



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



PATRÍCIA RAYNÁ SIMAS DE SOUZA

EFEITO DO MEIO CONDICIONADO EM CÉLULAS PRÉ-TRATADAS COM
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GUARANÁ EM CÉLULAS TUMORAIS

MANAUS-AM

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA



PATRÍCIA RAYNÁ SIMAS DE SOUZA

EFEITO DO MEIO CONDICIONADO EM CÉLULAS PRÉ-TRATADAS COM
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GUARANÁ EM CÉLULAS TUMORAIS

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Imunologia Básica e Aplicada, no Curso de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Amazonas.

Orientador (a): Profa. Dra. Jerusa Araújo
Quintão Arantes Faria

MANAUS-AM

2021

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729e Souza, Patrícia Rayná Simas de
Efeito do meio condicionado em células pré-tratadas com extrato hidroalcoólico de guaraná em células tumorais / Patrícia Rayná Simas de Souza . 2021
110 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria
Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Paullinia cupana. 2. Guaraná. 3. Meio condicionado. 4. Microambiente. 5. Tumor. I. Faria, Jerusa Araújo Quintão Arantes. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**EFEITO DO MEIO CONDICIONADO EM CÉLULAS PRÉ-TRATADAS COM
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GUARANÁ EM CÉLULAS TUMORAIS**

PATRÍCIA RAYNÁ SIMAS DE SOUZA

Aprovado em: 20/08/2021

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Dawidson Assis Gomes
Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Aya Sadahiro
Universidade Federal do Amazonas

*Dedico este trabalho ao meu amado filho,
Rafael.*

Aos meus pais, Raimundo e Olga.

Ao meu irmão, Patrick.

Ao meu noivo, Azamor.

Essa vitória também é de vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por toda proteção e cuidado. Por nunca ter deixado eu desistir, mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada Deus!

Ao meu filho, Rafael. Agradeço por entender, dentro das suas possibilidades, a ausência da mamãe. Eu te amo, meu filho!

Agradeço aos meus amados pais, Raimundo e Olga, nada disso seria possível sem vocês! Obrigada por cuidarem do Rafael na minha ausência. Por serem minha rede de apoio. Mesmo sem entender bem o que seria um mestrado, me apoiaram e incentivaram desde sempre. Vocês são meu alicerce, firme e forte. Obrigada! Amo vocês!

Meu irmão, Patrick. Te agradeço imensamente, minha vitória é sua vitória. Obrigada por me apoiar desde pequena em tudo, por cuidar de mim, por ter sido em tantos momentos meu segundo pai.

Agradeço ao meu noivo, Azamor. Você chegou no meio da tempestade, e se fez morada. Agradeço por ter sido meu porto seguro nesse último ano. Agradeço por todo apoio, compreensão, carinho e amor. Obrigada! Eu te amo!

Agradeço aos meus familiares por todo apoio! Amo vocês!

Ao meu amigo, Luiz Pedro. Você foi primordial para o início disso tudo. Sem você, nada disso teria acontecido. Muito obrigada!! Te amo!

Aos meus amigos do mestrado, Ivi, Lai, Gabi e Wlad. A amizade de vocês foi a rota de fuga de toda essa loucura. Fomos o suporte um do outro nos momentos de desânimo, de tristeza e quando perdemos o rumo. Mas graças a Deus, conseguimos! Sobrevivemos! Amo vocês!

Nenhuma palavra escrita aqui seria suficiente para agradecer você, Dra. Jerusa. Carrego a felicidade de ser sua aluna. Obrigada por tudo, por todo conhecimento repassado, toda compreensão, carinho e cuidado. Meu muito obrigada!

Agradeço ao Dr. Pritesh, por ter permitido o uso do seu laboratório para condução dos experimentos desta dissertação. Estendo os agradecimentos aos alunos do Lab IDI, pelo acolhimento e ajuda.

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas pelo apoio financeiro na condução do projeto. Agradeço à Capes pela concessão da bolsa de estudos.

A todos, meu muito obrigada!

RESUMO

Introdução: O microambiente tumoral é um determinante na regressão ou progressão do tumor apresentando a capacidade de modular as células tumorais. O estudo do efeito antineoplásico de quimioterápicos, abrange a modulação das células presentes no microambiente do tumor. Em adição, no cenário de fitoterápicos com ação antineoplásica, o guaraná (*Paullinia cupana*) tem emergido como um candidato promissor. **Objetivo:** O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito direto do extrato hidroalcoólico de guaraná (EHG) em diferentes linhagens celulares e o efeito dos meios condicionados (MCs) em macrófagos e em células epiteliais normais pré-tratadas com EHG no perfil proliferativo e migratório de células tumorais de mama e de pulmão. **Materiais e Métodos:** Os valores da concentração inibitória mínima do EHG, bem como a atividade antioxidante e avaliação do perfil de morte foram conduzidos em linhagens celulares. Os meios condicionados foram gerados nas células pré-tratadas com a maior concentração não citotóxica de EHG. Os efeitos do secretoma foram avaliados nas células tumorais pelos ensaios de viabilidade, clonogenicidade, migração celular e análise do perfil do ciclo celular. **Resultados:** A caracterização por RP-HLPC identificou a presença das metilxantinas cafeína, teobromina e teofilina, bem como catequina no EHG. O perfil de viabilidade e os valores de CI50 foram heterogêneos entre as distintas linhagens celulares: MDA-MB231, MCF7, MCF10A, A549, BEAS-2B, NIH-3T3, MRC5, NCTC clone 929, THP-1 diferenciada em macrófago. A linhagem mais resistente A549 adenocarcinoma de pulmão (CI50=17.652±10.22 µg/ml), enquanto a mais sensível foi o fibroblasto murino (CI50=1.504±34.78 µg/ml). Tratamento com EHG reduziu os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) na linhagem MDA-MB 231 e em THP-1 diferenciada em macrófagos em condição de estresse oxidativo. O tratamento direto de EHG direciona células BEAS-2B para um perfil de morte por apoptose. Os meios condicionados (MCs) gerados em MCF10A tratada ou não com EHG reduziram a viabilidade e a capacidade clonogênica, elevando o número de células tumorais A549 na fase G1 do ciclo celular. Ademais, estes secretomas promoveram a redução da capacidade clonogênica das células tumorais de mama MCF-7. O MC gerado em BEAS-2B previamente tratadas com EHG aumentou a capacidade de fechamento de ferida de A549 com redução da sua capacidade clonogênica. O secretoma de células THP-1 diferenciadas em macrófagos reduz a viabilidade de MCF-7, ao passo que o MC gerado em macrófagos desafiados com LPS é capaz de restaurar a viabilidade. Células A549 aumentam o percentual de migração quando incubadas com o secretoma de células diferenciadas em macrófagos pré-tratadas com EHG e estimulado com LPS. Adicionalmente, observa-se alteração morfológica de tais células tumorais com a formação de vacúolos, morfologia fusiforme e perda da adesão célula-célula. **Conclusão:** Os MCs gerado em BEAS-2B, MCF10A e THp-1 diferenciadas em macrófagos agem de modo distinto na capacidade proliferativa das linhagens tumorais estudadas. No entanto, observa-se que o secretoma de células pré-tratadas com EHG aumentaram a capacidade migratória de A549. Experimentos futuros são necessários para elucidar o mecanismo de EHG na modulação do secretoma de macrófagos, bem como avaliar a indução do processo de transição epitélio-mesenquimal nas células tumorais tratadas com o meio condicionado.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*; guaraná; meio condicionado, microambiente tumor

ABSTRACT

Introduction: The tumor microenvironment is a determinant in the programming, regression or progression of the tumor, as it has the ability to modulate tumor cells through the release of soluble factors in the environment. The study of the antineoplastic effect of drugs, as well as that of herbal medicines, encompasses the action of different cell types and how the action of these compounds modulate these cells present in the tumor microenvironment. In addition, in the scenario of herbal medicines with antineoplastic action, guarana (*Paullinia cupana*) has emerged as a candidate. **Objective:** The objective of this work was to evaluate the direct effect of the hydroalcoholic extract of guarana (EHG) on different cell lines and the effect of conditioned media (MCs) on macrophages and normal epithelial cells pretreated with EHG on the proliferative and migratory profile of breast and lung tumor cells. **Materials and Methods:** The values of the minimum inhibitory concentration of EHG, as well as the antioxidant activity and evaluation of the death profile were conducted in cell lines. Conditioned media were generated in cells pretreated with the highest non-cytotoxic concentration of EHG. The effects of secretoma were evaluated in tumor cells by means of the clonogenicity test, the assessment of viability, cell migration and analysis of the cell cycle profile. **Results:** The results showed that the values obtained from direct treatment with EHG were heterogeneous among the different cell lines evaluated: MDA-MB231, MCF7, MCF10A, A549, BEAS-2B, NIH-3T3, MRC5, NCTC clone 929, differentiated THP-1 in macrophage. The most resistant strain was lung adenocarcinoma ($IC_{50}=17.652\pm 10.22 \mu\text{g/ml}$), while the most sensitive was the murine fibroblast ($IC_{50}=1.504\pm 34.78 \mu\text{g/ml}$). EHG demonstrated antioxidant activity by reducing the levels of reactive oxygen species (ROS) in the MDA-MB 231 strain, both at baseline and under oxidative stress conditions. Direct treatment of EHG for 24h with the IC_{50} value ($12,022\pm 10.73 \mu\text{g/ml}$) directs BEAS-2B cells to an apoptotic death profile. The results showed that the MCs in MCF10A were able to reduce the viability and clonogenic capacity of A549, while those in MCF7 only reduced the clonogenic capacity. The MCF10A MC CTL increased the amount of A549 cell cycle G1 phase cells. MC from EHG-pretreated lung epithelial cells increases the wound closure capacity of A549 cells while reducing clonogenic capacity. The MCF7 lineage when treated with secretoma of differentiated cells into macrophages reduces viability within 72 hours of treatment, but the group that was stimulated with LPS restores cell viability, these data are not visualized in the clonogenic assay where all groups reduce clonogenic capacity. A549 is responsive only to groups that are stimulated with LPS in the clonogenic, increasing the percentage of migration of cells that were treated with secretoma of differentiated cells into macrophages pretreated with EHG and stimulated with LPS, while stimulating the formation of vacuoles in the tumor cells and changes morphology to fusiform, losing cell-cell adhesion. **Conclusion:** MCs act in different ways in the proliferative capacities of the studied tumor lines, however it is observed that the secretoma of cells pretreated with EHG increased the migratory capacity of A549. Future experiments are needed to elucidate the mechanism of action of the EHG in the modulation of macrophage secretoma, as well as to evaluate the induction of the epithelial-mesenchymal transition process in tumor cells treated with the conditioned medium.

Keywords: *Paullinia cupana*; guarana; conditioned medium, tumor microenvironment.

SUMÁRIO

	PARTE I	12
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Câncer: definição, etiologia, epidemiologia e tratamento.....	16
2.2	Biologia tumoral.....	18
2.3	Imunidade tumoral.....	20
2.4	O papel do microambiente tumoral.....	22
2.4.1	Perfil do secretoma de células do microambiente tumoral.....	24
2.4.1.1	Macrófagos associados ao tumor (MATs).....	24
2.4.1.2	Fibroblastos associados ao câncer (FACs).....	26
2.4.2	Modulação do secretoma das células do microambiente tumoral.....	27
2.5	Guaraná (<i>Paullinia cupana</i>).....	28
2.5.1	Guaraná e câncer.....	30
2.5.2	Guaraná e atividade antioxidante.....	30
3	OBJETIVOS.....	32
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
	PARTE II	33
	CAPÍTULO I	34
	Atividade citotóxica, antioxidante e mecanismo de morte do extrato hidroalcoólico de guaraná em linhagens celulares	35
	Artigo em preparação	35
	CAPÍTULO II	60
	Efeito do secretoma de células do microambiente tumoral e células tumorais pré-tratadas com extrato hidroalcoólico de guaraná	61
	Artigo em preparação	61
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
	ANEXOS	107

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma.....	17
Figura 2 -	Imagem ilustrando as características das células neoplásicas adquiridas durante os vários estágios de seu desenvolvimento.....	19
Figura 3 -	Esquema de imunoeedição do câncer.....	22
Figura 4 -	Ilustração ilustrativa da composição do microambiente tumoral.....	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ANOVA	Análise de variância
ATN	Ambiente tecidual normal
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina sérica bovina
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMEM/F12	Meio de Eagle modificado por Dulbecco: mistura de nutrientes F12.
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EHG	Extrato Hidroalcolico de Guaraná
Ex	Excitação
Em	Emissão
FAC	Fibroblasto associado ao câncer
FRC	Fadiga relacionada ao câncer
G1	Fase <i>gap1</i> do ciclo celular
G2	Fase <i>gap2</i> do ciclo celular
CI50	Concentração da metade do efeito
INCA	Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva
IDH	Índice de desenvolvimento humano
HNSCC	Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, do inglês <i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
M	Fase da mitose celular
MC	Meio condicionado
MAT	Microambiente tumoral
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
ON	Óxido nítrico
PBS	Tampão fosfato salino
PI	Iodeto de propídeo
RPMI 1640	Do inglês, <i>Roswell Park Memorial Institute 1640</i> .
RPM	Rotações por minuto
RIPK	Receptor com interação à proteína cinase

S	Fase de síntese de DNA
SFB	Soro fetal bovino
TAM	Macrófago associado ao câncer, do inglês <i>Tumor-associated macrophages</i> .
TEM	Transição epitélio-mesenquimal

PARTE I

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundial, sendo uma das principais causas de morte no mundo (BRAY et al., 2018). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer estimou 625 mil novos casos da doença para o triênio 2020-2022, a incidência de câncer de mama será de 66 mil novos casos e 30 mil novos casos de câncer de pulmão. Entre as mulheres, a frequência do câncer de mama representará cerca de 29,7% e de câncer de pulmão representará 5,6% do número total de câncer. Para os homens, o câncer de pulmão representará 7,9% (INCA, 2020).

O câncer é um termo genérico utilizado para denominar um grande grupo de doenças que podem afetar diversos órgãos do organismo. Apesar das diferenças entre os tipos, o câncer apresenta em comum, o descontrole do crescimento e proliferação celular, o que culmina na formação de um agregado de células com características anormais. Essa transformação maligna de uma célula é um processo multifatorial, que envolve diversas alterações genéticas e epigenéticas que resultam na perda do controle do ciclo celular e do processo de diferenciação. O ambiente que dá suporte para as células tumorais se desenvolverem é chamado de microambiente tumoral (MAT). É um ecossistema complexo, que inclui vasos sanguíneos, células do sistema imune, fibroblastos, tecido epitelial normal, matriz extracelular (MEC), fatores solúveis como, citocinas, hormônios, quimiocinas, fatores de crescimento, entre outros. Dessa comunicação cruzada entre o microambiente tumoral e as células tumorais pode desencadear tanto a inibição quanto a progressão do câncer (JONES; BAYLIN, 2007; HANAHAN; WEINBERG, 2011; EROLES et al., 2012; SOUZA et al., 2014).

O MAT é formado por diferentes grupos celulares, como as células epiteliais tumorais e estroma, rico em células inflamatórias e fibroblastos ativados, além de, células epiteliais normais, células-tronco mesenquimais, adipócitos, pericitos, células endoteliais, entre outras. O MAT se diferencia do ambiente tecidual normal (ATN) na organização celular, inflamação crônica, nível de oxigênio, pH, estado nutricional das células e consistência da MEC. O ATN geralmente inibe o câncer na tumorigênese inicial, enquanto o microambiente tumoral trabalha em prol do crescimento tumoral (JOYCE; POLLARD, 2009; ALLEN; JONES, 2011; ZHENG; GAO, 2019).

Quando o ambiente tecidual normal é alterado, e as alterações genéticas e epigenéticas são induzidas nas células epiteliais e estromais, as células estromais, como os macrófagos, perdem a capacidade de inibição e passam a estimular o crescimento de células epiteliais transformadas. Isso se deve ao fato das células transformadas modularem os macrófagos para um perfil pró-tumorigênico diferenciando-os em macrófagos associados ao tumor (TAM), os quais perdem a função de vigilância imunológica e passam a promover o crescimento de células tumorais (ARTS et al., 2016).

Os macrófagos desempenham um papel efetivo na eliminação das células tumorais, porém, quando modulados para o perfil de macrófagos associados ao tumor (TAMs) promovem a sobrevivência, proliferação, metástase, angiogênese e supressão imunológica das células tumorais. Neste cenário no qual o microambiente tem um papel fundamental na progressão do câncer, a busca por novos quimioterápicos envolve novas abordagens que incluem tanto a resposta das células estromais, quanto a dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) à terapia (NOY; POLLARD, 2014).

Na busca por novos tratamentos adjuvantes para o câncer, o guaraná (*Paullinia cupana*) surge como um candidato promissor. O guaraná é um fruto de planta nativa brasileira, originária da região Amazônica comumente empregada em bebidas caseiras e industriais, como tônico e estimulante. Muitos trabalhos descrevem suas propriedades antioxidantes, antiinflamatória e a associação do guaraná na melhora da fadiga em pacientes com câncer de mama em tratamento quimioterápico. Destacadamente, estudos *in vitro* e *in vivo* apontam a redução na proliferação tumoral e indução de mecanismo de apoptose com a administração do guaraná. Coletivamente, o efeito protetivo do guaraná contra danos químicos e oxidativos apontam sua potencial administração como adjuvante no tratamento oncológico (CAMPOS et al., 2003, 2011; FUKUMASU et al., 2006, 2006a, 2008, 2011;; BITTENCOURT et al., 2013, 2016; SCHIMPL et al., 2013; HERTZ et al., 2015; GONÇALVES-RIBEIRO et al., 2016).

Dada a sua possível interferência na progressão do câncer, conhecer o comportamento do tumor na presença de células estromais se faz necessário. Através do condicionamento do meio de cultura e pré-tratamento das células estromais é possível acessar os efeitos parácrinos de tais células e de possíveis componentes imunomodulatórios nas células tumorais. Considerando esta

abordagem, Wang e colaboradores 2017 mostrou que o pré-tratamento com o metabólito curcumina modulou a resposta de fibroblastos associados ao câncer (FACs) para um perfil de secretoma que inibiu a invasão e migração das células tumorais de pâncreas, reduzindo o processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM) nestas células. Recentemente, Ba et al., (2020) demonstraram que o pré-tratamento com curcumina reverteu o fenótipo de FACs para fibroblastos peritumorais, inibindo a secreção de citocinas pró-carcinogênicas e o meio condicionado dos FACs pré-tratados com curcumina inibiu a proliferação das células tumorais.

O guaraná é rico em cafeína, teobromina e teofilina, além de uma alta concentração de taninos condensados, dentre outras biomoléculas. Embora a concentração de cafeína possa variar entre as sementes, em geral, um grama de guaraná fornece 50 mg de cafeína, sendo a molécula bioativa de maior concentração em sua composição. FACs tratados com cafeína apresentaram redução na expressão e secreção de citocinas (IL-6, TGF- β , entre outras) e supressão do perfil angiogênico. Além disso, o pré-tratamento com cafeína reduziu os efeitos parácrinos do secretoma dos FACs nas células tumorais de câncer de mama, diminuindo a capacidade de invasão e migração destas células tumorais. De modo geral, a cafeína demonstrou um potencial de inativação dos FACs, fornecendo uma prevenção segura e eficaz ao crescimento e recorrência de tumores de mama através da inibição de seus efeitos pró-tumorais (AL-ANSARI; ABOUSSEKHRA, 2014; MARQUES et al., 2019).

Embora, alguns trabalhos correlacionem o efeito antiproliferativo direto (FUKUMASU et al., 2008; HERTZ et al., 2015) dos extratos hidroalcoólicos de guaraná (EHG) em células tumorais, não existe nenhum trabalho que avalie a modulação e reprogramação de células do microambiente tumoral ao tratamento com o extrato. Desta forma, o extrato hidroalcoólico de guaraná pode apresentar a capacidade de modular as células do microambiente tumoral, alterando o perfil de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento secretados, por fim, alterando a resposta das células tumorais a esse secretoma influenciando na regressão ou progressão da doença.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Câncer: definição, etiologia, epidemiologia e tratamento

Historicamente, a palavra câncer vem do grego *karkínos* e do latim *cancer*, que significa, em ambas línguas, caranguejo. Tal associação advém da forma como os tumores se infiltram nos tecidos adjacentes ao foco inicial assemelhando-se as patas do caranguejo fincadas na areia e/ou lama dificultando sua retirada. É uma doença relativamente antiga devido ao fato de ter sido detectada em múmias egípcias com mais de 3 mil anos (INCA, 2020).

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 200 doenças, caracterizadas pelo crescimento desordenado de células e invasão de tecidos vizinhos. O câncer é uma doença multifatorial, que envolve diversas alterações genéticas e epigenéticas que culminam na perda do controle sobre o ciclo, diferenciação celular e apoptose (BORGES et al., 2006; JONES; BAYLIN, 2007; INCA, 2020).

Em 2018, de acordo com dados da GLOBOCAN (do inglês *Global Cancer Observatory*), estimou-se 18,1 milhões de novos casos de câncer no mundo (17 milhões, excluindo câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de mortes por câncer (9,5 milhões, excluindo câncer de pele não melanoma). O câncer mais incidente no mundo foi o de pulmão, seguido pelo câncer de mama, colorretal e próstata. Entre os homens, o câncer de pulmão foi o mais frequente e a principal causa de morte por câncer, seguido pelos cânceres de próstata e colorretal (incidência) e câncer hepático e estômago (por mortalidade). Entre as mulheres, o câncer de mama foi mais frequente e comumente diagnosticado e a principal causa de morte, seguido por colorretal e pulmonar em incidência e mortalidade. (BRAY et al., 2018).

No Brasil, para o triênio de 2020-2022, o Instituto Nacional do Câncer estimou 625 mil novos casos da doença anualmente. A incidência de câncer de mama será de 66 mil novos casos e 30 mil novos casos de câncer de pulmão para cada ano do triênio. Entre as mulheres, a frequência do câncer de mama representará cerca de 29,7% e de câncer de pulmão representará 5,6%, enquanto entre os homens, o câncer de pulmão será de 7,9% (FIGURA 1) (INCA, 2020).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2020.

Para o Estado do Amazonas, a estimativa para 2020 de câncer de mama será de 450 novos casos, enquanto que o de pulmão (acompanhado de traqueia e brônquio) será de 320 novos casos. Para a capital Manaus, a estimativa será de 380 novos casos de câncer de mama e de 110 novos casos de câncer de traqueia, brônquio e pulmão (INCA, 2020).

O câncer de mama é uma neoplasia muito prevalente na sociedade moderna e está associada a uma etiologia multifatorial com heterogenia morfológica e clínica. A taxa de incidência é maior em países com índice de desenvolvimento humano alto e muito alto, com grande associação ao desenvolvimento econômico local. Dos diversos fatores envolvidos na etiologia do câncer de mama estão os fatores endócrinos, a nuliparidade, primeiro filho depois dos 30 anos, fatores ambientais como consumo de álcool, uso de pílulas contraceptivas, menopausa (reposição hormonal), exposição a radiações ionizantes e estilo de vida, assim como dieta hipercalórica e sedentarismo. Uma pequena proporção destes cânceres está associada à predisposição familiar e a mutações em dois genes de alto risco e alta penetrância, o *BRCA1* e o *BRCA2* (LAKHANI, et. al., 2005; BARNES et. al., 2011).

Como uma doença complexa, pode apresentar características clínicas, morfológicas e moleculares distintas entre os subtipos. A heterogeneidade não pode ser explicada baseada apenas pelos parâmetros clínicos, como tamanho de tumor, envolvimento de linfonodos, grau histológico, idade ou por biomarcadores. Assim, o câncer de mama não é uma única doença, mas muitas, sendo que cada indivíduo desenvolve um caso específico para qual o tratamento deve ser individual de acordo com suas características moleculares (EROLEs et al., 2012). Os tratamentos para o

câncer de mama incluem radioterapia e cirurgia, seguidos da administração de agentes bloqueadores de hormônios, quimioterapia e uso de anticorpos monoclonais. A busca por novos medicamentos visando caminhos moleculares específicos relacionados à oncogenes ou genes supressores de tumores é essencial. A este respeito, os produtos naturais são considerados grandes fontes de novos medicamentos, uma vez que mais de 60% das novas moléculas são isoladas de produtos naturais ou quando sintéticas, imitam seus efeitos (CHABNER; ROBERTS JR, 2005; JIÃO et al., 2018).

O câncer de pulmão ou tumor de pulmão é causa mais comum de morte por câncer em homens e o segundo mais comum em mulheres depois do câncer de mama. Os fatores de risco incluem: ser fumante ativo ou passivo, exposição ao gás radônio, amianto, poluição do ar e predisposição genética. O câncer de pulmão é tradicionalmente separado em carcinoma de células não-pequenas (80% dos casos diagnosticados) e carcinoma de células pequenas (20% dos casos diagnosticados). Dentro dessa classificação, os carcinomas de células não-pequenas são subclassificados em adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinomas de células grandes. Os carcinomas de células pequenas são altamente agressivos e seu tratamento é não cirúrgico, na maioria dos casos, enquanto os carcinomas de células não-pequenas são tratados com uma combinação de cirurgia e terapia adjuvante (MUSTAFA; et al., 2016; ZHENG, 2016).

2.2 Biologia tumoral

Hanahah e Weinberg (2000) propuseram seis características que a célula neoplásica necessita adquirir durante os vários estágios para seu efetivo desenvolvimento. As características são: sustentar a sinalização proliferativa, evitar as vias supressoras de crescimento, resistir à morte celular, possibilitar a imortalidade replicativa, induzir a angiogênese promovendo a invasões dos tecidos e possibilitar metástases. Adicionalmente, tem-se a instabilidade genômica e a inflamação como características facilitadoras para as demais. Em 2011, Hanahah e Weinberg adicionaram duas características a esta lista: a reprogramação do metabolismo energético e a evasão do sistema imune, além de sugerirem terapêuticas específicas direcionadas às características da célula tumoral (FIGURA

2).

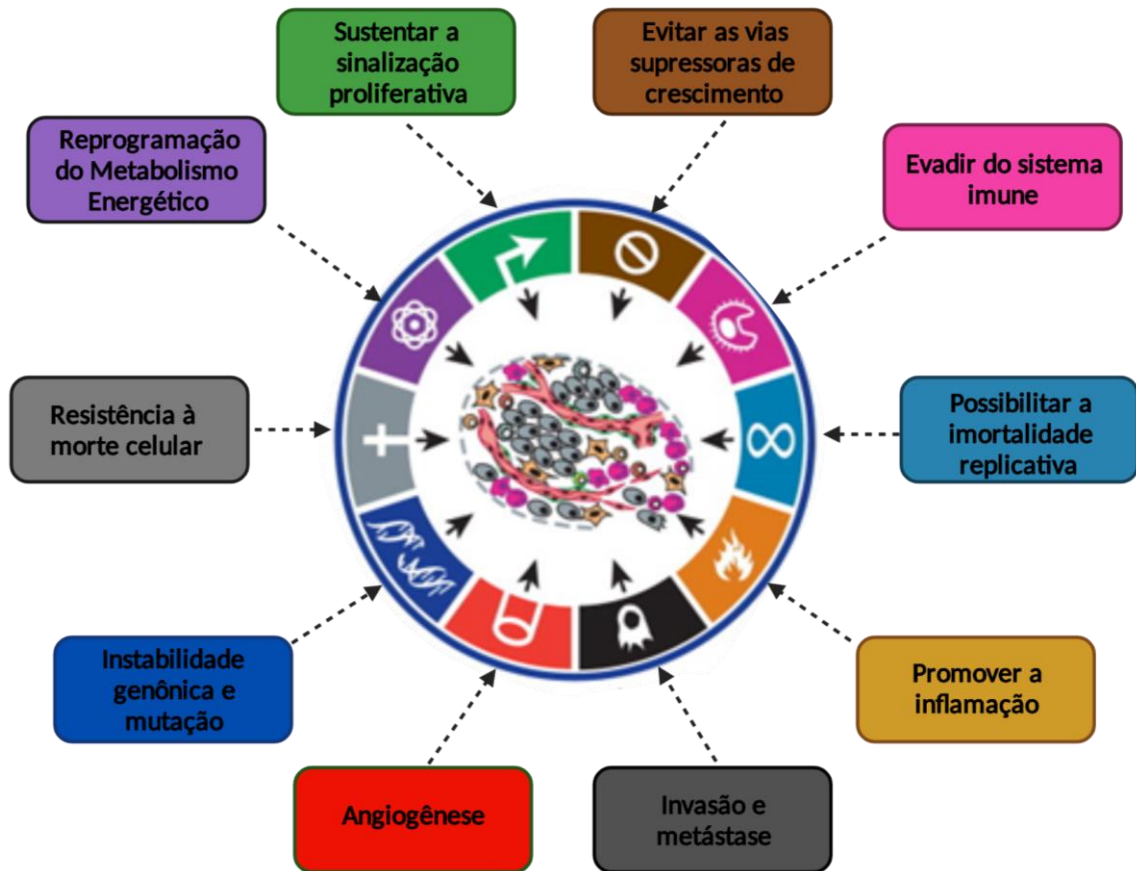


Figura 2 – Imagem ilustrando as características das células neoplásicas adquiridas durante os vários estágios de seu desenvolvimento. Fonte: HANAHAH; WEINBERG, 2011- modificado

A iniciação e progressão do câncer são dependentes da aquisição de várias alterações que ativam vias de oncogenes e de supressores de tumor. Essas alterações permitem que células envolvidas sofram desregulação no controle de processos fisiológicos como divisão ou morte celular e favorece a manutenção das células afetadas com o conseqüente aumento desta população celular. A manutenção do tumor advém também de um sistema complexo, estando a aquisição dessas mutações associada com a ocorrência de várias outras alterações genéticas – como conseqüência, por exemplo da instabilidade gênica – que não necessariamente serão vantajosas na seleção de um grupo celular. Essas diversas mutações que são conquistadas após vários ciclos de proliferação celular permitem uma grande diversidade na população de células que compõem o corpo do tumor. Tais mutações ditas silenciosas são capazes de aumentar a plasticidade fenotípica

das células tumorais repercutindo na grande heterogeneidade intratumoral (VOGELSTEIN; KNIZLER, 2004; MARUSYK et al., 2012; BURRELL et al., 2013).

Uma das vias mais alteradas nas células tumorais é a relacionada ao controle do ciclo celular. Em mamíferos, o ciclo celular é dividido em quatro fases (G1, S, G2 e M), apresentando pontos de controle que são rigorosamente controlados por cinases ciclinas dependentes (CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6) e suas coativadoras essenciais, as ciclinas (ciclinas A, B, D e E). As atividades quinases dessas CDKs são principalmente reguladas pela abundância de suas ciclinas parceiras e pela interação com inibidores de CDK como p16Arf, p21Waf1 e p27Kip1. A ciclina D1 se acumula durante a fase G1 e regula a atividade quinase de CDK4 e CDK6, sendo estas responsáveis pela fosforilação de pRB. A ativação da proteína regulatória pRB leva a uma interrupção do ponto de controle G1/S levando a proliferação celular. Sabe-se que a expressão excessiva da ciclina D1 ocorre em uma alta frequência em uma variedade de carcinomas, sendo assim considerado um protooncogene (LU et al., 2003).

