragment migration (tail size): class 0 (undamaged nucleoid, absence of tail), class 1 (nucleoid with a short tail, smaller than their diameter), class 2 (tail length one to two times the diameter of the nucleoid), class 3 (with a tail longer than twice the diameter of the nucleoid), and class 4 (nucleoid maximally damaged). Cells treated with doxorubicin and untreated cells were used, respectively, as a positive and negative control, while cells treated with DMSO 0.03% were vehicle control. All tests were performed in three independent experiments, in duplicate.

Two hundred nucleoids were analyzed, and damage scores were calculated by multiplying the number of nucleoids in each class by their respective class value, using the Equation (1):

$$\text{score} = \frac{[(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)]}{N}$$

Equation (1)

total score =  $[(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)]$ /  
where  $N$  is the total number of cells, and  $n$  is the number of nucleoids in each class.

### Cell reproductive capacity

The clonogenic assay (Franken *et al.* 2006) was performed using cells plated in 6-well plates at 500 cells/well and incubated as described in Table 1. Subsequently, they were treated with three different concentrations of the DCMF ( $IC_{50}$ ,  $1/2 IC_{50}$ , and  $2 \times IC_{50}$ ) and maintained at 37 °C for

48 h. After that, the culture medium was removed, and cells were washed with PBS 1X and resuspended in 2 mL of fresh culture medium. The culture plates were maintained at 37 °C for seven days, allowing viable cells to grow into macroscopic colonies. After this period, the medium was removed, and cells were washed using PBS 1X and fixed with methanol: acetic acid: water (1:1:8) for 30 min. Cells were stained with crystal violet (0.5% w/v) for 20 min. Colonies with more than 50 cells were counted using a stereomicroscope (Zeiss; Germany). The percentage of colonies was calculated as a ratio between the number of colonies derived from treated cells and those from negative control, multiplied by 100. Cells treated with doxorubicin and untreated cells were positive and negative controls, respectively. All tests were performed in three independent experiments, in duplicate.

### Cell migratory capacity

The wound healing assay was carried out using cells cultured into 48-well plates at  $1 \times 10^5$  cells/well and incubated for 24 h, as described in Table 1. Subsequently, a 200  $\mu$ L pipette was used to make a scratch on a confluent cell monolayer. Afterward, the medium was removed, and the cells were washed with PBS 1 $\times$  to remove debris and unadhered cells. After washing, the monolayers cells were treated with 1.25 and 2.5  $\mu$ g/mL and kept in an incubator at 37 °C and CO<sub>2</sub> 5% for another 24 h. Wound gaps were photographed at 0 and 24 h using an inverted microscope Axiovert 200 M (Zeiss; Germany). The closure area of migrating cells was measured using ZEN Lite/Blue software using the formula: wound closure % =  $[A(0) - A(t)/A(0)] \times 100$ , where 0 is the initial area and  $t$  the area after incubation time (Yue *et al.* 2010). Cells treated with doxorubicin and untreated cells were used as positive and negative controls, respectively. All tests were performed in three independent experiments, in triplicate.

### Cell nanostructure analysis

AFM was used to verify ultrastructural alterations induced by DCMF. DU145 and PNT2 cells ( $3 \times 10^4$ ) were seeded overnight on 13-mm circular glass coverslips in 24-well plates, as described in Table 1. The cells were washed with PBS 1X and treated with DCMF (1.25 and 2.5  $\mu$ g/mL) for 48 h. Subsequently, the cells were washed twice with PBS 1X and fixed with 4% formaldehyde solution for 30 min. The fixative solution was removed, and cells were washed twice with PBS 1X and air-dried for morphology imaging and ultrastructure analysis.

Imaging capturing was performed using circular coverslips containing the cells fixed to the AFM magnetic sample holder and analyzed by an AFM Multimode 8 (Bruker, CA, USA) in Peak Force Quantitative Nanomechanics (QNM) mode. ScanAsyst Air probes, with 0.4 N/m cantilever nominal spring constant and 2 nm tip radio, were used in all measurements. All data acquisition was made in ambient condition (23 °C and 44% humidity). Topographic images were acquired with at least nine different cells for each sample group (control

and treatment). To investigate the nanostructure of the cells, the root mean square roughness ( $R_q$ ) was calculated in the 5  $\mu\text{m}$  scans obtained in the central region of the cell nucleus, according to Equation (2) (Dufreneet *et al.* 2017):

$$R_q = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N z_i^2}, \quad (2)$$

where  $N$  is the number of pixels, and  $z$  is the height of each pixel.

### Statistical analysis

Normality tests were adopted to determine if data were normally distributed prior to statistical testing. Parametric data were evaluated through a one-way analysis of variance followed by the Tukey *post hoc* multiple comparisons test. In the case of the non-parametric data, the Kruskal–Wallis test was used, followed by Dunn's as the post-test. Spearman's non-parametric test was used to verify the correlation between colony formation, rate migration, and roughness. A nonlinear regression curve was used to measure the viability data obtained from the SRB assay in a dose-dependent manner. The results were expressed as means  $\pm$  standard deviation. In all cases, values were statistically significant when  $p < 0.05$ . Statistical analyses and graphs were generated using the Prism<sup>®</sup> program of the GraphPad version 6.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA).

## Results

### FBS affects the DCMF cytotoxicity

MCF7 and HeLa cell viability varied according to the proportion of FBS in the cell culture medium (Figure 2). DCMF at 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  reduced cell viability approximately 12-fold in medium containing FBS 1% compared to cells maintained at higher FBS concentrations for both cell lines (Figures 2(B,F)). When both tumor cells were exposed to a higher DCMF concentration (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), cell viability was reduced at FBS 1% and 5%, but not at 10% (Figure 2(C,G)). When cells were exposed to 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , there was a substantial decrease in cell viability in both cell lines, regardless of the serum concentration (Figure 2(D,H)), contrasting the treatment with the lowest DCMF concentration, in which there was no effect on cell viability (Figures 2(A,E)).

### Molecular docking

The molecular docking study revealed a strong interaction between dimeric flavonoids and the amino acid residues in the active site Trp-213 of the BSA chain A. All compounds showed the highest affinity parameters with the BSA structure. Brachydins A and C were the molecules that exhibited the most favorable interactions, with free binding energy values of  $-7.9$  and  $-7.92$  kcal/mol and 1.62 and 1.57  $\mu\text{M}$  inhibition constant, respectively (Table 2). Furthermore, Bra A interactions were superior to Bra B and Bra C, which includes two bonds hydrogen with Pro338 and

