

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA GERAL/BIOPROSPECÇÃO

**CINTIA MIRANDA DOS SANTOS**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS  
FOLHAS E RAÍZES DE *Senna rugosa***

**DOURADOS  
2020**

**CINTIA MIRANDA DOS SANTOS**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS  
FOLHAS E RAÍZES DE *Senna rugosa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, da Universidade Federal da Grande Dourados para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Bioprospecção  
Linha de pesquisa: Biotecnologia e Bioensaios

Orientador:  
Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos

Coorientadores:  
Dr<sup>a</sup>. Debora da Silva Baldivia  
Dr. José Tarcísio Giffoni de Carvalho Junior

**DOURADOS  
2020**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S237c Santos, Cintia Miranda Dos  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS E RAÍZES DE Senna  
rugosa [recurso eletrônico] / Cintia Miranda Dos Santos. -- 2020.  
Arquivo em formato pdf.

Orientador: Edson Lucas dos Santos.

Coorientadores: Debora da Silva Baldivia , José Tarcísio Giffoni de Carvalho Junior.

Dissertação (Mestrado em Biologia Geral/Bioprospecção)-Universidade Federal da Grande  
Dourados, 2020.

Disponível no Repositório Institucional da UFGD em:

<https://portal.ufgd.edu.br/setor/biblioteca/repositorio>

1. Cerrado. 2. amendoirana. 3. estresse oxidativo. 4. antioxidante. 5. câncer. I. Santos, Edson  
Lucas Dos. II. Baldivia, Debora Da Silva. III. Carvalho Junior, José Tarcísio Giffoni De . IV. Título.

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

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.

"COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS FOLHAS E RAÍZES DE  
*Senna rugosa*"

POR

**CINTIA MIRANDA DOS SANTOS**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA À UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE  
DOURADÓS (UFGD), COMO PARTE DOS REQUISITOS EXIGIDOS PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM BIOLOGIA GERAL - ÁREA DE  
CONCENTRAÇÃO: "BIOPROSPECÇÃO".



PROF. DR. EDSON LUCAS DOS SANTOS  
ORIENTADOR – UFGD



PROF. DR. CAIO FERNANDO RAMALHO DE OLIVEIRA  
MEMBRO TITULAR – UFGD



PROF.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> JAQUELINE FERREIRA CAMPOS  
MEMBRO TITULAR – UFGD

Aprovada em 27 de maio de 2020.

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal da Grande Dourados, juntamente a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Geral/Bioprospecção que com seu corpo docente, administração e direção forneceram o suporte para a realização da minha pós-graduação.

Ao meu orientador professor Dr. Edson Lucas dos Santos pelo seu apoio, incentivos e correções necessárias para meu desenvolvimento como pesquisadora.

Aos meus coorientadores Débora da Silva Baldivia e José Tarcísio Giffoni de Carvalho por me auxiliarem diretamente na realização da minha pesquisa e dessa forma contribuíram para o meu crescimento como mestranda.

Ao Grupo de Estudos em Biotecnologia e Bioprospecção Aplicados ao Metabolismo (GEBBAM) que me recebeu muito bem no laboratório, permitindo que minha pesquisa fosse realizada, me auxiliando no dia-a-dia como pesquisadora e como pessoa.

Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FUNDECT, pelo apoio financeiro que permitiu a realização dessa pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

Santos, C. M. dos. Composição química e atividades biológicas das folhas e raízes de *Senna rugosa* [Dissertação]. Dourados: Pós-Graduação em Biologia Geral/Bioprospecção, Universidade Federal da Grande Dourados; 2020.

## RESUMO

*Senna rugosa* é uma planta arbustiva encontrada no Cerrado, conhecida popularmente como amendoirana e utilizada na medicina popular como vermífugo e para o tratamento de acidentes ofídicos. Poucos estudos relatam as atividades biológicas de *S. rugosa*. Assim, este estudo teve como objetivo determinar a composição química, avaliar a atividade antioxidante, a proteção de macromoléculas e ação antileucêmica e anti-melanoma dos extratos etanólicos das folhas (EFSR) e raízes (ERSR) de *S. rugosa*. A composição química foi determinada por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. As propriedades antioxidantes foram avaliadas utilizando os ensaios de captura direta de radicais livres ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>, a proteção contra danos oxidativos foi avaliada em proteínas contra a oxidação induzida por 2,2'-Azobis (2-amidinopropano) (AAPH) e sobre a fragmentação de DNA induzida por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e radiação ultravioleta (UV). A atividade citotóxica foi avaliada contra as linhagens celulares leucêmicas K562 e Jurkat, de melanoma humano Sk-Mel-19, Sk-Mel-28, Sk-Mel-103, melanoma murino B16F10-Nex2, linhagens não cancerígenas de fibroblasto de pulmão humano MRC-5 e células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC). Os resultados da composição química demonstraram a presença de catequina, rutina, derivados de epigallocatequina, glicosídeos de kaempferol, luteolina e procianidinas diméricas e triméricas no EFSR. Os extratos EFSR e ERSR apresentam IC<sub>50</sub> para o ensaio de ABTS<sup>•+</sup>, de 4,86 ± 0,51 µg/mL e 8,33 ± 0,90 µg/mL, respectivamente, enquanto que para o ensaio de DPPH<sup>•</sup> os valores de IC<sub>50</sub> para EFSR e ERSR foram de 19,98 ± 1,96 µg/mL e 13,37 ± 1,05 µg/mL, respectivamente. Os extratos foram capazes de proteger BSA contra a oxidação induzida por AAPH e inibir a fragmentação de DNA plasmidial induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e radiação UV a partir da menor concentração avaliada, 5 µg/mL. Além disso, os extratos induziram a morte celular das linhagens leucêmicas K562 (IC<sub>50</sub> de 242,54 ± 2,38 µg/mL para EFSR e 223,00 ± 2,34 µg/mL para ERSR), Jurkat (IC<sub>50</sub> de 171,45 ± 2,25 µg/mL para EFSR e 189,30 ± 2,27 µg/mL para ERSR) e melanoma Sk-Mel-103 (IC<sub>50</sub> de 224,66 ± 2,35 µg/mL para EFSR e 221,98 ± 2,34 µg/mL para ERSR), após 48 h de tratamento. Para a linhagem não cancerígena MRC-5 os extratos apresentaram citotoxicidade a partir da concentração de 300 µg/mL. Enquanto que, para as células PBMC, o EFSR e ERSR apresentaram uma baixa citotoxicidade, observada apenas na concentração de 500 µg/mL. Juntos, esses resultados demonstram que os extratos de *S. rugosa* possuem atividade antioxidante e ação antileucêmica e anti-melanoma, sendo potenciais agentes terapêuticos na prevenção de condições relacionadas ao estresse oxidativo e ao câncer.

**PALAVRAS-CHAVE:** Cerrado, amendoirana, estresse oxidativo, antioxidante, câncer, leucemia, melanoma.

Santos, C.M. Chemical composition and biological activities of *Senna rugosa* leaves and roots [Dissertation]. Dourados: Postgraduate in Biodiversity and Environment, Universidade Federal da Grande Dourados; 2020.

## ABSTRACT

*Senna rugosa* is a shrub plant found in the Cerrado, popularly known as peanuts and used in folk medicine as a dewormer and for the treatment of snakebites. Few studies report the biological activities of *S. rugosa*. Thus, this study aimed to determine the chemical composition, evaluate the antioxidant activity, the protection of macromolecules and the anti-leukemic and anti-melanoma action of the ethanolic extracts of the leaves (EFSR) and roots (ERSR) of *S. rugosa*. The chemical composition was determined by liquid chromatography coupled with mass spectrometry. As antioxidant properties were evaluated using the ABTS<sup>•+</sup> and DPPH<sup>•</sup> free radical capture tests, protection against oxidative damage was evaluated in proteins against oxidation induced by 2,2'-Azobis (2-amidinopropane) (AAPH) and about a DNA fragmentation induced by hydrogen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and ultraviolet radiation (UV). Cytotoxic activity was evaluated against leukemic cell lines K562 and Jurkat, of human melanoma Sk-Mel-19, Sk-Mel-28, Sk-Mel-103, murine melanoma B16F10-Nex2, non-cancerous human lung fibroblast strains MRC-5 and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). The results demonstrated the presence of catechin, rutin, epigallocatechin derivatives, kaempferol glycosides, luteolin and dimeric and trimeric procyanidins in the EFSR. The extracts have IC<sub>50</sub> for the ABTS<sup>•+</sup> assay, with  $4.86 \pm 0.51$  µg/mL for EFSR and  $8.33 \pm 0.90$  µg/mL for ERSR, respectively, while for the DPPH<sup>•</sup> assay the IC<sub>50</sub> values for EFSR and ERSR were  $19.98 \pm 1.96$  µg/mL and  $13.37 \pm 1.05$  µg/mL, respectively. The extracts were able to protect protein albumin against oxidation induced by AAPH and inhibit the fragmentation of plasmid DNA induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and UV radiation from the lowest concentration, 5 µg/mL. In addition, the extracts induced cell death of the K562 leukemic strains (IC<sub>50</sub> of  $242.54 \pm 2.38$  µg/mL for EFSR and  $223.00 \pm 2.34$  µg/mL for ERSR), Jurkat (IC<sub>50</sub> of  $171.45 \pm 2.25$  µg/mL for EFSR and  $189.30 \pm 2.27$  µg/mL for ERSR) and Sk-Mel-103 melanoma (IC<sub>50</sub> of  $224.66 \pm 2.35$  µg/mL for EFSR and  $221.98 \pm 2.34$  µg/mL for ERSR), after 48 h of treatment. For the non-cancerous strain MRC-5 the extracts showed cytotoxicity from the concentration of 300 µg/mL. While, for PBMC cells, EFSR and ERSR showed low cytotoxicity, observed only at the concentration of 500 µg/mL. Together, these results demonstrate that the extracts of *S. rugosa* have antioxidant activity and anti-leukemic and anti-melanoma action, being potential therapeutic agents in the prevention of conditions related to oxidative stress and cancer.