2.3 Imunidade tumoral

Há inúmeras interações entre as células tumorais e imunes, passíveis de ocorrer desde a iniciação tumorigênica da primeira célula até no processo metastático. O sistema imune exerce uma pressão seletiva sobre as células tumorais induzindo a sua eliminação ou selecionando subclones menos imunogênicos direcionando as células tumorais para a evasão do sistema imune. Desta forma, inclui-se um novo conceito envolvendo o papel do sistema imune, a imunoeedição. O processo de imunoeedição é constituído por três fases, sendo conhecidas como os três “Es da imunoeedição”: eliminação, equilíbrio e evasão (FIGURA 4) (TORREZINI; ATHANAZIO, 2008; MITTAL, et al., 2014).

A eliminação é a fase na qual as células tumorais são detectadas, e os sistemas imunológicos, inato e adaptativo, eliminam de modo conjunto as células transformadas. Nesse momento, as células tumorais expressam antígenos tumorais via MHC I ou ligantes NKG2D reconhecidos por células T CD8+ efetoras e células NK, respectivamente. Simultaneamente, as células dendríticas fagocitam e apresentam de maneira cruzada, os antígenos tumorais para células T, incluindo NKT (antígenos glicolipídicos, via CD1d).Essas células efetoras secretam IFN- γ que

pode mediar a inibição da proliferação e a angiogênese das células tumorais. As células T CD8⁺ podem induzir a apoptose das células tumorais, ligando aos receptores Fas e TRAIL nas células tumorais, ou secretando perforinas e granzimas. As células T $\gamma\delta$ também podem reconhecer e promover a morte de células tumorais que expressam ligantes NKG2D (MIC A/B em humanos). Células do sistema imune, como macrófagos (M1) e granulócitos secretam TNF- α , IL-1, IL-12 e espécies reativas de oxigênio. Durante a eliminação, a resposta é direcionada para o perfil antitumoral pelo aumento da expressão de antígenos tumorais, MHC I, receptor Fas e TRAIL em células tumorais, e perforinas, granzimas, IFN- $\alpha/\beta/\gamma$, IL-1, IL-12, TNF- α no microambiente tumoral (MAT) (MITTAL et al., 2014; DHAR; WU, 2018).

Na fase de equilíbrio, o sistema imune mantém as células tumorais em estado de dormência funcional. Nesse momento, algumas células tumorais sofrem alterações genéticas e epigenéticas evoluindo para variantes que resistem ao reconhecimento imune e induzem imunossupressão pela expressão de PDL1. Nesta fase, há equilíbrio entre as respostas antitumorais (IL-12, IFN- γ) e citocinas pró-tumorigênicas (IL-10, IL-23) (MITTAL et al., 2014).

Na terceira fase ocorre a evasão do sistema imune, as células tumorais proliferam e passam a causar a doença clinicamente visível. Nesse momento, as células tumorais evadem o reconhecimento imunológico por mecanismos de perda de antígenos tumorais, baixa expressão de MHC I ou de moléculas co-estimulatórias, e passam a expressar moléculas de resistência aumentada, sobrevivência e imunossupressão, além da secreção de citocinas, fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), TGF- β , IL-6, fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) que potencializam a angiogênese. Nesse ponto, os macrófagos M2 passam a secretar citocinas imunossupressoras como a IL-10 e TGF- β que podem inibir a proliferação de linfócitos T CD8⁺ ou inibir a apoptose. As células T, incluindo Treg, podem expressar receptores como PD-1, CTLA-4 e LAG-3 que suprimem a resposta imune antitumoral favorecendo o crescimento tumoral. Nessa fase, o equilíbrio é desfeito e passa-se a etapa de progressão do tumor (SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011; MITTAL et al., 2014)

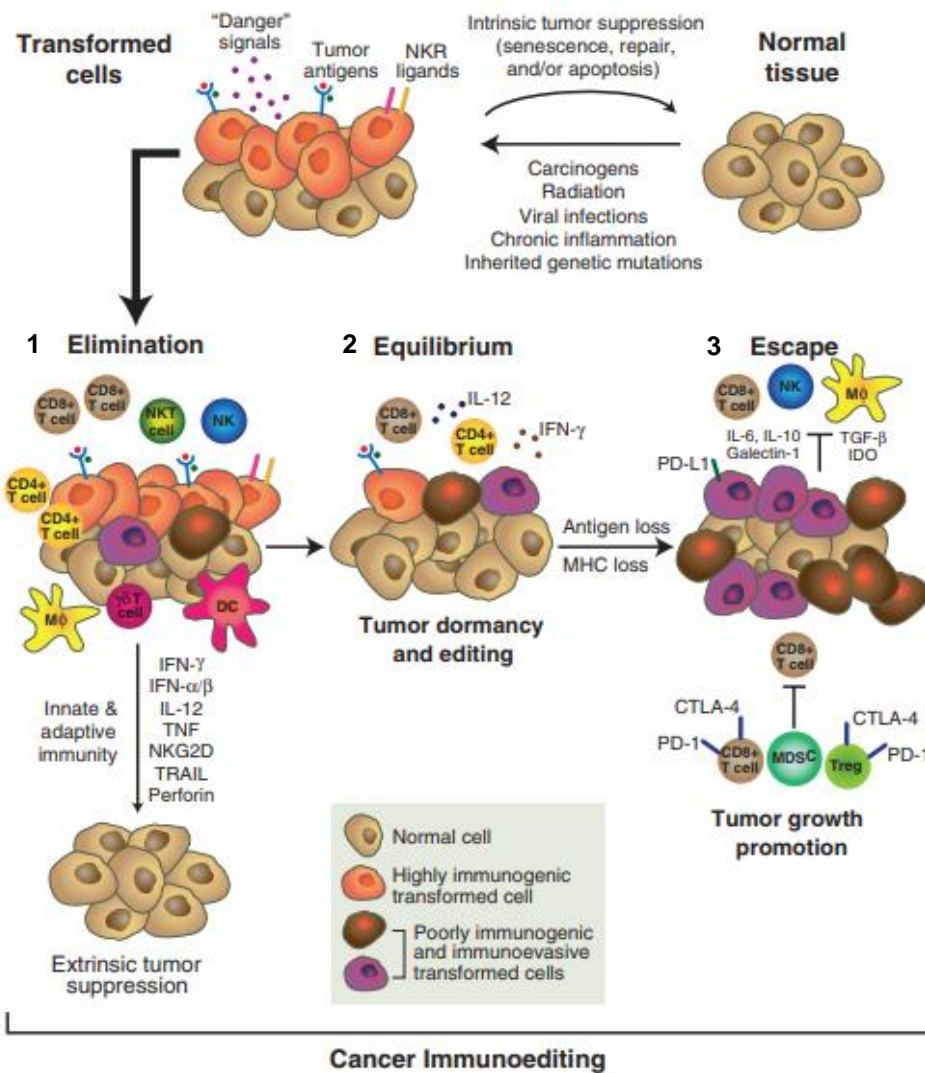


Figura 3 – Esquema ilustrativo do processo de imunoeedição do câncer. Nesse conceito de imunoeedição, as células tumorais passam pela fase de eliminação (1) na qual são reconhecidas pelo sistema imune e são destruídas ou passam a adquirir mutações que as tornam menos imunogênicas e entram em estágio de equilíbrio (2) com o sistema imune, podendo ficar assim por muito tempo até conseguirem entrar na terceira fase, a fase de evasão (3) do sistema imune. Nessa fase, as atividades das células do sistema imune são bloqueadas pela expressão de moléculas inibitórias nas células tumorais, ocorrendo a secreção de moléculas imunossupressoras inibindo a resposta imune efetiva citotóxica e favorecendo a progressão do tumor. Fonte: SCHREIBER; OLD; SMYTH, 2011.

2.4 O papel do microambiente tumoral

O microambiente tumoral diferencia do ambiente tecidual normal (ATN) na organização celular, inflamação crônica, nível de oxigênio, pH, estado nutricional das células e consistência da matriz extracelular. O ATN geralmente inibe o câncer na etapa de tumorigênese inicial, ao passo que, o microambiente tumoral, em geral atua em prol do crescimento tumoral (ZHENG; GAO, 2019).

O MAT é composto por uma grande diversidade de células, que incluem as células tumorais e as células de suporte. As células de suporte são recrutadas por células tumorais e estromais contribuindo com angiogênese tumoral, proliferação, invasão e metástase, bem como quimiorresistência. Nesse estroma estão presentes e em complexa interação, diferentes tipos celulares como células tronco derivados da medula óssea, células do sistema imune, células-tronco tumorais (CSC), fibroblastos, miofibroblastos, vasos sanguíneos, pericitos, células não transformadas e células dos vasos linfáticos (FIGURA 5) (JOYCE; POLLARD, 2009; BUSSARD, et al., 2016).

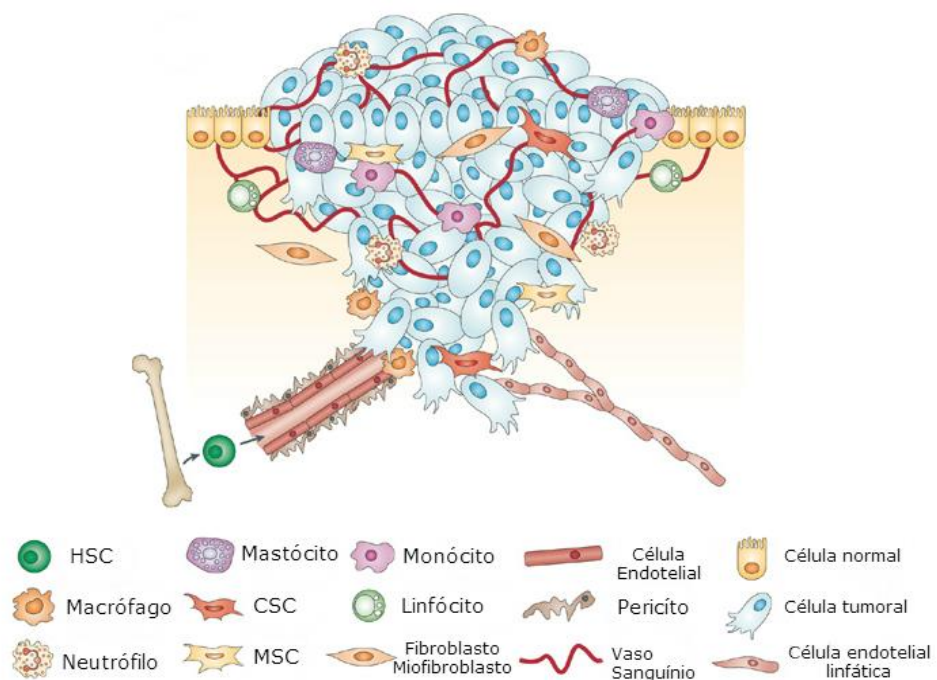


Figura 4 - Representação ilustrativa da composição do microambiente tumoral. O MAT é composto por células-tronco hematopoiética (HSC), células do sistema imune, mastócitos, células-tronco tumorais (CSC), células-tronco mesenquimais (MSC), fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, pericitos, vasos sanguíneos, células normais, célula endotelial linfática e células tumorais. Fonte: JOYCE; POLLARD, 2009 – modificado.

Em 1889, Stephen Paget estabeleceu a teoria de “semente e solo” para descrever o microambiente tumoral e a sua atuação no desenvolvimento do câncer. Nesta teoria, as metástases “as sementes” de um tumor específico, frequentemente invadem e se desenvolvem em locais “o solo” similares ao ambiente original do tumor. O “solo” corresponde assim ao microambiente tumoral. Durante o processo de carcinogênese e propagação, o MAT determina os processos posteriores, pois, o

tumor pode mudar o seu microambiente e o microambiente pode afetar o crescimento do tumor (KAMINSKA et al., 2015).

A maioria dos estudos sobre resistência à quimioterápicos foca em alterações genéticas ou fenotípicas das próprias células tumorais, e excluem seu estroma composto por diferentes tipos celulares que modulam as respostas das células tumorais. No entanto, evidências crescentes indicam que o estroma de tumores sólidos interage com o tumor tendo papel determinante na progressão do câncer e metástase (STEINBICHLER et al., 2015).

Bohrer e Schwertfeger (2012) mostraram que os macrófagos em torno de lesões pré-invasivas em camundongos secretam quimiocinas de ligação que promovem a migração e invasão de células epiteliais pré-neoplásicas vizinhas. Smith, Teknos e Pan (2013) relataram que os fibroblastos associados ao câncer (FACs) induzem a transição epitélio-mesenquimal (TEM) em células de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC). Em câncer colorretal, fibroblastos associados ao tumor atuam liberando fatores que promovem resistência ao tratamento quimioterápico. Neste cenário, a busca por novos quimioterápicos envolve novas abordagens que incluem a resposta e modulação das células estromais, como os fibroblastos, células epiteliais normais e macrófagos à terapia (GONÇALVES-RIBEIRO et al., 2016).

2.4.1 Perfil do secretoma de células do microambiente tumoral

As células do microambiente tumoral agem sobre as células tumorais liberando fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que influenciam a resposta frente à regressão ou progressão da doença (KAMINSKA et al., 2015).

2.4.1.1 Macrófagos associados ao tumor

Os macrófagos derivam dos monócitos circulantes do sangue periférico e podem se especializar em resposta à diferentes estímulos. Dentre estes perfis fenotípicos e funcionais estão os macrófagos M1, ativados classicamente e os macrófagos M2, ativados alternadamente. Em geral, os TAMs são de fenótipo M2 e executam, principalmente, ações que favorecem a sobrevivência, proliferação e metástase das células tumorais. A presença de um número elevado de macrófagos

M2 no MAT é indicativo de um pior prognóstico devido as suas atividades pro-oncogênicas (SOLIS-MARTINEZ et al. 2018).

Macrófagos polarizados para perfil M2 cocultivados com células tumorais de pâncreas foram capazes de aumentar a morfologia fibroblástica das células tumorais, regular positivamente os marcadores de transição epitélio-mesenquimal (TEM) e aumentar a proliferação, migração e atividade proteolítica das metaloproteinases (MMP2 e MMP9) nas células tumorais pancreáticas, além de diminuir a expressão de E-caderina, um marcador epitelial. A cocultura aumentou a expressão de TLR4 (do inglês *Toll like receptor 4*) em TAMs polarizadas em M2, e consequentemente sua ativação pelo lipopolissacarídeo aumentou a expressão de IL-10 resultando no aumento da TEM nas células tumorais de pâncreas (LIU et al., 2013).

WANG et al. (2011) isolaram TAMs dos tecidos primários de cânceres de pulmão de células não-pequenas e observaram a alta expressão de moléculas como a MMP-9, e esta mostrou correlação positiva com a progressão da doença. O meio condicionado dos TAMs aumentou a migração e invasão nas células de adenocarcinoma de pulmão, SPC-A1, H460 e A549 devido a ação, em parte, da MMP-9.

Semelhantemente, YAO et al. (2018) observaram que o cultivo de células de carcinoma hepatocelular (HCC) com meio condicionado em macrófagos polarizados para M2 apresentaram a morfologia fibroblástica, capacidade metastática aumentada e aumento da expressão de marcadores de TEM. Além disso, houve um aumento na expressão de TLR4 nas células HCC tratadas com meio condicionado em macrófagos polarizados para M2 promovendo a sua migração. O aumento da expressão de TLR4 está envolvida com a atividade iniciadora do tumor e promoção da quimiorresistência durante o desenvolvimento do HCC.

Macrófagos M2 secretam CCL18, a qual está envolvida criticamente nas metástases do câncer. She e colaboradores (2018) observaram que macrófagos polarizados para M2 manifestaram aumento do mRNA e da expressão proteica de CCL18, IL-10 e CD206 e o meio condicionado dessas células promoveram a migração e invasão das células de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (HNSCC), sendo observado também a ocorrência da TEM.

2.4.1.2 Fibroblastos associados ao câncer

Os FACs são componentes importantes do microambiente tumoral e “co-evoluem” com as células tumorais contribuindo para o seu crescimento, invasão e metástase, no entanto, os mecanismos envolvidos nestes eventos ainda não foram totalmente elucidados. Os FACs são marcados pela expressão de actina do músculo liso – α (α -SMA), vimentina e N-caderina (WANG, et al., 2017; WANG et al., 2019).

Em seu estudo, Wang et al. (2017) isolaram FACs de câncer de pulmão e verificaram que o meio condicionado gerado a partir dessas células aumentou drasticamente a migração e invasão de células do câncer de pulmão, induziu a TEM e a expressão de MMP2 e VEGF relacionados às metástases. Todos esses eventos relacionados à secreção de IL-6 e subsequentemente ativação da via de sinalização JAK2/STAT3.

Os fibroblastos associados ao câncer cocultivados com linhagem tumoral de mama (MCF7) apresentaram uma maior expressão de vimentina e menor expressão de E-caderina direcionando as células tumorais para a TEM e aumentando a sua invasão (SOON et al., 2013). Semelhantemente, no carcinoma de células escamosas de língua cocultivados com FACs, há o aumento da proliferação e invasão das células tumorais, além de induzir a regulação positiva dos marcadores de TEM, fibronectina e vimentina e regulação negativa de E-caderina (ZHOU et al., 2014).

WANG et al., (2019) em seus resultados identificou a epiregulina (EREG) como responsável na ativação do fenótipo FACs a partir de fibroblastos normais (FNs). A alta expressão de EREG nos FACs correlacionou-se com o estágio T (estadiamento do câncer) mais alto e maior invasão prevendo menor sobrevida global em pacientes com carcinoma epidermóide oral. Os FACs induzidos por EREG promoveram a TEM nas células tumorais de carcinoma epidermóide oral necessária para a migração e invasão dependente da via de sinalização JAK2/STAT3 e da IL-6.

Semelhantemente, dados de Wu et al., 2017 e Goulet et al., 2019, sugerem que os FACs no MAT promovem a progressão do câncer gástrico e de bexiga através da sinalização de IL-6/JAK2/STAT3 e a terapia direcionada a IL-6 pode ser uma abordagem alternativa nesses tipos de cânceres, atuando sobre os FACs.

2.4.2 Modulação do secretoma das células do microambiente tumoral por metabólitos

É conhecido que as células do microambiente tumoral possuem ação dual frente a progressão e regressão do tumor secretando citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (QUAIL; JOYCE, 2013). A modulação do MAT pode ser realizada para entender se uma determinada substância altera a resposta das células do MAT e o efeito desse secretoma na progressão ou regressão das células tumorais. Portanto, é possível modular células do microambiente tumoral por meio de substâncias químicas, citocinas, hipóxia, fatores de crescimento, entre outros. Tal abordagem tem sido conduzida em estudos com células-tronco mesenquimais visando a melhoria da eficácia de seu uso terapêutico em diversas aplicações (NORONHA et al., 2019).

A ação da nicotina nas células tumorais é conhecida, porém, o seu efeito nas células do MAT é desconhecido. Com base nisso, Chen et al. (2018) identificaram que a nicotina ativou FACs de modo que seu secretoma induziu o processo de TEM em células tumorais de mama. Curiosamente, o meio condicionado ativado por nicotina teve um efeito mais impactante na promoção da TEM e na capacidade de migração das células tumorais quando comparado ao tratamento direto com nicotina nas células tumorais de mama. No secretoma de FACs foi identificada a produção do fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) e do TFG- β , sendo cruciais para o desenvolvimento de TEM e a migração das células tumorais de mama, pois o seu bloqueio suprimiu essas respostas. Esses resultados sugerem que os FACs ativados por nicotina parecem ser os responsáveis por acelerar a progressão do câncer de mama mediado pelo tabagismo.

Em paralelo, os FACs se tornaram promissores alvos terapêuticos para suprimirem a progressão do tumor e se tornarem benéficos para o tratamento e prevenção do câncer. Wang et al (2017a) identificou que a ação da curcumina, um potente antioxidante natural com atividade antitumoral descrita, modula as respostas dos FACs para liberarem um secretoma que inibe a invasão e migração das células tumorais de pâncreas, evitando assim, a metástase. A curcumina modificou as características mesenquimais dos FACs e reduziu a TEM nas células tumorais de pâncreas.

Semelhantemente, Ba et al. (2020) em seu estudo identificaram que a curcumina reverteu o fenótipo de FACs para o fenótipo de fibroblastos peri-tumorais inibindo a secreção de citocinas pró-tumorais, como o TGF- β 1, MMP2 e fator derivado de células estromais 1 (SDF-1). O meio condicionado de FACs promoveu a proliferação da linhagem Cal-27 (carcinoma epidermóide da língua), porém, o meio condicionado em FACs pré-tratadas com curcumina levou ao bloqueio da proliferação mediada por FACs *in vitro* e *in vivo*. Assim, o pré-tratamento com a curcumina alterou o fenótipo dos FACs e suprimiu seu estímulo à proliferação e malignidade.

Os FACs tratados com cafeína regulam positivamente as proteínas supressoras de tumor p16, p53, p21 e Cav-1, reduz a expressão/secreção de várias citocinas (IL-6, TGF- β , SDF-1 e MMP-2), e regula negativamente a expressão de α -SMA. Diminuindo também as ações invasivas e migratórias dos FACs através da inativação da via Akt/Erk1/2 dependente de PTEN, além de suprimir o efeito pró-angiogênico dos FACs diminuindo a expressão e secreção de VEGF. Além disso, o meio condicionado em FACs pré-tratados com cafeína reduziu a ação parácrina pró-invasiva e migratória nas células de câncer de mama. Esses resultados sugerem que a cafeína tem a capacidade de inativar os miofibroblastos do MAT. Desta forma, a cafeína pode fornecer uma prevenção segura e eficaz contra o crescimento e recorrência de tumores de mama pela supressão dos efeitos pró-tumorais dos FACs (AL-ANSARI; ABOUSSEKHRA, 2014).

2.5 Guaraná (*Paullinia cupana*)

O guaraná é um fruto oriundo da região amazônica, sendo, por centenas de anos cultivado e utilizado pelos índios brasileiros. A semente é torrada e moída transformando-se em pó, este é misturado em água e utilizado como tônico e estimulante ou pode ser ingerido em cápsulas. O guaraná apresenta alta concentração de metilxantinas, sendo a cafeína, a de maior abundância seguida de teobromina e teofilina. Além disso, contém uma alta concentração de taninos condensados, como as epicatequinas, proantocianidinas e catequinas, correspondendo a cerca de 16% de sua composição o que contribui para prolongar o efeito estimulante, e adicionalmente possui saponinas e outros componentes minoritários (CAMPOS, 2018; MARQUES et al., 2019).

Atualmente, grande parte da sua produção é destinada a indústria de refrigerantes, mas também é muito valorizado na indústria cosmética e farmacêutica. Devido à propriedade estimulante da cafeína no sistema nervoso central, o guaraná tem sido amplamente utilizada no mercado farmacêutico. Muitos trabalhos descrevem várias propriedades biológicas do guaraná, incluindo ação antioxidante, antimicrobiana, agregação antiplaquetária, anti-obesogênico, antimutagênicos, efeitos antitumorais, neuroprotetor, quimiopreventivo, entre outros (NAZARÉ; FIGUEIREDO, 1982; MATTEI et al., 1998; CHABNER; ROBERTS, 2005; BASILE et al., 2005; OPALA et al., 2006; RAVI SUBBIAH; YUNKER, 2008; FUKUMASU et al., 2011; MARQUES et al., 2019).

2.5.1 Guaraná e câncer

O guaraná mostrou ser uma opção promissora para o tratamento da fadiga física e mental relacionada ao câncer uma vez que seu uso não está relacionado a efeitos colaterais significativos. Ademais, o guaraná apresenta um baixo custo em comparação com a terapia tradicional com medicamentos. A *P. cupana* foi estudada em modelos de câncer pré-clínico, nos quais foram observados um efeito quimiopreventivo em modelo hepatocarcinogênico em camundongos e efeito antineoplásico em metástases pulmonares de melanoma B16/F10 em ratos (FUKUMASU et al., 2006; FUKUMASU et al., 2008; CAMPOS et al., 2011).

Um estudo de cruzamento randomizado, duplo-cego, controlado por placebo foi conduzido por Campos et al. (2011) em pacientes com câncer de mama submetidos a quimioterapia sistêmica, com 100 mg/dia de suplemento em pó de guaraná. A suplementação de guaraná diminuiu significativamente a fadiga relacionada ao câncer (FRC). O estudo também indicou a não ocorrência de efeitos adversos tóxicos, distúrbios do sono ou ansiedade e depressão nos pacientes que receberam suplementação de guaraná. Apesar dos resultados sugerirem um efeito benéfico do guaraná em pacientes com câncer de mama com FRC, as moléculas bioativas no guaraná também podem afetar a eficácia quimioterapêutica.

O potencial efeito antitumoral das catequinas em células tumorais tem sido descrito na literatura, a exemplo da epigallocatequina galato (EGCG) encontrada no chá verde. Os dados sugeriram que EGCG pode proporcionar efeitos protetores contra cânceres relacionados a hiperativação hormonal: câncer de mama ou da próstata.

Investigações extensas *in vitro* usando linhagens celulares responsivas e não responsivas à hormônios mostraram que EGCG induz apoptose e altera a expressão de proteínas reguladoras do ciclo celular que são críticas para a sobrevivência e apoptose (WU; BUTLER, 2011).

No entanto, o efeito da cafeína é controverso, pois este metabólito parece estar associado, embora com baixa relação ao risco de câncer de mama em mulheres na pós-menopausa (JIANG; WU; JIANG, 2013). Além disso, a cafeína pode atenuar as respostas das células tumorais de mama à quimioterapia em função de sua capacidade intercalante na fita dupla do DNA (HILL; MORIARITY; SETZER, 2011). Em contraste, um estudo realizado em células tumorais de mama tratadas com paclitaxel demonstrou que a administração de cafeína aumentou a indução de apoptose desencadeada pelo medicamento quimioterápico (SAUNDERS et al., 1997). Observou-se ainda que o co-tratamento com agentes antitumorais e 6-selenocafeína reduziu a viabilidade celular da linhagem MCF-7 (MARTINS et al., 2013).

A cafeína, teobromina e teofilina são os membros mais conhecidos das metilxantinas. Em estudo *in vitro*, a cafeína inibiu a proliferação de células HOS (ostossarcoma humano) e suprimiu as atividades das vias NF- κ B, AKT, mTOR/S6K e ERK (MIWA et al., 2012). A teofilina desregulou a expressão do fator de *splicing* rico em arginina/serina 3 (SRSF3) e mudou p53 de isoformas α para β , assim como a cafeína nas linhagens HeLa (linhagem de câncer de colo de útero) e MCF-7 (câncer de mama). A teofilina induziu a apoptose celular, senescência e diminuição de formação de colônias. A teofilina reduziu a proliferação celular, enquanto a cafeína apresentou taxas aumentadas de proliferação (CHANG, et al., 2017). A teobromina inibiu a proliferação, aumentou os níveis intracelulares de cAMP, e diminuiu a ativação da via de sinalização do fator nuclear kappa B em células de glioblastoma humano (SUGIMOTO et al., 2014).

2.5.2 Guaraná e atividade antioxidante

A suplementação com extratos de alimentos antioxidantes em células tronco mesenquimais senescentes parece diminuir o processo de senescência, bem como reduzir o potencial de dano causado pelo estresse oxidativo (NORONHA et al., 2019).

Vários trabalhos vêm demonstrando o potencial antioxidante do guaraná e relacionando essa característica a quantidade de polifenóis (principalmente taninos) encontrado nos extratos (MATTEI et al. 1998; BASILE et al., 2005). Porém, Dalonso e Petkowicz, 2012 avaliaram a capacidade antioxidante do extrato metanólico e de polissacarídeos, o extrato metanólico exibiu uma alta capacidade de eliminação de radicais DPPH (90,9%) com dose de (10 mg / ml) na mesma dose, o polissacarídeo mostrou atividade sequestrante de 68,4%. De modo que, os polissacarídeos também podem estar envolvidos na atividade antioxidante.

O guaraná exibiu efeito protetor *in vitro* contra citotoxicidade e estresse oxidativo em células de fibroblastos murinos NIH-3T3 induzidas pela exposição a nitroprussiato de sódio (SNP). No entanto, esses efeitos dependeram da concentração de guaraná, com as concentrações de extrato mais eficazes variando de 0,5 a 5 mg/ml. Estes resultados sugerem que o guaraná tem uma ação bioativa *in vitro* sobre a modulação do óxido nítrico (ON), possuindo ação antioxidante em situações com níveis mais altos de ON celular (BITTENCOURT et al., 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da exposição do meio condicionado em células previamente tratadas com extrato hidroalcoólico de guaraná na capacidade proliferativa e migratória de células tumorais de mama e de pulmão.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de viabilidade, o efeito antioxidante e o perfil de morte celular em linhagens tumorais e em células de característica de microambiente tumoral tratados com EHG.

- Avaliar a capacidade proliferativa e clonogênica das células tumorais de mama e de pulmão cultivadas com os meios condicionados gerados em células de características de microambiente tumoral;

- Avaliar o perfil de migração e do ciclo celular da linhagem tumoral pulmonar submetida aos meios condicionados nas células de características de microambiente tumoral previamente tratadas com EHG;

PARTE II

CAPÍTULO I

ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTIOXIDANTE E MECANISMO DE MORTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GUARANÁ EM LINHAGENS CELULARES

Artigo em preparação

ATIVIDADE CITOTÓXICA, ANTIOXIDANTE E MECANISMO DE MORTE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE GUARANÁ EM LINHAGENS CELULARES

Patrícia Rayná Simas de Souza¹, Kalil Araújo Silva², Giane Engel Montagner³, Patrícia Gomes³, Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria^{1,2}

1 Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Universidade Federal do Amazonas.

2 Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas.

3 Programa de Pós-graduação em Nanociências, Universidade Franciscana.

RESUMO

O guaraná é um fruto amazônico rico em metilxantinas, como a cafeína e teobromina, entre outros metabólitos. Em função do alto teor de cafeína, é comumente utilizado em bebidas tônicas e estimulantes. O guaraná possui atividades biológicas descritas, como: antioxidante, antiinflamatória e antitumoral. O objetivo deste trabalho consistiu em avaliar o efeito direto do extrato hidroalcoólico de guaraná (EHG) em diferentes linhagens celulares. Os metabólitos majoritários presentes no extrato: cafeína, teobromina, teofilina e catequina foram quantificados por RP-HPLC. Os valores de CI50 do EHG foram obtidos através de ensaios de viabilidade por metabolização dos reagentes MTT, resazurina e por coloração com vermelho neutro. A atividade antioxidante foi avaliada através da sonda fluorescente DCFDA e perfil de morte por marcação com Anexina V/7AAD por citometria de fluxo. A análise cromatográfica do extrato permitiu identificar uma elevada concentração de cafeína seguido de teofilina, teobromina e catequina. O tratamento direto com EHG revelou perfis e valores de CI50 heterogêneos entre as linhagens celulares avaliadas: MDA-MB 231, MCF7, MCF10A, A549, BEAS-2B, NIH-3T3, MRC5, NCTC clone 929, THP-1 diferenciada em macrófagos. A linhagem mais resistente foi a de adenocarcinoma de pulmão (CI50=17652±10,22 µg/ml), enquanto a mais sensível foi o fibroblasto murino (CI50=1504±34,78 µg/ml). As concentrações 500 e 1000 µg/ml de EHG demonstraram atividade antioxidante reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) na linhagem MDA-MB 231 tanto em condições basais quanto sob estresse oxidativo. THP-1 diferenciadas em macrófagos sob estresse oxidativo e pré-tratadas com 1000 µg/ml apresentaram redução nos níveis de EROS. O tratamento com o valor de CI50 de EHG (12.022±10.73 µg/ml) direciona células BEAS-2B para um perfil de morte por apoptose. Coletivamente, os resultados mostram que o EHG possui perfil heterogêneo quanto à citotoxicidade. Além disso, o extrato apresenta atividade antioxidante em linhagens celulares e induz um perfil apoptótico de morte celular. Nossos resultados reforçam a indicação do extrato de guaraná como possível terapêutica adjuvante no tratamento do câncer.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*; guaraná; células tumorais, macrófagos.