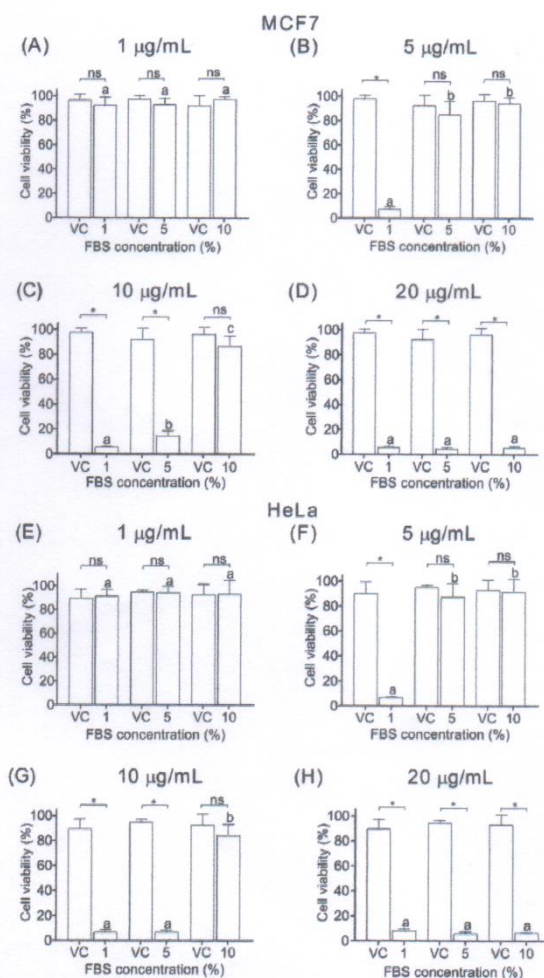


Figure 2. Viability of DCMF-treated tumor cells (1, 5, 10 and 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 48 h in culture media supplemented with FBS (1.0%, 5.0% and 10%). HeLa: cervical cancer cell line. MCF7: breast carcinoma. DCMF: dichloromethane fraction. VC: vehicle control. ns: not significant. Each value represents the mean  $\pm$  SD of three independent experiments performed in duplicate using sulforhodamine B assay. Different letters or an asterisk indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) by one-way ANOVA followed by Dunn post-test.

Val292 residues. Spatial conformations can be seen in Figure 3.

### The DCMF presents antitumor activity

We established FBS 1% as the standard protocol for cell viability analysis using the SRB assay based on the results described above. Figure 4 (A–D) presents the  $\text{IC}_{50}$  for each tumor cell lineage (2.77, 2.46, and 2.51  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for MCF7, HeLa, and DU145, respectively), as well as for non-tumor cell (4.08  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The DCMF was effective against tumor cells, with an SI  $\geq 1.48$ . The SI observed for HeLa cells was three times higher when the same cells were treated with doxorubicin.

Table 2. Molecular docking analysis between each brachyidin (brachyidin A, brachyidin B and brachyidin C) and BSA.

Ligand/receptor	$\Delta G_{\text{bind}}$ (Kcal/mol)	Ki ( $\mu\text{M}$ )	Hydrogen bonds	Hydrophobic interactions
Bra A-BSA	-7.9	1.62	Pro338, Val292	Arg198, Arg217, Arg194, Ala290, Glu291, Lys221, Lys294, Trp213, Gln220, Val342, Asp450, Ala341, Pro446, Glu339
Bra B-BSA	-7.37	3.94	Val292	Glu291, Ala290, Lys221, Glu339, Pro336, Arg194, Gln220, Arg217, Arg198, Asp450, Ala341, Val342, Trp213
Bra C-BSA	-7.92	1.57	Val292	Glu291, Ala290, Lys294, Arg194, Lys221, Arg217, Arg198, Pro446, Asp450, Pro338, Gln220, Trp213, Ala341, Val342, Tyr340

Abbreviations: Bra: brachyidin; BSA: bovineserumalbumin;  $\Delta G_{\text{bind}}$ : binding energy; Ki: inhibition constant.

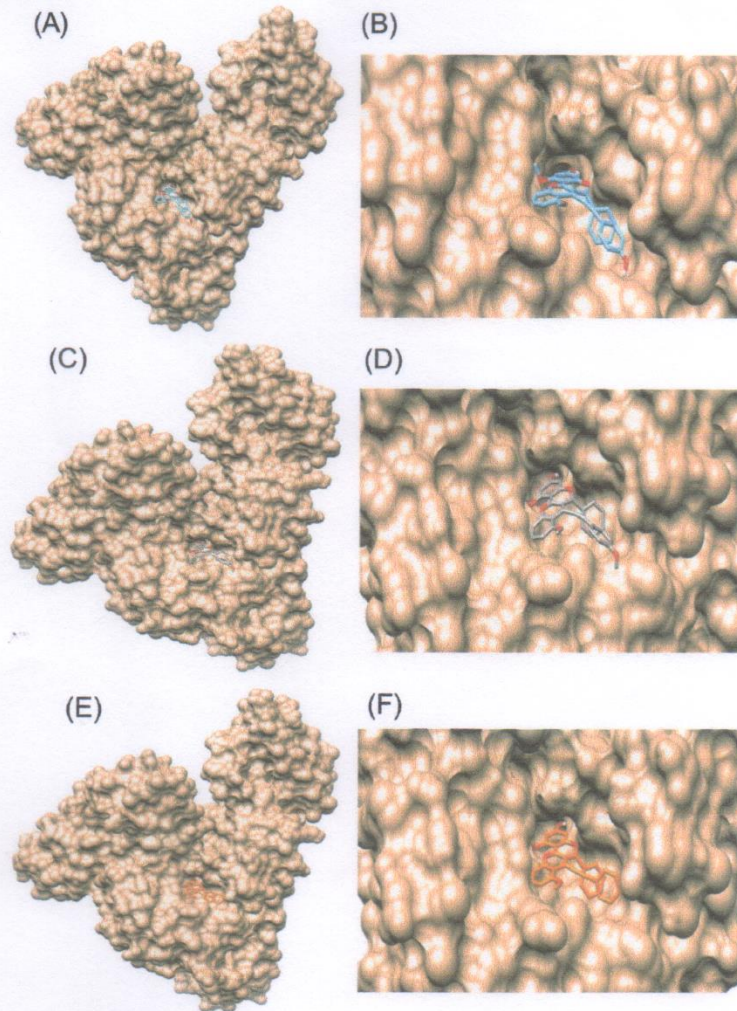


Figure 3. Three-dimensional interaction between each dimeric flavonoid (brachyidin A, brachyidin B, and brachyidin C) and BSA. BSA: Bovine serum albumin. Brachyidin A is highlighted in blue (A and B); Brachyidin B in gray (C and D); brachyidin C in yellow (E and F) and BSA in red. Brachyidin/BSA molecular representation was generated using the UCSF Chimera software.

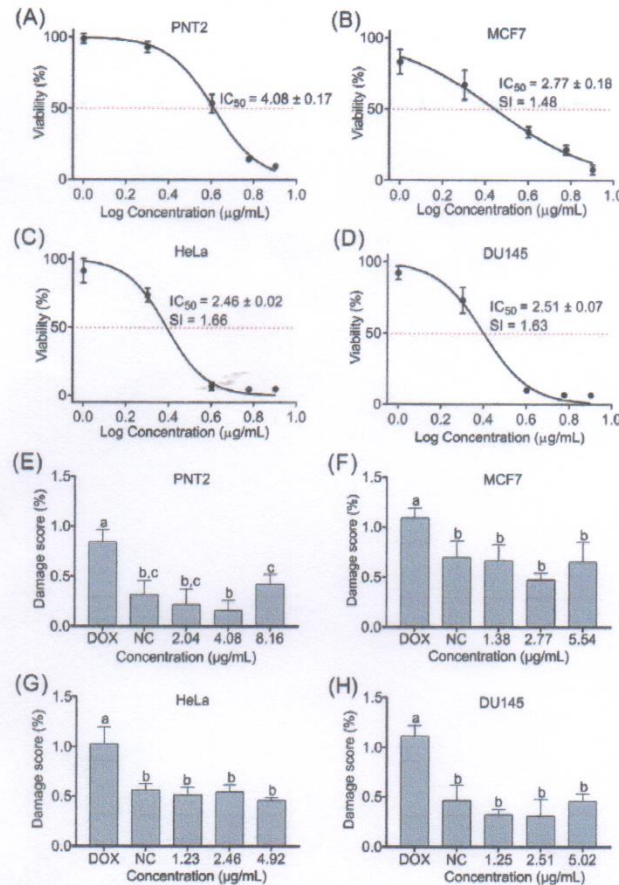
#### DCMF does not cause DNA damage

Genotoxic analysis of tumor and non-tumor cells treated with DCMF ( $1/2$   $IC_{50}$ ,  $IC_{50}$ , and double  $IC_{50}$ ) for 3 (data not shown) and 24 h (Figure 4(E-H)) revealed that DCMF does not cause DNA damage under the experimental conditions used in this study.