**KEYWORDS:** Cerrado; amendoirana; oxidative stress; antioxidant. Cancer; leukemia; melanoma.

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

Figura 1	-	Cadeia respiratória de elétrons	4
Figura 2	-	Os estágios do ciclo celular	9
Figura 3	-	Vias de sinalização apoptóticas extrínsecas e intrínsecas	12
Figura 4	-	Diferenciação das células hematopoéticas	18

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 - Leucemia e melanoma: Características e tratamentos

17

## LISTA DE ABREVIATURAS

A549	Linhagem celular de carcinoma do pulmão
AA	Ácido ascórbico
AAPH	2,2'- azobis (2-amidinopropano)
ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
APAF1	Do inglês: <i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
BAK	Do inglês: <i>BCL2 antagonist/killer 1</i>
BAX	Do inglês: <i>BCL2 associated X</i>
BCL2A1	Do inglês: <i>BCL2 related protein A1</i>
BCL2L2	Do inglês: <i>BCL2 like 2</i>
BCL-X <sub>L</sub>	Do inglês: <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BHT	Hidroxitolueno butilado
BIM	Do inglês: <i>BCL2-interacting mediator of cell death</i>
CASP9	Pró-caspase 9
CD95L	Do inglês: <i>CD95 Ligand</i>
Cdc25	Do inglês: <i>Therapeutic targeting the cell division cycle 25</i>
CDKIs	Inibidores das CDKs
CDKs	Do inglês: <i>cyclin-dependent kinase</i>
CT	Controle
DISC	Do inglês: <i>Death-inducing signaling complex</i>
DMEM	Do inglês: <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DPPIV	Dipeptidil peptidase IV
E2F	Fator de Ligação ao Promotor de E2
EFSR	Extrato das folhas de <i>Senna rugosa</i>
EPM	Erro padrão da média
ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
ERNs	Espécies reativas de nitrogênio
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ERs	Espécies reativas

ERSR	Extrato das raízes de <i>Senna rugosa</i>
FADD	Do inglês: <i>Fas-associated protein with death domain</i>
FADH <sub>2</sub>	Flavina e Adenina dinucleotídeo
FAZ	Receptor de morte na superfície celular
Fe <sup>2+</sup>	Ferro II
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FOXO	Do inglês: <i>Forkhead box O</i>
GLUT	Proteína transportadora de glicose
GPX	Glutaciona peroxidase
GR	Glutaciona redutase
GSH	Glutaciona
GSSG	Glutaciona oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HepG2	Carcinoma hepatocelular
Hs578T	Carcinoma de mama
IC <sub>50</sub>	Metade da concentração inibitória máxima
IS	Índice de seletividade
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MCF-7	Carcinoma de mama
MCL1	Do inglês: <i>Myeloid cell leukaemia 1</i>
MRC-5	Fibroblasto de pulmão humano
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltertrazólio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF-κB	Fator nuclear kappa B
NO·	Óxido nítrico
O <sub>2</sub>	Oxigênio
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
OH·	Radical hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	Proteína P53
p21CIP1	Do inglês: <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1</i>
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico humano
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular

PE	Ficoeritrina
PI3K / AKT	Fosfoinositida-3-quinase-proteína-quinase B / Akt
PMAIP1	Do inglês: <i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i>
PMME	Permeabilização da membrana externa mitocondrial
pRb	Proteína do retinoblastoma
PRX	Peroxirredoxinas
OS	Fosfatidilserina
PTEN	Supressor de tumor homólogo de fosfatase e tensina
PUMA	Do inglês: <i>P53-upregulated modulator of apoptosis</i>
RBP4	Proteína ligante do retinol 4
RE	Retículo endoplasmático
RNAse	Ribonuclease
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
SMAC	Do inglês: <i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
SOD1	Superóxido dismutase 1
SOD2	Superóxido dismutase 2
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TNF	Fator de necrose tumoral
TNFR1	Receptor 1 do TNF
TRAIL	Do inglês: <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TRX	Tioredoxinas
U138MG	Glioblastoma
U251MG	Astrocitoma de glioblastoma
UV	Ultravioleta
XIAP	Do inglês: <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1.	ESTRESSE OXIDATIVO, GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E SISTEMA ANTIOXIDANTE.....	3
2.2.	ANTIOXIDANTES.....	5
2.3.	ANTIOXIDANTES E CÂNCER.....	6
2.4.	CICLO CELULAR.....	8
2.5.	APOPTOSE.....	10
2.6.	CÂNCER.....	13
2.7.	CÂNCER E CICLO CELULAR.....	14
2.8.	CÂNCER, MUTAÇÕES EM VIAS DE SINALIZAÇÃO E LINHAGENS CELULARES.....	15
2.9.	PLANTAS NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DO CÂNCER.....	17
2.10.	GÊNERO <i>Senna</i> .....	19
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4.	REFERÊNCIAS.....	23
5.	ANEXOS.....	28

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo. Em 2018 ocorreram 9,6 milhões de mortes relacionadas ao câncer (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Câncer é uma doença complexa e multifatorial caracterizada pelo crescimento desordenado de células que apresentam auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais de inibição do crescimento, perda da capacidade de entrar em morte celular programada (apoptose), potencial de replicação ilimitado, indução de angiogênese e a capacidade de invadir outros tecidos e órgãos (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O surgimento de mutações pode ser causado por alterações nos genes que controlam o ciclo celular e a apoptose. Essas mudanças ocorrem em duas classes de genes reguladores do crescimento: os proto-oncogenes, que promovem o crescimento celular, e os genes supressores de tumor que inibem este crescimento (MILLIMOUNO et al., 2014; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). Além disso, essas alterações podem ser hereditárias, chamadas de mutação herdada ou surgir a partir de fatores externos, tais como exposição excessiva à luz solar, tabagismo, álcool, dieta rica em carboidratos e lipídeos, compostos químicos e determinados fungos, vírus e bactérias (DANAEI et al., 2005; DART, 2019; GALLUZZI et al., 2018, 2018; HASSANPOUR; DEGHANI, 2017; JIN et al., 2019; VAN ELSLAND; NEEFJES, 2018).

As mutações adquiridas por fatores externos são responsáveis pela maioria dos casos de câncer e podem surgir ao longo da vida, por substâncias que promovam o estresse oxidativo, uma condição patológica caracterizada por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes do organismo (YOUNG; WOODSIDE, 2001).

O estresse oxidativo pode promover danos às macromoléculas, lipídeos, proteínas e DNA. As espécies reativas podem causar alterações nos lipídios da membrana celular, que levam a alterações na fluidez da membrana, inativação de receptores, aumento da permeabilidade da mesma, além de gerar produtos oxidados, como o malondialdeído (MDA), que são quimicamente reativos e podem interagir com outras moléculas. As proteínas também podem ter sua estrutura e função afetadas pelas espécies reativas de oxigênio, ocorrendo perda de função, clivagem, proteólise, inibição da atividade enzimática, agregação proteica e consequentemente, toxicidade. Outra macromolécula afetada é o ácido desoxirribonucleico (DNA), que quando oxidado aumenta o risco de desenvolvimento de câncer (DALLE-DONNE et al., 2006), pois, ocorrem mutações em proto-oncogenes, responsáveis pelo

crescimento e proliferação celular; e nos genes supressores de tumor, que retardam a divisão celular, reparam danos ao DNA e promovem a apoptose (MILLIMOUNO et al., 2014; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Atualmente existem diferentes tipos de tratamentos contra o câncer, tais como cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, terapia alvo, imunoterapia e transplante de medula óssea. Dentre esses, a quimioterapia é um tratamento muito utilizado em todo o mundo, porém apresenta alta toxicidade para o organismo e com o tempo, muitas células cancerígenas podem desenvolver resistência aos medicamentos quimioterápicos, dificultando o tratamento (DOMINGUES et al., 2018; JONES; BUZDAR, 2004; QURESHI; HALL, 2013).