INTRODUÇÃO

O guaraná (*Paullinia cupana*) é um fruto de planta nativa brasileira, originária da região Amazônica comumente empregada em bebidas caseiras e industriais, como tônico e estimulante (MARQUES et al., 2019; BITTERCOURT et al., 2016; SCHIMPL et al., 2013). O guaraná apresenta altas concentrações de metilxantinas, sendo a cafeína, o componente majoritário seguida de teobromina e teofilina. Além disso, contém taninos condensados, como as epicatequinas, proantocianidinas e catequinas (MARQUES et al., 2019; SCHIMPL et al., 2013). Bittencourt et al., (2014) quantificou os metabólitos presentes no guaraná e encontrou 34,19±1,26 mg/g de cafeína, 0,14±0,01 mg/g de teobromina, 3,76±0,12 mg/g de catequina e 4,05±0,16 mg/g de epicatequina.

Vários estudos descrevem suas propriedades antioxidantes (SILVA, 2019; CAMPOS et al., 2011; DALONSO; PETKOWICZ, 2012), antiinflamatória (CARVALHO, 2016), antitumoral (FUKUMASU et al., 2008; CADONÁ et al., 2016; CADONÁ et al., 2017), dentre outras. Destacadamente, estudos *in vitro* e *in vivo* apontam a redução na proliferação tumoral e indução de apoptose com a administração do guaraná (FUKUMASU et al., 2008; BITTENCOURT et al., 2013). Coletivamente, o efeito protetivo do guaraná contra danos químicos e oxidativos apontam sua potencial administração como adjuvante no tratamento oncológico (FUKUMASU et al., 2006; HERTZ et al., 2015).

Cadoná et al. (2017) descreveu que o guaraná inibe *in vitro* a via MAPKs na linhagem de câncer de mama e sinalização por mTOR em células de câncer de mama e colorretal. Tal bloqueio promoveu a redução na proliferação celular e a capacidade clonogênica das células sugerindo sua aplicação como um fármaco com atividade antitumoral. Em um estudo pré-clínico Fukumasu et al. (2008) identificou que o guaraná reduz a proliferação e induz a apoptose em metástases pulmonares de células de melanoma B16/F10 em camundongos. Neste sentido, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do extrato hidroalcoólico de guaraná em linhagens celulares, tanto tumorais quanto normais, avaliando seu perfil citotóxico, antioxidante e o mecanismo de morte celular associado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e preparo do extrato hidroalcoólico de guaraná (EHG)

Neste trabalho foi utilizado o guaraná em pó cedido pela Associação dos Agricultores Familiares do Alto Urupadi (AAFAU), localizada na Comunidade Nossa Senhora de Nazaré, polo 11 do Alto Urupadi, a 80 km da cidade de Maués, Amazonas. A amostra obtida pertence à safra de 2017, lote nº 1. Todos os dados referentes à espécie vegetal, local de coleta e o foco da pesquisa foram submetidos ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Adquirido (SisGen) vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA). O Comprovante de Cadastro de Acesso e o número do Cadastro encontram-se no Anexo I.

Para geração das frações solúveis, o extrato hidroalcoólico foi obtido como descrito por Bittencourt et al. (2013). O pó de guaraná foi diluído para uma concentração final de 200 mg/ml em solução etanol: água (70:30). Após 24 horas sob agitação, essa suspensão foi submetida a centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à rotavaporização a 50°C até eliminação completa do solvente. Em seguida ao passo de remoção do etanol, a solução foi submetida a liofilização. O extrato seco foi ressuspenso em tampão fosfato salino (PBS) (200 mg/ml) e homogeneizado em agitador magnético por 10 minutos. Após a homogeneização, a solução foi transferida para um tubo de 50 ml e infundida em água fervente por 7 minutos. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e distribuído em alíquotas de 200 µl em tubos de 1,5 ml que foram armazenadas no freezer a -80°C para utilização posterior nos experimentos.

Quantificação de metabólitos do extrato seco de guaraná por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

O extrato hidroalcoólico de guaraná foi injetado na concentração de 500 µl/ml no cromatógrafo líquido de alta eficiência para a quantificação dos metabólitos, A

análise cromatográfica foi realizada segundo Roggia et al. (2020) para análise de metilxantinas (teobromina, teofilina e cafeína) e taninos (catequina e epicatequina).

Cultivo celular

As linhagens humanas: MDA-MB 231 (ATCC® HTB-26™) carcinoma de mama, A549 (ATCC® CCL-185™) carcinoma de pulmão, MCF10A (ATCC®CRL-10317™) células epiteliais mamárias normais, BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) células epiteliais pulmonares normais, THP-1 (ATCC® TIB-202™) monócitos de sangue periférico humano, cedidas pelos colaboradores Dr. Dawidson Assis Gomes (ICB/UFMG) e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (UFU) foram utilizadas nos experimentos. Ademais, foram utilizadas as linhagens: MRC5 (ATCC® CCL-171™), fibroblasto humano normal, MCF7 (ATCC® HTB-22™), adenocarcinoma mamário, NCTC clone 929 (ATCC® CCL-1™), fibroblasto murino e NIH-3T3 (ATCC® CRL-1658™), fibroblasto murino.

As linhagens NIH-3T3 e NCTC clone 929 foram cultivadas em meio basal de Dulbecco, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* high-glucose (DMEM; Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (Life Technologies), 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies).

A linhagem MCF10A foi mantida em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12; *Life Technologies*) suplementando com fator de crescimento epidermal (EGF) (20 ng/mL), hidrocortisona (0.5 µg/mL), insulina (10 µg/ml), toxina colérica (100 ng/mL), 10% de soro fetal bovino (Life Technologies), 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies).

As linhagens BEAS-2B, A549, MDA-MB 231e MCF7 foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12; *Life Technologies*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies), 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies).

As células THP-1 foram mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640* da *Life Technologies* suplementado com 10% de soro fetal bovino (Life Technologies), 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Life

Technologies). Para a indução da diferenciação das células, os monócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) na concentração de 10 ng/ml durante 48 horas, após esse período as células foram lavadas com PBS 1X e o meio de cultura renovado para descanso por 48 horas até início dos experimentos.

Todos os meios foram devidamente filtrados em membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (Millipore). As células foram mantidas em garrafas T75, armazenadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% v/v CO₂ e o meio substituído a cada 3 dias. As subculturas celulares foram realizadas quando as garrafas de cultura atingiram uma confluência aproximada de 70 a 80%.

Isolamento de fibroblasto primário de pele de camundongo e cultivo celular

A utilização de modelo animal foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amazonas – UFAM sob o nº 031/2019. Os fragmentos de pele foram isolados de camundongos da linhagem *swiss* e colocados em uma placa de Petri com solução tampão salina fosfato 0,15 mol/L pH 7,2 (PBS 1x). Em capela de fluxo laminar, os fragmentos foram colocados em tubo cônico de polietileno de 15 ml estéril, em seguida, centrifugado por 7 minutos a 234 xg em PBS 1x, no intuito de isolar do sobrenadante as células gordurosas, sanguíneas e impurezas que dificultam a aderência das células fibroblásticas nas placas de cultura. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 2 ml de solução de colagenase tipo 1, 0,10% m/V (Thermo Fisher Scientific) para digestão da matriz extracelular, por 90 minutos, em estufa 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Durante esse período a cada 15 minutos, o tubo contendo o tecido foi agitado vigorosamente para facilitar a ação da colagenase. O tubo foi centrifugado novamente a 234xg por 7 minutos a temperatura ambiente. Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo a pele com fração celular foi ressuspense em meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% e transferido com o explante para dois poços de placas de cultura celular que foram mantidas em estufa 37°C, atmosfera úmida e 5% CO₂. Após dois dias de repouso, o conteúdo das placas de cultura foi novamente transferido para tubos de polietileno (15 ml) e centrifugado a 234xg por 7 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado, o precipitado formado ressuspense em meio de cultura DMEM suplementado com

SFB 10% e recolocado nas placas de cultura A cada dois dias, o meio de cultura era removido, o poço da placa lavado com 1 ml de PBS 1x para remoção de células sanguíneas e gordurosas residuais e fibroblastos não aderentes, e recolocado 1 ml de meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10%. As placas foram examinadas ao microscópio até que fossem observados grupos de fibroblastos aderidos, o que ocorria em torno de 7 dias. Os fragmentos de pele eram então descartados e após alguns dias, com uma maior densidade de células, transferidos para garrafas de cultura celular.

Quando as células atingiram 80% de confluência na garrafa, o meio de cultura foi retirado, as células lavadas com PBS 1x e tratadas com tripsina 0,05% EDTA por 5 minutos. Após a ação da tripsina, a garrafa recebia meio de cultura DMEM suplementado com SFB 10% na proporção de 3 vezes o volume da tripsina para sua inativação, e a suspensão formada colocada em mais garrafas. Inicialmente foi utilizada a garrafa T25 e a seguir a garrafa T75.

Os fibroblastos primários foram cultivados em meio basal de Dulbecco, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* high-glucose (DMEM; Sigma-Aldrich) suplementado com 5 mM de bicarbonato de sódio, 10% de soro fetal bovino (Life Technologies), 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (Life Technologies). As células primárias utilizadas no ensaio de viabilidade estavam na terceira passagem.

Ensaio de viabilidade celular e obtenção do valor de CI50 do EHG

Os ensaios baseados na metabolização dos reagentes MTT, resazurina e marcação lisossomal com vermelho neutro foram utilizados para avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de guaraná na viabilidade das células MDA-MB-231, MCF10A, BEAS-2B, A549, THP-1, MCF7, NIH-3T3, NCTC clone 929, MRC5 e fibroblastos primários murinos.

Ensaio de metabolização do reagente MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina]

Neste experimento, as células MDA-MB 231, MCF10A, MCF7, MRC5, NIH-3T3, NCTC clone 929, fibroblasto primário murino e A549 foram plaqueadas em

placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células/poço, as células BEAS-2B na densidade de 2×10^4 e as células THP-1 diferenciadas em macrófagos foram plaqueadas na densidade de $1,2 \times 10^5$ células/poço (Placa 96 poços) sendo mantidas na estufa a 37°C com 5% de CO_2 . No segundo dia, as células foram incubadas com diferentes concentrações de EHG (50000, 25000, 10000, 5000, 2500, 2000, 1000, 750, 500, 100, 50, 25 e 10 $\mu\text{g/ml}$) para a determinação da concentração inibitória 50% (CI50). Como controle positivo de morte celular foi utilizada dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 20% (Sigma-Aldrich) em meio completo, e o controle negativo consistiu de células não tratadas. Decorridas 24 horas de incubação, em cada poço foram adicionados o reagente MTT: 105 μl de meio acrescido de 85 μl da solução estoque de MTT (5 mg/ml) para as células MDA-MB 231, MCF10A, NIH-3T3, NCTC clone 929, MCF7 e A549, e 90 μl de meio acrescido de 100 μl da solução estoque de MTT (5 mg/ml) para BEAS-2B, MRC5 e THP-1. Após 2 horas para as células MDA-MB 231, MCF10A, NIH-3T3, NCTC clone 929, MCF7 e A549, e 4 horas para BEAS-2B, MRC5 e THP-1, os cristais de formazan formados foram solubilizados com a adição de 100 μl de solução isopropanol acidificado com 0,04N de HCl (MOSMANN, 1983). Após 20 minutos no agitador de placas foi realizada a leitura a 595 nm no leitor de placas (Chameleao™ V Multitecnológico) do laboratório de Purificação de Biomoléculas – CAM/ UFAM.

Metabolização do reagente resazurina (7-hidroxi- 3H -fenoxazin-3-ona 10-óxido)

As células foram plaqueadas e tratadas conforme item anterior. Decorridas 24h de incubação com os tratamentos, em cada poço foram adicionados 5 μl de resazurina (3 mM) acrescidos de 95 μl de meio completo. Após 3 horas de incubação a placa foi lida em 570nm e 595nm no leitor de placas do laboratório de Purificação de Biomoléculas – CAM/ UFAM.

Marcação lisossomal com corante vermelho neutro

As células foram plaqueadas e tratadas conforme o protocolo de MTT. Decorridas 24h de tratamento, o procedimento de marcação lisossomal com vermelho neutro foi realizado de acordo com Repetto, del Peso e Zurita (2008). A

leitura foi realizada a 540 nm no leitor de placas do laboratório de Purificação de Biomoléculas – CAM/ UFAM.

Avaliação da atividade antioxidante do EHG

Este ensaio foi conduzido nas células tumorais MDA-MB 231 e em monócitos diferenciados em macrófagos, THP-1. Células MDA-MB 231 foram plaqueadas na densidade 1×10^4 células/poço em placa 96 poços. Células THP-1 plaqueadas na densidade de $1,2 \times 10^5$ diferenciadas com 10 ng/ml de PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) por 48 horas. As células foram tratadas com as concentrações 100, 500 e 1000 $\mu\text{g/ml}$ de EHG, após 24 horas foram lavadas com *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) 1X. O grupo controle antioxidante foram células tratadas por 1h com o flavonoide quercetina na concentração de 50 μM . Após esse período, em todos os grupos foram acrescentados de 25 μM da sonda fluorescente DCFDA (2',7'-Diclorofluoresceína diacetato) em solução HBSS 1X por 45 minutos. Após esse período, as células foram lavadas para retirada da sonda com HBSS 1X e parte dos grupos foram submetidos ao estresse oxidativo utilizando 100 μM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por 1 hora, enquanto a outra parte permaneceu em solução de HBSS 1x. Após 1 hora, as células foram raspadas com o auxílio de uma ponteira P200 e transferidas para uma placa preta de fundo opaco para leitura da fluorescência (excitação em 488 e emissão em 535) no leitor de microplacas do Laboratório de Purificação de Biomoléculas do CAM/UFAM.

Avaliação do mecanismo de morte induzido pelo EHG por citometria de fluxo

As células BEAS-2B foram plaqueadas em placa de 6 poços na densidade de 1×10^6 células por poço. Após 24h, as células foram tratadas com a concentração inibitória 50% (CI50) de EHG, para controle de morte foi utilizado cisplatina (10 μM) e controle negativo de morte consistiu de células não tratadas. Após 24h de tratamento, as células foram lavadas com PBS 1x e retiradas da placa por ação enzimática utilizando solução Tripsina-EDTA a 0,05%. Após inativação com meio completo, as células foram centrifugadas a 200 xg por 5 minutos e ressuspensas em uma concentração final de 1×10^6 células/ml em PBS 1x gelado. A lavagem foi realizada duas vezes e em seguida foram ressuspensas em tampão de ligação 1x

(Kit I PE Annexin V Apoptosis Detection, BD Pharmingen™). 100 µL (1×10^5 células) foi transferido para um tubo de 5 mL e adicionados 5 µL de Anexina V e 5 µL de 7-AAD e após a homogeneização, o tubo foi incubado por 15 minutos à temperatura ambiente (25°C) no escuro. Após esse período foi adicionado 400 µL de tampão de ligação 1x em cada tubo e analisado no citômetro BD Acurri C6. Procedeu-se com a leitura de 50.000 eventos. Na análise foram consideradas células apoptóticas marcadas com Anexina-V/PE, apoptóticas tardias/necróticas para células duplamente marcadas com Anexina V-PE e 7-AAD e células necróticas, as células marcadas somente com 7-AAD e as células viáveis correspondentes ao quadrante sem marcação. Os resultados foram analisados no *software FlowJo* versão 10.6.1.

Análise estatística

Os dados foram obtidos pela realização de pelo menos três experimentos independentes e expressos utilizando a média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software GraphPad Prism 8*. Para a obtenção dos valores de CI50 foi realizada uma análise de regressão não-linear. Com o objetivo de avaliar a significância das diferenças observadas entre os grupos estudados foi conduzida a análise de variância one-way ANOVA e quando aplicado, teste de comparação de médias (Tukey's).

RESULTADOS

EHG apresenta a cafeína como metabólito majoritário seguido de teofilina

A amostra apresentou as metilxantinas (teobromina, teofilina e cafeína) e taninos (catequina), conforme Figura 1. O cromatograma apresenta outros picos nos tempos de retenção (tr) de 5,9 min; 6,5 min e 15,9 min. Porém, essas substâncias não foram identificadas e quantificadas, devido à ausência dos metabólitos de referência. Na tabela 1 é indicado o teor dos marcadores encontrados na amostra.

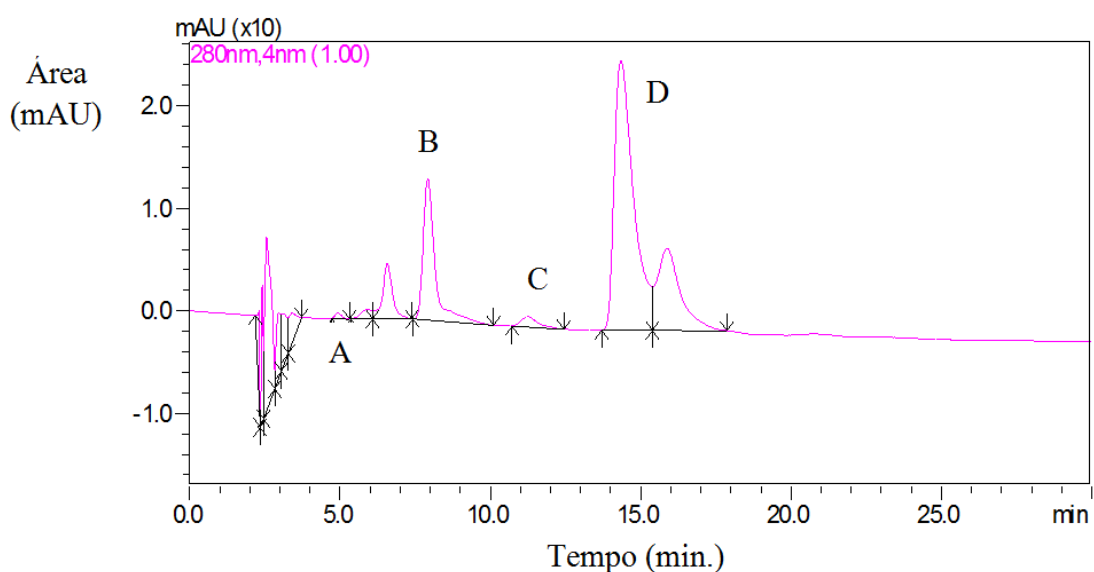


Figura 1 – Cromatograma obtido através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) da amostra de extrato de seco de guaraná, na concentração de 500 µg/mL. A: Teobromina (tr= 4,9 min), B: teofilina (tr= 7,9 min), C: catequina (tr= 11,3 min), D: cafeína (tr= 14,3 min).

Tabela 1 - Teor dos marcadores encontrados na amostra do extrato seco de guaraná.

Marcador	Teor (µg/mL)	Teor (%)
Teobromina	0,537 ± 0,03	0,11 ± 0,01
Teofilina	7,446 ± 0,38	1,49 ± 0,08
Catequina	4,116 ± 0,20	0,82 ± 0,04
Cafeína	23,443 ± 0,10	4,69 ± 0,02

Células normais, tumorais e células primárias tratadas com EHG apresentam perfil distinto de viabilidade

O efeito do EHG na viabilidade celular foi avaliado pelo ensaio de metabolização dos reagentes MTT e resazurina com concentrações do extrato variando de 10 – 50000 µg/ml em 24 horas de exposição. Os valores obtidos de CI50 (Concentração Inibitória 50%) do extrato hidroalcoólico de guaraná, bem como os gráficos com as curvas dose-resposta do EHG nas linhagens celulares tumorais: A549, MDA-MB 231, MCF7; linhagens normais de mama e pulmão MCF10-A e BEAS-2B; linhagens de fibroblastos: NCTC clone 929, MRC-5, NIH-3T3, monócitos diferenciados em macrófagos: THP-1 e células primárias de fibroblastos murinos são apresentados, respectivamente, na tabela 2 e figura 2.

Tabela 2 - Determinação dos valores de CI50 do EHG em diferentes linhagens celulares por ensaio de metabolização de MTT^(a) (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina) e resazurina^(b) (7-hidroxi- 3H -fenoxazin-3-ona 10-óxido). Os valores são descritos com média ± desvio padrão. As concentrações de EHG são descritas em µg/ml. (n=4).

A549 ^(b)	17652±10,22
MCF10A ^(b)	16872±15,47
MRC-5 ^(a)	9426±20,08
MCF-7 ^(a)	6771±25,22
MDA-MB 231 ^(a)	4549±16,36
BEAS-2B ^(b)	3438±11,11
Fibroblasto primário murino ^(b)	3392±11,65
NCTC clone 929 ^(b)	2573±9,76
THP-1 ^(a)	2265±21,31
NIH-3T3 ^(a)	1504±34,78
CI50, concentração inibitória 50%.	

Dentre as linhagens tumorais avaliadas, a linhagem de carcinoma de pulmão humano A549 foi a mais resistente ao efeito citotóxico do EHG necessitando de 17652±10,22 µg/ml para atingir o valor de CI50, sendo a menos resistente a linhagens de adenocarcinoma de mama MDA-MB 231 (CI50 = 4549±16,36 µg/ml).

Considerando as células de características de microambiente tumoral analisadas, a linhagem epitelial mamária normal MCF10A foi a mais resistente necessitando de 16872±15,47 µg/ml de EHG para atingir a CI50, enquanto THP-1

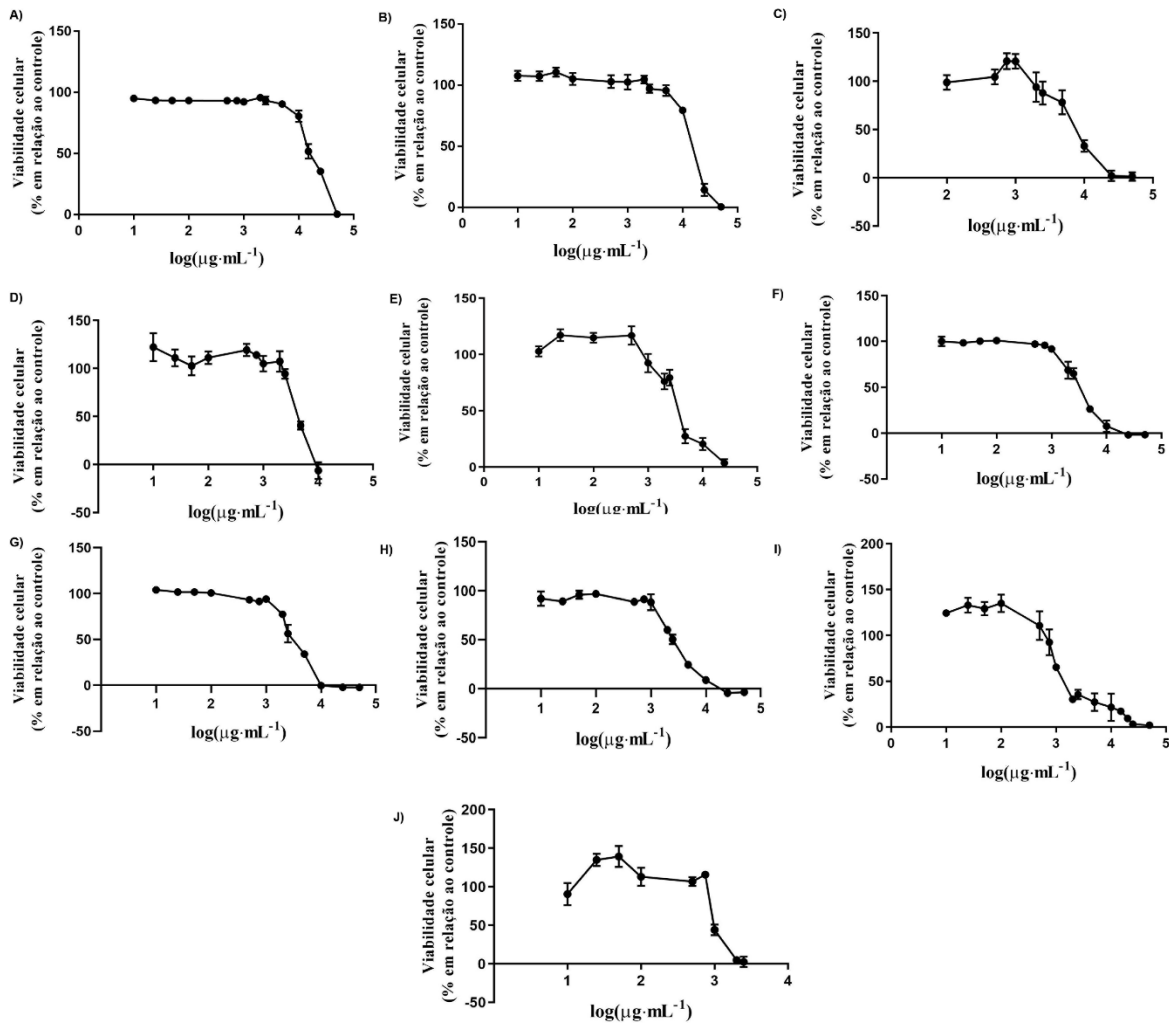


Figura 2 - Efeito do tratamento com EHG na viabilidade de diversas linhagens celulares. Curva dose-resposta de EHG nas células (A) A549, carcinoma de pulmão, (B) MCF10A, célula epitelial mamária normal, (C) MRC-5, fibroblasto humano normal, (D) MCF-7, adenocarcinoma mamário, (E) MDA-MB-231, adenocarcinoma de mama humano, (F) BEAS-2B, célula epitelial humana de pulmão, (G) Fibroblasto primário murino, (H) NCTC clone 929, fibroblasto murino, (I) THP-1, monócito de sangue periférico humano, (J) NIH-3T3, fibroblasto murino. As células com 70-80% de confluência foram tratadas com EHG (25-50000 µg/ml) em meio de cultura completo por 24h, após esse período foi realizado o ensaio de metabolização de MTT (C, D, E, H e I) ou resazurina (A, B, F e G) para determinar a viabilidade das células. Os dados são expressos com média \pm desvio padrão (n=4). EHG, extrato hidroalcoólico de guaraná.

diferenciada para macrófagos, necessitou de $2265 \pm 21,31$ µg/ml. A avaliação da viabilidade de células ao EHG foi conduzida em linhagens celulares de fibroblastos murinos e humanos. Dentre os tipos celulares analisados, a linhagem de fibroblasto humano MRC5 foi o mais resistente tendo como CI50 $9426 \pm 20,08$ µg/ml de EHG. Já as células de fibroblastos primários isolados da derme de camundongo apresentaram um valor de CI50 de $3392 \pm 11,65$ e a linhagem menos resistente foi o

fibroblasto murino NIH-3T3 necessitando com valor de CI50 EHG de 1504±34,78 µg/ml.

As linhagens BEAS-2B e THP-1 diferenciadas para macrófagos foram avaliadas por três ensaios de citotoxicidades: metabolização de MTT, metabolização de resazurina e coloração com vermelho neutro. Ambas as linhagens apresentaram resultados distintos nos protocolos: metabolização de resazurina e vermelho neutro em relação ao obtido pela metabolização de MTT (TABELA 3). Na linhagem BEAS-2B, a metabolização da resazurina apresentou um CI50 maior que o grupo MTT ($p < 0,0001$) enquanto vermelho neutro obteve um valor menor de CI50 ($p < 0,05$). Na linhagem de THP-1, tanto resazurina quanto vermelho neutro obtiveram valores superiores de CI50 ($p < 0,0001$) quando comparados à metabolização do MTT. Esses resultados demonstram que os ensaios de citotoxicidades não seguiram um padrão para o EHG nas linhagens celulares, tendo resultados diferentes em relação ao MTT, sendo este o ensaio de citotoxicidade mais comumente usado para viabilidade celular (MARKOSSIAN et al., 2004).

Tabela 3 - Determinação dos valores de CI50 do EHG em BEAS-2B e THP-1 por diferentes métodos de citotoxicidades. Os valores são descritos com média ± desvio padrão. As concentrações de EHG são descritas em µg/ml. (n=4). As diferenças estatísticas entre os ensaios de citotoxicidade em relação à metabolização do MTT são descritas por letras minúsculas onde, ^a significa diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, ^b significa diferença estatística ($p < 0,0001$) pelo teste de Tukey.

	MTT	Resazurina	Vermelho Neutro
BEAS-2B	2330±16,19	3438±11,11 ^b	2287±14,48 ^a
D THP-1	2265±21,31	4338±15,95 ^b	4429±21,06 ^b

Concentrações baixas de EHG aumentam o metabolismo em linhagens celulares

Nos experimentos de viabilidade realizados nas linhagens THP-1, MDA-MB 231 e NIH-3T3 (FIGURA 2) foi observado para baixas concentrações do extrato, aumento na viabilidade celular. Assim, para avaliar este perfil, as células foram tratadas por 24h com as concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/ml de EHG. Em células MDA-MB 231, observa-se um aumento na viabilidade em relação ao grupo controle para células tratadas nas concentrações de 25 e 100 µg/ml. Células THP-1 diferenciadas em macrófagos apresentaram um aumento dose-dependente na

viabilidade. Em células NIH-3T3, observa-se o aumento na viabilidade nas as concentrações 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$, mas não para o tratamento com 100 $\mu\text{g/ml}$.