#### The DCMF reduces tumor cell colony-forming

DCMF inhibited colony formation in tumor cell lines in a concentration-dependent manner ( $r = -0.944$ ,  $p < 0.05$ ). When HeLa and MCF7 cells were treated with  $IC_{50}$  (2.77 and 2.46  $\mu\text{g/mL}$ , respectively), they were almost completely





**Figure 4.** Cell viability and DNA damage scores observed in DCMF-treated prostate cells. (A–D) Dose-response viability curves for non-tumor and tumor cells treated with DCMF for 48 h. (E–H) DNA damage scores in non-tumor and tumor cells treated with DCMF for 24 h. PNT2: prostate non-tumor cell line; MCF7: breast cancer cell line; HeLa: cervical cancer cell line; DU145: prostate tumor cell line; DCMF: dichloromethane fraction; Dox: doxorubicin; NC: negative control; SI: selectivity index. The dashed line indicates the reported half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>). Values are mean ± SD of three independent experiments. Different letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) by one-way ANOVA followed by Tukey's test. Note: IC<sub>50</sub> values of doxorubicin were  $0.09 \pm 0.02$  (SI = 2.33),  $0.13 \pm 0.05$  (SI = 1.61),  $0.4 \pm 0.001$  (SI = 0.5) and  $0.21 \pm 0.02$  µg/mL for DU145, MCF7, HeLa and PNT2, respectively.

inhibited, whereas, at lower concentrations, they decreased by 25% and 16, 4%, respectively. Additionally, 2.5 µg/mL and 1.25 µg/mL significantly inhibited DU145 colony-forming by 87.3% and 39.2%, respectively. PNT2, on the other hand, showed a reduction of only 44% at 2.5 µg/mL but an increase of 92% at 1.25 µg/mL (Figure 5(A,B)). Noteworthy that there was no colony-forming when all cell lines were treated with the highest concentration of DCMF or doxorubicin.

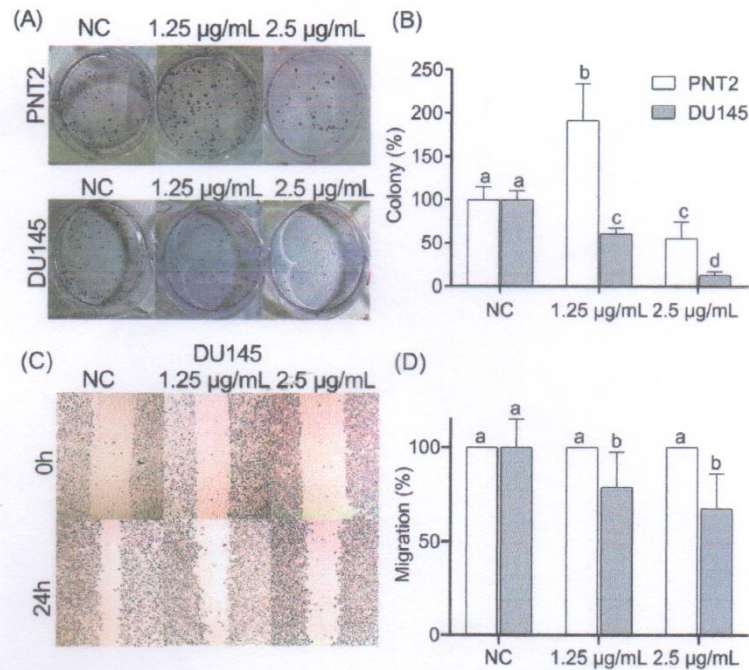
#### The DCMF reduces tumor cell migration

Considering that DCMF reduced cell viability and colony formation in all tumor lines, we conducted migration and AFM assays using only DU145, as the non-tumor cell line is also derived from prostate tissue (PNT2). When tumor cells were exposed to 1.25 and 2.5 µg/mL, the closing areas were 20.9% and 32.6% smaller, respectively, than the negative control.

DCMF inhibited tumor cell motility in a concentration-dependent manner ( $r = -0.751$ ,  $p < 0.05$ ). By contrast, no effect on non-tumor cells was observed (Figure 5(C–D)).

#### The DCMF induces ultrastructural alterations in tumor cells

AFM images of prostate cells exposed to DCMF showed morphological changes according to the DCMF concentration (Figure 6(A), tumor cells in images a–f and non-tumor cells in images g–m). The ultrastructural changes (as holes) in the tumor cells nuclear membrane surfaces were observed at 1.25 and 2.5 µg/mL (e–f). Interestingly, PNT2 treated with the same DCMF concentrations exhibited fewer alterations (images l–m). The brown scale colors in the images denote different heights, with light and dark denoting the upper and lower topography, demonstrating that differences in membrane height increase with DCMF concentration.



**Figure 5.** Colony formation and cell migration in tumor and non-tumor prostate cell lines treated with DCMF. (A) Representative images of a colony-forming assay in prostate tumor and non-tumor cells with and without DCMF treatment and (B) the respective quantitative analysis. (C) Representative images of gaps observed at 0 and 24 h in the prostate tumor cells with and without DCMF treatment using wound healing assay and (D) the quantitative analysis of prostate cells. DCMF: dichloromethane fraction. NC: negative control. PNT2: prostate non-tumor cell line. DU145: prostate tumor cell line. The experiments were carried out three times in duplicate. Different letters indicate significant differences by ANOVA followed by Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

Subsequently, we performed a quantitative analysis of cell roughness by calculating the mean square surface roughness of the membrane ( $R_q$ ) to measure the nuclear membrane's nanostructure. Surface roughness is estimated from the deviations of the measured two-dimensional z-value profile from an ideal surface (Antonio *et al.* 2012). Untreated DU145 presented a roughness of  $7.9 \pm 0.43$  nm, whereas DCMF-treated DU145 (1.25 and 2.5 µg/mL) showed a roughness of  $11.6 \pm 1.42$  nm and  $15.37 \pm 3.9$  nm, respectively, with a positive correlation between DCMF concentration and tumor cell roughness ( $r = 0.857$ ,  $p < 0.05$ ). For PNT2, on the other hand, cell roughness increased only at the highest concentration (2.5 µg/mL), resulting in an  $R_q$  equal to  $10.78 \pm 2.23$  nm (Figure 6(B)).