Diante disto, tem sido cada vez maior a busca outras fontes de novos compostos com atividade citotóxica como novas alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer. Muitos compostos naturais de origem vegetal possuem seletividade, pois exercem efeitos citotóxicos sobre as células cancerígenas e apresentam baixa ou nenhuma toxicidade em células saudáveis. Neste sentido, a comunidade científica tem intensificado a busca por novos agentes terapêuticos com atividade anticâncer a partir de compostos naturais oriundos de plantas (DE GIFFONI DE CARVALHO et al., 2019; DEMAÏN; VAISHNAV, 2011; GREENLEE, 2012; MILLIMOUNO et al., 2014).

O Brasil possui uma rica biodiversidade vegetal, e muitas espécies ainda não foram investigadas quanto a sua constituição química e ao seu potencial citotóxico (BERLINCK, 2012). *Senna rugosa* é uma espécie vegetal pouco estudada quanto as suas atividades farmacológicas. Conhecida popularmente como amendoirana, alcacuz bravo, bico-de-corvo, boi gordo e paratudo, *S. rugosa* é amplamente distribuída no Cerrado e conhecida por seu uso popular como vermífugo (RICARDO et al., 2017) e para o tratamento de acidentes ofídicos (RICARDO et al., 2017; RODRIGUES; CARVALHO, 2007).

Nesse contexto, esse estudo disponibilizará informações científicas sobre o potencial antioxidante e atividade citotóxica e a capacidade de modular a migração frente a linhagens celulares de leucemia e melanoma das folhas e raízes de *S. rugosa*. Além disso, o estudo visa contribuir para a valoração da biodiversidade do Cerrado bem como abrir perspectivas para novos estudos farmacológicos com esta espécie vegetal.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. ESTRESSE OXIDATIVO, GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS E SISTEMA ANTIOXIDANTE

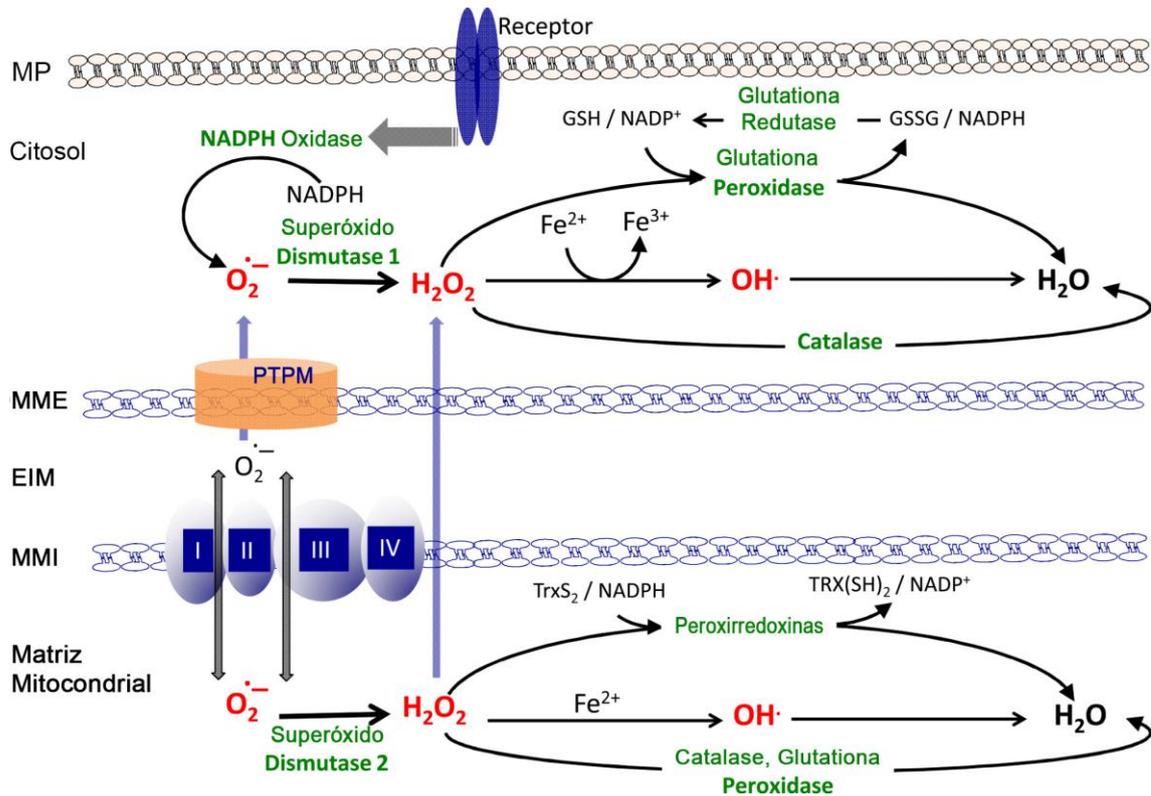
O estresse oxidativo é uma condição caracterizada pelo desequilíbrio entre a produção excessiva de espécies reativas e a capacidade do sistema antioxidante endógeno (NOGUEIRA; HAY, 2013). No organismo são encontradas principalmente as espécies reativas de oxigênio (EROs), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) e radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) (PISOSCHI; POP, 2015; POYTON; BALL; CASTELLO, 2009). Além disso, existem outras espécies reativas formadas por moléculas que contém em sua estrutura átomos de enxofre, cobre ou ferro (PISOSCHI; POP, 2015).

As EROs são normalmente produzidas no nosso organismo, pois participam de várias situações fisiológicas, como subprodutos normais da cadeia respiratória mitocondrial, são gerados a partir da ativação de fagócitos durante infecções para eliminação de patógenos, pelo complexo enzimático microsomal do citocromo P450, pela beta-oxidação peroxisomal, lipoxigenases e ciclooxigenase. Além disso, as EROs podem ser produzidas sob condições patológicas e atuar como promotoras do estresse oxidativo ou através de fatores exógenos, como a exposição à fumaça, pesticidas, radiação ultra violeta (UV), alcoolismo e tabagismo (NOGUEIRA; HAY, 2013; PISOSCHI; POP, 2015; POYTON; BALL; CASTELLO, 2009).

A produção excessiva de EROs pode gerar muitos danos ao organismo. Por exemplo, o  $H_2O_2$  é capaz de inativar enzimas, oxidar o DNA e lipídios, o  $OH^{\cdot}$  altamente reativo pode reagir com moléculas orgânicas e inorgânicas, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídios e carboidratos. Tais reações envolvem remoção de hidrogênio, adição e transferência de elétrons. Esses danos oxidativos às biomoléculas estão relacionados ao processo de envelhecimento, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, diabetes, inflamação crônica e diversos tipos de câncer (PISOSCHI; POP, 2015).

Uma ERO normalmente presente no organismo é o superóxido, gerado a partir de duas fontes principais: durante a respiração celular ou via sistema NADPH oxidase. Durante a respiração celular elétrons são transferidos das coenzimas Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH) e Flavina adenina dinucleotídeo ( $FADH_2$ ) (PISOSCHI; POP, 2015), através de quatro complexos enzimáticos que são transportadores de elétrons, o **complexo I** – NADH-desidrogenase, **complexo II** - succinato desidrogenase coenzima Q redutase,

**complexo III** - citocromo b-c1 e **complexo IV**- citocromo oxidase (Figura 1) (MOLONEY; COTTER, 2018) para o aceptor final de elétrons, o oxigênio ( $O_2$ ) (PISOSCHI; POP, 2015). Nesse processo o oxigênio é reduzido à água, mas cerca de 2% deste pode ser reduzido a  $O_2^{\cdot-}$  que em seguida é convertido a  $H_2O_2$  e a  $OH^{\cdot}$ . A geração de  $O_2^{\cdot-}$  ocorre principalmente nos complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial (POYTON; BALL; CASTELLO, 2009) (Figura 1).