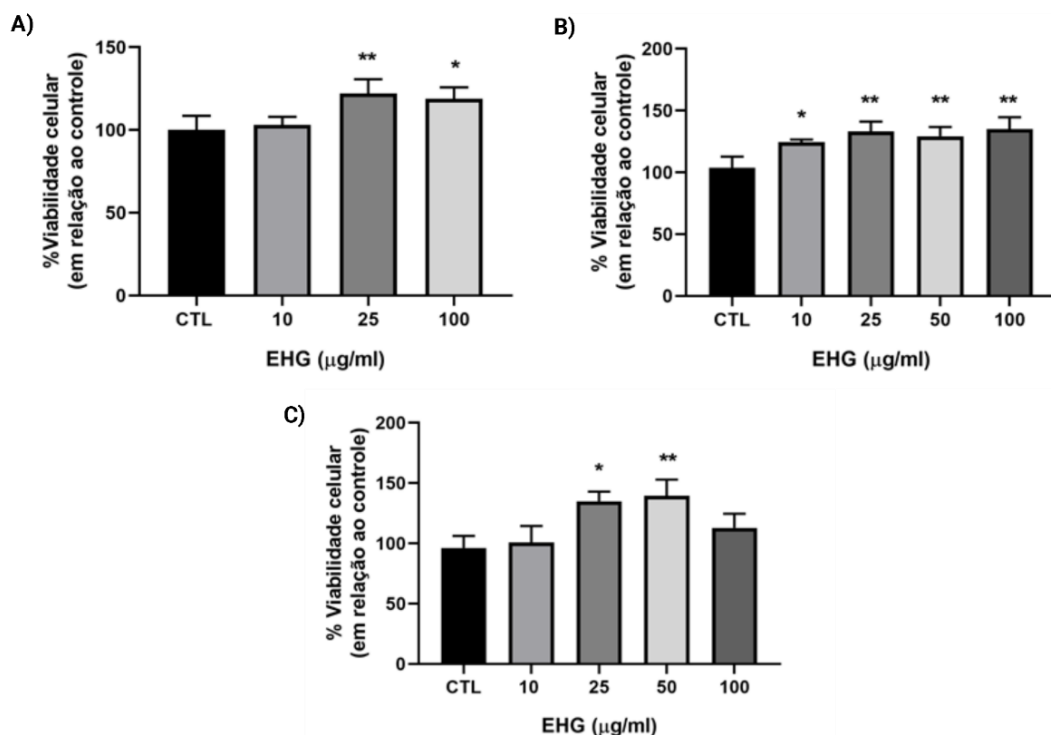


Figura 3 - Viabilidade celular de MDA-MB 231, THP-1 e NIH-3T3 tratadas com baixas concentrações de EHG. As células (A) MDA-MB 231 apresentaram um aumento na viabilidade nas doses de 25 e 100 $\mu\text{g/m}$. (B) monócitos THP-1 diferenciados em macrófagos apresentaram aumento na viabilidade frente ao tratamento em todas as concentrações testadas (C) Em NIH-3T3, 24 horas de tratamento com EHG aumentou a proliferação nas concentrações 25 e 50 $\mu\text{g/ml}$, (n=3) * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$

EHG apresenta atividade antioxidante em linhagens tumoral de mama e em monócito diferenciado em macrófagos

Em um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, a capacidade antioxidante do EHG foi avaliada por equivalência de trollox e os resultados mostraram alta capacidade antioxidante (SILVA, 2019). Para avaliação da atividade antioxidante de EHG *in vitro* foi conduzida a quantificação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) em linhagens MDA-MB 231 e THP-1 diferenciada em macrófagos previamente tratadas com o extrato em concentrações não citotóxicas. Assim, a detecção de EROs foi realizada utilizando a sonda fluorescente DCFDA em

células submetidas ou não ao estresse oxidativo. Na linhagem MDA-MB 231 (FIGURA 4A), o tratamento com EHG reduziu os níveis basais de EROs nas concentrações de 1000 µg/ml e 500 µg/ml. Em células MDA-MB 231 submetidas ao estresse oxidativo com peróxido de hidrogênio, todas as concentrações de EHG testadas, incluindo a dose de 100 µg/ml apresentaram redução nos níveis de EROs comparadas ao grupo controle. Além disso, a concentração de 1000 µg/ml de EHG se iguala ao tratamento com quercetina (50µM), um flavonoide com capacidade antioxidante descrita (YOKOMIZO; MORIWAKI, 2006; ZHANG et al., 2011).

Na linhagem de monócitos de sangue periférico diferenciados em macrófagos (FIGURA 4B), o tratamento com o EHG não apresentou alteração nos níveis basais de EROs. No entanto, quando as células que foram submetidas ao estresse oxidativo, a concentração de 1000 µg/ml de EHG promoveu uma redução significativa nos níveis de EROs em relação ao observado para o grupo controle.

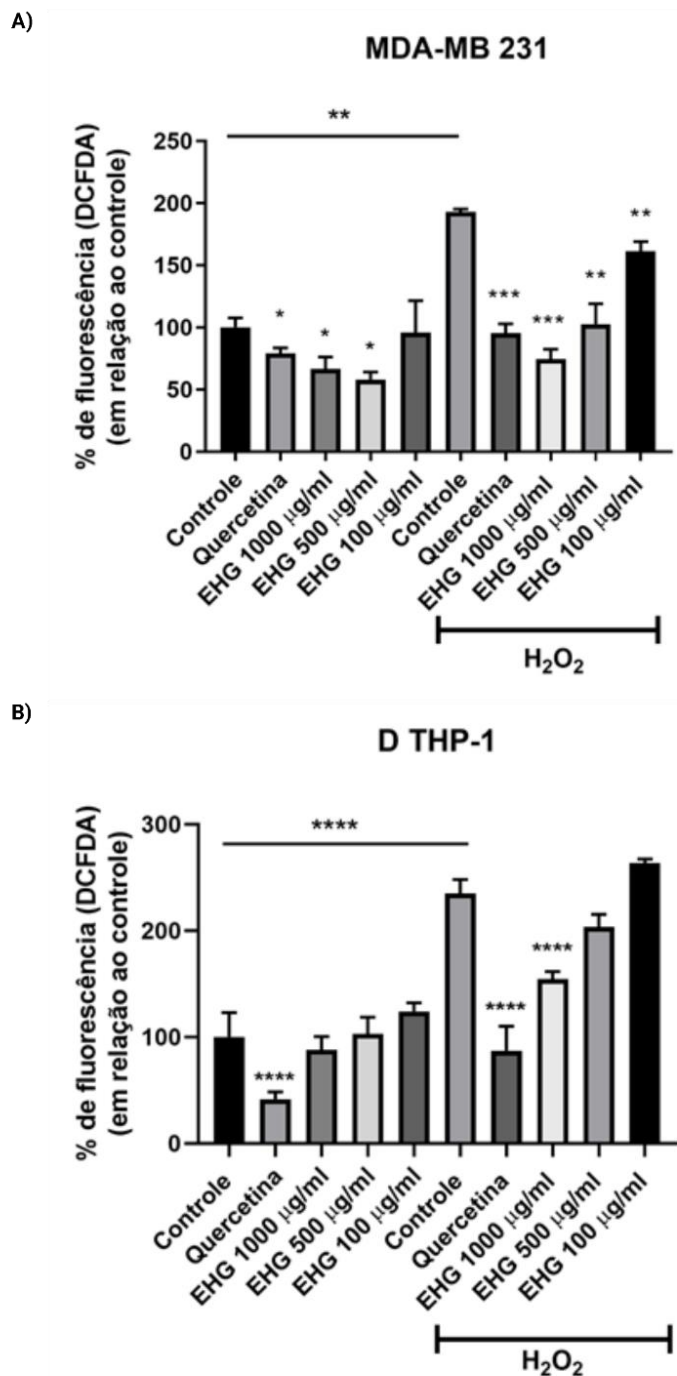


Figura 4 - Potencial antioxidante do extrato hidroalcoólico de guaraná nas células tumorais de mama e monócitos diferenciados em macrófagos. (A) MDA-MB 231 e (B) THP-1. Os níveis de espécies reativas de oxigênio foram analisados através da sonda fluorescente 2'7'-Acetato Diclorofluoresceína (DCFDA). Células foram tratada por 24 horas com as concentrações de EHG e após esse período, o grupo Quercetina (50 µM) por 1 hora, e a sonda foi aplicada por 45 minutos. O estresse oxidativo foi induzido utilizando peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (50 µM) por 1 hora. Após esse período, as células foram raspadas e transferidas para a placa de fundo preto para leitura da fluorescência em 488nm/535nm. * p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001e **** p< 0,0001 (n=4).

O EHG promove morte celular por apoptose

Uma vez que o EHG promove redução na viabilidade celular (FIGURA 1), seguiu-se com a análise do mecanismo de morte desencadeado pelo extrato. A linhagem epitelial pulmonar BEAS-2B foi submetida ao tratamento com dose correspondente ao valor CI50 do EHG por 24h e marcada para Anexina V/7-AAD e análise por citometria de fluxo. Os dados quantificados revelaram uma maior marcação por anexina V do que por 7-AAD ou ambas conjuntamente, revelando que o EHG parece ativar vias que direcionam a célula para a apoptose (Figura 5A).

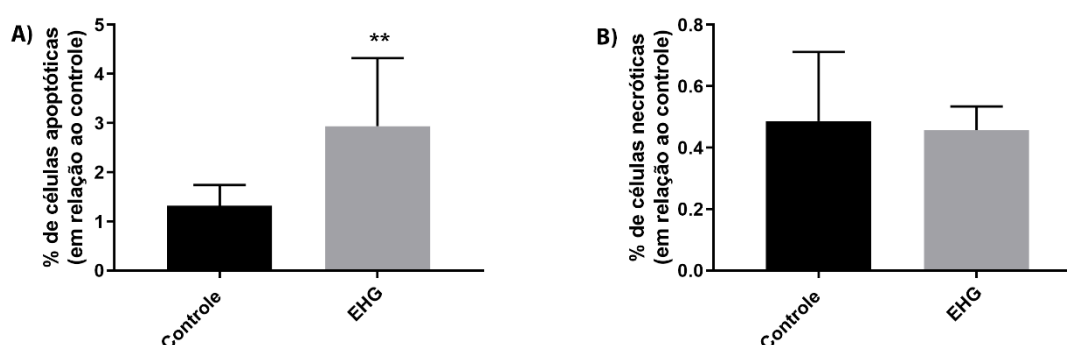


Figura 5 - Determinação do perfil de morte de BEAS-2B submetida ao tratamento com CI50 de EHG por marcação com Anexina V/7-AAD por citometria de fluxo. O EHG direciona BEAS-2B, célula epitelial humana de pulmão para um perfil de morte apoptótico (A). Os dados são expressos com média \pm desvio padrão (n=4). EHG, extrato hidroalcoólico de guaraná. **p<0,01

DISCUSSÃO

O guaraná é um fruto amazônico popularmente conhecido pelas suas propriedades estimulantes e tônicas, sendo e tais características atribuídas à presença de altas concentrações de metilxantinas (cafeína, teobromina e teofilina). Em adição, possui metabólitos como, taninos condensados (catequinas, epicatequinas, etc), entre outros compostos (MARQUES et al., 2019). De acordo com a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019), as sementes possuem no mínimo 4% de taninos totais, 5% de metilxantinas, sendo 3,5% de cafeína.

A análise química cromatográfica do extrato permitiu a identificação e quantificação dos metabólitos, sendo eles, cafeína, teobromina, teofilina e catequina. Observa-se que outros componentes se encontram presentes e em concentrações consideráveis, mas os mesmos não foram identificados por indisponibilidade dos

marcadores padrões. Como relatado na literatura, a cafeína apresenta-se como o componente majoritário na amostra, com teor de $4,69 \pm 0,02\%$, seguido de teofilina ($1,49 \pm 0,08\%$), catequina ($0,82 \pm 0,004\%$) e teobromina ($0,11 \pm 0,001\%$), os dados são semelhantes ao de Bittencourt et al. (2014) que determinaram a concentração de $\sim 3,4\%$ de cafeína, $\sim 0,3\%$ de catequinas e $\sim 0,01\%$ de teobromina no extrato de guaraná. Porém, em relação à cafeína, Peixoto et al. (2017) quantificaram cerca de 10% de cafeína, um valor superior ao dos resultados encontrados neste trabalho, mas encontrou resultados menores de teofilina (0,23%) e teobromina (0,01%) no extrato de guaraná analisado.

O pó do guaraná, bem como extratos gerados do mesmo apresentam distintas atividades biológicas descritas como: antioxidante, antitumoral, quimiopreventivo, entre outras (MARQUES et al., 2019). Com o objetivo de acessar a resposta de diferentes células ao extrato hidroalcoólico de guaraná, foi conduzida a análise de viabilidade após 24 horas de tratamento. Observou-se valores de CI50 do EHG heterogêneos entre as linhagens estudadas. Dentre este grupo de células, a linhagem de carcinoma pulmonar A549 apresentou a maior resistência a altas doses de EHG, apresentando valor CI50 de 17652 $\mu\text{g/ml}$. Santa Maria et al. (1998) determinou o CI50 do extrato aquoso de guaraná em linhagem de ovário de hamster chinês pela metabolização do MTT e determinou uma dose alta para inibição de 50% de viabilidade (34620 $\mu\text{g/ml}$) corroborando com os dados do nosso estudo. Lui, Zhou e Tang (2017) ao avaliar a citotoxicidade do componente majoritário do guaraná, a cafeína, nas linhagens de câncer gástrico MGC-803 e SGC-7901 verificou que a concentração de 4mM (776,76 $\mu\text{g/ml}$) reduziu em 50% a viabilidade celular após 24 horas de tratamento em ambas as linhagens. Considerando a caracterização do extrato, a concentração de cafeína corresponde ao CI50 nas linhagens tumorais analisadas foram: 827,8 $\mu\text{g/ml}$ para A549, 213,3 $\mu\text{g/ml}$ para MDA-MB 231 e 317,5 $\mu\text{g/ml}$ para MCF-7.

Baixas concentrações foram usadas por Hertz et al., (2015) para avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de guaraná na viabilidade da linhagem de câncer de mama MCF7. Observou-se que as doses 1, 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ não afetava a viabilidade celular em 24 horas, mas doses de 5 e 10 $\mu\text{g/ml}$ diminuíram a viabilidade em 72h. Tais dados reforçam o perfil de citotoxicidade dependente de dose e tempo de exposição do extrato hidroalcoólico de guaraná. Pois, foi observado este perfil de dose-dependência na linhagem de fibroblasto murino NIH-3T3, que apresentou em

24h CI50 de $1504 \pm 34,78$ $\mu\text{g/ml}$ e em 48h o CI50 decai para $88,1 \pm 16,21$ $\mu\text{g/ml}$ (Anexo V)

Similar de Hertz et al. (2015) em nosso estudo células MCF-7 não mostraram alteração na viabilidade após 24 horas de incubação com 10 $\mu\text{g/ml}$ de EHG. Nesta mesma concentração, células MDA-MB 231 não apresentam alteração na viabilidade em 24 horas de tratamento. No entanto, com o aumento da concentração para 25 $\mu\text{g/ml}$ as células apresentaram aumento de viabilidade. Esse aumento de viabilidade pode ser em decorrência da presença de cafeína no extrato, visto que células HeLa tratadas com baixas concentrações de cafeína apresentam aumento na proliferação (CHANG et al., 2017).

Nas linhagens celulares BEAS-2B e THP-1 diferenciada em macrófago (D THP-1), o efeito do EHG na viabilidade celular foi acessado por 3 protocolos distintos. Os métodos de viabilidade MTT (MONSMANN, 1983) e resazurina baseiam-se na redução dos reagentes por desidrogenases mitocondriais. Já o ensaio de vermelho neutro baseia-se na impregnação de lisossomos pelo corante vermelho neutro (REPETTO; del PESO; ZURITA, 2008).

Os resultados encontrados nesta comparação dos métodos de avaliação da citotoxicidade indicaram discrepâncias entre os resultados de CI50 obtidos pelos métodos distintos. Em BEAS-2B os resultados obtidos por MTT foram diferentes dos obtidos por resazurina e vermelho neutro. Enquanto resazurina apresentou um valor elevado comparado ao MTT, vermelho neutro apresentou um valor inferior. Essa diferença também foi observada em D THP-1, onde resazurina e vermelho neutro obtiveram dados semelhantes, porém altos em relação ao MTT.

Estas alterações podem ser explicadas pelas diferenças no protocolo de execução, sendo que os componentes do EHG podem estar alterando diretamente o reagente. No caso do MTT para D THP-1, a concentração de MTT utilizada no ensaio pode ter apresentado um efeito citotóxico sinérgico com o extrato. Além disso, dada a característica antioxidante do EHG, os metabolitos podem ter ficado aderidos a superfície de plástico da placa e contribuído para isso. Diferentemente dos nossos resultados, Santa Maria et al. (1998) ao avaliar a citotoxicidade do extrato aquoso guaraná por três métodos diferentes (MTT, Vermelho Neutro e Teor total de proteínas – *Kenacid Blue*) em células de ovários de hamster chinês, obteve os seguintes dados: MTT, 34.620 $\mu\text{g/ml}$, NR, 32.020 $\mu\text{g/ml}$ e KB, 39.950 $\mu\text{g/ml}$, revelando pequena diferença nos resultados obtidos pelos métodos empregados.

Os metabólitos majoritários do guaraná como cafeína, teobromina e teofilina apresentam capacidade antioxidante caracterizada (AZAM et al., 2003; GEBEYEHU; BIKILA, 2015). Em um trabalho prévio do nosso grupo de pesquisa, a capacidade antioxidante do EHG utilizado nesta pesquisa foi avaliada por equivalência de trollox e os resultados mostraram alta capacidade antioxidante (SILVA, 2019). Na linhagem MDA-MB 231, o EHG reduziu os níveis basais de EROs nas concentrações de 1000 e 500 µg/ml, resultado semelhante ao flavonoide quercetina cuja atividade antioxidante já é bem caracterizada (YOKOMIZO; MORIWAKI, 2006). Dentre os metabolitos do guaraná, a presença dos flavonoides, principalmente, as catequinas são as principais responsáveis pela capacidade antioxidante do fruto (MATTEI et al., 1998). A capacidade antioxidante do extrato de guaraná foi demonstrada *in vivo* por Peixoto et al. (2017), no qual o tratamento com extrato de guaraná com dose de 300 µg/ml foi capaz de reduzir em até 30% as EROs intracelulares em vermes do tipo selvagem (*C. elegans*).

Em nosso estudo observamos que em células MDA-MB 231 submetidas ao estresse oxidativo, todas as concentrações de EHG avaliadas, incluindo a dose de 100 µg/ml apresentaram redução nos níveis de EROs comparadas ao grupo controle. Além disso, a concentração de 1000 µg/ml de EHG se iguala a de quercetina na capacidade antioxidante. Corroborando com os dados de Bittencourt et al. (2013) que avaliaram a capacidade do guaraná em reverter o estresse oxidativo na linhagem de fibroblasto murino NIH-3T3 ocasionado por nitroprussiato de sódio (10 µM). Neste estudo, observou-se que as concentrações mais baixas do EHG (0,5, 1 e 5 mg/ml) foram eficazes em reduzir o estresse oxidativo.

Essa redução significativa de EROs em células tumorais é interessante como abordagem terapêutica, uma vez que a produção de EROs induzida por TGF-β aumenta a migração celular e a expressão de fibronectina, causando transição epitélio-mesenquimal (TEM) em células epiteliais mamárias (BOUDREAU et al., 2012).

Os macrófagos produzem e liberam EROs em virtude do processo de fagocitose e exposição à vários agentes (FORMAN; TORRES, 2001). Em células THP-1 diferenciadas para macrófagos, verificou-se que o tratamento com EHG não alterou os níveis de EROs basal, mas quando exposto ao estresse oxidativo ocasionado por peróxido de hidrogênio reduziu EROs na concentração de 1000 µg/ml. Essa atividade antioxidante do EHG em macrófagos pode estar inibindo a

ativação do inflamassoma NLRP3, visto que EROs são indutores da sua ativação e, conseqüentemente, reduzindo a produção de IL-1 β e IL-18 contribuindo para a diminuição da inflamação (ZHOU et al., 2011). Tal mediação parece ocorrer prioritariamente pela ação da cafeína, visto que Zhao et al., (2019) observaram que o pré-tratamento com cafeína suprimiu a liberação de ambas as citocinas pró-inflamatórias de uma maneira dependente da dose em macrófagos estimulado com LPS/ATP e reduziu a expressão de mRNA e proteína de NLRP3. Assim, a supressão da ativação do inflamassoma estaria associada à redução da produção de EROs ocasionado pela redução na expressão do receptor de adenosina A2a, indicando assim que a inibição de A2aR poderia atuar como um mediador pelo qual a cafeína suprime a ativação de NLRP3.

A linhagem epitelial pulmonar normal BEAS-2B foi submetida ao tratamento com EHG na concentração de CI50 para verificar o perfil de morte acionado pelo extrato. A análise revelou que o EHG parece ativar vias que direcionam a célula para a apoptose. Dados semelhantes foram observados por Fukumasu et al., (2008) em modelo experimental *in vivo* de melanoma, o tratamento com pó de guaraná reduziu os índices de proliferação celular e aumentou os índices apoptóticos após 14 dias de tratamento. De mesma forma, Niknafs (2011), ao tratar a linhagem celular MCF7 de câncer de mama com o componente majoritário do guaraná, a cafeína, observou a indução de apoptose como o principal mecanismo de morte acionado. Em adição, Liu, Zhou e Tang (2017) observaram que a cafeína direciona as células de câncer gástrico para apoptose por ativar as vias das caspases 3 e 9. Assim, para comprovar o programa de morte celular acionado pelo EHG, faz-se necessário experimentos adicionais explorem as vias de sinalização apoptóticas acionadas pelo mesmo.

CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível caracterizar os constituintes majoritários do EHG e gerar o perfil de viabilidade e CI50 do extrato em várias linhagens celulares. Células tumorais mostra-se viáveis mesmo em altas concentrações do extrato, já fibroblastos primários murinos, por sua vez mostraram-se sensíveis ao tratamento com o extrato. A perda da viabilidade e morte celular associada ao tratamento com o extrato parece acessar mecanismos de apoptose. Em baixas concentrações, o EHG induz aumento na viabilidade celular. Os dados revelaram a elevada capacidade do EHG em reduzir

a geração de EROs basal em linhagem tumoral mamária MDA-MB 231, mas não em linhagem de monócitos de sangue periférico diferenciados em macrófagos. Em resposta a estresse oxidativo, o pré-tratamento da linhagem mamária promoveu a redução de EROs nas concentrações testadas. No entanto, na linhagem de monócito diferenciados em macrófagos somente a dose mais alta foi capaz de reduzir após o estresse oxidativo. Coletivamente, os resultados obtidos neste estudo suportam os achados da literatura que diversas atividades biológicas associadas ao guaraná.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AZAM, S.; et al. 2003. Antioxidant and prooxidant properties of caffeine, theobromine and xanthine. **Med Sci Monit.**, 9(9):BR325-30.

BITTENCOURT, L.S., MACHADO, D.C., MACHADO, M.M., DOS SANTOS, G.F.F., ALGARVE, T.D., MARINOWIC, D.R., RIBEIRO, E.E., SOARES, F.A.A., BARBISAN, F., ATHAYDE, M.L., CRUZ, I.B.M., 2013. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and Chemical Toxicology**, 53, 119-125.

BITTENCOURT, L. S.; et al. 2014. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) prevents β -amyloid aggregation, generation of advanced glycation-end products (AGEs), and acrolein-induced cytotoxicity on human neuronal-like cells. **Phytother Res.**, 28(11):1615-24.

BITTENCOURT, L.S., BORTOLIN, R.C., KOLLING, E.A., SCHNORR, C.E., ZANOTTO-FILHO, A., GELAIN, D.P., MOREIRA, J.C.F., 2016. Antioxidant Profile Characterization of a Commercial *Paullinia cupana* (Guarana) Extracts. **Journal of Natural Products and Resources**, 2(1), 47-52.

BONDREAU, H. E.; et al. 2012. Nox4 involvement in TGF-beta and SMAD3-driven induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and migration of breast epithelial cells. **Free Radical Biology and Medicine**, 53(7), 1489-1499.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2019. Farmacopeia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, vol. I, 6 ed.

CADONÁ, F. C.; et al. 2017. Guaraná, a Highly Caffeinated Food, Presents in vitro Antitumor Activity in Colorectal and Breast Cancer Cell Lines by Inhibiting AKT/mTOR/S6K and MAPKs Pathways. **Nutrition and Cancer**, 1-11.

CADONÁ, F. C.; et al. 2016. Guaraná a Caffeine-Rich Food Increases Oxaliplatin Sensitivity of Colorectal HT-29 Cells by Apoptosis Pathway Modulation, **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, 16(8), 1055-1065.

CAMPOS, M.P.D., RIECHELMANN, R., MARTINS, L.C., HASSAN, B.J., CASA, F.B.A., DEL GIGLIO, A., 2011. Guarana (*Paullinia cupana*) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 17, 505–512.

CARVALHO, L. V. N.; et al. 2016. Evaluation of Antibacterial, Antineoplastic, and Immunomodulatory Activity of *Paullinia cupana* Seeds Crude Extract and Ethyl-Acetate Fraction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1–7.

CHANG, Y.; et al. 2017. Theophylline exhibits anti-cancer activity *via* suppressing SRSF3 in cervical and breast cancer cell lines. **Oncotarget.**, 8:101461-101474.

DALONSO, N.; PETKOWICZ, C.L.D.O.; 2012. **Guarana powder polysaccharides: characterisation and evaluation of the antioxidant activity of a pectic fraction.** **Food Chem.**, 134, 1804-1812.

FORMAN, H. J.; TORRES, M. 2001. Redox signaling in macrophages. **Mol Aspects Med.**, 22(4-5):189-216.

FUKUMASU, H., SILVA, T.C., AVANZO, J.L., LIMA, C.E., MACKOWIAK, I.I., ATROCH, A., SPINOSA, H.S., MORENO, F.S., DAGLI, M.L.Z., 2006. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, 233,158-164.

FUKUMASU, H., AVANZO, J.L., NAGAMINE, M.K., BARBUTO, J.A., RAO, K.V. DAGLI, M.L., 2008. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Braz J Med Biol Research**, 41, 305-310.

GEBEYEHU, B. T; BIKILA, S. L.. 2015. Determination of Caffeine Content and Antioxidant Activity of Coffee. **American Journal of Applied Chemistry**, 3 (2), 69.

HERTZ, E., CADONÁ, F.C., MACHADO, A.K., AZZOLIN, V., HOLMRICH, S., ASSMANN, C., LEDUR, P., RIBEIRO, E.E., DE SOUZA FILHO, O.C., MÂNICA-CATTANI, M.F., DA CRUZ, I.B., 2015. Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. **Mol Clin Oncology**, 3(1):37-43.

LIU, H; ZHOU, Y.; TANG, L. 2017. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway. **Mol Med Rep.**, Sep; 16(3): 2445–2454.

MARQUES, L. L. M. et al. 2019. *Paullinia cupana*: a multipurpose plant – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, e. 29, 77–110.

MATTEI, R., DIAS, R.F., ESPÍNOLA, E.B., CARLINI, E.A., BARROS, S.B.. 1998. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**. 60, 111–116.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 16;65 (1-2), 55-63

NIKNAFS, B. Induction of Apoptosis and Non-Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7) by Cisplatin and Caffeine. 2011. **Iran Biomed J.**, Oct; 15(4): 130–133.

PEIXOTO, H. 2017. Anti-Aging and Antioxidant Potential of *Paullinia cupana* var. *sorbilis*: Findings in *Caenorhabditis elegans* Indicate a New Utilization for Roasted Seeds of Guarana. **Medicines (Basel)**, 4(3):61.

REPETTO, G.; del PESO, A.; ZURITA, J.L.2008. Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity. **Nat Protoc**, 3(7):1125-31.

ROGGIA, I.; et al. 2020. Guarana: Stability-indicating RP-HPLC method and safety profile using microglial cells. **Journal of Food Composition and Analysis**. vol 94, 103629.

SANTA MARIA, A.; et al.. 1998. Evaluation of the Toxicity of Guarana with in Vitro Bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**. 39, 164—167.

SCHIMPL, F.C., DA SILVA, J.F., GONÇALVES, J.F., MAZZAFERA, P. 2013. Guaraná: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **J Ethnopharmacology**, 150,14-31

SILVA, K. A. 2019. Elaboração, caracterização e avaliação da viabilidade celular e atividade antioxidante de encapsulados de extrato hidroalcoólico de guaraná (*Paullinia cupana* (Mart.) Ducke). Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Biotecnologia) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

YOKOMIZO; MORIWAKI. Effects of Uptake of Flavonoids on Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide in Human Intestinal Caco-2 Cells, **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, 70:6, 1317-1324, 2006.

ZHANG, M.; et al. 2011. Antioxidant properties of quercetin. **Adv Exp Med Biol.**, 701:283-9.

ZHAO, W.; et al. 2019. Caffeine Inhibits NLRP3 Inflammasome Activation by Suppressing MAPK/NF-κB and A2aR Signaling in LPS-Induced THP-1 Macrophages. **Int J Biol Sci.**, 15(8):1571-1581.

ZHOU, R.; et al. 2011. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. **Nature**, vol. 469, 221–225.

CAPÍTULO II

EFEITO DO SECRETOMA DE CÉLULAS DO MICROAMBIENTE TUMORAL E CÉLULAS TUMORAIS PRÉ-TRATADAS COM EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE GUARANÁ

Artigo em preparação

**EFEITO DO SECRETOMA DE CÉLULAS DO MICROAMBIENTE TUMORAL E
CÉLULAS TUMORAIS PRÉ-TRATADAS COM EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE
GUARANÁ**

Patrícia Rayná Simas de Souza¹, Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria^{1,2}

1 Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada

2 Departamento de Ciências Fisiológicas, ICB/UFAM.

RESUMO

Introdução: O microambiente tumoral (MAT) é composto por uma diversidade de células, que incluem as células tumorais e as células estromais, contribuindo com a angiogênese tumoral, proliferação, invasão e metástase, bem como quimiorresistência. Neste cenário no qual o MAT tem um papel de destaque na progressão tumoral, a busca por novos quimioterápicos envolve novas abordagens que incluem tanto a resposta das células tumorais e quanto das estromais à terapia. A modulação de células do MAT, como os macrófagos é acionada por metabólitos, como o ácido clorogênico, que direcionam tais células para um fenótipo inflamatório e tumoricida, uma abordagem promissora de imunoterapia. Desta forma, o guaraná surge como um candidato promissor. Este fruto amazônico com alto teor de metilxantinas e taninos condensados, possui distintas atividades biológicas descritas como antioxidante, antiproliferativa, quimiopreventiva, dentre outras. **Objetivo:** O objetivo deste estudo consistiu em investigar o efeito modulador do extrato hidroalcoólico de guaraná (EHG) tanto em células do MAT e o efeito do secretoma destas células em células tumorais de mama e pulmão **Materiais e Métodos:** As células tumorais foram desafiadas com os meios condicionados (MCs) gerados em células normais de pulmão e mama e em macrófagos provenientes de THP-1 diferenciada. Paralelamente, macrófagos foram tratados com os MCs gerados em células tumorais e normais de pulmão e mama. Os ensaios de viabilidade e proliferação foram obtidos através da metabolização de resazurina e ensaio clonogênico, os ensaios de migração foram conduzidos em câmara de *transwell* e por análise de fechamento de ferida. Ademais, foram conduzidas a análise do perfil de ciclo celular e a análise morfológica das células por microscopia confocal **Resultados:** As respostas das células tumorais de mama e pulmão foram distintas frente ao tratamento com os MC MCF10A, MC BEAS-2B e MC D THP-1. Enquanto A549 reduz a viabilidade e capacidade clonogênica com MC MCF10A e altera o ciclo celular para maior percentual de células na fase G1, as células MCF7 apresentam redução somente na capacidade clonogênica. O MC BEAS-2B pré-tratado com EHG reduz a capacidade clonogênica e aumenta a capacidade migratória das células A549. MC D THP-1 pré-tratado ou não com EHG e estimulado com LPS diminuem a capacidade clonogênica de A549 bem como perda de adesão célula-célula, intensa vacuolização e morfologia fibroblástoide. O secretoma gerado pelo pré-tratamento com EHG promove um aumento na migração. O pré-tratamento com EHG foi capaz de reverter o perfil de perda de viabilidade observada nas células tratadas com o secretoma de macrófagos controle estimulados com LPS. MCs em células tumorais pré-tratado com EHG reduziu a viabilidade de macrófagos. Em adição, o pré-tratamento com EHG potencializa a capacidade de redução da viabilidade do secretoma de células BEAS-2B **Conclusão:** O secretoma gerado em linhagens celulares distintas modula, o perfil proliferativo e migratório das células tumorais de mama e pulmão, de modo linhagem específica. **Palavras-chave:** modulação, *paullinia cupana*, microambiente tumoral, macrófagos, célula tumoral.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento do câncer envolve uma ampla gama de alterações genéticas e epigenéticas atribuindo características às células tumorais de modo que consigam atingir a proliferação autônoma, adquiram a imortalidade replicativa, a resistência à morte celular, evasão da resposta imune, conseqüentemente, invadam e formem metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011). A comunicação cruzada do microambiente tumoral (MAT) com células tumorais favorece o desenvolvimento do tumor através da secreção de fatores solúveis e fornecimento de nutrientes pelo MAT. Neste cenário, o MAT também é responsável pela resistência aos tratamentos administrados (SOYSAL; TZANKOV; MUENST, 2015; STEINBICHLER et al., 2015).