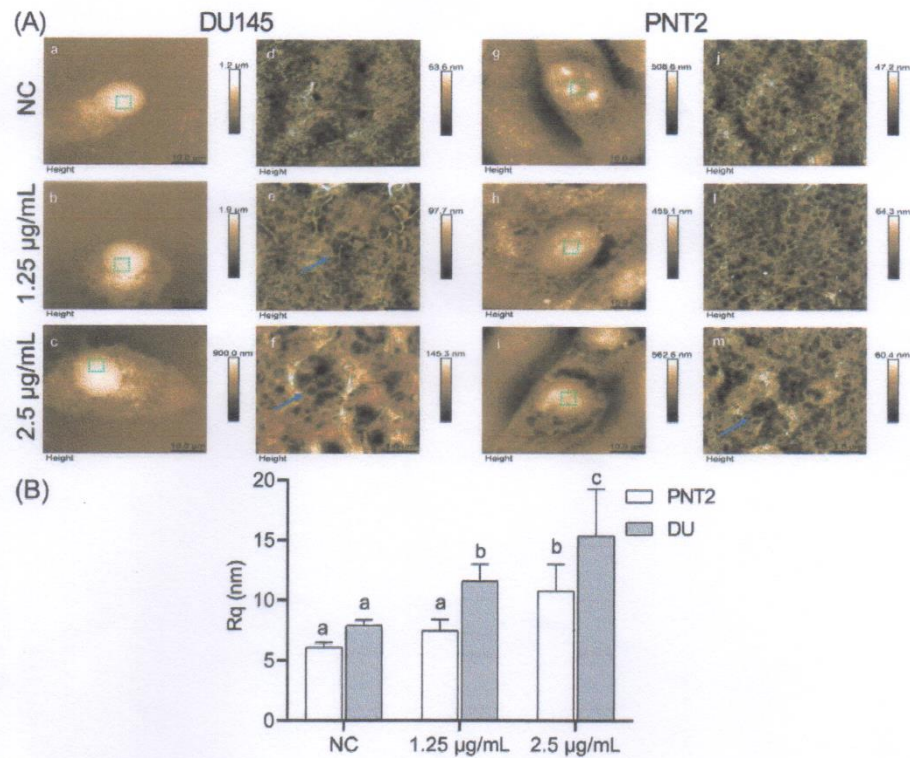
Colony-forming, migration rate, and roughness were tested by Spearman's non-parametric test. The results showed a positive correlation between the migration and colony formation capacity of the tumor cells ( $r = 0.692$ ,  $p < 0.05$ ). On the other hand, migration and roughness were negatively correlated ( $r = -0.608$ ,  $p < 0.05$ ). Likewise, colony-formation and roughness exhibited an inverse correlation ( $r = -0.806$ ,  $p < 0.05$ ). These findings suggest that DCMF has a concentration-dependent antitumor effect (Figure 7).

## Discussion

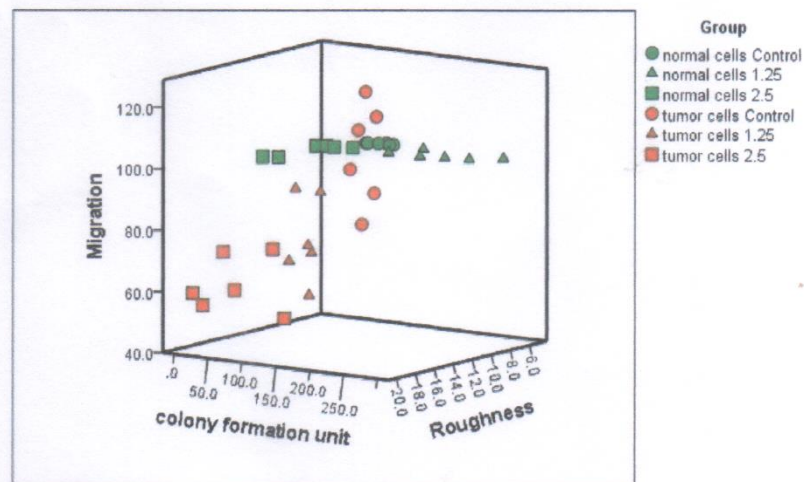
Chemotherapy remains the most often used cancer treatment, despite its high toxicity. As a result, antitumor drugs

with fewer toxicological effects have been required (Choudhariat *et al.* 2020, Siddiqui *et al.* 2022). Taking this into account, we investigated the biological effects of DCMF (containing three structural dimeric flavonoids) on tumor cell lines. It is noteworthy that developing a robust protocol is critical to avoid false-negative or false-positive results *in vitro* assays, which are caused mainly by drug-medium component interaction. For example, Ribéreau-Gayonet *et al.* (1995), Knöpfel-Sidler *et al.* (2005), and Faheina-Martins *et al.* (2011) reported the effect of FBS on the cytotoxic activity of plant extracts. Recent studies attributed lower cytotoxicity of flavonoids (Fujii *et al.* 2019) and saponins (Lin *et al.* 2017) to their interaction with the albumin in FBS. Thus, we determined the optimal conditions to perform all assays in the current study. The findings showed that FBS inhibits the DCMF's cytotoxic activity on tumor cells in a concentration-dependent manner. We confirmed a strong interaction between the three unusual dimeric flavonoids and BSA using molecular docking, suggesting that the cytotoxicity reduction could be due to the structural affinity of BSA for the flavonoids, potentially reducing their availability. As a result, we conducted all experimental *in vitro* assays (cytotoxicity, genotoxicity, cell reproduction, and cell migration) using cells maintained in culture medium supplemented with 1% FBS.

Regarding cytotoxicity, the DCMF significantly reduced the viability of tumor cells, corroborating with previous studies in which the antitumor activity was demonstrated for extracts (Serpeloni *et al.* 2020) and for each of the three



**Figure 6.** Atomic force microscopy images of the nuclear membrane surface of prostate cells with and without DCMF treatment and the quantitative analysis of cell roughness. (A) AFM images of prostate cells showing morphological changes according to the DCMF concentration. (a–c): Morphology of tumor cells and (d–f): membrane ultrastructure images (5 µm × 5 µm) in corresponding cell region indicated by green frame. (g–i): Morphology of non-tumor cells and (j–m): membrane ultrastructure images (5 µm × 5 µm) in corresponding cell region indicated by green frame. The blue arrow indicates the holes in the membrane surface. (B): quantitative analysis of cell roughness. PNT2: non-tumor prostate cell line. DU145: prostate tumor cell line. NC: negative control. Different letters mean there is a difference by ANOVA followed by Tukey's test  $p < 0.05$ .



**Figure 7.** 3D scatter plots among migration, colony formation, and roughness according to cell types. Green dots indicate the prostate non-tumor cell line, and red dots indicate the prostate tumor cell line.

brachydins separately (Nunes *et al.* 2020, de Oliveira *et al.* 2021). Recently, de Lima *et al.* (2022) described this ability also in glycosylated brachydins. In our study, the DCMF

containing the three brachydins showed antitumor activity with a lower  $IC_{50}$ , suggesting a synergistic effect of these rare flavonoids.

Interestingly, the DCMF also reduced almost 90% of prostate tumor colony-forming in a concentration-dependent manner, reinforcing its ability to control cell proliferation and, consequently, the tumor progression. Likewise, de Oliveira *et al.* (2021) and de Lima *et al.* (2022) also reported the anti-proliferative effect of bradydins but evaluated each one separately and for a more extended period. Interestingly, the lowest concentration of DCMF significantly increased PNT2 cell proliferation, while the highest concentration decreased it. Various substances exhibit ambiguous dose-dependent pharmacological effects, with low doses having a stimulatory effect and high doses having a toxic effect, a phenomenon referred to as biphasic dose-response or hormesis (Calabrese and Baldwin 2002). Future research should elucidate this phenomenon, which was observed only in normal cells exposed to DCMF.