**Figura 1.** Íons superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) gerados a partir da cadeia respiratória ou via sistema NADPH oxidase no citoplasma das mitocôndrias são convertidos em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase 1.  $O_2^{\cdot-}$  gerados a partir da cadeia respiratória e transportados através do espaço inter-mitocondrial (EIM) na mitocôndria são convertidos em  $H_2O_2$  pela enzima superóxido dismutase 2.  $H_2O_2$  sofre ação de três enzimas: catalase, glutatona peroxidase (GPX) e peroxirredoxinas (PRX), para ser convertido a  $H_2O$ . As enzimas GPX e PRX precisam utilizar a glutatona (GSH) e tioredoxinas (TRX), respectivamente, geradas pela NADPH. Complexo I: NADH-desidrogenase. Complexo II: succinato desidrogenase coenzima Q redutase. Complexo III: citocromo b-c1. Complexo IV: Citocromo Oxidase. MP: Membrana plasmática. MME: Membrana mitocondrial externa. MMI: Membrana mitocondrial interna. PTPM: Poro de transição de permeabilidade mitocondrial.  $OH^{\cdot}$ : radical hidroxila. Figura adaptada e modificada de Nogueira e Hay (2013). doi: 10.1158 / 1078-0432.CCR-12-1424.

Além desse sistema os fagócitos possuem em suas membranas o sistema NADPH oxidase, que durante a fagocitose promove a produção de espécies reativas, essenciais para a função microbicida (PISOSCHI; POP, 2015). A ativação da NADPH oxidase requer a união das subunidades da membrana (P22 e GP91) com as subunidades citosólicas (P40, P47 e P67), o que promove alteração conformacional da subunidade GP91 que leva a atividade de redução do oxigênio em superóxido (PANDAY et al., 2015).

Para a manutenção do equilíbrio das espécies reativas nas células existem os sistemas antioxidantes endógenos que neutralizam as EROs e os antioxidantes exógenos oriundos da dieta que também atuam no organismo positivamente contra as EROs.

## 2.2. ANTIOXIDANTES

O equilíbrio das espécies reativas nas células é mantido através de sistemas antioxidantes endógenos ou antioxidantes adquiridos pela dieta, que neutralizam ou reparam os danos às células causados por EROs. Estes sistemas podem ser classificados quanto a sua atuação no organismo em antioxidantes de primeira, segunda, terceira ou quarta linha de defesa (LOBO et al., 2010).

Os antioxidantes da primeira linha de defesa são as enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutaciona peroxidase (GPX), e também as proteínas de ligação transferrina, ceruloplasmina, ferritina e albumina, que possuem a capacidade de quelar íons de metais de transição, como ferro e cobre (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; MIROŃCZUK-CHODAKOWSKA; WITKOWSKA; ZUJKO, 2018).

Por exemplo, para a desmutação do superóxido produzido nas mitocôndrias durante a respiração celular, é necessário que este seja transferido para a matriz mitocondrial onde é transformado em  $H_2O_2$  pela enzima superóxido dismutase 2 (SOD2) no interior das mitocôndrias, enquanto no citosol é convertido pela enzima superóxido dismutase 1 (SOD1) (Figura 1) (NOGUEIRA; HAY, 2013). Em seguida, o  $H_2O_2$  pode ser neutralizado por outros elementos do complexo antioxidante celular, como a catalase, enzima abundante nos peroxissomas, que decompõe esta espécie não radicalar em água e  $O_2$ . Por outro lado, a decomposição de  $H_2O_2$  em água também pode ocorrer através do sistema glutaciona (IGHODARO; AKINLOYE, 2018), composto pela enzima glutaciona peroxidase (GPX) que metaboliza  $H_2O_2$  utilizando a glutaciona (GSH), como substrato, resultando na glutaciona oxidada (GSSG), que é reciclada pela ação da enzima glutaciona redutase (GR) (ESPINOSA-DIEZ et al., 2015). Na matriz mitocondrial o  $H_2O_2$  também pode ser neutralizado pelas enzimas peroxirredoxinas, que fazem parte de uma família de proteínas compostas pelas tioredoxinas, tiorredoxina peroxidase e peroxirredoxinas (NOGUEIRA; HAY, 2013), que convertem  $H_2O_2$  em água (PISOSCHI; POP, 2015). De modo que, a ação das enzimas antioxidantes para neutralizar o  $H_2O_2$  é muito importante, pois apesar desta não ser uma das ERO mais reativas, este pode ser oxidado na presença de ferro<sup>2+</sup> e  $OH^-$  pela reação de Fenton,

uma reação que promove a oxidação do ferro<sup>2+</sup> a ferro<sup>3+</sup> resultando na produção de OH<sup>·</sup>, que por sua vez, possui alto poder oxidante (Figura 1) (BOKARE; CHOI, 2014; SILVA, 2010).

Na segunda linha de defesa estão incluídos os antioxidantes que atuam sobre as espécies reativas através da doação de elétrons, neutralizando os radicais que podem iniciar reações em cadeia ou que propagam reações de oxi-redução. Nesse processo, os antioxidantes dessa categoria podem se tornar agentes oxidantes, porém menos tóxicos e facilmente neutralizados por outros antioxidantes desta mesma linha de defesa. Moléculas desta classe podem ser adquiridas através da alimentação e reduzem o risco do desenvolvimento de doenças crônicas, como obesidade, diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (RASOULI; FARZAEI; KHODARAHMI, 2017). Dentre estes compostos destacamos os polifenóis, compostos orgânicos amplamente encontrados em frutas, vegetais, chás, chocolates, legumes, cereais e bebidas (GANESAN; XU, 2017).

Na terceira linha de defesa temos as enzimas que podem degradar proteínas modificadas pela oxidação, impedem o acúmulo de proteínas oxidadas e também reparam o DNA danificado, dentre elas estão as polimerases, glicosilases, nucleases e proteases (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; LOBO et al., 2010).

A quarta linha de defesa antioxidante envolve mecanismos adaptativos e de recrutamento. Durante a produção de espécies reativas e reações de oxido-redução, ocorrem sinalizações celulares que induzem a formação e o transporte de antioxidantes endógenos para o local onde estão ocorrendo os danos oxidativos (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; LOBO et al., 2010).

Assim cada linha de defesa antioxidante atua de uma forma específica em diferentes níveis, podendo ser preventivo como os antioxidantes da primeira linha; pela eliminação direta dos radicais livres, realizado pelos antioxidantes da segunda linha; reparo de macromoléculas, pelas enzimas de reparo da terceira linha de defesa; e através da adaptação celular ao dano oxidativo, a quarta linha de defesa. Em conjunto todos esses sistemas promovem a proteção celular, através de diferentes formas, garantindo que as espécies reativas não danifiquem os componentes intracelulares (IGHODARO; AKINLOYE, 2018; LOBO et al., 2010).

### **2.3. ANTIOXIDANTES E CÂNCER**

A relação entre antioxidantes e câncer ocorre pelo menos de quatro formas:

I - Antioxidantes previnem danos ao DNA. As EROs promovem a quebra de cadeia de DNA e alteram a estrutura dos nucleotídeos resultando em mutações. Os antioxidantes reduzem a frequência de mutações conferindo proteção ao DNA (PISOSCHI; POP, 2015).

II - Os antioxidantes são usados em associação com quimioterápicos para diminuir os efeitos tóxicos destes. Os quimioterápicos são citotóxicos tanto para as células cancerígenas quanto para as células saudáveis, assim muitos efeitos indesejados ocorrem durante o tratamento quimioterápico. Estudos demonstram que os antioxidantes administrados concomitantemente com quimioterápicos não interferem no efeito da droga, e ainda aumentam o efeito citotóxico da quimioterapia, além de proteger o tecido normal, aumentando a sobrevida do paciente e a resposta terapêutica (CALVANI; PASHA; FAVRE, 2020; SINGH et al., 2018).

III – Algumas substâncias em baixas concentrações tem ação antioxidante e em altas concentrações atuam como pró-oxidante. Por exemplo, o ácido ascórbico, que apesar de ser um ótimo antioxidante, também pode ser pró-oxidante em altas quantidades, o que promove a morte de celular (DOS SANTOS et al., 2018), sendo este o mecanismo de ação de alguns quimioterápicos. O aumento de EROs promovido por drogas quimioterápicas em células cancerígenas, que já possuem espécies reativas em níveis mais elevados quando comparadas às células normais, induz a morte celular (PISOSCHI; POP, 2015; RAHAL et al., 2014; YANG et al., 2018).

IV - O estresse oxidativo pode promover a ativação de algumas vias já estudadas e relacionadas ao câncer, como a via MAPK (do inglês: *Mitogen-activated protein kinase*). Além disso, alguns fatores de transcrição podem ser regulados por EROs, como o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), a proteína P53 e FOXO (do inglês: *Forkhead box O*). Esses fatores são regulados através da ativação de proteínas quinases, pela inativação de fosfatases e pela oxidação de fatores de transcrição. Assim, as espécies reativas podem promover a ativação de fatores de transcrição resultando na desregulação da expressão de genes alvo, importantes para o desenvolvimento do câncer (GÀO; SCHÖTTKER, 2017).