O MAT é composto por uma grande diversidade de células, que incluem as células tumorais e as células de suporte. As células de suporte são recrutadas por células tumorais e estromais contribuindo com a angiogênese tumoral, proliferação, invasão e metástase, bem como quimiorresistência. Nesse estroma estão presentes e em complexa interação, diferentes tipos celulares como células tronco derivados da medula óssea, células do sistema imune, células-tronco tumorais (do inglês – *cancer stem-cell* - CSC), fibroblastos, miofibroblastos, vasos sanguíneos, pericitos, células não transformadas e células dos vasos linfáticos (JOYCE; POLLARD, 2009; BUSSARD, et al., 2016; RUNA et al., 2017).

Em virtude da alta plasticidade, no MAT, os macrófagos são polarizados para um perfil pró-tumorigênico, sendo denominados macrófagos associados ao tumor (TAMs), os quais exibem fenótipos direcionados para a promoção do crescimento tumoral, remodelamento do tecido, angiogênese e supressão da imunidade adaptativa (QIU et al., 2018; ZHOU et al., 2020).

Bohrer e Schwertfeger (2012) demonstraram que os macrófagos em torno de lesões pré-invasivas em camundongos secretam quimiocinas de ligação que promovem a migração e invasão de células epiteliais pré-neoplásicas vizinhas. É descrito que o maior número de macrófagos M2 no MAT está relacionado ao mau prognóstico e pior desfecho da doença, enquanto que a CCL22 derivada de macrófago aumenta a capacidade migratória ativando a transição epitélio-mesenquimal (TEM) nas células tumorais (YEUNG et al., 2015; JUNG et al., 2015; ZHOU et al., 2019).

Neste cenário em que o microambiente tem um papel fundamental na progressão do câncer, a busca por novos quimioterápicos envolve novas abordagens que incluem tanto a resposta das células estromais, quanto a dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) à terapia (NOY; POLLARD, 2014). Devido a sua alta plasticidade, é possível modular os TAMs por metabólitos, como o ácido clorogênico, para um fenótipo inflamatório e tumoricida, uma abordagem promissora de imunoterapia (XUE et al., 2017).

Desta forma, o guaraná surge como um candidato. É um fruto amazônico, empregado em bebidas caseiras e industriais, que apresenta alto teor de metilxantinas e taninos condensados dentre outros metabólitos (BITTENCOURT et al., 2016; MARQUES et al., 2019). Dentre as atividades biológicas associadas, destaca-se o efeito protetivo do guaraná contra danos químicos e oxidativos e sua aplicação adjuvante no tratamento oncológico (FUKUMASU et al., 2006; HERTZ et al., 2015).

Neste contexto, o objetivo deste estudo consistiu em investigar o efeito modulador do extrato hidroalcoólico de guaraná (EHG) tanto em células do MAT e o efeito do secretoma destas células em células tumorais de mama e pulmão, nos perfis de viabilidade, proliferação, migração e perfil de ciclo celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal e preparo do extrato hidroalcoólico de guaraná (EHG)

Neste trabalho foi utilizado o guaraná em pó cedido pela Associação dos Agricultores Familiares do Alto Urupadi (AAFAU), localizada na Comunidade Nossa Senhora de Nazaré, polo 11 do Alto Urupadi, a 80 km da cidade de Maués, Amazonas. A amostra obtida pertence à safra de 2017, lote nº 1. Todos os dados referentes à espécie vegetal, local de coleta e o foco da pesquisa foram submetidos ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Adquirido (SisGen) vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA). O Comprovante de Cadastro de Acesso e o número do Cadastro encontram-se no Anexo I.

Para geração das frações solúveis, o extrato hidroalcoólico foi obtido como descrito por Bittencourt et al. (2013). O pó de guaraná foi diluído para uma

concentração final de 200 mg/ml em solução etanol: água (70:30). Após 24 horas sob agitação, essa suspensão foi submetida a centrifugação a 3000 rpm, por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante foi submetido à rotavaporização a 50°C até eliminação completa do solvente. Em seguida ao passo de remoção do etanol, a solução foi submetida a liofilização. O extrato seco foi ressuspenso em tampão fosfato salino (PBS) (200 mg/ml) e homogeneizado em agitador magnético por 10 minutos. Após a homogeneização, a solução foi transferida para um tubo de 50 ml e infundida em água fervente por 7 minutos. Em seguida, o extrato foi centrifugado a 1500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm e distribuído em alíquotas de 200 µl em tubos de 1,5 ml que foram armazenadas no freezer a -80°C para utilização posterior nos experimentos.

Cultivo celular

As linhagens humanas: MCF7 (ATCC® HTB-22™), adenocarcinoma mamário, A549 (ATCC® CCL-185™) carcinoma de pulmão, MCF10A (ATCC®CRL-10317™) células epiteliais mamárias normais, BEAS-2B (ATCC® CRL-9609™) células epiteliais pulmonares normais, THP-1 (ATCC® TIB-202™) monócitos de sangue periférico humano, cedidas pelos colaboradores Dr. Dawidson Assis Gomes (ICB/UFMG) e Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart (UFU) foram utilizadas nos experimentos.

A linhagem MCF10A foi mantida em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12; *Life Technologies*) suplementando com fator de crescimento epidermal (EGF) (20 ng/mL), hidrocortisona (0.5 µg/mL), insulina (10 µg/ml), toxina colérica (100 ng/mL), 10% de soro fetal bovino (*Life Technologies*), 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (*Life Technologies*).

As linhagens BEAS-2B, A549 e MCF7 foram mantidas em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM/F12; *Life Technologies*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Life Technologies*), 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (*Life Technologies*).

As células THP-1 foram mantidas em meio *Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640* da *Life Technologies* suplementado com 10% de soro fetal bovino (*Life Technologies*), 100 unidades/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina (*Life Technologies*). Para a indução da diferenciação das células, os monócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) na concentração de 10 ng/ml durante 48 horas, após esse período as células foram lavadas com PBS 1X e o meio de cultura renovado para descanso por 48 horas até início dos experimentos.

Todos os meios foram devidamente filtrados em membrana de difluoreto de polivinilideno de 0,22 µm (Millipore). As células foram mantidas em garrafas T75, armazenadas em estufa de atmosfera úmida a 37°C e 5% v/v CO₂ e o meio substituído a cada 3 dias. As subculturas celulares foram realizadas quando as garrafas de cultura atingiram uma confluência aproximada de 70 a 80%.

Geração do meio condicionado (MC) em monócitos de sangue periféricos diferenciados em macrófagos

As células foram plaqueadas na densidade $3,2 \times 10^6$ células por poços em placas de 6 poços e diferenciadas com PMA (10 ng/ml) por 48 horas conforme Park et al. (2007). Após o período de diferenciação, as células foram lavadas com PBS 1X e seguiu-se o tratamento com EHG (1000 µg/ml) em meio completo por 24 horas, o grupo controle permaneceu em meio completo por 24 horas.

Após esse período de tratamento, os grupos foram subdivididos em: tratados e não tratados com LPS (Lipopolissacarídeo). Um grupo foi lavados com PBS 1X e condicionados com meio isento de soro por 30 horas permanecendo sem estímulo e sendo denominados de MC D THP-1 CTL e MC D THP-1 EHG, e o outro grupo foi estimulado com 10 ng/ml de LPS por 30 horas durante o condicionamento com meio isento de soro (ZHOU et al., 2018) sendo denominados MC D THP-1 CTL LPS e MC D THP-1 EHG LPS.

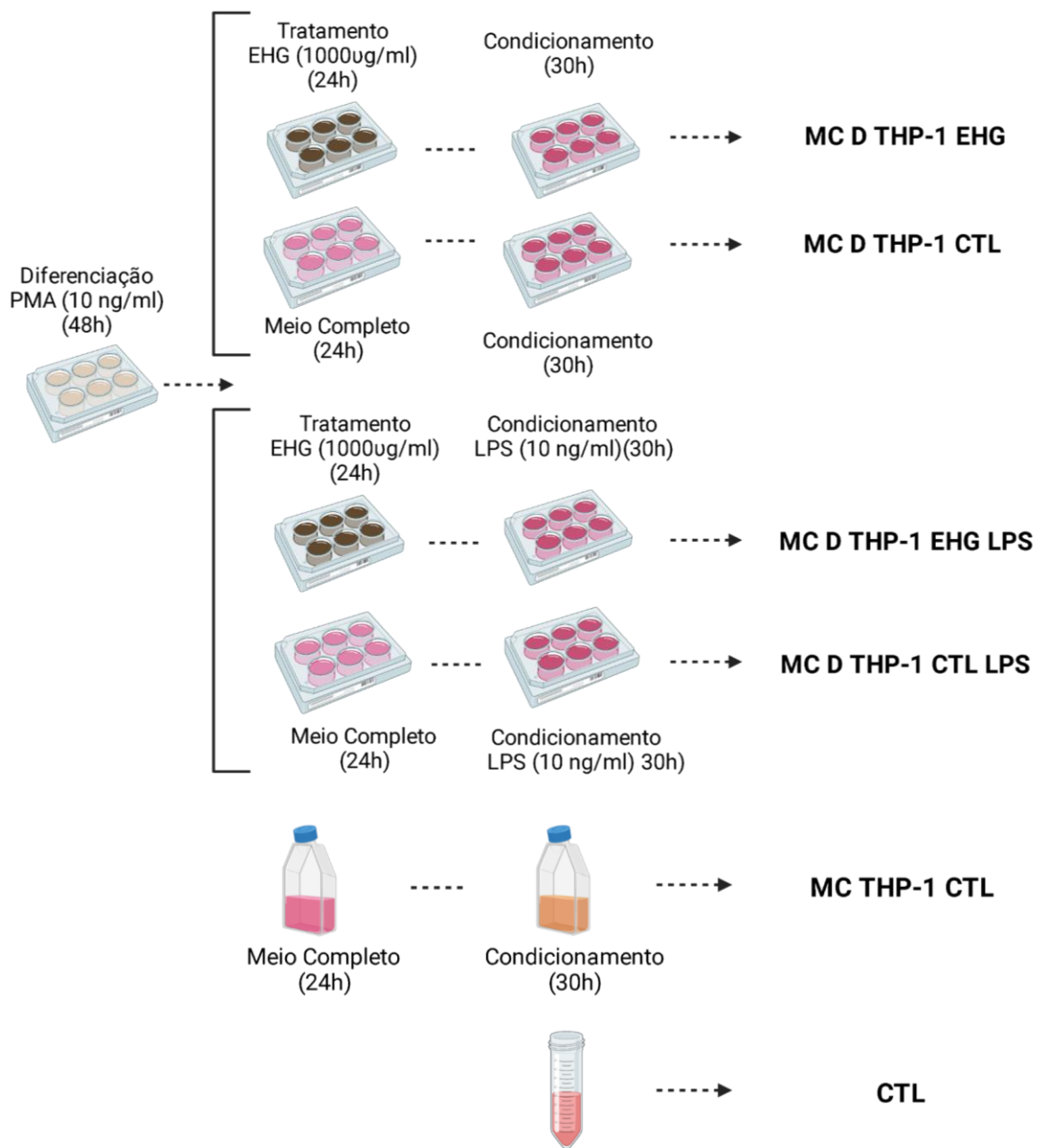


Figura 1 - Esquema ilustrativo do protocolo de geração de meio condicionado em monócitos diferenciados em macrófagos. O processo se inicia com a diferenciação das células monocíticas em macrófagos com o uso de PMA (10ng/ml), posterior tratamento com EHG (1000 µg/ml) e condicionamento com meio isento de soro fetal bovino, parte do grupo foram estimulados com LPS (10 ng/ml) por 30 horas e parte ficou

Como grupo controle, foi realizado o condicionamento de células monocíticas não diferenciadas por 30 horas em meio sem soro, sendo este denominado MC THP-1 CTL e também utilizado meio sem soro que não entrou em contato com célula.

Após o período de condicionamento, os sobrenadantes foram coletados em tubo cônico, centrifugado a 200xg por 5 minutos para retirar os *debris* celulares. Os meios condicionados foram utilizados imediatamente nos experimentos ou armazenados em alíquotas de 1,5 ml no freezer -80°C para utilização futura.

Geração dos MCs em linhagens epiteliais normais e tumorais de pulmão e de mama

As células MCF10A (4×10^6 células), MCF-7 (4×10^6 células), BEAS-2B (4×10^6 células) e A549 (4×10^6 células) foram cultivadas em garradas T75 até atingirem a confluência de 80%. Após isso, nos grupos MC-EHG foi adicionado meio completo acrescido de EHG na concentração 1000 $\mu\text{g/ml}$, enquanto o grupo MC-CTL permaneceu em meio completo. Decorrida 24 horas de incubação com o EHG, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS 1X. Meio sem suplementação com soro fetal bovino (SFB) e acrescido de antibiótico (1%) foi adicionado e mantido em condicionamento por 48 horas. Após esse período, o meio foi transferido para um tubo cônico e centrifugado a 220 xg por 5 minutos para remoção dos *debris* celulares, sendo este denominado MC EHG. Como controle, células mantidas por 24 horas em meio completo sem adição de EHG seguiram com 2 lavagens com PBS 1X e condicionadas com meio sem soro por 48 horas, o meio coletado denominado MC CTL. Os meios condicionados foram utilizados imediatamente nos experimentos ou armazenados em alíquotas de 1,5 ml no freezer -80°C para utilização futura. Como controle foi utilizado meio sem soro que não entrou em contato com células, sendo denominado CTL.

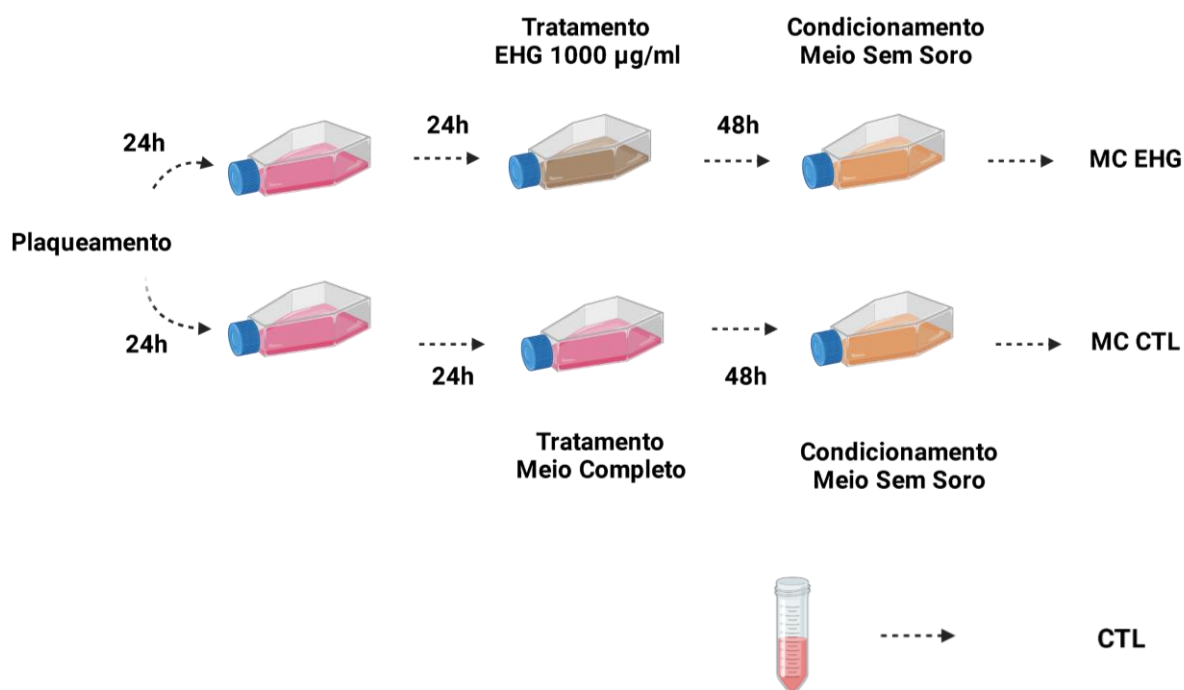


Figura 2 - Imagem representativa do desenho experimental de geração de meio condicionado em células epiteliais normais e tumorais de mama e pulmão. O processo se inicia com o plaqueamento das células em garrafa T75, ao atingir a confluência de 80% as células foram tratadas, parte com EHG e parte permaneceu em meio completo por 24h, após o período de tratamento as células foram lavadas e então condicionadas em meio sem soro por 48h. O grupo que recebeu o pré-tratamento com EHG se denominou MC EHG e o grupo que ficou em meio completo foi chamado de MC CTL.

Ensaio de viabilidade

O ensaio de viabilidade foi realizado utilizando o reagente resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido). As células tumorais foram plaqueadas na densidade de 5×10^3 / $7,5 \times 10^3$ / 1×10^4 para os tempos de tratamento 24h/48h/72h, respectivamente, em placas de 96 poços. Decorridas 24h de plaqueamento, as células foram lavadas com PBS 1X e foi acrescido os meios condicionados por 24h, 48h e 72h. O controle consistiu de células tratadas com meio isento de soro e sem contato prévio com células. Decorrido o período de tratamento, em cada poço foram adicionados 5 µl de resazurina (3 mM) acrescidos de 95 µl de meio completo. Após 3 horas de incubação, as placas foram lidas em 570nm e 595nm no leitor de placas do laboratório de Purificação de Biomoléculas – CAM/ UFAM.

Ensaio Clonogênico

Para a condução do experimento de clonogenicidade, as células MCF7 e A549 foram plaqueadas na densidade de 100 células/poço para placas de 12 poços. Após 24h do plaqueamento, as células foram tratadas na proporção 1:1 do meio condicionado gerado nas linhagens de MCF10A, BEAS-2B e THP-1 e meio de cultura suplementado com 10% SFB, apresentando assim uma concentração final de 5% SFB. O grupo controle consistiu de células tratadas com meio de cultura contendo SFB 5%. A cada 2 dias, os meios eram renovados e as culturas mantidas ao longo de 10 dias. Após este período, os meios foram removidos e as colônias celulares que cresceram em cada poço foram coradas com cristal violeta a 1% em solução 4% de formaldeído em PBS 1X por 30 minutos. Em seguida, os poços foram lavados com água e deixados na bancada para secar por 24h em temperatura ambiente. A contagem do número de colônias foi realizada manualmente com o auxílio de uma lupa de mão e capturadas as imagens representativas de cada tratamento.

Ensaio de fechamento de ferida (*Scratch assay*)

As células A549 foram plaqueadas em placas de 6 poços na densidade de 2×10^5 células por poço em meio completo. Com a obtenção da confluência da monocamada seguiu-se com o ensaio, no qual forma-se uma interrupção na monocamada celular, por meio de uma falha ou ferida e segue-se com o acompanhamento do fechamento dessa abertura (YUE et al., 2010) por observação e fotografia em microscópio de luz. Com a constatação da confluência total das células, a ferida foi realizada no centro do poço da placa de 6 poços com o auxílio da ponteira de P1000, e em seguida os poços foram lavados com PBS 1X para a remoção dos *debris* celulares. Em cada poço foram adicionados 2 mL dos meios condicionados de MC BEAS e MC MCF10A. O meio foi renovado a cada 12 horas. O fechamento da ferida foi acompanhado nos períodos de 0, 12, 24 e 36 horas por meio de fotodocumentação. Para determinar a taxa de migração celular, a área inicial da ferida foi arbitrariamente marcada como 100% da área livre de células. O decréscimo dessa área livre se caracterizou como o índice de migração celular. A

taxa de migração foi conduzida por análise da área no software *ImageJ* (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

Ensaio de migração em câmara de *transwell*

Células A549 foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células em cada câmara superior de *transwell* - membrana porosa de 8 μm - em placa de 24 poços. Após 24h do plaqueamento, o meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1X e adicionado meio condicionado em THP-1 diferenciadas pré-tratadas ou não com EHG e estimuladas com LPS (10ng/ml). A migração foi induzida na câmara inferior da placa com meio suplementado com 10% de SFB. Após 48 horas, a câmara superior foi retirada e as células da parte inferior que migraram foram coradas e fixadas com cristal violeta a 1% em solução 4% de formaldeído em PBS 1X por 30 minutos. Após a secagem da placa, o quantitativo de células que migraram foi contado com auxílio microscópio de luz invertido.

Imunofluorescência

As células A549 foram plaqueadas em placa de 6 poços com lamínula na densidade de 5×10^4 células/poço. Após 24 horas, as células foram lavadas com PBS 1X por duas vezes, fixadas com 1ml de paraformaldeído 3,7% em PBS1X por 15 minutos. Novamente lavadas com PBS 1X e permeabilizadas com solução 0,2% de Triton X-100 em PBS 1X por 10 minutos. Lavadas com PBS 1X e bloqueadas com solução de NGS (*normal goat serum* – soro de cabra normal) 5% em solução de BSA (*bovine serum albumin* – Albumina sérica bovina) 1% por 1 hora. Após o período, as células foram marcadas com Alexa Fluor® 546-Faloidina (1:200) por 3 horas à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com ProLong™ Diamond Antifage Mountant com DAPI para coloração nuclear. As imagens foram adquiridas no microscópio confocal Leica TCS SP8 do Centro Multiusuário para Análise de Fenômenos Biomédicos da Universidade do Estado do Amazonas.

Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Células A549 foram plaqueadas em placas de 6 poços, na densidade de 5×10^5 células/poço, 3 poços por grupo, e tratadas com o meio condicionado gerado em MCF10A e BEAS-2B. Após 48 horas, as células foram coletadas por tripsinização e contadas em triplicata. Um total de 1×10^5 células foram fixadas com etanol 70%, centrifugadas a $400 \times g$ por 10 minutos, lavadas com PBS 1x, lisadas com 300 μ L de uma solução hipotônica contendo 0,5% (v/v) de Triton X-100 (Sigma-Aldrich), centrifugadas novamente, e coradas com 20 μ g/mL de iodeto de propídeo (ThermoFisher Scientific) e 0,2 mg/ml RNase A (ThermoFisher Scientific) (RICCARDI; NICOLETTI, 2006). As células foram incubadas a 4°C por 1 hora e analisadas no citômetro de fluxo FACSCanto™ II (BD Bioscience). O grupo controle (não tratado) foi utilizado para o ajuste dos parâmetros de espalhamento frontal e lateral, necessário para a determinação da população de estudo. A análise foi feita em escala logarítmica. As amostras foram excitadas utilizando o laser de 488 nm e a fluorescência emitida detectada utilizando o filtro de emissão 525/30 nm. Foram realizadas a leitura de 20.000 eventos e os resultados foram analisados utilizando o software *FlowJo* (versão 10.6.1). Os dados foram plotados em gráficos de porcentagem de células em G1, S e/ou M/G2, em relação ao número total de células.

Análise estatística

Os dados foram obtidos pela realização de pelo menos três experimentos independentes e expressos utilizando a média \pm desvio padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism 8*. Para a obtenção dos valores de CI50 foi realizada uma análise de regressão não-linear. Com o objetivo de avaliar a significância das diferenças observadas entre os grupos estudados foi conduzida a análise de variância one-way ANOVA e quando aplicado, teste de comparação de médias (Tukey's).

RESULTADOS

O meio condicionado em MCF10A reduz a viabilidade e capacidade de formação de colônia de células A549 mas não altera a capacidade de migração celular

A capacidade de modulação do EHG foi acessada pelo desafio de células normais como MCF10A, BEAS-2B e THP-1 diferenciada em macrófagos. Previamente, as células com fenótipo estromal foram tratadas por 24 horas com a concentração mais elevada de EHG que não promove alteração na viabilidade celular (Figura 1 do capítulo 1). Decorrida este período, meio sem soro foi adicionado e o meio condicionado gerado após 48 horas de incubação (FIGURA 2).

A viabilidade e capacidade de formação de colônias das células tumorais A549 tratadas com os meios condicionados em células MCF10A foram avaliadas. Tanto o meio condicionado controle quanto o gerado em células pré-tratadas com EHG reduziram a viabilidade de A549 nos tempos 48h, em 72h a redução persistiu, sendo maior no grupo MC pré-tratado com EHG (FIGURA 3A). O ensaio clonogênico em células A549 tratadas com o secretoma gerado em células MCF10A revela uma redução dos grupos MC em relação ao controle não desafiado. Observa-se que não houve diferença entre o grupo desafiados com o meio condicionado controle do meio gerado em células pré-tratadas com EHG. (FIGURA 3B). Tais resultados sugerem que o secretoma de MCF10A age modulando e suprimindo o desenvolvimento do tumor ou ativando o processo de transição epitélio-mesenquimal (TEM) nas células A549 corroborando com a redução de proliferação.

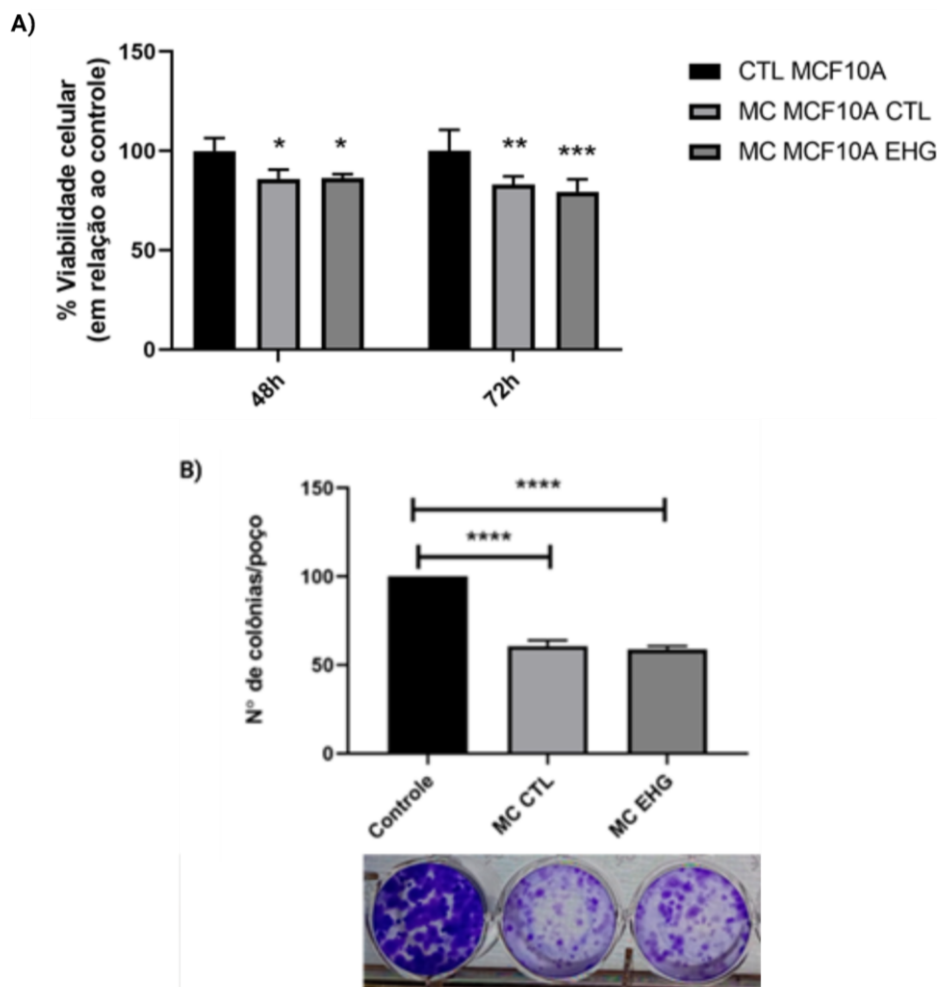


Figura 3 - Ensaio de viabilidade e clonogênico das células A549 cultivadas com os meios condicionados em MCF10A. O ensaio de viabilidade utilizado foi metabolização da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) (3 mM). As células A549 na presença de MC MCF10A diminuem a viabilidade após 48h e 72h, sendo mais evidente a diminuição nos grupos pré-tratados com EHG (n=4). No ensaio clonogênico, ambos os MCs reduziram a capacidade de formação de colônia. O controle negativo consistiu em células tratadas com meio de cultura isento de soro e não condicionado (n=3). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

Ademais, a mudança observada na morfologia da linhagem A549 tratada com meio condicionado em MCF10A revela a alteração da morfologia epitelial do grupo controle para uma morfologia fusiforme e alongada (ANEXO II).

O perfil de migração foi avaliado por meio do ensaio de fechamento de ferida, as células A549 foram tratadas com MCs por 24h não sendo observada alteração no perfil de migração celular das células desafiadas (FIGURA 4).