Cell migration is required for the tumor to spread to other parts of the body, increasing the risk of death (Wu *et al.* 2021). Thus, considering that antitumor candidates should possess anti-invasion and anti-metastatic activities (Steeg and Theodorescu 2008), we evaluated cell motility to determine the migration rate, according to Kabala-Dzik *et al.* (2017). Our data showed that DCMF significantly inhibited DU145 migration, with no effect on non-tumor cells, corroborating de Lima *et al.* (2022), who obtained similar results evaluating glycosylated bradydins. Hence, the DCMF is promising since it possesses three critical antitumor properties, i.e., cytotoxic, antiproliferative, and antimigration capacities, with selectivity against tumor cells ( $IS > 1.6$ ). Additionally, as no individual bradydin isolation is required, the DCMF is less expensive to manufacture.

Considering that several antitumor agents may act by inducing DNA damage (Gurova 2009, Reuvers *et al.* 2020), we also investigated whether this would be a possible mechanism involved in the DCMF antitumor activity. Our main objective was to determine the capacity of DCMF to cause DNA damage at concentrations defined in the cytotoxic assays ( $IC_{50}$ ). We tested three concentrations ( $IC_{50}$ ,  $1/2 IC_{50}$ , and  $2 \times IC_{50}$ ) within 3 and 24 h of treatment. Our results agree with other authors who evaluated the genotoxic or mutagenic potential of bradydins. Resende *et al.* (2017) reported that the DCMF did not cause mutations in bacteria, while Nunes *et al.* (2020) tested each bradydin individually and did not detect genotoxicity. DNA damage-inducing chemotherapeutics maintain a prominent position among the strategies used to treat cancer. However, usually, they are poorly selective, causing a variety of adverse effects, including an increased secondary cancer risk (Wang *et al.* 2019, Reuvers *et al.* 2020). Thus, antitumor agents that do not cause DNA damage are of great interest, as most side effects will be reduced (Gurova 2009).

Finally, we used AFM to demonstrate for the first time, to our knowledge, the ultrastructural impact of DCMF on human prostate cancer cells. AFM is a powerful nanotool imaging technique that enables us to visualize cellular molecules (Pillet *et al.* 2014, Dufrene *et al.* 2017) and probe drug-induced damage to cellular morphology (Lekka and Laidler 2009, Wang *et al.* 2009). Our analysis revealed an increase in the number of holes and roughness of the cell membrane,

most notably in tumor cells, in a concentration-dependent manner, corroborating with the cytotoxicity, clonogenicity, and migration effects observed in DCMF-treated cells. Previous studies have demonstrated that flavonoids may interact with cell membranes by penetrating their hydrophobic or interphase spaces and rearranging the membrane elements involved in signal transmission, metabolism regulation, or other biological functions (Tsuchiya 2010, 2015, Escribá *et al.* 2015).

The roughness of the cell membrane reflects the presence of macromolecules and their various aggregated states and changes in these structures caused by cell injury (Yeowet *et al.* 2017). Notably, there are differences between the components of tumor cell membranes and those of normal cells, enabling roughness parameters for diagnosis and evaluation of antitumor therapy strategies (Wang *et al.* 2009, Tan *et al.* 2017). Changes in membrane roughness have been described in tumor cells (Wang *et al.* 2016), erythrocytes (Buys *et al.* 2013), and fibroblasts (Chang *et al.* 2017), which were associated with abnormalities of the cytoskeleton. Recently, studies have demonstrated an association among migration, invasion, and colony formation with alterations in the cytoskeleton of actin in tumor cells treated with cisplatin (Raudenska *et al.* 2019), equinomycin (Chen *et al.* 2020), and graphene oxide (Wang *et al.* 2020). Taking into account the reduction of migration and colony-forming and the higher roughness in DCMF-treated tumor cells, we suggest that the antitumor activity may be related to changes in cytoskeletal proteins. However, further investigations are needed to better elucidate the mechanism underlying the antitumor activity of DCMF.

Under the experimental conditions of this study, we conclude that DCMF isolated from *A. brachypoda* roots reduces the viability of tumor cells without causing DNA damage. In addition, DCMF inhibits the proliferation and migration of tumor cells, whose membranes exhibit concentration-dependent ultrastructural alterations. These results suggest that DCMF may be a promising anticancer agent with lower toxicity to normal cells.

### Acknowledgement

The authors wish to express their gratitude to the Nanobiotechnology Laboratory at the Federal University of Uberlandia in Minas Gerais, Brazil (particularly to Professor Luiz Ricardo Goulart Filho, *in memoriam*) and the Mutagenesis Laboratory at the University of Franca in São Paulo, Brazil (particularly, Professor Denise Crispim Tavares Barbosa) for donating the cell lines used in this study.

### Disclosure statement













The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### Funding

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brazil (CAPES - Finance Code 001; grant number 88887.472618/2019-00-PROCAD-AM). This research was also

supported by Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), grant number 00838/17-Universal.

## ORCID

Vera Lucia Maciel-Silva  <http://orcid.org/0000-0001-7727-8674>  
 Claudia Quintino da Rocha  <http://orcid.org/0000-0002-3578-1869>  
 Luciana Magalhães Rebelo Alencar  <http://orcid.org/0000-0001-8210-2016>  
 Patrícia Valéria Castelo-Branco  <http://orcid.org/0000-0001-7654-3982>  
 Israel Higino de Sousa  <http://orcid.org/0000-0001-8915-517X>  
 Ana Paula Azevedo-Santos  <http://orcid.org/0000-0002-6404-0103>  
 André Alvares Marques Vale  <http://orcid.org/0000-0002-9932-929X>  
 Silvio Gomes Monteiro  <http://orcid.org/0000-0002-4185-4577>  
 Rosy-Eric Pereira Soares  <http://orcid.org/0000-0002-4273-3160>  
 Sulayne Janayna Araujo Guimarães  <http://orcid.org/0000-0003-3255-5281>  
 Jessyane Rodrigues do Nascimento  <http://orcid.org/0000-0003-2870-8695>  
 Silma Regina Ferreira Pereira  <http://orcid.org/0000-0003-1718-833X>