Os antioxidantes podem inibir vias de sinalização superexpressas em células cancerígenas, através da neutralização de espécies reativas, ou modulação de enzimas e outras substâncias antioxidantes endógenas promovendo o reestabelecimento do equilíbrio redox nas células saudáveis (IGHODARO; AKINLOYE, 2018).

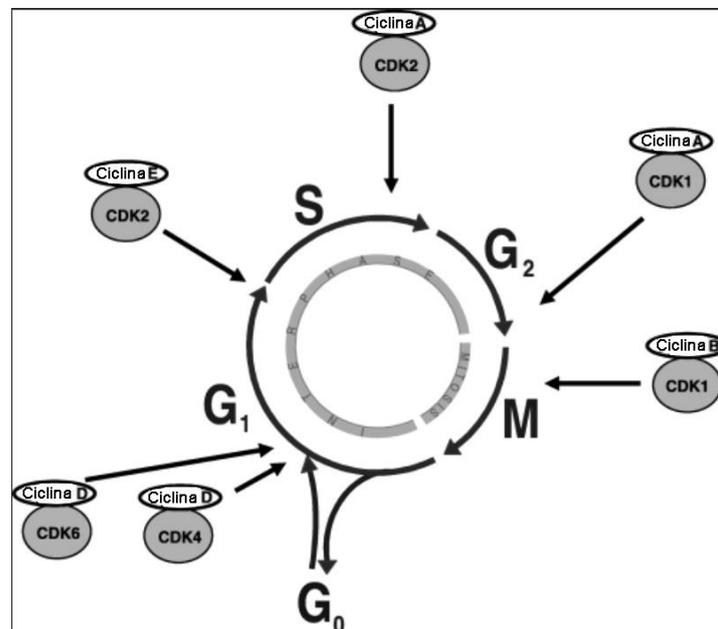
## 2.4. CICLO CELULAR

O ciclo celular é formado por uma sequência de eventos no qual os componentes celulares são duplicados e posteriormente segregados para a formação de células filhas. Este processo é extremamente regulado por proteínas do tipo quinases dependentes de ciclinas (CDKs) que são ativadas em momentos específicos para sinalizar e regular as diferentes fases da mitose. O ciclo celular pode ser dividido em interfase, composta pelas fases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>, e os estágios da mitose que são a prófase, metáfase, anáfase e telófase (SCHAFER, 1998). O controle do ciclo celular é essencial para a proliferação garantindo a replicação correta do material genético, a segregação dos cromossomos, diferenciação, senescência e morte celular (SOUZA, 2011). A progressão do ciclo celular precisa ser monitorada através de pontos de verificação que detectam erros durante a replicação do DNA e na separação dos cromossomos. Caso ocorra algum erro durante o ciclo celular, os pontos de verificação são ativos e ocorre parada do ciclo para que os defeitos sejam reparados. Dessa forma, não ocorre a duplicação celular, com consequente formação de células-filhas com alterações genéticas. Essa detecção é realizada através de vias de sinalização que inibem as CDKs, que têm a função de fosforilar substratos-chave, para promover a síntese de DNA e a progressão da mitose. Dessa forma, a inativação das CDKs promove a parada do ciclo. Se as mutações encontradas forem corrigidas, ocorre a progressão do ciclo, mas caso o reparo não ocorra corretamente, as células podem entrar em apoptose (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

A atividade das CDKs é dependente de sua associação com uma subunidade de proteínas chamadas ciclinas, que são expressas durante as fases do ciclo celular. Em cada fase, diferentes tipos de ciclinas são sintetizadas e após a realização de suas funções, são degradadas. As ciclinas formam um complexo catalítico com as CDKs, denominado ciclina-CDK, que atua sobre uma proteína muito importante no controle da proliferação celular que é a proteína do retinoblastoma (pRb) (SCHAFER, 1998).

O início da progressão do ciclo celular ocorre em resposta a sinais extracelulares, como fatores de crescimento, que estimulam as células a iniciarem a divisão celular. Antes desta sinalização a célula se encontra em uma fase conhecida como G<sub>0</sub>, na qual não está ocorrendo a proliferação celular. Na fase G<sub>1</sub> ou G<sub>0</sub> a pRb está ativa, pois esta se encontra na forma hipofosforilada. Assim, ela se liga e inibe proteínas reguladores de genes, como o Fator de Ligação ao Promotor de E2 (E2F) bloqueando sua atividade, o que inibe a transcrição de proteínas importantes para a progressão de G<sub>1</sub> para G<sub>2</sub>/S, incluindo ciclina A, ciclina E e uma família de fosfatase, as Cdc25 (do inglês: *Cell division cycle 25*) (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Quando ocorre um estímulo extracelular a célula entra em G<sub>1</sub>, e se prepara para iniciar a síntese de DNA, nesse momento ocorre à expressão de ciclina do tipo D, que se liga às moléculas CDK4 e CDK6 (Figura 2) (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Estes complexos associam-se a proteína p21<sup>Cip1</sup> e a outra proteína, a p36 também chamada de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que é importante no reparo e replicação do DNA. Dessa forma, este complexo Ciclina-CDK-p21<sup>Cip1</sup>-p36 torna-se ativo, sendo capaz de forforilar a pRb, o que promove a inativação parcial desta proteína, liberando os fatores de transcrição E2F. A partir disso, estes fatores podem induzir a transcrição dos genes que codificam as proteínas ciclinas A e E (SOUZA, 2011).



**Figura 2.** Estágios do ciclo celular (fases G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> e M), juntamente com o local de atividade dos complexos reguladores CDK e suas respectivas ciclinas. Figura adaptada de Vermeulen; Bockstaele; Berneman (2003), doi.org/10.1046/j.1365-2184.2003.00266.x.

Com a formação do complexo Ciclina E-CDK2, ocorre um aumento da fosforilação da pRb, inativando-a completamente. Este momento caracteriza a passagem do primeiro ponto de checagem de restrição, G<sub>1</sub> para a fase S, onde ocorre à replicação do DNA, e a partir disso há sinalização para a progressão do ciclo celular dependente apenas de sinais intracelulares (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

Posteriormente a ciclina E é degradada e substituída pelas ciclinas A e B, que formam complexo com a CDK2 e CDK1, respectivamente, e assim mantém a proteína pRb inativa durante as próximas fases do ciclo. Durante a fase S, é necessária a formação do complexo ciclina A-CDK2 para a passagem para a próxima fase. A etapa final de replicação

do DNA e subsequente preparação para a mitose é chamada de G2, na qual a CDK1 está ligada a ciclinas do tipo A para promover o início da mitose. No decorrer da fase G2, as ciclinas A são degradadas para que ocorra a formação do complexo ciclina B-CDK1, que é responsável por promover a mitose, fase final do ciclo celular no qual ocorre a divisão da célula (Figura 2) (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Uma vez que o ciclo celular passa a ser regulado por sinais intracelulares, a progressão deste continuará em um sistema de retroalimentação positiva, de modo que a parada deste processo ocorre pela expressão de inibidores das CDKs, que são os CDKIs. Estes reguladores impedem a fosforilação da pRb, sendo divididos em dois grupos, o primeiro é denominado Inibidor da Quinase Dependente de Ciclina 4 (INK4) e incluindo as proteínas p15 (INK4b), p16 (INK4a), p18 (INK4c) e p19 (INK4d) que inibem especificamente os complexos formados entre ciclinas D com CDK4 e CDK46. Enquanto o segundo grupo são os Cip/Kip e inclui as proteínas p21 (Waf1, Cip1), p27 (Cip2) e p57 (Kip2), que não são específicos e podem inibir a formação de todos os complexos Ciclina-CDK (MALUMBRES; BARBACID, 2009; SOUZA, 2011). Além disso, a p21 pode inibir a replicação do DNA e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). A expressão e produção dos inibidores CDKIs são regulados por sinais intra e extracelulares (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

O mau funcionamento das ciclinas-CDKs pode ocasionar a instabilidade genômica, gerando mutações genéticas e a instabilidade cromossômica que promove alterações numéricas nos cromossomos. Estas alterações propiciam o surgimento de diversas patologias, como o câncer (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

## **2.5. APOPTOSE**

Para a manutenção da fisiologia normal, nossas células são constantemente renovadas para substituir aquelas que estão danificadas ou em processo de senescência. Dessa forma, a morte celular programada ou apoptose é uma via de morte celular evolutivamente conservada e extremamente regulada que promove a eliminação de células, sendo importante durante o desenvolvimento embrionário e para a manutenção da homeostase do organismo (MILLIMOUNO et al., 2014; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019). Esse tipo de morte se caracteriza pela ativação de caspases que através de sua ação catalítica degradam os componentes celulares resultando no encolhimento citoplasmático, na condensação da cromatina, fragmentação do DNA, além da externalização de um tipo específico de fosfolípido de membrana, a fosfatidilserina, e por fim promove a formação de bolhas na

membrana plasmática que levam a geração de pequenos corpos apoptóticos que podem ser absorvidos por células fagocíticas (GALLUZZI et al., 2018; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