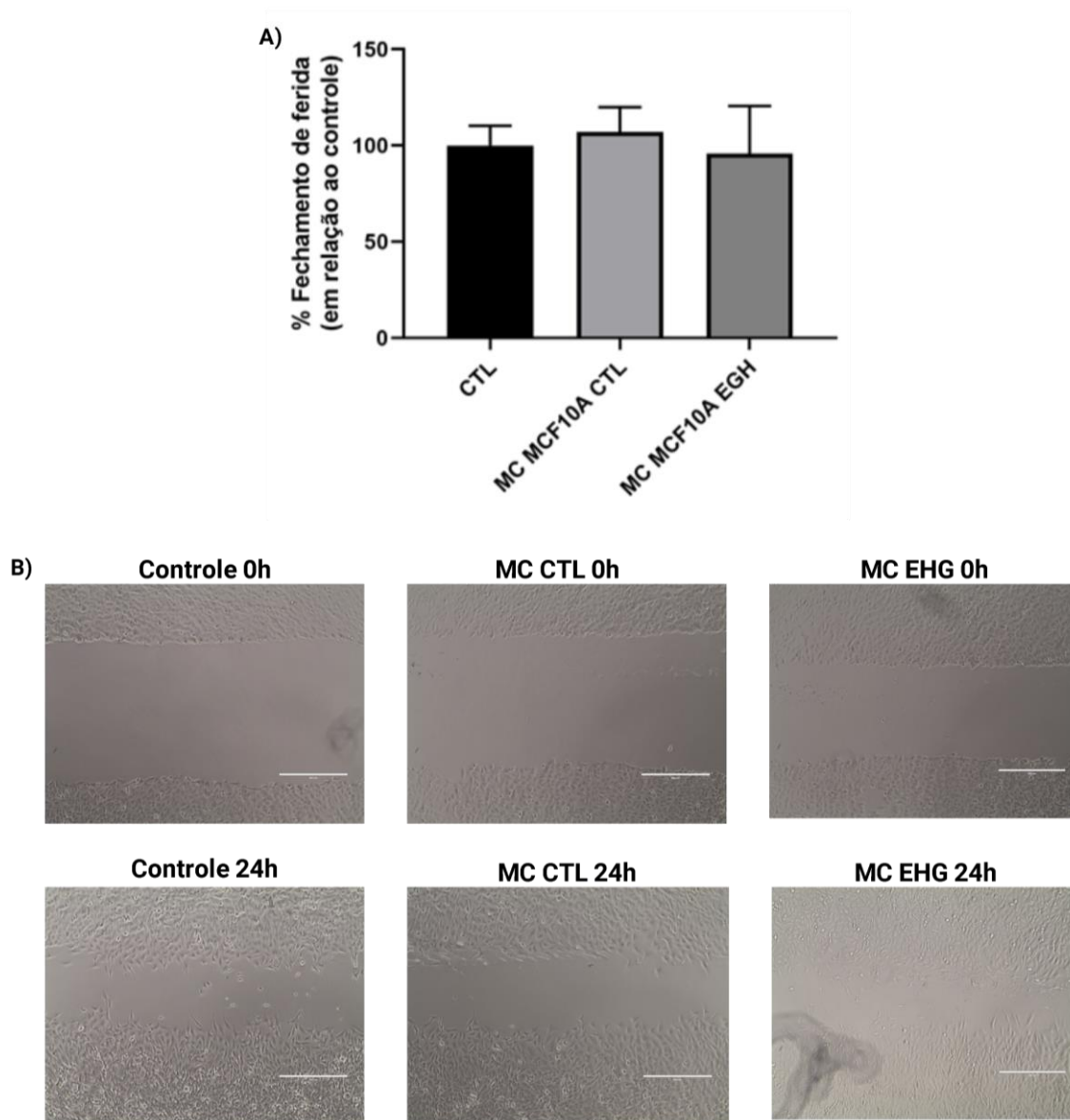


Figura 4 – Ensaio de fechamento de ferida com A549 tratada com MC MCF10A. A linhagem foi cultivada em placa de 6 poços até atingir a monocamada e realizada a ranhura central, recebendo tratamento com MCs por 24h. Os tempos 0h e 24h foram fotodocumentados. As áreas nos três tempos foram calculadas utilizando o software ImageJ em todos os tratamentos. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-way ANOVA (n=3).

Uma vez que a viabilidade e clonogenicidade das células cultivadas no secretoma de MCF10-A indicaram uma redução da proliferação celular, o perfil do ciclo celular destas células foi acessado por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que as células cultivadas sem meio condicionado em célula normal mamária tanto controle quanto as previamente tratadas com EHG apresentam um maior número de células na fase G1 (FIGURA 5).

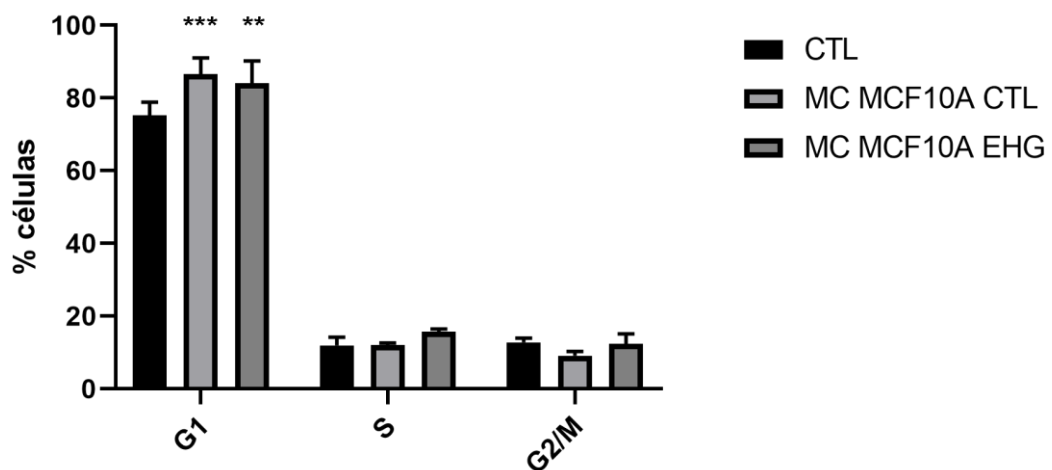


Figura 5 – Análise de ciclo celular por citometria de fluxo em A549 tratadas com MC MCF10A. As células A549 foram cultivadas com os MCs em MCF10A por 48 horas e marcadas com iodeto de propídeo para análise por citometria de fluxo. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-way ANOVA. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ ($n=3$).

O secretoma de células BEAS-2B pré-tratadas com EHG reduz a clonogenicidade e aumenta a migração de células tumorais A549

Células tumorais pulmonares A549 foram avaliadas quanto a sua viabilidade e capacidade de formação de colônias na presença do secretoma de células normais pulmonares BEAS-2B pré-tratadas com EHG. No ensaio de viabilidade, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados no período de 48 horas e 72 horas de incubação com os meios condicionados (FIGURA 6A). Em contrapartida, a exposição mais prolongada ao secretoma revelou a capacidade do meio condicionado em células pré-desafiadas com o EHG em reduzir a capacidade de formação de colônias de células tumorais A549 ($p < 0,05$) (FIGURA 6B). Observa-se que o cultivo com o secretoma de célula BEAS-2B tanto controle quanto pré-tratado com EHG promove uma redução no tamanho das colônias formadas. A alteração fenotípica pode ser comprovada pelas imagens de microscopia das células após o cultivo (ANEXO III).

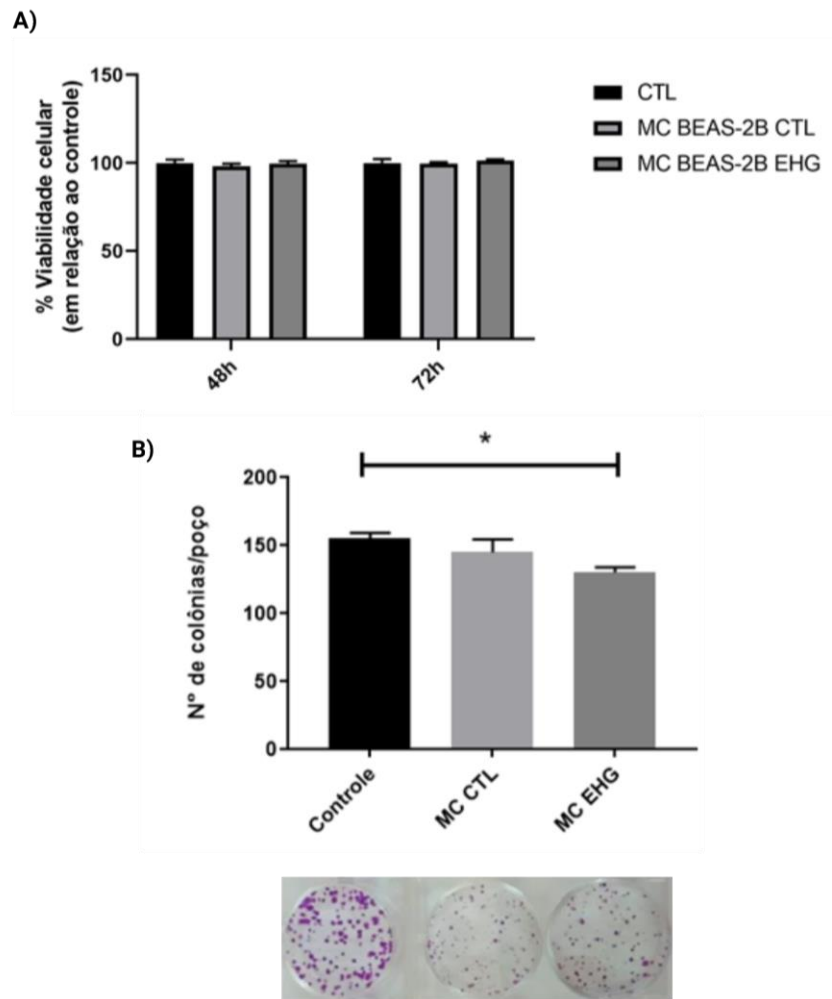


Figura 6 - Ensaio de viabilidade e clonogênico das células A549 cultivadas com os meios condicionados em BEAS-2B. O ensaio de viabilidade utilizado foi metabolização da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) (3 mM). As células A549 na presença de MC BEAS não apresenta diferença significativa (n=4). No ensaio clonogênico, o MC BEAS-2B EHG reduziu a capacidade de formação de colônia. O controle negativo consistiu em células tratadas com meio de cultura isento de soro e não condicionado (n=3). * <math><0,05</math>

Em função da alteração fenotípica observadas nas células A549 cultivada em MC gerados em BEAS-2B, avaliou-se o do efeito do secretoma na capacidade de fechamento de ferida. Os resultados demonstraram que as células tumorais cultivadas com MC BEAS-2B EHG apresentaram um aumento na migração comparado ao grupo controle não tratado (FIGURA 7).

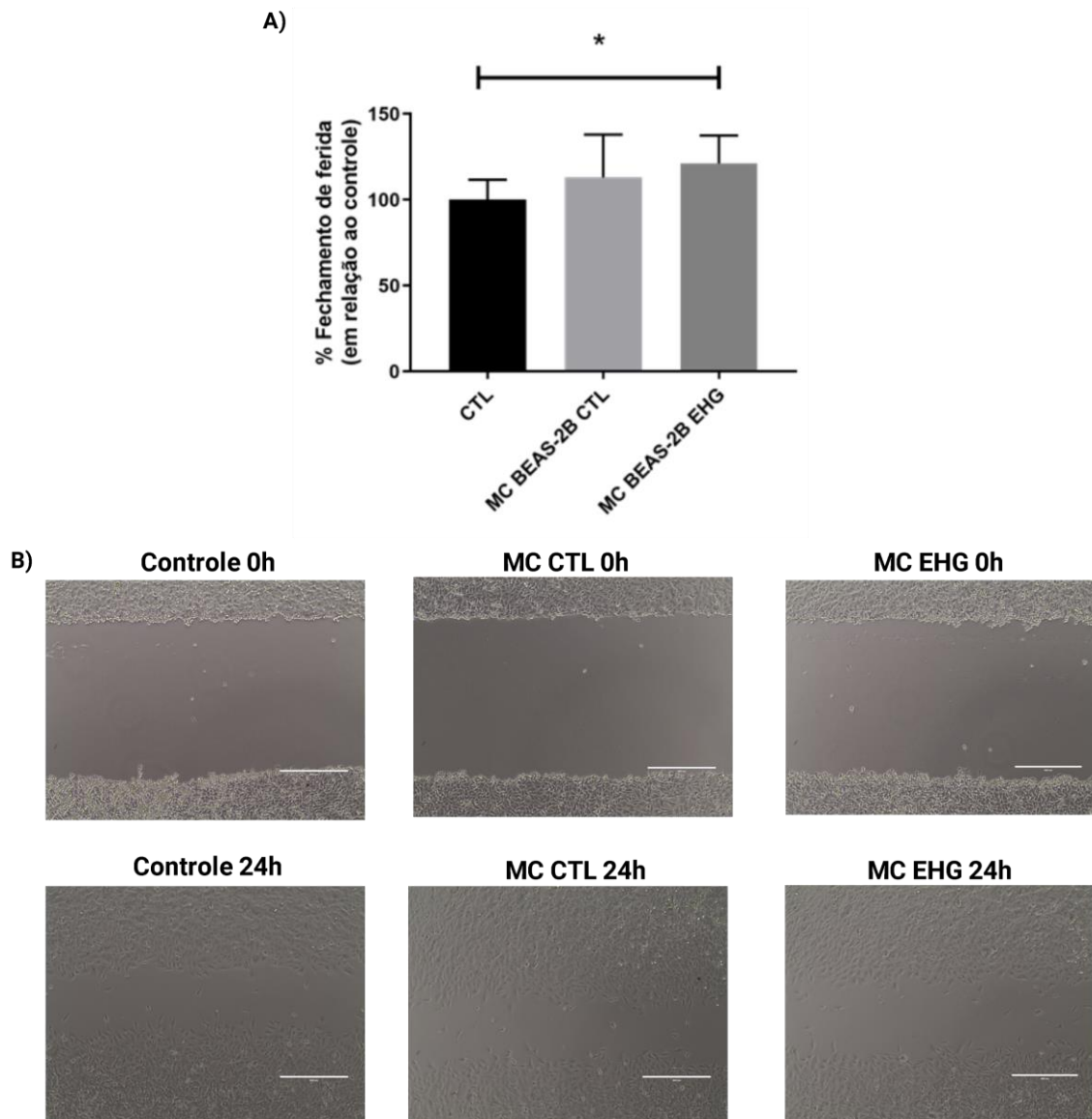


Figura 7 – Ensaio de fechamento de ferida com A549 tratada com MC BEAS-2B. A linhagem foi cultivada em placa de 6 poços até atingir a monocamada e realizada a ranhura central, recebendo tratamento com MCs por 24h. Os tempos 0h e 24h foram fotodocumentados. As áreas nos três tempos foram calculadas utilizando o software ImagemJ em todos os tratamentos. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-way ANOVA. * $p < 0,05$ ($n=3$).

Em função da redução na capacidade clonogênica de células A549 desafiadas com MC BEAS-2B, seguiu-se com a análise do perfil do ciclo de tais células. Observa-se que as células tumorais cultivadas por 48 horas em meio condicionado tanto em células BEAS-2B controle quanto BEAS-2B desafiadas com EHG apresentam um maior número de células na fase G1, diminuição em fase S. Na fase G2/M, verifica-se distinção entre células tratadas com MC BEAS-2B CTL e MC BEAS-2B EHG, enquanto há aumento de células no grupo MC CTL (<0,01), o grupo MC EHG se iguala ao grupo controle (FIGURA 8).

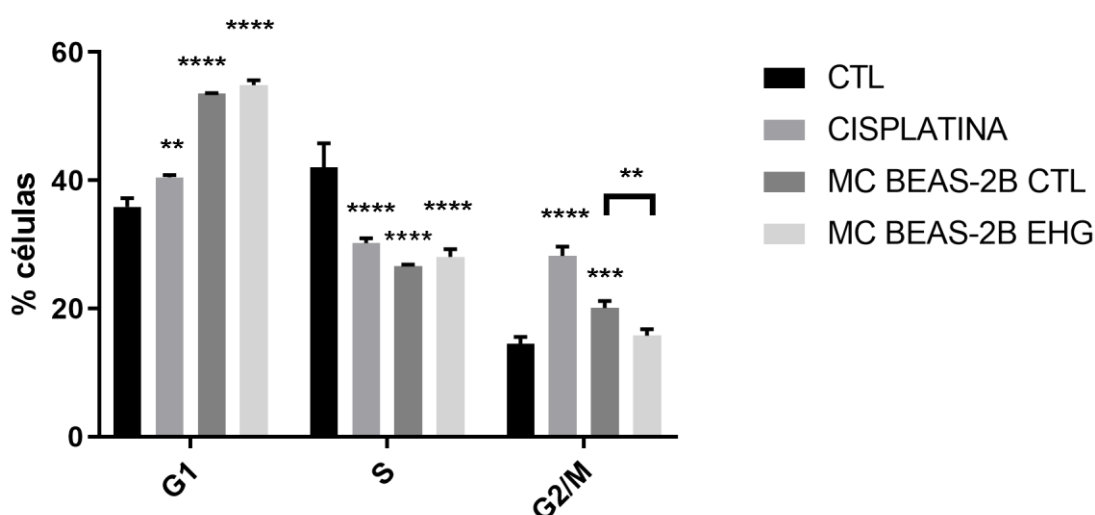


Figura 8 – Análise de ciclo celular por citometria de fluxo em A549 tratadas com BEAS-2B. As células A549 foram cultivadas com os MCs de BEAS-2B por 48 horas e marcadas com iodeto de propídeo para análise por citometria de fluxo. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-way ANOVA. *p<0,05, ** p< 0,01, *** p< 0,001 e **** p<0,0001 (n=3).

Secretoma de MCF10A pré-tratadas com EHG reduzem a capacidade clonogênica de células tumorais de mama

Células MCF7 cultivadas com MC MCF10A CTL e MC EHG foram avaliadas quanto ao perfil de viabilidade e capacidade de formação de colônia. Em 48 horas, observa-se uma elevação na viabilidade das células cultivadas com o meio gerado em célula previamente tratada com o extrato. Em 72h, o aumento na viabilidade ocorre tanto para o grupo MC MCF10A CTL quanto MC MCF10A EHG. (FIGURA 9). Em contrapartida a este aumento de viabilidade, o cultivo prolongado por meio do ensaio clonogênico, revela a redução na capacidade de formação de colônia de

MCF7 para ambos os grupos desafiados com secretoma. No entanto, observa-se que a redução mais pronunciada para o grupo MC MCF10A EHG comparada ao controle (FIGURA 9).

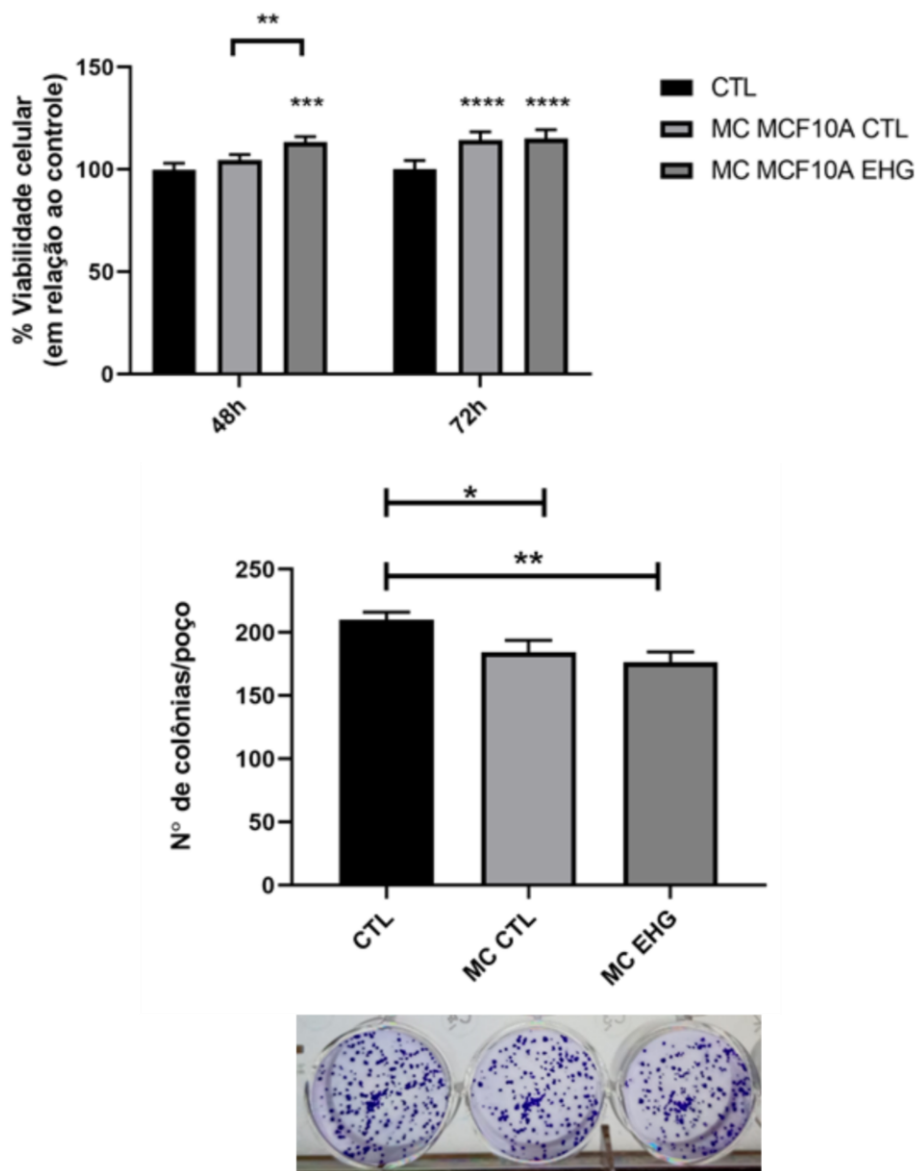


Figura 9 - Ensaio de viabilidade e clonogênico das células MCF7 cultivadas com os meios condicionados em MCF10A. O ensaio de viabilidade utilizado foi metabolização da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) (3 mM). As células MCF7 na presença de MC MCF10A apresenta aumento de viabilidade (n=4). No ensaio clonogênico, o MC MCF10A reduziu a capacidade de formação de colônia em ambos os tratamentos, sendo mais significativo em MC EHG ($p < 0,01$). O controle negativo consistiu em células tratadas com meio de cultura isento de soro e não condicionado (n=3). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

O MC de D-THP-1 CTL estimulado com LPS restaura a viabilidade de MCF7 quando comparado ao MC CTL

As células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos e posteriormente tratadas com EHG ou permaneceu em meio completo, para então ser condicionada por 30h em meio sem soro, parte do grupo foi estimulado com LPS concomitante ao processo de condicionamento (FIGURA 1).

As células MCF7 foram tratadas com os meios condicionados em THP-1 nos tempos 24h/48h/72h. O tratamento com meio condicionado em monócitos diferenciados em macrófagos D-THP-1 revelou um aumento de viabilidade para todos os grupos após 24h de cultivo. Este perfil permanece em 48 horas de cultivo. Já em 72 horas de cultivo verifica-se esse aumento, com exceção do grupo MC D THP-1 CTL que apresenta uma redução significativa na viabilidade celular ($p < 0,001$). Observa-se no tempo de 72 horas que a viabilidade de MCF7 desafiados com MC CTL é restaurada quando o secretoma é gerado em macrófagos estimulados com LPS (MC D THP-1 CTL LPS x MC D THP-1 CTL) ($p < 0,0001$). Tal perfil demonstra que o LPS modula os macrófagos no momento do condicionamento para um perfil de secretoma indutor de viabilidade na célula tumoral (FIGURA 10A). Interessantemente, o pré-tratamento de macrófagos com EHG promoveu uma alteração no secretoma repercutindo na resposta de alta viabilidade da célula tumoral similar ao efeito do secretoma de macrófagos estimulados com LPS (grupo MC D THP-1 EHG x MC D THP-1 EHG LPS). Durante o processo de padronização da produção de meio condicionado, foi realizada a avaliação das células D THP-1 quanto a sua viabilidade pós-condicionamento e observou-se que o grupo pré-tratado com EHG apresentou maior viabilidade após 48h que o grupo MC CTL, corroborando com os dados de que o EHG promove maior viabilidade celular (ANEXO IV).

O ensaio clonogênico demonstra que as células MCF7 tratadas com o secretoma de células monocíticas que não foram diferenciadas reduzem a formação de colônia, nos grupos que foram tratados com o secretoma de macrófagos não estimulado com LPS a capacidade de formação de colônia também é reduzida, sendo mais significativo no grupo pré-tratado com EHG ($p < 0,001$). Ambos os meios condicionados em macrófagos desafiados com LPS, controle e os previamente

estimulados com EHG apresentaram expressiva redução no número de colônias ($p < 0,0001$) (FIGURA 10B).

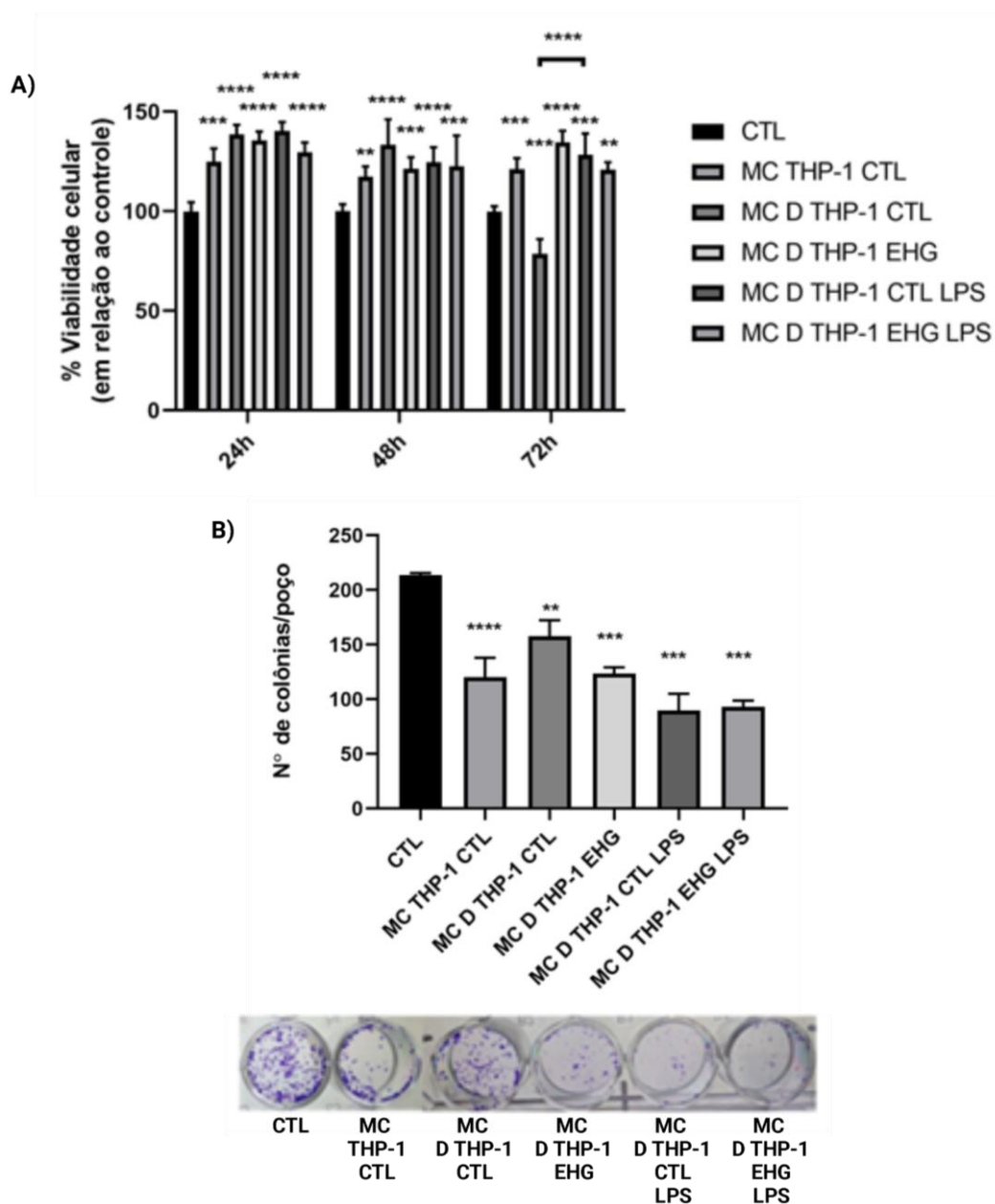


Figura 10 - Ensaio de viabilidade e clonogênico das células MCF7 cultivadas com os meios condicionados em THP-1 diferenciadas em macrófagos (D THP-1). O ensaio de viabilidade utilizado foi metabolização da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) (3 mM). As células MCF7 alteram seu perfil de viabilidade, se tornando mais viáveis, em todos os tempos e todos os grupos, com exceção do grupo MC D THP-1 CTL que reduz a viabilidade em 72h de tratamento. Perfil este, que é revestido quando comparado ao grupo MC D THP-1 CTL estimulado com LPS que restaura a viabilidade de MCF7 (n=4). No ensaio clonogênico, ocorre a redução de formação de colônia em todos os grupos não estimulados, sendo mais evidente no grupo MC EHG. Nos grupos estimulados com LPS, ambos os MCs reduzem a formação de colônia igualmente (n=3). O controle negativo consistiu em células tratadas com meio de cultura isento de soro e não condicionado. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$

O secretoma de macrófagos estimulados com LPS reduz a capacidade de formação de colônia em células tumorais A549

Os meios condicionados em células D-THP-1 não alteram o perfil de viabilidade de células tumorais A549 em desafio pelo período de 24h, 48h e 72h (FIGURA 11A). Observou-se que os meios condicionados que foram previamente estimulados com LPS reduziram a capacidade de formação de colônia da célula tumoral de pulmão (FIGURA 11B), indicando que o estímulo com LPS altera o perfil dos metabólitos secretados pelas células THP-1 diferenciadas em macrófagos e de forma a alterar o perfil de resposta da linhagem tumoral comparado ao grupo não estimulado.