## References

- Antonio, P.D., et al., 2012. Scale-independent roughness value of cell membranes studied by means of AFM technique. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818 (12), 3141–3148.
- Buys, A., et al., 2013. Changes in red blood cell membrane structure in type 2 diabetes: a scanning electron and atomic force microscopy study. *Cardiovascular Diabetology*, 12 (1), 25.
- Calabrese, E.J., and Baldwin, L.A., 2002. Defining hormesis. *Human & Experimental Toxicology*, 21 (2), 91–97.
- Chang, C.-H., Lee, H.-H., and Lee, C.-H., 2017. Substrate properties modulate cell membrane roughness by way of actin filaments. *Scientific Reports*, 7 (1), 9068.
- Chen, M., et al., 2020. Examination of the relationship between viscoelastic properties and the invasion of ovarian cancer cells by atomic force microscopy. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, 11, 568–582.
- Choudhari, A.S., et al., 2020. Phytochemicals in cancer treatment: from preclinical studies to clinical practice. *Frontiers in Pharmacology*, 10, 1614.
- Dufrène, Y.F., et al., 2017. Imaging modes of atomic force microscopy for application in molecular and cell biology. *Nature Nanotechnology*, 12 (4), 295–307.
- Escribá, P.V., et al., 2015. Membrane lipid therapy: modulation of the cell membrane composition and structure as a molecular base for drug discovery and new disease treatment. *Progress in Lipid Research*, 59, 38–53.
- Faheina-Martins, G.V., et al., 2011. Influence of fetal bovine serum on cytotoxic and genotoxic effects of lectins in MCF-7 cells. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 25 (5), 290–296.
- Franken, N.A.P., et al., 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature Protocols*, 1 (5), 2315–2319.
- Fujii, Y., et al., 2019. Elucidation of the interaction between flavan-3-ols and bovine serum albumin and its effect on their in-vitro cytotoxicity. *Molecules*, 24 (20), 3667.
- Geng, R., et al., 2018. Influence of bovine serum albumin-flavonoid interaction on the antioxidant activity of dietary flavonoids: new evidence from electrochemical quantification. *Molecules*, 24 (1), 70.
- Greenwell, M., and Rahman, P.K.S.M., 2015. Medicinal plants: their use in anticancer treatment. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6 (10), 4103–4112.
- Gurova, K., 2009. New hopes from old drugs: revisiting DNA-binding small molecules as anticancer agents. *Future Oncology (London, England)*, 5 (10), 1685–1704.
- Hu, Y.J., et al., 2012. Molecular spectroscopic studies on the interaction of morin with bovine serum albumin. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology*, 112, 16–22.
- Kabata-Dzik, A., et al., 2017. Migration rate inhibition of breast cancer cells treated by caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester: an in vitro comparison study. *Nutrients*, 9 (10), 1144.
- Knöpfel-Sidler, F., et al., 2005. Human cancer cells exhibit in vitro individual receptiveness towards different mistletoe extracts. *Die Pharmazie*, 60 (6), 448–454.
- Lekka, M., and Laidler, P., 2009. Applicability of AFM in cancer detection. *Nature Nanotechnology*, 4 (2), 72–72.
- de Lima, C.A., et al., 2022. Antiproliferative activity of two unusual dimeric flavonoids, brachydin E and brachydin F, isolated from *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann: in vitro and molecular docking evaluation. *BioMed Research International*, 2022, 1–12.
- Lin, Y., et al., 2017. The interaction of serum albumin with ginsenoside Rh2 resulted in the downregulation of ginsenoside Rh2 cytotoxicity. *Journal of Ginseng Research*, 41 (3), 330–338.
- Liu, E.-H., Qi, L.-W., and Li, P., 2010. Structural relationship and binding mechanisms of five flavonoids with bovine serum albumin. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 15 (12), 9092–9103.
- Martin, F., et al., 2008. Antioxidant C-glycosylxanthones from the leaves of *Arrabidaea patellifera*. *Journal of Natural Products*, 71 (11), 1887–1890.
- Morris, G.M., et al., 2009. AutoDock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, 30 (16), 2785–2791.
- Nunes, H.L., et al., 2020. Characterization of the *in vitro* cytotoxic effects of brachydins isolated from *Fridericia platyphylla* in a prostate cancer cell line. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 83 (15-16), 547–558.
- de Oliveira, L.C.B., et al., 2021. Aglycone flavonoid brachydin A shows selective cytotoxicity and antitumor activity in human metastatic prostate (DU145) cancer cells. *Cytotechnology*, 73 (6), 761–774.
- Pal, S., and Saha, C., 2014. A review on structure-affinity relationship of dietary flavonoids with serum albumins. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 32 (7), 1132–1147.
- Pillet, F., et al., 2014. Atomic force microscopy and pharmacology: from microbiology to cancerology. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840 (3), 1028–1050.
- Raudenska, M., et al., 2019. Cisplatin enhances cell stiffness and decreases invasiveness rate in prostate cancer cells by actin accumulation. *Scientific Reports*, 9 (1), 1660.
- Ravi, L., and Krishnan, K., 2016. A handbook on protein-ligand docking tool: AutoDock 4. *Journal of the Medical Sciences*, 4, 28–33.
- Rayan, A., Raijn, J., and Falah, M., 2017. Nature is the best source of anticancer drugs: indexing natural products for their anticancer bioactivity. *PLOS One*, 12 (11), e0187925.
- Resende, F.A., et al., 2017. In vitro toxicological assessment of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) bureau: mutagenicity and estrogenicity studies. *Regulatory Toxicology and Pharmacology: RTP*, 90, 29–35.
- Reuvers, T.G.A., Kanaar, R., and Nonnekens, J., 2020. DNA damage-inducing anticancer therapies: from global to precision damage. *Cancers*, 12 (8), 2098.
- Ribéreau-Gayon, G., et al., 1995. Effect of fetal calf serum on the cytotoxic activity of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins in cell culture. *Phytotherapy Research*, 9 (5), 336–339.
- da Rocha, C.Q., et al., 2014. Dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* and assessment of their anti-trypanosoma cruzi activity. *Journal of Natural Products*, 77 (6), 1345–1350.
- da Rocha, C.Q., et al., 2011. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) bureau roots. *Journal of Ethnopharmacology*, 133 (2), 396–401.
- Rocha, V., et al., 2018. Antileishmanial activity of dimeric flavonoids isolated from *Arrabidaea brachypoda*. *Molecules*, 24 (1), 1.
- Salgado, C., et al., 2020. In Vitro anti-inflammatory activity in arthritic Synoviocytes of *A. brachypoda* root extracts and its unusual dimeric flavonoids. *Molecules*, 25 (21), 5219.
- Serpeloni, J., et al., 2020. *Fridericia platyphylla* (Cham.) L.G. Lohmann root extract exerts cytotoxic and antiproliferative effects on gastric tumor

- cells and downregulates *BCL-XL*, *BIRC5*, and *MET* genes. *Human & Experimental Toxicology*, 39 (3), 338–354.
- Siddiqui, A.J., et al., 2022. Plants in anticancer drug discovery: from molecular mechanism to chemoprevention. *BioMed Research International*, 2022, 5425485–5425418.
- Singh, N.P., et al., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research*, 175 (1), 184–191.
- de Sousa Andrade, L.M., et al., 2020. Antimicrobial activity and inhibition of the *NorA* efflux pump of *Staphylococcus aureus* by extract and isolated compounds from *Arrabidaea brachypoda*. *Microbial Pathogenesis*, 140, 103935.
- Steeg, P.S., and Theodorescu, D., 2008. Metastasis: a therapeutic target for cancer. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 5 (4), 206–219.
- Sung, H., et al., 2021. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71 (3), 209–249.
- Tan, L.T.H., et al., 2017. Targeting membrane lipid a potential cancer cure? *Frontiers in Pharmacology*, 8, 12.
- Tang, F., et al., 2017. Fetal bovine serum influences the stability and bioactivity of resveratrol analogues: a polyphenol-protein interaction approach. *Food Chemistry*, 219, 321–328.
- Tice, R.R., et al., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35 (3), 206–221.
- Tsuchiya, H., 2010. Structure-dependent membrane interaction of flavonoids associated with their bioactivity. *Food Chemistry*, 120 (4), 1089–1096.
- Tsuchiya, H., 2015. Membrane interactions of phytochemicals as their molecular mechanism applicable to the discovery of drug leads from plants. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20 (10), 18923–18966.
- Vichai, V., and Kirtikara, K., 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1 (3), 1112–1116.
- Wang, J., et al., 2009. Atomic force microscope study of tumor cell membranes following treatment with anti-cancer drugs. *Biosensors & Bioelectronics*, 25 (4), 721–727.
- Wang, J., et al., 2020. Graphene oxide inhibits cell migration and invasion by destroying actin cytoskeleton in cervical cancer cells. *Aging*, 12 (17), 17625–17633.
- Wang, X., Zhang, H., and Chen, X., 2019. Drug resistance and combating drug resistance in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 2 (2), 141–160.
- Wang, Y., et al., 2016. Quantitative analysis of the cell-surface roughness and viscoelasticity for breast cancer cells discrimination using atomic force microscopy. *Scanning*, 38 (6), 558–563.
- Wu, J., et al., 2021. Plasticity of cancer cell invasion: patterns and mechanisms. *Translational Oncology*, 14 (1), 100899.
- Yang, F., et al., 2013. Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin-organogermanium (IV) complex in MCF-7 cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23 (20), 5544–5551.
- Yeow, N., Tabor, R.F., and Garnier, G., 2017. Atomic force microscopy: from red blood cells to immunohaematology. *Advances in Colloid and Interface Science*, 249, 149–162.
- Yue, P.Y.K., et al., 2010. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *Journal of Biomolecular Screening*, 15 (4), 427–433.