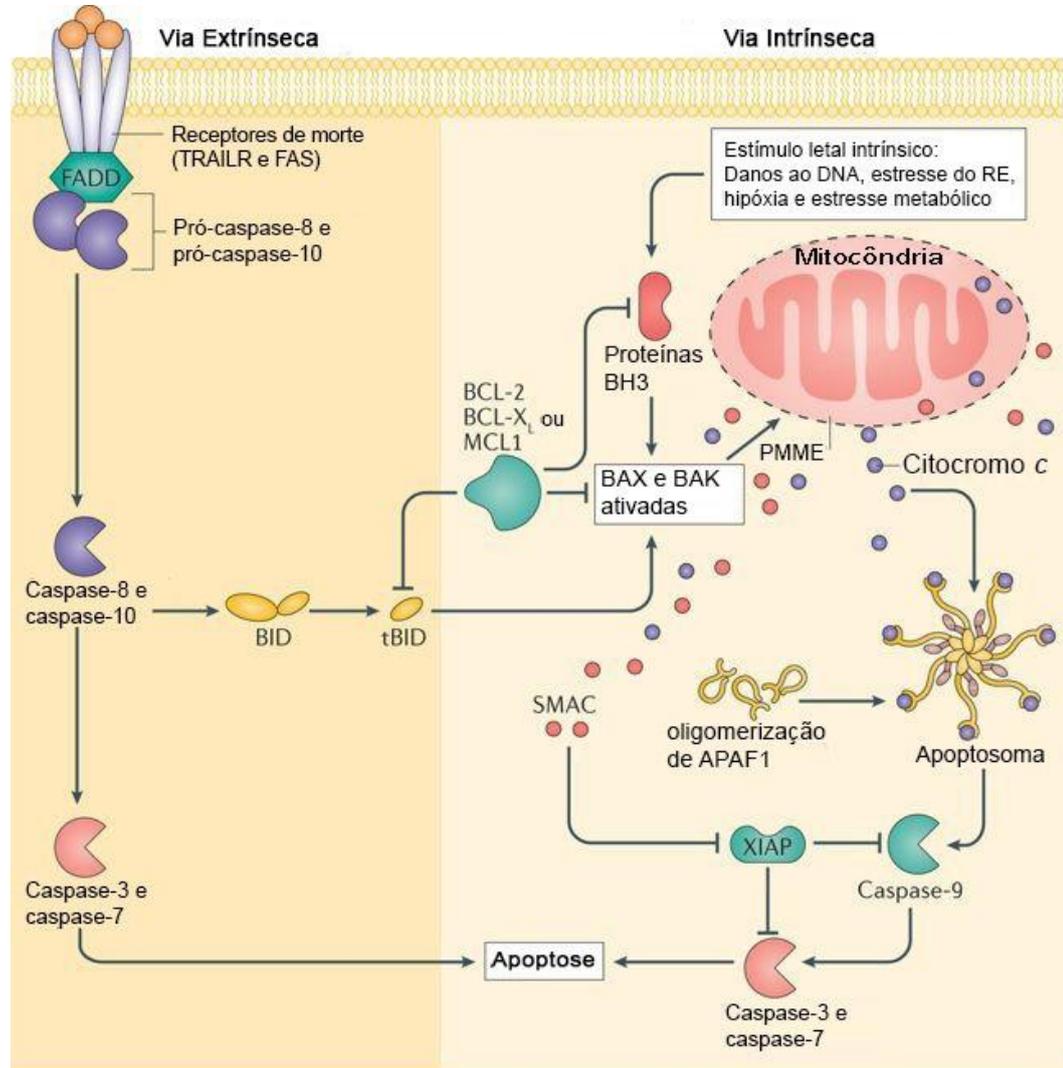
A apoptose pode ser iniciada por estímulos internos que caracterizam a via intrínseca, ou estímulos externos, que ativam a via extrínseca. Em relação à morte de células cancerígenas por agentes antineoplásicos, a via intrínseca é mais comum. Essa é mediada por moléculas liberadas pelas mitocôndrias, enquanto a extrínseca depende da ativação de receptores específicos de morte ou proteínas presentes na superfície da membrana celular (MILLIMOUNO et al., 2014; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

A via intrínseca pode ser desencadeada por fatores como danos ao DNA e às organelas (como as mitocôndrias), inibição de vias de sinalização intracelular, estimulação mitogênica e estresse do retículo endoplasmático (RE). Além disso, o excesso de EROs, a ativação de morte celular por oncogenes, falta de nutrientes ou de fatores de crescimento e a ativação da via p53 (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019), uma proteína relacionada com o controle do ciclo celular, apoptose e reparo do DNA (MILLIMOUNO et al., 2014).

A execução e regulação da via intrínseca são realizadas por uma família de proteínas chamadas BCL-2, existindo membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos. Os membros desta família possuem quatro segmentos de aminoácidos diferentes, que são chamados de homologia de BCL-2 (BH1, BH2, BH3 e BH4). As proteínas pró-apoptóticas são compostas por membros que possuem apenas o domínio BH3, conhecidas como ativadoras, que são constituídas pelo PUMA (do inglês: *p53-upregulated modulator of apoptosis*), BIM (do inglês: *BCL2-interacting mediator of cell death*) e a proteína PMAIP1 (do inglês: *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*, conhecida como NOXA). Essas proteínas ligam-se e ativam outras proteínas pró-apoptóticas que são efetoras, BAX (do inglês: *BCL2 associated X*), e a BAK ou BAK1 (do inglês: *BCL2 antagonist/killer 1*) (GALLUZZI et al., 2018; SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

Quando BID, BIM, PUMA e NOXA ligam-se e ativam as proteínas BAX e BAK, estas oligomerizam e formam poros na membrana das mitocôndrias, então ocorre a permeabilização da membrana mitocondrial externa (PMME). Em seguida há liberação de proteínas apoptogênicas no citoplasma que normalmente estão presentes no espaço inter-mitocondrial, como o citocromo *c* que se liga a APAF1 (do inglês: *apoptotic protease-activating factor 1*) para formar o complexo conhecido como apoptossomo, cliva pró-caspase 9 (CASP9). A ativação das caspases também pode ocorrer através do SMAC (do inglês: *second mitochondria-derived activator of caspases*), que neutraliza proteínas inibidoras de

caspsases, como o XIAP (do inglês: *X-linked inhibitor of apoptosis protein*). Após a liberação de SMAC há a clivagem da pró-caspase 9 (iniciadora) que ativa as pró-caspases 3 e 7 (executoras) que promovem a apoptose (Figura 3) (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).



Nature Reviews | Cancer

**Figura 3.** Vias de sinalização apoptóticas extrínsecas e intrínsecas. Na apoptose pela via intrínseca o estresse celular ativa as proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2, levando à atividade de BAX e BAK que desencadeiam a permeabilização da membrana mitocondrial externa (PMME). Após a PMME, Citocromo *c* é liberado no citosol e ativa a pró-caspase-9, que por sua vez, ativa a pró-caspase-3 e a pró-caspase-7, levando a apoptose. Enquanto a via extrínseca é iniciada a partir de perturbações do ambiente extracelular, que ativam receptores específicos da membrana celular que podem ativar as caspases iniciadoras (caspase-8 e caspase-10), que clivam e ativam pró-caspase-3 e pró-caspase-7, levando à apoptose. A clivagem do agonista da proteína BID pela Caspase-8, também estimula a liberação do citocromo *c*. RE: retículo endoplasmático. Figura adaptada de Ichim e Tait (2016), doi: 10.1038 / nrc.2016.58.

Em contrapartida, proteínas anti-apoptóticas que também são membros da família BCL-2, possuem todos os domínios BH e são constituídas pelas proteínas BCL-2, a proteína BCL-X<sub>L</sub> (dos inglês: *B-cell lymphoma-extra large*), BCL2L2 (do inglês: *BCL2 like 2*, mais conhecido como BCL-W), BCL2A1 (do inglês: *BCL2 related protein A1*, conhecido como

BFL1) e MCL1 (do inglês: *myeloid cell leukaemia 1*). Essas proteínas geralmente estão na membrana mitocondrial externa e bloqueiam a apoptose ligando-se aos ativadores das proteínas BAX e BAK, impedindo assim a formação de poros na membrana das mitocôndrias (Figura 3) (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

Os níveis das proteínas da família BCL-2 diferem de acordo com o tipo de célula, seu estágio de desenvolvimento e de algum tipo de dano celular. De modo que, o desequilíbrio entre as proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas pode promover uma apoptose aumentada ou insuficiente (SINGH; LETAI; SAROSIEK, 2019).