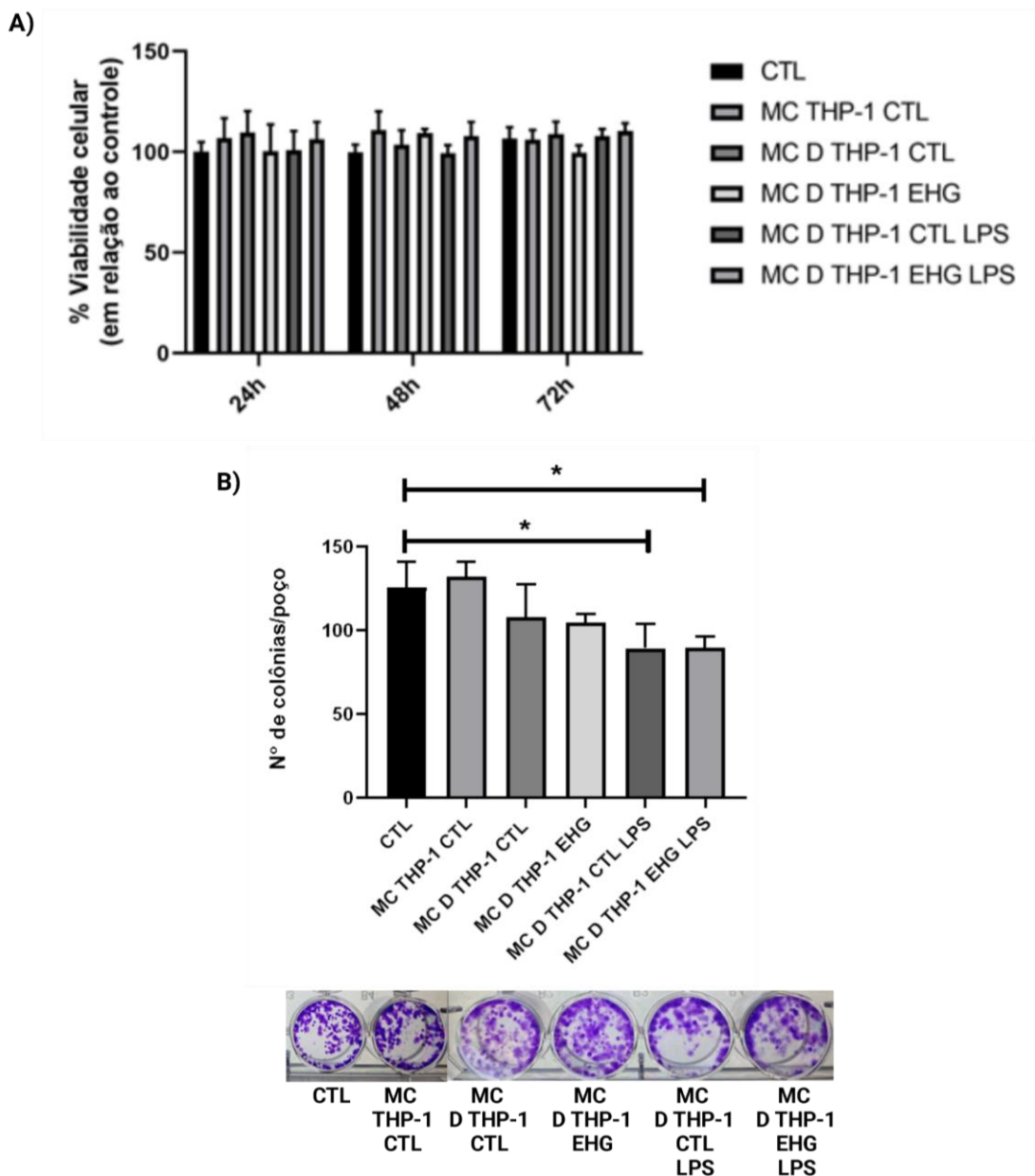


Figura 11 - Ensaio de viabilidade e formação de colônias das células A549 cultivadas com os meios condicionados em THP-1 diferenciadas em macrófagos (D THP-1). O ensaio de viabilidade utilizado foi metabolização da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) (3 mM). As células A549 não alteram seu perfil de viabilidade (A) nos tempos de tratamento com MC THP-1 (24h, 48h e 72h), mesmo nos grupos pré-tratados com EHG ou estimulados com LPS (n=4). No ensaio clonogênico (B) houve redução de capacidade clonogênica nos grupos que foram previamente estimulados com LPS durante o condicionamento (n=3). O controle negativo consistiu em células tratadas com meio de cultura isento de soro e não condicionado, um segundo controle foi utilizado sendo denominado MC THP-1 CTL consistindo de MC de células monocíticas não diferenciadas com PMA. *p<0,05

O pré-tratamento com EHG e estímulo com LPS aumenta a taxa de migração de células tumorais de pulmão em câmara *transwell*

A linhagem tumoral A549 foi desafiada com o meio condicionado em macrófagos estimulado com LPS para a avaliação da taxa de migração em câmara de *transwell*. Não se observa diferença na migração entre as células incubadas com o meio condicionado em macrófagos estimulados com LPS e as cultivadas com meio sem soro. No entanto, as células tumorais cultivadas com o secretoma de macrófagos pré-tratados com EHG e posteriormente estimulado com LPS apresentou um aumento na taxa de migração em relação aos controles. (FIGURA 12).

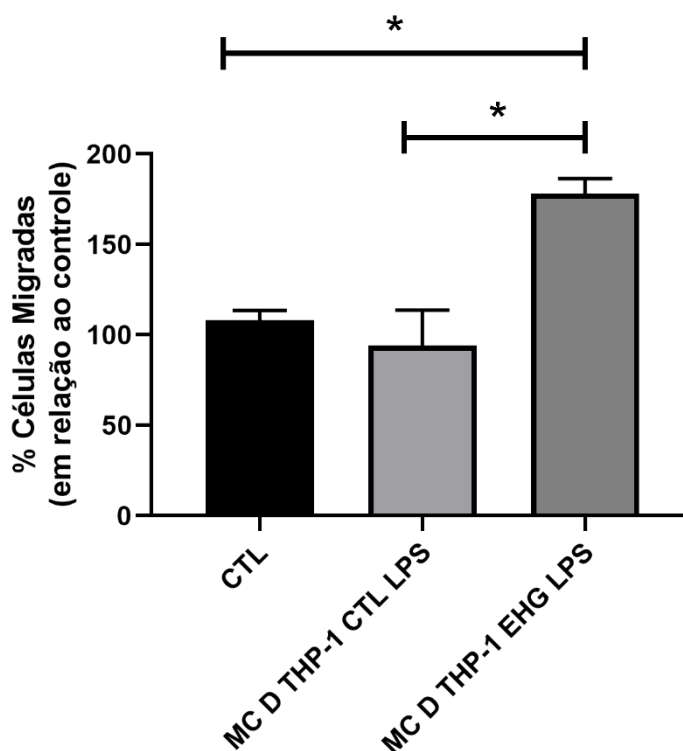


Figura 12 – Ensaio de migração em câmara *transwell* da linhagem A549 utilizando meios condicionados em células THP-1 pré-tratadas com EHG e estimuladas com LPS. As células A549 foram cultivadas na câmara superior (5×10^4) com meios condicionados, na câmara inferior a indução da migração foi realizada com meio completo. Após 48 horas, a câmara superior foi retirada e as células que migraram foram fixadas e foram coradas e contadas. As análises estatísticas foram feitas utilizando One-way ANOVA. * $p < 0,05$ ($n=3$).

Células cultivadas com meios condicionados estimulados com LPS apresentam alteração morfológica

Células A549 foram cultivadas por 48 horas na presença de meios condicionados de THP-1 não diferenciadas (MC THP-1 CTL), THP-1 diferenciadas em macrófagos pré-tratados ou não com EHG e estimulados com LPS (MC D THP-1 CTL LPS e MC D THP-1 EHG LPS). A análise das imagens de fluorescência revela que as células cultivadas nos meios condicionados de macrófagos estimulados com LPS apresentam maior vacuolização, morfologia mais alongada, fibroblastóide e com perda de adesão célula a célula (FIGURA 13C e FIGURA 13D), em comparação ao grupo controle (FIGURA 13A) e ao grupo MC THP-1 CTL (FIGURA 13B). Em relação à diferença entre a quantidade de vacúolos observados nas células tratadas com MC CTL e MC EHG, os resultados sugerem que o pré-tratamento com o extrato de guaraná reduz a vacuolização no citoplasma.

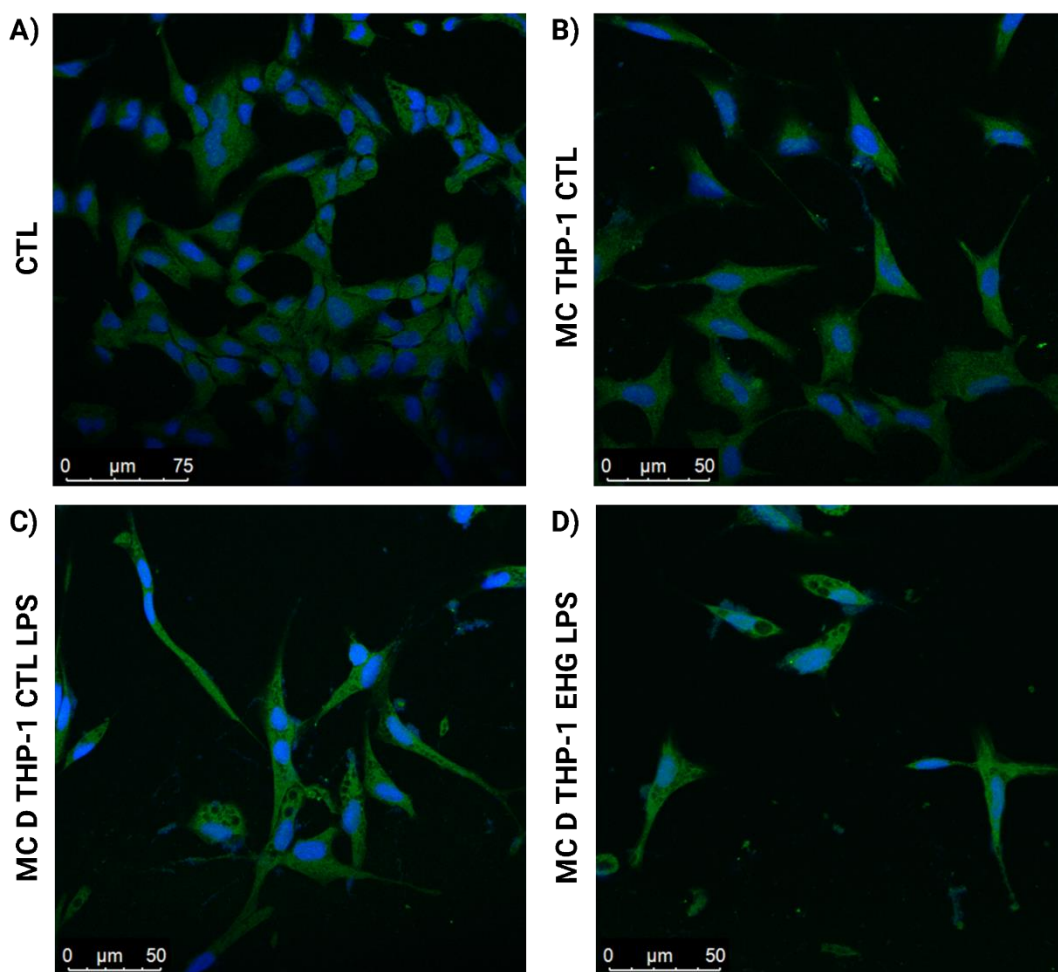


Figura 13 – imunofluorescência de A549 tratada com MCs em THP-1. As imagens mostram células vacuolizadas após tratamento com MC D THP-1 CTL e EHG estimulados com LPS.

Células THP-1 diferenciadas em macrófagos sofrem morte celular após tratamento com meio condicionado em células epiteliais pulmonares normais

Até o presente momento, descrevemos o efeito do secretoma gerado em células estromais: células epiteliais pulmonares, células epiteliais mamárias e macrófagos derivados da diferenciação de THP-1 no comportamento das células tumorais. Assim, visando estender o conhecimento da comunicação bidirecional entre as células do microambiente tumoral, avaliamos o efeito do meio condicionado em células tumorais A549 e MCF-7 e em células normais pulmonares BEAS-2B na viabilidade de macrófagos. Assim, células THP-1 diferenciadas em macrófagos, estimuladas ou não com LPS (10 ng/ml) foram cultivadas por 48 horas nos meios condicionados: MC A549, MC BEAS-2B, MC MCF-7.

Os meios condicionados em células tumorais de mama MCF7 não afetaram a viabilidade de células THP-1 diferenciadas em macrófagos (FIGURA 14A). Macrófagos cultivados com o meio condicionado em células A549 apresentaram redução na viabilidade no grupo tratado com MC EHG sem estímulo LPS comparada ao grupo controle. Já para os grupos estimulados com LPS, não apresentaram diferença significativa (FIGURA 12B). Macrófagos tratados com MC BEAS-2B reduziram a viabilidade em MC CTL e MC EHG sem estímulo de LPS. Observa-se a perda pronunciada de viabilidade dos macrófagos cultivados com secretoma de células BEAS-2B pré-tratadas com EHG (FIGURA 14C).

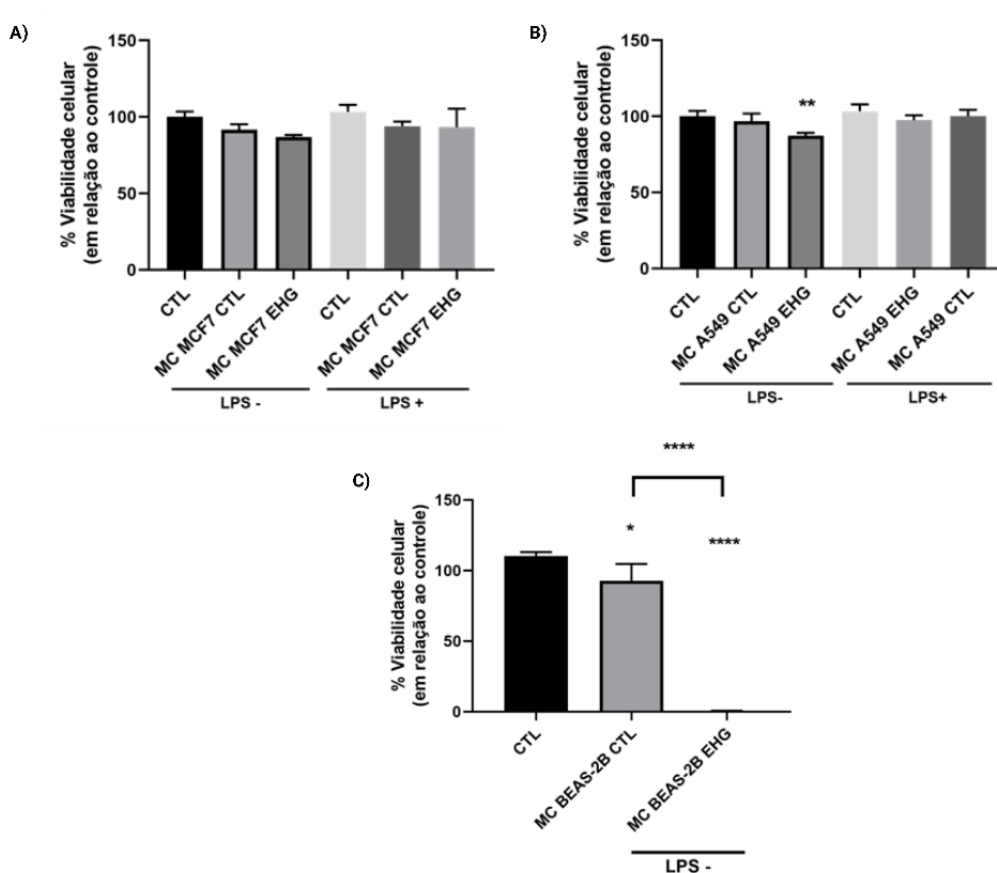


Figura 14 - Efeito dos meios condicionados em (A) MCF7, (B) A549 e (C) BEAS-2B na viabilidade de macrófagos estimulados ou não com LPS. A análise da viabilidade foi realizada pela metabolização da resazurina. As células diferenciadas em macrófagos foram expostas por 48h aos meios condicionados em (A) MCF7, (B) A549 e (C) BEAS-2B. O grupo LPS (10ng/ml) foi aplicado nas últimas 24 horas de cultivo com os MCs (A) e (B). Foi observado redução da viabilidade no grupo tratado com MC A549 EHG. Os macrófagos cultivados com meio condicionado em BEAS-2B apresentam redução na sua viabilidade (C) MC BEAS-2B EHG apresentou uma redução significativa da viabilidade dos macrófagos ($p < 0,0001$). As análises estatísticas foram feitas utilizando One-way ANOVA. ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ ($n = 3$).

DISCUSSÃO

As células epiteliais normais são as células vizinhas mais próximas às células tumorais durante o processo inicial de carcinogênese e se comunicam através do contato célula-célula, fatores solúveis e através de vesículas extracelulares (PORAZINSKI et al., 2016). Nossos resultados demonstraram que o meio condicionado em células epiteliais mamárias normais (MCF10A) reduziu a viabilidade das células tumorais de pulmão (A549) e aumentou a viabilidade de

mama (MFC7), diminuiu a capacidade clonogênica em ambas linhagens. No entanto, células MCF7 desafiadas com o meio condicionado gerado em células MCF10A pré-tratadas com EHG apresentaram uma redução expressiva em relação ao controle. A análise do ciclo celular, indicou que a modulação do meio condicionado em MCF10A promove um aumento no número de células A549 em fase G1. A redução na viabilidade de células A549 parece não ser decorrente de mecanismos de morte celular, uma vez que o conteúdo sub-G1 de células tratadas com MC MCF10 CLT e MC MCF10 EGH não diferiram do controle (ANEXO V). Tais resultados sugerem que o secretoma de MCF10A age modulando e suprimindo o desenvolvimento do tumor ou ativando o processo de transição epitélio-mesenquimal nas células A549 corroborando com a redução de proliferação observada na (Figura 3). Ademais, a mudança observada na morfologia da linhagem A549 tratada com meio condicionado em MCF10A revela a alteração da morfologia epitelial do grupo controle para uma morfologia fusiforme e alongada (ANEXO II).

Porazinski et al., (2016) relatou que as células epiteliais normais que circundam células transformadas em co-cultura em monocamada acabam por induzir a extrusão das células tumorais e conseqüentemente apoptose. De modo inverso, através da comunicação celular no MAT, as células tumorais são capazes de modular as células epiteliais normais. Jo et al., (2021) descreveu que o co-cultivo de células epiteliais mamárias normais (MCF10A) e células tumorais de mama (MDA-MB 231) fez com que houvessem mudanças na morfologia celular, com transição para células fusiformes, com perda de adesão célula-célula e da expressão de E-caderina nas células epiteliais normais, havendo aumento da taxa de proliferação, capacidade clonogênica e migração celular durante o co-cultivo. O cultivo com o MC gerado nas células tumorais, apresentou somente alguns fenótipos observados previamente como o aumento da motilidade celular e resistência à privação de soro nas células epiteliais mamárias normais. Esses resultados indicam que a modulação é realizada em maior quantidade através do contato célula-célula.

A modulação do secretoma de células epiteliais pulmonares normais (BEAS-2B) em células tumorais pulmonares A549 apresentou um perfil diferente do secretoma de MCF10A, uma vez que os MCs das células normais pulmonares não afetaram a viabilidade celular. Adicionalmente, o secretoma das células pré-tratadas com EHG reduziu a capacidade de formação de colônia e aumentou a motilidade celular das células tumorais no experimento de fechamento de ferida. Ademais, a

análise do ciclo celular revelou um aumento no número de células tumorais na fase G1 e redução do número de células na fase S para o grupo de células tratadas com meio condicionado em BEAS-2B. Tal perfil corrobora com a redução proliferativa e com o aumento da motilidade sugerindo à ativação do mecanismo de transição epitélio-mesênquimal desencadeada pelo meio condicionado. Neste sentido, os metabólitos, em especial as metilxantinas presentes no EHG poderiam estar ativando a sinalização pró-inflamatória culminando na liberação de fatores solúveis como TGF- β , miRNA, vesículas extracelulares que atuariam como os indutores da resposta de TEM nas células tumorais (ZHAO; MISHRA; DENG, 2018). Sendo necessário para compreender melhor esse mecanismo a utilização de marcadores de TEM nas células A549.

Para a confecção dos meios condicionados em THP-1 diferenciadas em macrófagos (D THP-1) foi utilizado o LPS como um ativador da resposta inflamatória, em baixa concentração (10 ng/ml) para um estímulo próximo ao valor fisiológico (ZHOU et al., 2018). O LPS é um indutor clássico do TLR4, que ao ser ativado induz a secreção de citocinas pró-inflamatórias que são essenciais para ativar respostas imunes (LU; YEH; OHASHI, 2008; KAWASAKI; KAWAI, 2014).

Os meios condicionados em D THP-1 com e sem estímulo de LPS, aumentaram a viabilidade das células MCF7 em 24 e 48 horas. Em 72 horas de tratamento, células MCF-7 tratadas com o secretoma de macrófagos diferenciados não tratadas com EHG e não estimulados com LPS (MC D THP-1 CTL) apresentaram redução expressiva na viabilidade. O pré-tratamento dos macrófagos com EHG ou o estímulo com LPS mostraram-se efetivos em reverter este perfil. Assim, neste modelo, o extrato hidroalcoólico de guaraná parece mimetizar a resposta pró-inflamatória acionada pelo LPS em macrófagos. A longo prazo, o efeito do meio condicionado em macrófagos revela uma redução na capacidade de formação de colônias para todos tratamentos. Muito embora, a redução menos expressiva no número de colônias corresponde ao grupo MC D THP-1 CTL. Esse dado sugere que o LPS utilizado como um baixo estímulo para inflamação age modulando as células D THP-1 para um perfil M1 com produção de citocinas pró-inflamatórias e o secretoma dessa célula difere das células pré-tratado com EHG.

O guaraná tem atividade imunomoduladora descrita por Carvalho et al., (2016) que quantificou as citocinas no sobrenadante de esplenócitos tratados com extrato sendo observada a redução de citocinas pró e antiinflamatória em doses altas

do guaraná (100 µg/ml). A citocina IL-17A foi a exceção apresentando uma elevação nesta concentração do guaraná. Em um estudo utilizando camundongo, del Giglio et al., (2015) verificou que o guaraná diminuiu a expressão de NF-κB e COX2 e reduziu significativamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF-α. O secretoma de células estimuladas com LPS pode estar aumentando a expressão de TLR4 nas células tumorais e isso favorecendo o perfil de sobrevivência das mesmas, o EHG parece estar contribuindo mimetizando essa estimulação das células tumorais.

O receptor TLR4 é expresso, principalmente, por macrófagos, mas pode ser expresso em menor quantidade por células endoteliais e estromais. Após ativados, o TLR4 aumenta a quantidade de citocinas pró-inflamatórias aumentando a proliferação, migração, invasão e sobrevivência celular, sendo este processo importante na defesa contra patógenos e reparo tecidual. No tumor, a superexpressão de TLR4 pelas células tumorais favorece o seu crescimento e formação de metástase (RAN et al., 2019). A elevação da expressão de TLR4 em células de câncer de mama MCF7 e MDA-MB 231 aumentou a expressão/secreção de MMP-2, MMP-9 e VEGF contribuindo para a migração e invasão das células *in vitro*. Em adição, a superexpressão de TLR4 em tecido de câncer mamário correlaciona-se à pacientes que se encontravam com metástase em linfonodos (YANG et al., 2014). Assim, a superexpressão de TLR4 parece estar relacionada a capacidade de sobrevivência celular tumoral.

As células A549 apresentaram um perfil diferente de resposta para o tratamento com meio condicionado em macrófagos diferenciados (D THP-1) não sendo observada diferença no ensaio de viabilidade entre os grupos avaliados. A capacidade clonogênica das células A549 somente apresentou redução significativa nas células cultivadas com o MC de células estimuladas com LPS, tanto controle quanto desafiadas com EHG. Esses resultados diferem dos descritos na literatura, no qual THP-1 diferenciados em macrófagos e estimulados com LPS em baixa dose produzem citocinas pró-inflamatórias como, IL-6 e IL-8, e essas citocinas aumentam a viabilidade de células de câncer gástrico em modelo *in vitro* e se relacionam com o avanço do câncer gástricos em pacientes (ZHOU et al., 2018). Desta forma, como a redução na capacidade proliferativa é um dos mecanismos associados ao processo de invasão e malignidade, a redução da capacidade de formação de colônia desencadeada pelo secretoma de macrófagos estimulados com LPS pode estar

relacionada à ativação da TEM em células A549. Interessantemente, células A549 cultivadas com o secretoma de macrófagos pré-tratados com EHG e estimulado com LPS apresentaram uma elevada capacidade de migração. Para acessar os mecanismos moleculares associados a esta mudança fenotípica, faz-se necessário a análise do perfil de citocinas nos sobrenadantes dos MCs de D THP-1. Citocinas pró-inflamatórias provenientes de THP-1 estão relacionadas com aumento da taxa de migração, invasão, ativação de fatores de transcrição e marcadores relacionados à TEM em células de câncer de mama (BEDNARCZYK et al., 2018). TGF- β 1 induz TEM em células epiteliais pulmonares e seu efeito é potencializado por TNF- α (WILLIS et al., 2005)

As células A549 com característica epitelial ao serem cultivadas no secretoma de macrófagos passam a apresentar uma morfologia fibroblastóide. Alterações como a perda de adesão célula-célula e presença de vacúolos citoplasmáticos são evidentes nas células tumorais desafiadas com o MC em macrófagos estimulados com LPS. A vacuolização citoplasmática pode estar relacionada à morte celular, pois, ocorre em células de mamíferos quando expostos à patógenos bacterianos ou compostos naturais e artificiais (SHUBIN et al., 2016). No entanto, os dados de viabilidade celular (Figura 9A) sugerem que os tratamentos com os MC gerados em macrófagos estimulados ou não com LPS ou com EHG parecem não induzir mecanismos de morte celular, não sendo observada alteração na viabilidade entre os grupos avaliados. Em relação à diferença entre a quantidade de vacúolos observados entre as células tratadas com MC CTL e MC EHG, os resultados parecem indicar que o pré-tratamento com o extrato de guaraná reduz a vacuolização no citoplasma.

Para investigar a comunicação cruzada entre as células tumorais e macrófagos foi realizado o ensaio de viabilidade de células THP-1 diferenciadas em macrófagos (D THP-1) tratadas com MCs em células tumorais e normais pré-tratadas ou não com EHG (MCF7, A549 e BEAS-2B). O secretoma de células A549 e BEAS-2B pré-tratadas com EHG reduziram a viabilidade de macrófagos não estimulados com LPS. Destaca-se a redução expressiva na viabilidade de BEAS-2B caracterizando a ativação de um processo de morte celular intenso. Esses dados corroboram com Han et al., (2020) que ao estudar a linhagem epitelial normal de pulmão BEAS-2B observaram que a linhagem possui perfil semelhante às células-

tronco mesenquimais (CTMs), compartilhando dos mesmos marcadores de superfície. Neste estudo, os autores avaliaram o perfil imunomodulador do meio condicionado em BEAS-2B e observaram que o mesmo exerce uma inibição significativa semelhante às CTMs na proliferação de linfócitos T totais e linfócitos Th1. Esta resposta está relacionada a produção exacerbada de indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) por BEAS-2B. Assim, será interessante avaliar o papel da IDO e dos metabolitos da via da quinureninas na resposta dos macrófagos desafiados com o secretoma de células BEAS-2B tratada com EHG.

CONCLUSÃO

O secretoma gerado em linhagens celulares distintas apresentam efeitos heterogêneos sobre a viabilidade, clonogenicidade e migração de células tumorais. Enquanto o meio condicionado em MCF10A reduziu a viabilidade e proliferação de A549 com aumento do número de células em fase G1 do ciclo celular, na linhagem MCF7, houve um inicial aumento na viabilidade e uma redução na capacidade clonogênica. O meio condicionado em células normais pulmonares pré-tratadas com EHG afetou fenotipicamente as células tumorais com redução da clonogenicidade e aumento na migração sugerindo a indução de um perfil agressivo com possível ativação da transição epitélio-mesenquimal.

Muito embora perfis de modulação do secretoma de macrófagos desafiados com LPS apresentaram-se distinção entre as linhagens estudadas, observa-se o estímulo com LPS afeta a clonogenicidade. O pré-tratamento dos macrófagos com EHG e estímulo com LPS aumentou a capacidade migratória de A549, com alteração morfológica sugerindo a ativação de TEM. O secretoma de células epiteliais pulmonares desafiadas com EHG compromete a viabilidade de macrófagos. Como perspectivas futuras, têm-se a caracterização dos secretomas com a quantificação das citocinas e metabólitos da via das quinureninas, marcadores de transição epitélio-mesenquimal e produção de metaloproteinases nas células tumorais, com o objetivo de elucidar os mecanismos responsáveis pelos perfis funcionais encontrados neste estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BEDNARCZYK, R. B. ; et al. 2018. Macrophage inflammatory factors promote epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. **Oncotarget**, 9(36):24272-24282.

BITTENCOURT, L.S., BORTOLIN, R.C., KOLLING, E.A., SCHNORR, C.E., ZANOTTO-FILHO, A., GELAIN, D.P., MOREIRA, J.C.F., 2016. Antioxidant Profile Characterization of a Commercial *Paullinia cupana* (Guarana) Extracts. **Journal of Natural Products and Resources**, 2(1), 47-52.

BITTENCOURT, L.S., MACHADO, D.C., MACHADO, M.M., DOS SANTOS, G.F.F., ALGARVE, T.D., MARINOWIC, D.R., RIBEIRO, E.E., SOARES, F.A.A., BARBISAN, F., ATHAYDE, M.L., CRUZ, I.B.M., 2013. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and Chemical Toxicology**, 53, 119-125.

BOHRER L. R.; SCHWERTFEGER, K.L. 2012. Macrophages promote fibroblast growth factor receptor-driven tumor cell migration and invasion in a CXCR2-dependent manner. **Mol Cancer Res**, 10:1294–305.

BUSSARD, K.M., MUTKUS, L., STUMPF, K., GOMEZ-MANZANO, C., MARINI, F. C. 2016. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. **Breast Cancer Res**. Aug 11;18(1):84.

CARVALHO, L. V. N.; et al. 2016. Evaluation of Antibacterial, Antineoplastic, and Immunomodulatory Activity of *Paullinia cupana* Seeds Crude Extract and Ethyl-Acetate Fraction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1–7.

DEL GIGLIO, A.; DEL GIGLIO, A.; 2015. Using *Paullinia cupana* (Guarana) to Treat Fatigue and Other Symptoms of Cancer and Cancer Treatment. **Bioactive Nutraceuticals and Dietary Supplements in Neurological and Brain Disease**, 57–63.

FUKUMASU, H., AVANZO, J.L., HEIDOR, R., SILVA, T.C., ATROCH, A., MORENO, F.S., DAGLI, M.L.Z., 2006. Protective effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart. var. *Sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver H. **Food and Chemical Toxicology**, 44, 862-867.

FUKUMASU, H., AVANZO, J.L., NAGAMINE, M.K., BARBUTO, J.A., RAO, K.V. DAGLI, M.L., 2008. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Braz J Med Biol Research**, 41, 305-310.

HERTZ, E., CADONÁ, F.C., MACHADO, A.K., AZZOLIN, V., HOLMRICH, S., ASSMANN, C., LEDUR, P., RIBEIRO, E.E., DE SOUZA FILHO, O.C., MÂNICA-CATTANI, M.F., DA CRUZ, I.B., 2015. Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. **Mol Clin Oncology**, 3(1):37-43.

HAN, X.; et al. 2020. Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells. **PLoS ONE**, 15(1): e0227174.

HAN, X.; et al. Human lung epithelial BEAS-2B cells exhibit characteristics of mesenchymal stem cells. **PLoS One**, 15(1):e0227174.

HANAHAH, D., WEINBERG, R.A.2011. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5), 646-674.

JO, S. H.; et al. 2021. S100A8/A9 mediate the reprogramming of normal mammary epithelial cells induced by dynamic cell–cell interactions with adjacent breast cancer cell. **Sci Rep.**, 11: 1337.

JOYCE, J.A., POLLARD, J.W., 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer**, 9(4), 239-252.

JUNG, K. Y.; et al. 2015. Cancer with higher density of tumor-associated macrophages were associated with poor survival rates. **J. Pathol. Transl. Med.**, 49(4): 318-324.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T.. 2014. Toll-like receptor signaling pathways. **Front Immunol.**, 5:461.

LU, C.; YEH, W.; OHASHI, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. **Cytokine**, 42(2):145-151.

MARQUES, L. L. M. et al. 2019. Paullinia cupana: a multipurpose plant – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, e. 29, 77–110.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. 2014. **Immunity.**, Jul 17;41(1):49-61.