## ANEXO II

Participação como co-autora em artigos extra-tese durante período do doutorado

Brazilian Journal of Biology

ISSN 1519-6984 (Print)

ISSN 1678-4375 (Online)

<https://doi.org/10.1590/1519-6984.184337>

Notes and Comments

**River waters near to agricultural sites in the Northeastern Brazil  
(Maranhão State) cause genetic damage in Nile Tilapia  
(*Oreochromis niloticus*)**

M. S. Castro<sup>a,b</sup>, R. Luvizotto-Santos<sup>b,c</sup>, S. R. F. Pereira<sup>a</sup>, V. R. Moreira<sup>a</sup>, P. V. Castelo-Branco<sup>a</sup>,  
V. L. M. Silva<sup>d</sup> and L. F. Carvalho-Costa<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biologia, Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Cidade Universitária Dom Delgado, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, CEP 65080-805, São Luis, MA, Brasil

<sup>b</sup>Programa de Pós-graduação em Biodiversidade e Conservação, Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Cidade Universitária Dom Delgado, Avenida dos Portugueses, Bacanga, 1966, CEP 65080-805, São Luis, MA, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Oceanografia e Limnologia, Universidade Federal do Maranhão – UFMA, Cidade Universitária Dom Delgado, Avenida dos Portugueses, 1966, Bacanga, CEP 65080-805, São Luis, MA, Brasil

<sup>d</sup>Departamento de Química e Biologia, Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, Cidade Universitária Paulo VI, Tirirical, CP 09, CEP 65055-970, São Luis, MA, Brasil

\*e-mail: lfcc@ufma.br

Received: August 22, 2017 – Accepted: October 2, 2017 – Distributed: May 31, 2019  
(With 2 figures)

Munim River is a small basin (15,918.04 km<sup>2</sup>, 320,000 inhabitants) in northeastern Brazil (Maranhão state), whose water quality has been threatened by pesticides, untreated domestic and industrial wastewater discharges, and solid waste disposal (Presoti and Cutrim, 2011). These pollutants may bring several problems to the aquatic biota, such as mutagenic and carcinogenic effects (Bolognesi and Hayashi, 2011) including risks to human health. Therefore, it is critical to understand the potential impacts of xenobiotics on this river basin, especially their genotoxic and mutagenic effects. We investigated the genotoxic and mutagenic potential of the Munim River waters to assess the impact of the presence of xenobiotics on the aquatic biota.

We collected water from two sampling sites (Figure 1) in September 2015 (dry season). As test organism, we used 40 juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) obtained from local fish farms, which were acclimatized to experimental conditions for 30 days in a 1,000-L (Liter) tank and maintained with constant filtration and aeration system. Fish were fed three times a day with commercial fish food at a proportion of 5% of their biomass. Four 80-L water glass tanks containing ten fish each were used, as follows: a) negative control (tap water from a well); b) positive control (intraperitoneal injection of cyclophosphamide at 50 mg/kg); c) Water from Sampling site 1; and d) Water from Sampling site 2. Fish were exposed to treatments for 72 hours without the provision of food in a static system with constant aeration (Ethics Committee Permit: CEUA # 23115.008075/2016-12).

We measured genotoxic and mutagenic effects of water samples on the erythrocytes from tilapias using the comet assay (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000) and the micronucleus test (Hooftman and Raat, 1982), respectively. For comet assay, we acquired the damage scores by observing the number of nucleoids in each damage

class (0 to IV) per sample under fluorescence microscopy. The damage score was calculated by multiplying the number of nucleoids in each class by the respective class value according to Speit and Hartmann (1995). DNA damage scores revealed a normal distribution (Shapiro-Wilk test) and were analyzed by ANOVA (analysis of variance) followed by Tukey test ( $p < 0.05$ ). The frequency of micronuclei was determined by observing 1000 cells per sample under light microscope. Because data did not fit into normal distribution, we applied the Kruskal-Wallis test, followed by Student-Newman-Keuls test ( $p < 0.05$ ).

Water from both sampling sites proved to be genotoxic and mutagenic to *O. niloticus*. Cells showed high DNA damage, showing high genotoxicity (Figure 2A), similar to the positive control ( $p < 0.05$ ). We also found a significant increase in the frequency of micronuclei when all groups are compared to the negative control ( $p < 0.05$ ) (Figure 2B).

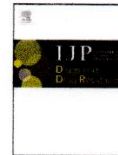
Sampling sites are 181 km apart and showed the same level of DNA damage and mutagenic effects, revealing that hazardous xenobiotics are widely dispersed along the basin. Both sites are located in a region characterized by small subsistence agriculture and discharge of untreated sewage. The city of Chapadinha (Sample site 1) and others regions from Middle-Upper Munim drainage are also affected by large scale transgenic soybean cultures (Presoti and Cutrim, 2011) dependent on the use of the glyphosate herbicide, which has been shown to be genotoxic and mutagenic to fish, even at low concentrations (Moreno et al., 2014). Other studies have showed that several compounds, even in small concentrations, may be associated with genotoxicity and mutagenicity on aquatic organisms (Barberio et al., 2009). Some compounds, such as surfactants, phenols, and metals, together with untreated domestic and industrial wastewater discharges are also associated to genotoxic and mutagenic effects in fishes and might be present in the Munim waters (Steffens et al., 2015).



Contents lists available at ScienceDirect

IJP: Drugs and Drug Resistance

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ijpddr](http://www.elsevier.com/locate/ijpddr)



## Ascorbic acid reduces the genetic damage caused by miltefosine (hexadecylphosphocholine) in animals infected by *Leishmania (Leishmania) infantum* without decreasing its antileishmanial activity



Patrícia Valéria Castelo-Branco<sup>a</sup>, Hugo José Alves<sup>a</sup>, Raissa Lacerda Pontes<sup>a</sup>, Vera Lucia Maciel-Silva<sup>a,b</sup>, Silma Regina Ferreira Pereira<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, Cidade Universitária do Bacanga, São Luís, Maranhão, Brazil  
<sup>b</sup> Department of Chemistry and Biology, University of State of Maranhão, São Luís, Maranhão, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
 Antigenotoxicity  
 Antimutagenicity  
 Antioxidant  
*Leishmania*, Impavidão\*

### ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease caused by over 20 *Leishmania* species, occurring in more than a hundred countries. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) is the single oral drug used in treatment for leishmaniasis, including cases of infections resistant to pentavalent antimony. Our group has recently demonstrated the ability of miltefosine to cause genomic lesions by DNA oxidation. Acknowledging that antioxidant compounds can potentially modulate Reactive Oxygen Species (ROS), our study verified whether ascorbic acid reduces the genotoxic and mutagenic effects caused by miltefosine, and whether it interferes with drug efficacy. For this purpose, uninfected Swiss mice received simultaneous (single dose treatment) miltefosine and ascorbic acid (gavage and intraperitoneally), besides pre and post treatments (ascorbic acid 24 h before and after drug administration); furthermore, Balb/c mice infected with *Leishmania infantum* received miltefosine plus ascorbic acid (repeated doses treatment). We conducted comet assays, micronucleus tests, dosages of superoxide dismutase enzyme and parasitic burden by the limiting dilution assay. We observed that ascorbic acid administered intraperitoneally displayed a protective effect over damage caused by miltefosine. However, this effect was not observed when the same doses were administered via gavage, possibly due to low serum levels of this antioxidant. Ascorbic acid's protective effect reinforces that miltefosine damages DNA by oxidizing its nitrogenous bases, which is reduced by ascorbic acid due to its ability of protecting genetic material from the action of ROS. Therefore, our results show that this drug is efficient in reducing parasitic burden of *L. infantum*.