Outra forma de ativar a morte celular programada é através de sinais extracelulares, conhecida como via extrínseca, que é iniciada a partir de perturbações do ambiente extracelular, que ativam receptores específicos da membrana celular e desencadeiam a apoptose. Dentre os receptores presentes na membrana temos o receptor de morte na superfície celular (FAS) e receptores do fator de necrose tumoral (TNF), como CD95 (APO-1 / Fas), o receptor 1 do TNF (TNFR1) e TRAIL (do inglês: *TNF-related apoptosis-inducing ligand* - TRAIL-R1 e TRAIL-R2). Os ligantes correspondentes do TNF incluem uma superfamília de ligantes de receptor de morte, como ligante CD95L (do inglês: *CD95 Ligand*), enquanto o TNF- $\alpha$  e a linfotóxina  $\alpha$  são ligantes dos receptores tipo TRAIL (do inglês: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*) (Figura 3) (FULDA; DEBATIN, 2006).

Quando os receptores extracelulares citados acima são estimulados por seus ligantes ocorre o recrutamento de moléculas adaptadoras como FADD (do inglês: *Fas-associated protein with death domain*), que promovem a montagem de um complexo multiproteico chamado de DISC (do inglês: *Death-inducing signaling complex*). Este complexo induz a oligomerização das pró-caspases 8 e 10 tornando-as ativas. Assim, as caspases 8 ou 10 clivam diretamente as pró-caspases 3 e 7, resultando na apoptose (Figura 3) (FULDA; DEBATIN, 2006; GALLUZZI et al., 2018; ICHIM; TAIT, 2016).

Além disso, a caspase 8 pode promover a clivagem de BID, uma das proteínas pró-apoptóticas, que se transloca para a mitocôndria e estimula a liberação de citocromo *c*, induzindo a ativação da apoptose (Figura 3) (FULDA; DEBATIN, 2006).

## 2.6. CÂNCER

Câncer é um termo que abrange várias doenças, caracterizado por uma divisão exacerbada das células, que pode surgir em qualquer parte do organismo podendo ou não se espalhar para outros tecidos e órgãos (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Quando as células sofrem mutações que não são reparadas, podem se tornar anormais e desenvolver mecanismos para escapar da apoptose, além de se dividirem descontroladamente, podendo formar tumores. Estas células são capazes de suprimir as células do sistema imunológico, além de estimular a angiogênese para suprir os tumores com nutrientes e oxigênio (HANAHAN; WEINBERG, 2000; LANDSKRON et al., 2014). Estes tumores podem ser malignos e algumas células que os formam podem apresentar a capacidade de se desprender e invadir outros locais, através do mecanismo conhecido como metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

## 2.7. CÂNCER E CICLO CELULAR

Nas células normais podem ocorrer mutações nos proto-oncogenes ou nos genes supressores de tumor, que podem desencadear a divisão celular descontrolada, dentre as proteínas supressoras estão a pRb e p53 (MILLIMOUNO et al., 2014; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). Mutações também podem alterar o controle do ciclo celular através da desregulação da atividade da CDK. Quando há uma expressão reduzida dos inibidores de CDK, como a p21 e da p53 ou com a superativação de fosfatases Cdc25 (do inglês: *Therapeutic targeting the cell division cycle 25*) que regulam positivamente as CDKs, estas podem ficar hiperativas (MALUMBRES; BARBACID, 2009). A superexpressão de CDK4 foi identificada em linhagens celulares de melanoma, sarcoma, glioma e tumores de mama. Enquanto a expressão exacerbada de CDK6 é relatada em algumas leucemias e sarcomas (MALUMBRES; BARBACID, 2009; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). Além disso, um aumento na expressão de ciclinas do tipo D é descrita nos carcinomas de mama, esôfago, bexiga, pulmão e células escamosas. Da mesma forma, o aumento de ciclina A e E foi relatado no carcinoma pulmonar, e a ciclina E também é superexpressa em carcinomas colorretais e de mama (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Alterações genéticas podem promover modificações de proteínas-chave para o controle da proliferação celular, como o gene que codifica a proteína p53, que é frequentemente mutado no câncer humano, cerca de 50% dos casos (MILLIMOUNO et al., 2014; VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; YUE et al., 2017).

A pRb também pode apresentar alterações que levam ao desenvolvimento do câncer, mutações e deleções resultam em pRb não-funcional e totalmente ausente, respectivamente. Assim, sua perda de função é associada à progressão do ciclo celular sem

restrições, sendo comumente relatada na leucemia linfoblástica aguda (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Outra proteína alterada que pode promover o desenvolvimento de câncer é o fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ) que inibe a proliferação de células epiteliais normais através da indução de inibidores de CDK como p15INK4B, p21CIP1 e p27KIP1. Em algumas linhagens celulares cancerígenas de pulmão há uma redução da atividade de TGF- $\beta$  (OSADA; TAKAHASHI, 2002).

Considerando a importância da progressão do ciclo celular no desenvolvimento dos diferentes tipos de câncer, agentes quimioterápicos citostáticos como os inibidores da topoisomerase irinotecano e doxorrubicina, agentes alquilantes como a oxaliplatina, cisplatina e ciclofosfamida atuam inibindo a progressão do ciclo celular. Porém, estes quimioterápicos apresentam diversos efeitos tóxicos para o organismo, como a nefrotoxicidade, toxicidade gastrointestinal, cardiovascular, pulmonar e hematológica (IQBAL et al., 2017). Neste contexto, novos agentes terapêuticos de origem vegetal que atuem como citostáticos e citotóxicos e que apresentem menos efeitos colaterais foram investigados nos últimos anos (IQBAL et al., 2017; SCHIRRMACHER, 2018).

## **2.8. CÂNCER, MUTAÇÕES EM VIAS DE SINALIZAÇÃO E LINHAGENS CELULARES**

As mutações também podem ocorrer em várias vias de promoção do crescimento, como nas MAPKs, fosfoinositida-3-quinase-proteína-quinase B / Akt (PI3K / AKT) (OSADA; TAKAHASHI, 2002). Essas alterações podem ser causadas por fatores externos no ambiente celular que podem levar a ativação de quatro subfamílias de MAPKs, são elas: ERK1/2, ERK5, JNK e p38. Com a ativação das vias das MAPKs ocorrem alterações em várias funções celulares, como sobrevivência, proliferação, metabolismo e interação com outras células (CUENDA; ROUSSEAU, 2007).

A via ERK1/2 ou via RAS-RAF-MEK-ERK pode ser superexpressa ocasionando a sobrevivência, proliferação e a metástase (GÃO; SCHÖTTKER, 2017). A família das proteínas RAS é formada por três proteínas KRAS, HRAS e NRAS, que frequentemente estão mutadas nos cânceres humanos. RAS induz a proliferação celular através de estímulos pró-crescimento e por inibir os sinais anti-crescimento (OSADA; TAKAHASHI, 2002; PYLAYEVA-GUPTA; GRABOCKA; BAR-SAGI, 2011). As proteínas RAS promovem à ativação constitutiva de alvos a jusante como a via da RAF1 / MAPK, o que induzem a