PORAZINSKI, S.; et al. 2016. EphA2 Drives the Segregation of Ras-Transformed Epithelial Cells from Normal Neighbors. **Current Biology**, 26, 3220–3229.

QIU, S.; et al., 2018. Tumor-associated macrophages in breast cancer: Innocent bystander or important player?. **Cancer Treat Rev.**, vol 70, 178-189.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nat Protoc.**, 1(3):1458-61.

RUNA, F.; et al. 2017. Tumor Microenvironment Heterogeneity: Challenges and Opportunities. **Current Molecular Biology Reports**, vol 3, 218–229.

SHUBIN, A. V.; et al. 2016. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. **Oncotarget**, 7:55863-55889.

SOYSAL, S. D.; TZANKOV, A.; MUENST, S.E. 2015. Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. **Pathobiology**, 82:142-152.

STEINBICHLER, Teresa Bernadette; METZLER, Veronika; PRITZ, Christian; RIECHELMANN, Herbert; DUDAS, Jozsef. 2015. Tumor-associated fibroblast-conditioned medium induces CDDP resistance in HNSCC cells. **Oncotarget**, Vol. 7, No. 3, 2508-2518.

XUE, N.; et al. 2017. Chlorogenic acid inhibits glioblastoma growth through repolarizing macrophage from M2 to M1 phenotype. **Sci Rep.**, 7:39011.

WILLIS, B. C.; LIEBLER, J.M., LUBY-PHELPS, K.,; NICHOLSON, A.G.; CRANDALL, E. D.; DU BOIS, R. M.; et al. 2005. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. **Am J Pathol.** 166: 1321–1332.

YANG, H.; et al. 2014. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. **PLoS One**, 9(10):e109980.

YEUNG, O. W. H.; et al. 2016. Alternatively activated (M2) macrophages promote tumour growth and invasiveness in hepatocellular carcinoma. **Journal of Hepatology**, vol 62(3), 607-616.

YUE, P. Y. K.; et al. 2010. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **J Biomol Screen.**, 15(4):427-33.

ZHAO, M.; MISHRA, L.; DENG, C. 2018. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer. **Int J Biol Sci.**, 14(2): 111–123.

ZHOU, J.; et al. 2020. Tumor-associated macrophages: Recent insights and therapies. **Front. Oncol.**, 10:188.

ZHOU, Z.; et al.; 2019. CCL18 secreted from M2macrophages promote migration and invasion via the PI3K/Akt pathway in gallbladder cancer. **Cellular Oncology**, 42, 81-92.

ZHOU, X.; et al. 2018. Induction of Pro-Inflammatory Response via Activated Macrophage-Mediated NF- κ B and STAT3 Pathways in Gastric Cancer Cells. **Cell Physiol Biochem.**, 47(4):1399-1410.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (Dissertação)

- AL-ANSARI, M. M.; ABOUSSEKHRA, A. 2014. Caffeine mediates sustained inactivation of breast cancer-associated myofibroblasts via up-regulation of tumor suppressor genes. **PLoS One.**, Mar 3;9(3): e90907.
- ALLEN, M.; JONES, J. L. 2011. Jekyll and Hyde: The Role of the Microenvironment on the Progression of Cancer. **J Pathol**, Jan;223(2):162-76.
- ARTS, R. J. W.; et al. Transcriptional and metabolic reprogramming induce an inflammatory phenotype in non-medullary thyroid carcinoma-induced macrophages. 2016. **Oncoimmunology**, 5(12).
- BA, P.; et a. 2020. Curcumin suppresses the proliferation and tumorigenicity of Cal27 by modulating cancer associated fibroblasts of TSCC. **Oral Dis.**, Feb.
- BASILE, A., FERRARA, L., PEZZO, M.D., MELE, G., SORBO, S., BASSI, P., MONTESANO, D., 2005. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology** 102, 32–36.
- BARNES, B. B., STEINDORF, K., HEIN, R., FLESCH-JANYNS, D., & CHANG-CLAUDE, J., 2011. Population attributable risk of invasive postmenopausal breast cancer and breast cancer subtypes for modifiable and non-modifiable risk factors. **Cancer Epidemiol**, 35(4), 345-352.
- BITTENCOURT, L.S., BORTOLIN, R.C., KOLLING, E.A., SCHNORR, C.E., ZANOTTO-FILHO, A., GELAIN, D.P., MOREIRA, J.C.F., 2016. Antioxidant Profile Characterization of a Commercial *Paullinia cupana* (Guarana) Extracts. **Journal of Natural Products and Resources**, 2(1), 47-52.
- BITTENCOURT, L.S., MACHADO, D.C., MACHADO, M.M., DOS SANTOS, G.F.F., ALGARVE, T.D., MARINOWIC, D.R., RIBEIRO, E.E., SOARES, F.A.A., BARBISAN, F., ATHAYDE, M.L., CRUZ, I.B.M., 2013. The protective effects of guaraná extract (*Paullinia cupana*) on fibroblast NIH-3T3 cells exposed to sodium nitroprusside. **Food and Chemical Toxicology**, 53, 119-125.
- BOHRER L. R.; SCHWERTFEGER, K.L. 2012. Macrophages promote fibroblast growth factor receptor-driven tumor cell migration and invasion in a CXCR2-dependent manner. **Mol Cancer Res**, 10:1294–305.
- BORGES, A. D. V. B.; et al. 2006. Perception of death by oncological patient along its development. **Psicologia em Estudo**, Maringá, v. 11, n. 2, p. 361-369, mai./ago.
- BRAY, F. et al. 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **A cancer journal of clinicians**, nov/dec 68 (6): 394-424.
- BURRELL, R. A.; et al. 2013. The Causes and Consequences of Genetic Heterogeneity in Cancer Evolution. **Nature**, Sep 19;501(7467):338-45.

BUSSARD, K.M., MUTKUS, L., STUMPF, K., GOMEZ-MANZANO, C., MARINI, F. C. 2016. Tumor-associated stromal cells as key contributors to the tumor microenvironment. **Breast Cancer Res.** Aug 11;18(1):84.

CAMPOS, A.R., BARROS, A.I., SANTOS, F.A., RAO, V.S., 2003. Guarana (Paullinia cupana Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytother Research**, 17(10), 1199-1202.

CAMPOS, M.P.D., RIECHELMANN, R., MARTINS, L.C., HASSAN, B.J., CASA, F.B.A., DEL GIGLIO, A., 2011. Guarana (Paullinia cupana) improves fatigue in breast cancer patients undergoing systemic chemotherapy. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, 17, 505–512.

CAMPOS, A. F. 2018. Efeitos do guaraná (Paullinia cupana) na saúde cardiovascular: uma revisão sistemática. Dissertação – Mestrado em Nutrição em Saúde Pública. Universidade de São Paulo – USP, Escola de Saúde Pública, São Paulo. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6138/tde-27082018-120729/publico/AndressaFerreiraCampos_MTR_REVISADA.pdf. Acesso em: 09 mar 2020.

CHAABANE, W., USER, S. D., EL-GAZZAH, M., JAKSIK, R., SAJJADI, E., RZESZOWSKA-WOLNY, J., & LOS, M. J., 2013. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**, 61(1), 43-58.

CHABNER, B. A.; ROBERTS JR, T. G.;2005. Timeline: Chemotherapy and the War on Cancer. **Nat Rev Cancer**, Jan;5(1):65-72.

CHANG, Y.; 2017. Theophylline exhibits anti-cancer activity via suppressing SRSF3 in cervical and breast cancer cell lines. **Oncotarget**, Vol. 8, (No. 60).

CHEN, P.; et al. 2018. Activation of Fibroblasts by Nicotine Promotes the Epithelial-Mesenchymal Transition and Motility of Breast Cancer Cells. *J Cell Physiol.*, Jun;233(6):4972-4980.

DHAR, P.; WU, J. D. 2018. NKG2D and Its Ligands in Cancer. *Curr Opin Immunol*, 51:55-61.

EROLE, P., BOSCH, A., PEREZ-FIDALGO, J.A., LLUCH, A.,2012. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev.** 38(6), 698-707.

FERREIRA, J. R.; et al. 2018. Mesenchymal Stromal Cell Secretome: Influencing Therapeutic Potential by Cellular Pre-conditioning. *Front Immunol*, e. 4; n. 9:2837.

FUKUMASU, H., AVANZO, J.L., HEIDOR, R., SILVA, T.C., ATROCH, A., MORENO, F.S., DAGLI, M.L.Z., 2006. Protective effects of guarana (Paullinia cupana Mart. var. Sorbilis) against DEN-induced DNA damage on mouse liver H. **Food and Chemical Toxicology**, 44, 862-867.

FUKUMASU, H., SILVA, T.C., AVANZO, J.L., LIMA, C.E., MACKOWIAK, I.I., ATROCH, A., SPINOSA, H.S., MORENO, F.S., DAGLI, M.L.Z., 2006a. Chemopreventive effects of *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, the guaraná, on mouse hepatocarcinogenesis. **Cancer Letters**, 233,158-164.

FUKUMASU, H., AVANZO, J.L., NAGAMINE, M.K., BARBUTO, J.A., RAO, K.V. DAGLI, M.L., 2008. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. **Braz J Med Biol Research**, 41, 305-310.

FUKUMASU, H., LATORRE, A.O., Z Aidan-DAGLI, M.L., 2011. *Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*, guarana, increases survival of Ehrlich ascites carcinoma (EAC) bearing mice by decreasing cyclin-D1 expression and inducing a G0/G1 cell cycle arrest in EAC cells. **Phytother Research**, 25: 11-16.

GONÇALVES-RIBEIRO, S., DÍAZ-MAROTO, N.G., BERDIEL-ACER, M., SORIANO, A., GUARDIOLA, J., MARTÍNEZ-VILLACAMPA, M., SALAZAR, R., CAPELLÀ, G., VILLANUEVA, A., MARTÍNEZ-BALIBREA, E., MOLLEVÍ, D.G., 2016. Carcinoma-associated fibroblasts affect sensitivity to oxaliplatin and 5FU in colorectal cancer cells. **Oncotarget**, 7(37), 59766-59780.

GOULET, C. R.; et al. 2019. Cancer-associated fibroblasts induce epithelial–mesenchymal transition of bladder cancer cells through paracrine IL-6 signalling. **BMC Cancer**, e. 19, n. 137.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A.2011. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144(5), 646-674.

HANAHAN, D., WEINBERG, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. **Cell.**, 100: 57-70.

HERTZ, E., CADONÁ, F.C., MACHADO, A.K., AZZOLIN, V., HOLMRICH, S., ASSMANN, C., LEDUR, P., RIBEIRO, E.E., DE SOUZA FILHO, O.C., MÂNICA-CATTANI, M.F., DA CRUZ, I.B., 2015. Effect of *Paullinia cupana* on MCF-7 breast cancer cell response to chemotherapeutic drugs. **Mol Clin Oncology**, 3(1):37-43.

HILL GM, MORIARITY DM, SETZER WN., 2011. Attenuation of cytotoxic natural product DNA intercalating agents by caffeine. **Sci Pharm.**, 79:729-747.

HUI, L., CHEN, Y., 2015. Tumor microenvironment: Sanctuary of the devil. **Cancer Letters**, 368(1), 7-13.

INCA. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. Estimativas 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em :20 fevereiro 2020.

JIANG W, WU Y, JIANG X. Coffee and caffeine intake and breast cancer risk: an updated dose-response meta-analysis of 37 published studies. **Gynecol Oncol**. 2013; 129:620–629.

JIÃO, Y.; ZHAO, H.; CHEN, G.; SANG, X.; YANG, L; HOU, Z.; SI, W.; ZHENG, B.. Pyroptosis of MCF7 Cells Induced by the Secreted Factors of hUCMSCs. 2018. **Hindawi Stem Cells International**. Article ID 5912194, 12 pages.

JONES, P.A., BAYLIN, S.B., 2007. The epigenomics of cancer. **Cell**, 128(4), 683-692.

JOYCE, J.A., POLLARD, J.W., 2009. Microenvironmental regulation of metastasis. **Nat Rev Cancer**, 9(4), 239-252.

KAMINSKA, K.; et al. 2015. The role of the cell–cell interactions in cancer progression. **Journal of cellular and molecular medicine**, feb, v. 19 (2): 283-296.

LAKHANI, S. R., REIS-FILHO, J. S., FULFORD, L., PENAULT-LLORCA, F., VAN DER VIJVER, M., PARRY, S., 2005. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. **Clin Cancer Res**, 11(14), 5175-5180.

LI, J.; et al. 2017. The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment. **Oncotarget**. Sep 12; 8(39): 66656–66667.

LIU, H; ZHOU, Y.; TANG, L. 2017. Caffeine induces sustained apoptosis of human gastric cancer cells by activating the caspase-9/caspase-3 signalling pathway. **Mol Med Rep**., Sep; 16(3): 2445–2454.

LIU, C. T. et al. 2013. M2-polarized tumor-associated macrophages promoted epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells, partially through TLR4/IL-10 signaling pathway. *Lab Invest.*, Jul;93(7):844-54.

LU F, GLADDEN AB, DIEHL JA. 2003. An alternatively spliced cyclin D1 isoform, cyclin D1b, is a nuclear oncogene. **Cancer Res** 63: 7056–7061.

MARTINS IL, MIRANDA JP, OLIVEIRA NG, FERNANDES AS, GONÇALVES S, ANTUNES AM. Synthesis and biological activity of 6-selenocaffeine: potential modulator of chemotherapeutic drugs in breast cancer cells. **Molecules**. 2013; 18:5251–5264.

MARQUES, L. L. M. et al. 2019. Paullinia cupana: a multipurpose plant – a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, e. 29, 77–110.

MARUSYK, A., ALMENDRO, V., & POLYAK, K.. 2012. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer?. **Nat Rev Cancer**, 12(5), 323-334.

MATTEI, R., DIAS, R.F., ESPÍNOLA, E.B., CARLINI, E.A., BARROS, S.B.. 1998. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**. 60, 111–116.

MITTAL, D. et al. 2014. New Insights Into Cancer Immunoediting and Its Three Component Phases - Elimination, Equilibrium and Escape. **Curr Opin Immunol**, Apr;27:16-25.

MIWA, S.; et al. 2012. Caffeine induces apoptosis of osteosarcoma cells by inhibiting AKT/mTOR/S6K, NF- κ B and MAPK pathways. **Anticancer Res.**, Sep;32(9):3643-9.

MOSMANN, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, 16;65 (1-2), 55-63.

MUSTAFA, M.; et al. Lung Cancer: Risk Factors, Management, And Prognosis. 2016. **Journal of Dental and Medical Sciences**. v. 15, oct., p. 94-101.

NAZARÉ, R.F.R.; FIGUEIREDO, F.J.C. 1982. Contribuição ao estudo do guaraná. Belém, **Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Úmido**, 40p. (EMBRAPA/CPATU. Documentos. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/382454/1/CPATUDOC4.pdf>. Acesso em: 20 setembro 2019.

NIKNAFS, B. Induction of Apoptosis and Non-Apoptosis in Human Breast Cancer Cell Line (MCF-7) by Cisplatin and Caffeine. 2011. **Iran Biomed J.**, Oct; 15(4): 130–133.

NORONHA, N. C.; et al. 2019. Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. **Stem Cell Research & Therapy**, e. 10, n. 131.

NOY, R.; POLLARD, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. 2014. **Immunity**, Jul 17;41(1):49-61.

OPALA, T., RZYMSKI, P., PISCHEL, I., WILCZAK, M., WOZNIAK, J., 2006. Efficacy of 12 weeks supplementation of a botanical extract-based weight loss formula on body weight, body composition and blood chemistry in healthy, overweight subjects: a randomised double-blind placebo-controlled clinical trial. **European Journal of Medical Research**.11, 343–350.

PARK, E.K.; JUNG, H.S.; YANG, H.I.; YOO, M.C.; KIM, C.; KIM, K.S.; 2007. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. **Inflamm Res.**, Jan; 56(1):45-50.

POLO, S.H.O., 2006. Estrutura e desenvolvimento de sementes de Paullinia L. (*Sapindaceae*). Campinas, SP. Disponível em: http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/315564/1/Polo_SandraHelianyObando_M.pdf. Acesso em 17 dez 2018.

QUAIL, D.F., JOYCE, J.A.. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nat Med**, 19(11), 1423-1437.

RAVI SUBBIAH, M.T., YUNKER, R., 2008. Studies on the nature of anti-platelet aggregatory factors in the seeds of the Amazonian Herb Guaraná (*Paullinia cupana*). International **Journal for Vitamin and Nutrition Research** 78, 96–101.

RICHARDSON, C. J., SCHALM, S. S., & BLENIS, J. 2004. PI3-kinase and TOR: PIKTORing cell growth. **Semin Cell Dev Biol**, 15(2), 147-159.

REPETTO, G.; del PESO, A.; ZURITA, J.L.2008. Neutral Red Uptake Assay for the Estimation of Cell Viability/Cytotoxicity. **Nat Protoc**, 3(7):1125-31.

SANTA MARIA, A.; et al.. 1998. Evaluation of the Toxicity of Guarana with in Vitro Bioassays. **Ecotoxicology and environmental safety**. 39, 164—167.

SAUNDERS DE, LAWRENCE WD, CHRISTENSEN C, WAPPLER NL, RUAN H, DEPUPO G. 1997. Paclitaxel-induced apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Int J Cancer*. 70: 214-220.

SCHIMPL, F.C., DA SILVA, J.F., GONÇALVES, J.F., MAZZAFERA, P. 2013. Guaraná: revisiting a highly caffeinated plant from the Amazon. **J Ethnopharmacology**, 150,14-31.

SCHREIBER, R. D; OLD, L. J.; SMYTH, M. J.; 2011. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. **Science**, vol. 331 no. 6024 1565-1570.

SHE L.; QIN Y.; WANG J.; et al. 2018. Tumor-associated macrophages derived CCL18 promotes metastasis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Cell Int.*,18:120.

SILVA, K. A. Elaboração, caracterização e avaliação da viabilidade celular e atividade antioxidante de encapsulados de extrato hidroalcoólico de guaraná (*Paullinia cupana* (Mart.) Ducke). Trabalho de Conclusão de Curso (Tecnologia em Biotecnologia) – Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2019.

SMITH, Ashley; TEKNOS, Theodoros N.; PAN, Quintin. 2013. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 49, 287–292

SOLIS-MARTINEZ, R., et al. 2018. Regulation of Immunophenotype Modulation of Monocytes-Macrophages From M1 Into M2 by Prostate Cancer Cell-Culture Supernatant via Transcription Factor STAT3. **Immunol Lett.**,196:140-148.

SOON, P. S.; et al. 2013. Breast cancer-associated fibroblasts induce epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells. **Endocr Relat Cancer**, Jan 7;20(1):1-12.

SOUZA, W. F.; et al. 2014. Sinalização celular em câncer. **Cienc. Cult.** São Paulo, vol.66 no.1.

STEINBICHLER, Teresa Bernadette; METZLER, Veronika; PRITZ, Christian; RIECHELMANN, Herbert; DUDAS, Jozsef. 2015. Tumor-associated fibroblast-conditioned medium induces CDDP resistance in HNSCC cells. **Oncotarget**, Vol. 7, No. 3, 2508-2518.

STEWART, B. W., WILD, C., International Agency for Research on Cancer & World Health Organization. 2014. **World cancer report 2014**. Lyon, France.

STUART, E. C., SCANDLYN, M. J., ROSENGREN, R.J.. 2006. Role of epigallocatechin gallate (EGCG) in the treatment of breast and prostate cancer. **Life Sci.**79:2329–2336.

SU, S.J., CHANG, K.L., SU, S.H., YEH, Y.T., SHYU, H.W., & CHEN, K.M. 2013. Caffeine regulates osteogenic differentiation and mineralization of primary adipose-derived stem cells and a bone marrow stromal cell line. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 64, 429–436.

SUGIMOTO, N.; et al. 2014. Theobromine, the Primary Methylxanthine Found in Theobroma cacao, Prevents Malignant Glioblastoma Proliferation by Negatively Regulating Phosphodiesterase-4, Extracellular Signal-regulated Kinase, Akt/mammalian Target of Rapamycin Kinase, and Nuclear Factor-Kappa B. **Nutrition and Cancer**, 66(3), 419–423.

TORREZINI, T.; ATHANAZIO, A. D. 2008. Imunovigilância e Imunoedição de Neoplasias : Implicações Clínicas e potencial terapêutico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 54(1): 63-77.

VOGELSTEIN, B., & KINZLER, K. W. 2004. Cancer genes and the pathways they control. **Nat Med**, 10(8), 789-799.

WAGNER, W., HO, A.D., & ZENKE, M. 2010. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part B**, 16, 445–453.

WANG, R.; et al. 2011. Tumor-associated macrophages provide a suitable microenvironment for non-small lung cancer invasion and progression. **Lung Cancer**, Nov., v. 74(2): 188-196.

WANG, L.; et al. 2017. Cancer-associated fibroblasts enhance metastatic potential of lung cancer cells through IL-6/STAT3 signaling pathway. **Oncotarget.**, Jun 28;8(44):76116-76128.

WANG, Q.; et al.. 2017a. Curcumin suppresses epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of pancreatic cancer cells by inhibiting cancer-associated fibroblasts. **Am J Cancer Res.**, 7(1): 125–133.

WANG, Y.; et al. 2019. Epiregulin reprograms cancer-associated fibroblasts and facilitates oral squamous cell carcinoma invasion via JAK2-STAT3 pathway. **J Exp Clin Cancer Res.** jul., 38: 274.

WU A. H.; BUTLER, L.M. 2011. Green tea and breast cancer. *Mol Nutr Food Res*, 55: 921-930.

WU, X.; et al; 2017. IL-6 secreted by cancer-associated fibroblasts promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of gastric cancer via JAK2/STAT3 signaling pathway. ***Oncotarget.***, Mar 28;8(13):20741-20750.

YOKOMIZO; MORIWAKI. Effects of Uptake of Flavonoids on Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide in Human Intestinal Caco-2 Cells, ***Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry***, 70:6, 1317-1324, 2006.

YAO, R. R.; et al. 2018. M2-polarized tumor-associated macrophages facilitated migration and epithelial-mesenchymal transition of HCC cells via the TLR4/STAT3 signaling pathway. ***World J Surg Oncol.*** Jan 16;16(1): 9.

YU, G; et al.2016. Combinational Immunotherapy with Allo-DRibble Vaccines and Anti-OX40 Co-Stimulation Leads to Generation of Cross-Reactive Effector T Cells and Tumor Regression. *Scientific Report.* ***Springer Nature.*** v. 6, n. 1, p.423-431.

YUE, P. Y. K.; LEUNG, E. P. Y.; MAK, N. K.; WONG, R. N. S.; 2010. A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. ***Journal of Biomolecular Screening***, 15(4).

ZHENG, J.; GAO, P. 2019. Toward Normalization of the Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. ***Integr Cancer Ther.***, 18.


ZHENG, M. 2016. Classification and Pathology of Lung Cancer. ***Surg Oncol Clin NAm***, 25: 447–468.

ZHOU, B.; et al. 2014. A role for cancer-associated fibroblasts in inducing the epithelial-to-mesenchymal transition in human tongue squamous cell carcinoma. ***J Oral Pathol Med.***, Sep;43(8):585-92.

ZHOU, Y.; et al. 2018. Induction of Pro-Inflammatory Response via Activated Macrophage-Mediated NF- κ B and STAT3 Pathways in Gastric Cancer Cells. ***Cell Physiol Biochem.***, 47:1399–1410.

ANEXOS

ANEXO I – Comprovante de Cadastro no Sistema nacional de Gestão ao Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado


Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A4ED2CA

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro:	A4ED2CA
Usuário:	Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria
CPF/CNPJ:	068.567.686-21
Objeto do Acesso:	Patrimônio Genético
Finalidade do Acesso:	Pesquisa

Espécie
Paullinia cupana

Título da Atividade: **Efeito do melo condicionado em fibroblastos tratados com extrato hidroalcoólico de guaraná nas células tumorais de mama**

Equipe

Jerusa Araújo Quintão Arantes Faria	Universidade Federal do Amazonas
Kallil Araújo da Silva	Universidade Estadual do Amazonas
Patrícia Rayna Simas de Souza	Universidade Federal do Amazonas
Italo Rennan Pinto Pessoa	Universidade Federal do Amazonas
Pedro Henrique Campelo Félix	Universidade Federal do Amazonas
Dawidson Assis Gomes	Universidade Federal de Minas Gerais
Emerson Silva Lima	Universidade Federal do Amazonas
Parcelas Nacionais	

ANEXO II – Morfologia da linhagem A549 com MC em MCF10A

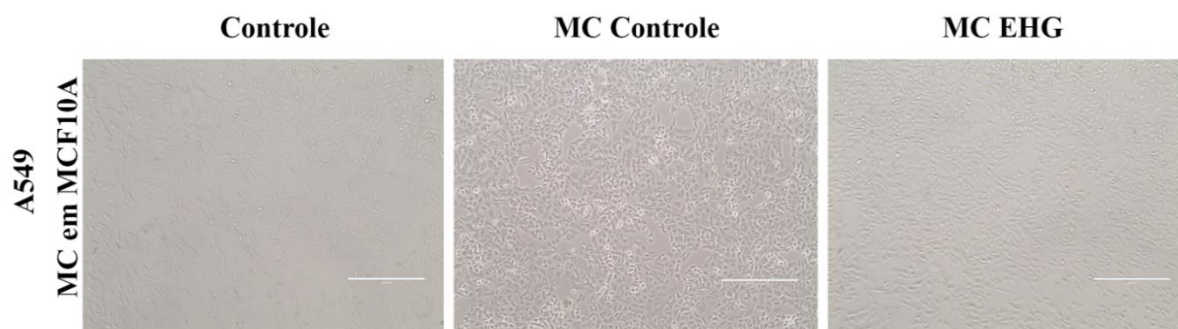


Figura S1. Morfologia de A549 com meios condicionados em MCF10A após 24 horas de tratamento. Observa-se a perda da morfologia epitelial nos grupos MC Controle e aquisição de morfologia mesenquimal com células mais alongadas. Enquanto grupos Controle e MC EHG são semelhantes. Aumento de 10x. (Barra de escala = 400 μ m).

ANEXO III - Morfologia da linhagem A549 com MC em BEAS-2B

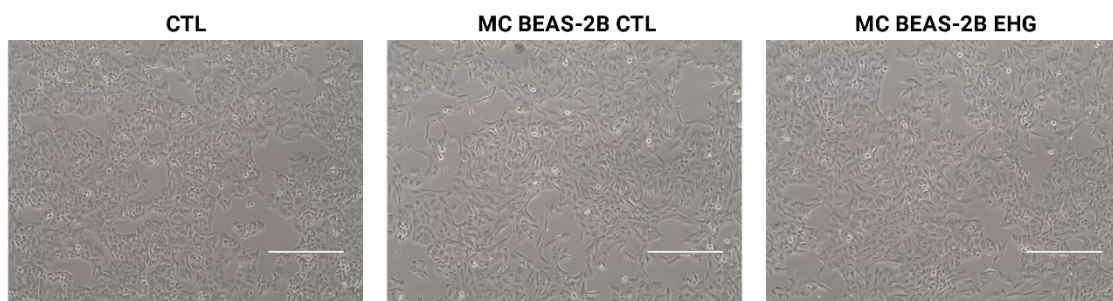


Figura S2. Morfologia de A549 com meios condicionados em BEAS-2B após 24 horas de tratamento. Observa-se a perda da morfologia epitelial nos grupos MC CTL e MC EHG e aquisição de morfologia mesenquimal com células mais alongadas em relação ao grupo CTL. Aumento de 10x. (Barra de escala = 400 μm).

ANEXO IV - Viabilidade de THP-1 pós-condicionamento

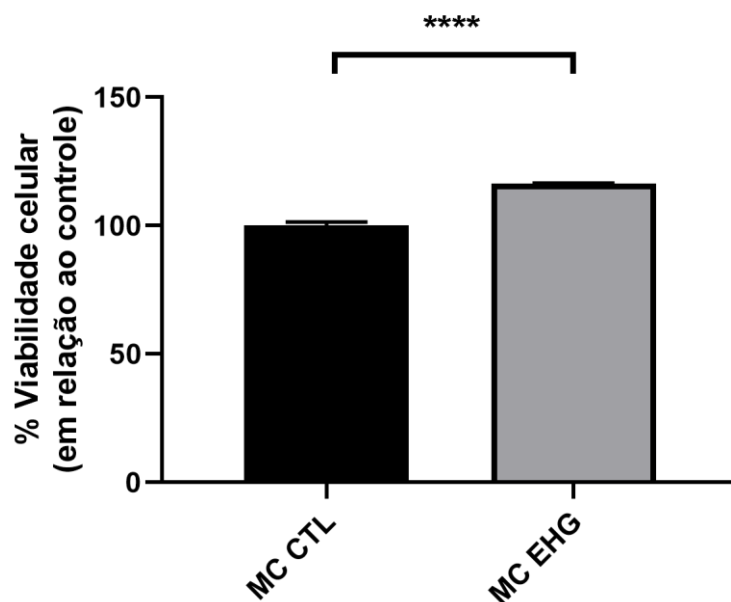


Figura S3. Viabilidade de THP-1 após 48h condicionando. Durante a padronização dos métodos, as células THP-1 foram avaliadas quanto a sua viabilidade após o período de condicionamento e observou-se que nos grupos que foram pré-tratadas com EHG houve uma maior viabilidade do que o grupo CTL, evidenciando que o EHG promove melhor viabilidade das células tratadas. **** $p < 0,0001$

ANEXO V - Conteúdo Sub-G1 de A549 tratadas com MC MCF10A

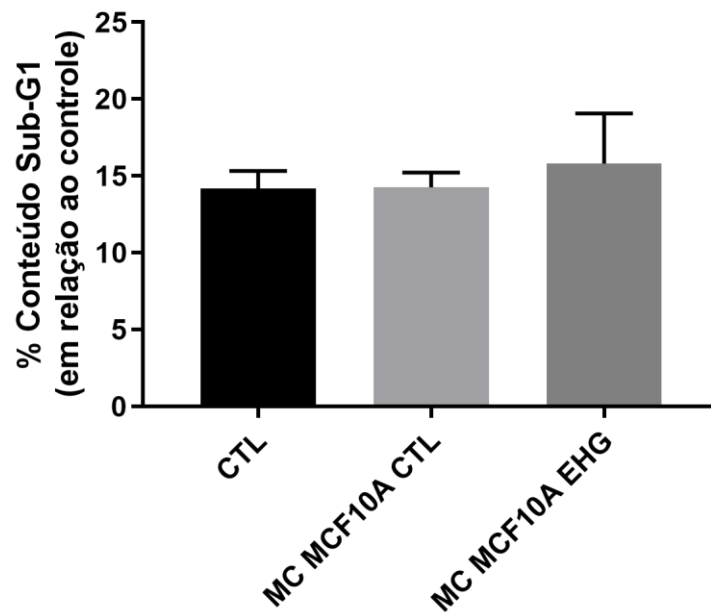


Figura S4. Conteúdo sub-G1 de A549 tratadas com MC MCF10A. A análise do conteúdo Sub-G1 de A549 tratadas com MCF10A mostra que o tratamento não induziu morte por apoptose, pois os dois tratamentos não diferem do controle.