### 1. Introduction

Leishmaniasis comprise a group of non-contagious, highly neglected, parasitic and chronic infectious diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* (Brasil et al., 2017). There are three main forms of the disease: cutaneous leishmaniasis, the most common form, which causes skin lesions; mucocutaneous leishmaniasis, which leads to partial or total destruction of mucous membranes; and visceral leishmaniasis, which is fatal if not treated appropriately. Visceral leishmaniasis is broadly distributed and recorded in 102 countries, with over 90% of the cases occurring in the following countries: Bangladesh, Brazil, Ethiopia, India, South Sudan and Sudan. We estimate that around 700 thousand to 1 million new cases of this disease surface every year, out of which 500 thousand correspond to the visceral form of leishmaniasis, generating 20 to 30 thousand deaths a year (WHO, 2017).

Treatment for leishmaniasis is very restricted, consisting mostly of two pharmacological lines: antimonials (meglumine antimoniate and sodium stibogluconate) and non-antimonials (pentamidine, amphotericin B, paromomycin and miltefosine). Pentavalent antimonials are still commonly used (Almeida and Santos, 2011), even if several studies have already declared them highly toxic (Demicheli et al., 2002; Kato et al., 2014) and mutagenic (Lima et al., 2010; Cantanhêde et al., 2015; Moreira et al., 2017; de Jesus et al., 2018).

In the past decade, a non-antimonial drug has gathered attention in treatment of leishmaniasis: miltefosine (hexadecyl 2- (trimethylazonyl) ethyl phosphate). Also known as hexadecylphosphocholine, miltefosine was created in the United States, in the 1980's, originally for treatment of skin cancer. Following studies demonstrated that it also presented antileishmanial activity and, in 2002, countries such as India, Nepal and Bangladesh introduced it in treatment of leishmaniasis (Moore and

\* Corresponding author. Av dos Portugueses, 1966, Cidade Universitária do Bacanga, São Luís, MA, CEP 65080-805, Brazil.  
 E-mail address: [silma.pereira@ufma.br](mailto:silma.pereira@ufma.br) (S.R. Ferreira Pereira).

<https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.12.002>

Received 14 September 2018; Received in revised form 6 December 2018; Accepted 12 December 2018

Available online 13 December 2018

2211-3207/© 2018 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of Australian Society for Parasitology. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

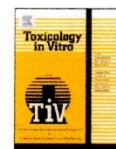




ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxinvit](http://www.elsevier.com/locate/toxinvit)

## Ruthenium (II) complexes with N, O-chelating proline and threonine ligands cause selective cytotoxicity by the induction of genomic instability, cell cycle arrest and apoptosis in breast and prostate tumor cells



Israel Higino de Sousa<sup>a,b,\*</sup>, Vanessa Niely Soares Campos<sup>c</sup>, André Alvares Marques Vale<sup>d,e</sup>, Vera Lucia Maciel-Silva<sup>a,b,f</sup>, Celisnolia Moraes Leite<sup>g</sup>, Alberto Jorge Oliveira Lopes<sup>d,h</sup>, Penina Sousa Mourão<sup>h</sup>, Francisco das Chagas Alves Lima<sup>h</sup>, Alzir Azevedo Batista<sup>g</sup>, Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos<sup>e</sup>, Marcio Aurélio Pinheiro Almeida<sup>e</sup>, Silma Regina Ferreira Pereira<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Postgraduate Program in Biodiversity and Biotechnology-BIONORTE, Federal University of Maranhão, Dom Delgado University City, 1966, CEP. 65085-580, São Luís, MA, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, Brazil

<sup>c</sup> Coordination of Science and Technology, Federal University of Maranhão, Brazil

<sup>d</sup> Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Maranhão, Brazil

<sup>e</sup> Laboratory of Immunology applied to Cancer, Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, Brazil

<sup>f</sup> Department of Chemistry and Biology, State University of Maranhão, Paul VI campus, CEP 65055970, São Luís, MA, Brazil

<sup>g</sup> Department of Chemistry, Federal University of São Carlos, CP 676, CEP 13565-905, São Carlos, SP, Brazil

<sup>h</sup> Research Group in Computational Quantum Chemistry & Pharmaceutical Planning, State University of Piauí, GPQQ&PF/UESPI, Teresina, PI, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Antitumoral  
Cytotoxicity  
Genotoxicity  
Cell death

### ABSTRACT

Ruthenium complexes are being considered as novel chemotherapeutic alternatives for cancer treatment. In our study, we assessed the antitumoral activities of novel ruthenium complexes coupled to the amino acids proline (RuPro) and threonine (RuThr) in prostate tumor cell lines (DU145) and breast (MCF7), and normal cell lines of the lung fibroblast (GM07492A). Our results revealed that the EC<sub>50</sub> of the complexes for DU145 and MCF7 was two times lower than that GM07492A. Moreover, RuPro and RuThr were not able to induce significant genomic instability, cell cycle arrest or cell death in GM07492A, but could induce DNA damage, arrest in G2/M and apoptosis in DU145 and MCF7. Furthermore, BAX, TP53 and ATM were found to be upregulated in DU145 and MCF7 treated with RuPro and RuThr, in which, a higher ASCT2 gene expression was also observed. Using molecular docking, RuPro and RuThr interact with ASCT2, suggesting that this transporter might have a pivotal role in the execution of their activities. Hence, our results with RuPro and RuThr are capable of selectively inducing genetic damage, cell cycle arrest and apoptosis in DU145 and MCF7. We suggest that the selective action of the RuPro and RuThr complexes is related to the higher expression of ASCT2 in the tumor cells.

### 1. Introduction

Although cancer is the second deadliest disease in the world (Ferlay et al., 2015), therapeutic options are still restricted, and some inorganic compounds such as cisplatin and carboplatin are commonly being used for the treatment of several types of cancers. However, due to a series of adverse effects associated with the usage of these platin-based compounds, investigation of new antitumor drugs is ongoing (Alama et al., 2009; Albert et al., 2015). Studies on the complexes of copper, cobalt,

zinc (Pan et al., 2017) and iron (Estrada-Montañó et al., 2017) have revealed that they are potentially cytotoxic to different tumor cell lines. Herein, we will focus on ruthenium complexes that have been synthesized and tested for different biological activities, including as promising drugs against several tumor cell lines (Mari et al., 2015; Pages et al., 2015; Adeniyi and Ajibade, 2016).

The antitumor properties of the ruthenium complexes may have different mechanisms of action. These mechanisms generally include mitochondria pathways, death receptor-mediated pathways, and

\* Corresponding author at: Laboratory of Genetics and Molecular Biology, Department of Biology, Federal University of Maranhão, Brazil.  
E-mail address: [israelhigino@hotmail.com](mailto:israelhigino@hotmail.com) (I.H. de Sousa).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104679>

Received 16 July 2019; Received in revised form 20 September 2019; Accepted 5 October 2019

Available online 30 October 2019

0887-2333/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.