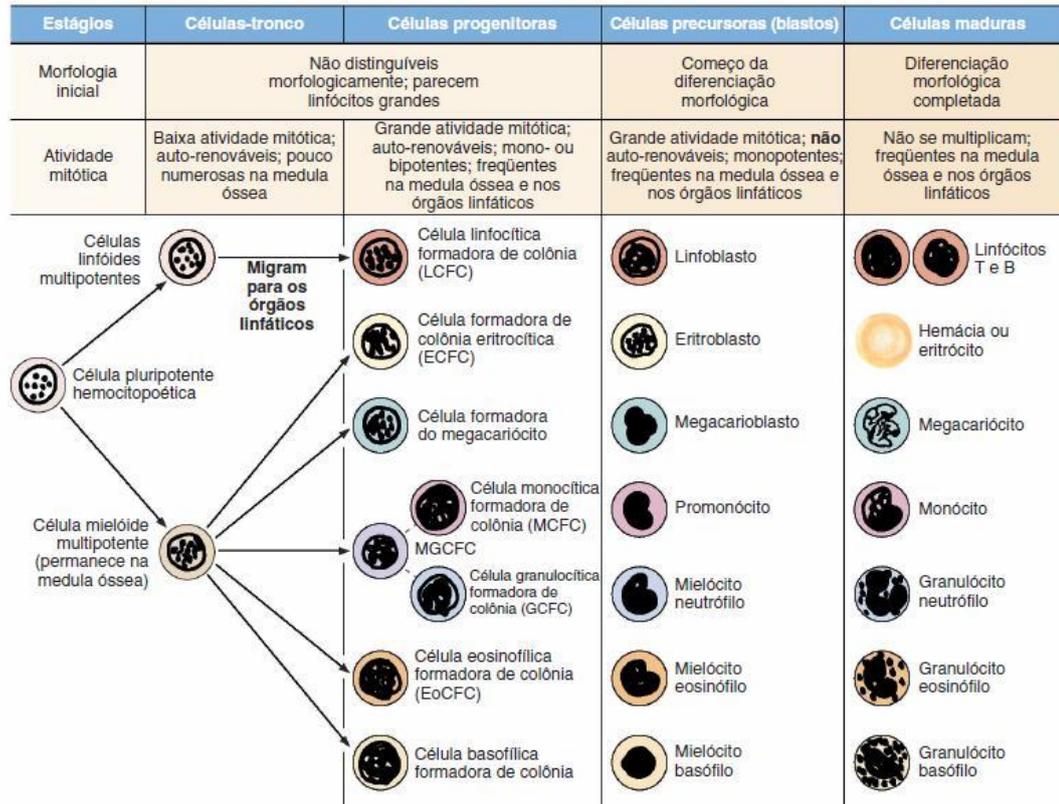
transcrição de vários genes relacionados o ciclo celular, como Ciclina D1 (OSADA; TAKAHASHI, 2002). Além disso, alterações na via p38 podem estar relacionadas com a autossuficiência em sinais de crescimento, replicação ilimitada, escape da apoptose, angiogênese, invasão e metástase (CUENDA; ROUSSEAU, 2007). A via PI3K / AKT é ativada por fatores de crescimento e sinais extracelulares, mas é bloqueada pelo supressor de tumor homólogo de fosfatase e tensina (PTEN). Caso ocorra a perda da função de PTEN ou a superexpressão do gene que codifica a subunidade catalítica PI3K, ocorre um aumento da sinalização desta via (LEE; MULLER, 2010).

Assim, algumas linhagens celulares apresentam alterações nestas vias de sinalização celular. Por exemplo, o melanoma é um tipo de câncer de pele altamente agressivo devido a sua capacidade para formar metástase e apresenta mutações nas vias RAS / RAF / MEK / ERK. As linhagens de melanoma humano Sk-Mel-19 e Sk-Mel-28 apresentam mutações de substituição – Missense (alteração de uma das bases do DNA que forma o códon de nucleotídeos de um aminoácido) no gene B-RAF (CISILOTTO, 2014; JÖNSSON et al., 2007; NISSAN et al., 2014). A Sk-Mel-28 também apresenta deleção de Tp53 e PTEN. Enquanto a Sk-mel-19 apresenta deleção no gene CDKN2A (XING et al., 2012). Outras mutações de substituição – Missense comuns são em N-RAS que ocorre na Sk-Mel-103 (NISSAN et al., 2014; XING et al., 2012). Algumas proteínas anti-apoptóticas como a BCL-2 são mais expressas na linhagem celular Sk-Mel-19 enquanto que proteínas BCL-XL e MCL1 são mais expressas na linhagem celular Sk-Mel-103 (Tabela 1) (RALPH, 2014; SANTOS, 2011).

**Tabela 1.** Leucemia e melanoma: Características e tratamentos.

	LEUCEMIA	MELANOMA
<b>Características</b>	Neoplasia hematológica	Câncer de pele
<b>Tipos</b>	Leucemia mielóide aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide crônica e leucemia linfocítica crônica (ZHAO; WANG; MA, 2018)	Melanoma cutâneo, melanoma acral, melanoma da mucosa; melanoma uveal (RABBIE et al., 2019)
<b>Alterações genéticas</b>	Ausência da expressão de PTEN, p53, BAX (Jurkat); mutação cromossômica no cromossomo <i>Philadelphia</i> (BCR-ABL) (K562) (GIOIA et al., 2018; QURESHI; HALL, 2013)	Mutação missense de BRAF (Sk-Mel-19 e Sk-Mel-28) e NRAS (Sk-Mel-103); deleção de PTEN e p53 (Sk-Mel-28) e CDKN2A (Sk-Mel-19); aumento na expressão de BCL-2 (Sk-Mel-19), BCL-XL e MCL1 (Sk-Mel-19) (CISILOTTO, 2014; RALPH, 2014; XING et al., 2012)
<b>Tratamentos</b>	Quimioterapia, radioterapia, anticorpos monoclonais e transplante de células-tronco/medula óssea (SAEDI et al., 2014)	Quimioterapia, radioterapia, anticorpos específicos, cirurgia (DOMINGUES et al., 2018)

Outro tipo de câncer em que ocorrem alterações na sinalização celular são as leucemias, neoplasias que afetam os diferentes tipos de células do sistema hematopoiético (Figura 4), levando a maturação celular anormal e a proliferação descontrolada (QURESHI; HALL, 2013). As leucemias apresentam células cancerígenas com diferentes tipos de mutações em proteínas e vias importantes para a proliferação das células. Por exemplo, a linhagem celular K562, modelo de leucemia mielóide crônica, é caracterizada por uma mutação cromossômica que resulta no cromossomo *Philadelphia*, que consiste em uma translocação recíproca entre os braços dos cromossomos 9q34 e 22q11. Esta alteração leva a produção de uma proteína híbrida BCR-ABL que tem maior atividade da tirosina-quinase intrínseca, que proporciona a proliferação celular e a liberação de inibidores de apoptose (Tabela 1) (QURESHI; HALL, 2013; SALES; VASCONCELOS, 2013).



**Figura 4.** Diferenciação das células hemopoéticas (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

Outras linhagens de leucemia humana como a Jurkat, leucemia linfoblástica aguda, apresenta diferentes mutações como nos receptores de células T, com a ausência de PTEN, regulador muito importante na sinalização da via PI3K. Essa linhagem também é caracterizada pela ausência na expressão de alguns genes supressores tumorais, como p53 e BAX (Tabela 1) (GIOIA et al., 2018). Dessa forma, essa linhagem celular, assim como esse quadro clínico de leucemias, se torna resistente à via intrínseca de apoptose (GIOIA et al., 2018; MÓCSAI; RULAND; TYBULEWICZ, 2010).

## 2.9. PLANTAS NA PREVENÇÃO E TRATAMENTO DO CÂNCER

Muitas plantas apresentam compostos bioativos com um amplo potencial farmacológico e são utilizadas há milênios para o tratamento de doenças. A literatura tem relatado o efeito de muitos fitoquímicos extraídos de plantas na promoção da saúde humana (IQBAL et al., 2017; MILLIMOUNO et al., 2014; SECA; PINTO, 2018). Dentre os compostos provenientes dos metabólitos secundários isolados de plantas há os terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (MILLIMOUNO et al., 2014).

Os flavonoides, que pertencem à classe dos compostos fenólicos, podem apresentar atividades biológicas diferentes como a atividade antioxidante e citotóxica,

neutralizando as espécies reativas ou estimulando as enzimas antioxidantes endógenas em células saudáveis e também podem promover a morte de células cancerígenas (PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

Os taninos, outra classe de compostos fenólicos, também são muito estudados por suas atividades anticancerígenas, sendo capazes de regular o ciclo celular, induzir a apoptose pela via intrínseca e pela inativação de vias de sinalização importantes para a proliferação celular como AKT e ERK (JIA et al., 2013; YILDIRIM; KUTLU, 2015).

Outro fitoquímico muito importante é o ácido gálico, composto polihidroxifenólico, encontrado em alimentos naturais, como em frutas. O ácido gálico apresenta atividades biológicas importantes, como antioxidante e anti-carcinogênica. O ácido gálico é capaz de induzir a apoptose e inibir a proliferação de células cancerígenas (SOURANI et al., 2016). Um estudo também demonstrou que a combinação de ácido gálico e Paclitaxel potencializou a ação citotóxica deste quimioterápico (ABOREHAB; OSAMA, 2019).

Dessa forma, é imprescindível a busca por fitoquímicos com atividades farmacológicas imporâtes como anticâncer e considerando a diversidade de espécies vegetais do Brasil e que muitas ainda não foram investigadas quanto a sua constituição química e ao seu potencial citotóxico (BERLINCK, 2012), verificamos a necessidade de estudos para a prospecção de novas espécies vegetais.

## **2.10. Gênero *Senna***

O gênero *Senna* é um dos maiores da família Fabaceae, apresentando cerca de 600 espécies, muitas delas utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças e investigadas quanto as suas atividades biológicas (CAMPOS et al., 2016).

Estudos com extrato clorofórmico das folhas de *Senna villosa* demonstraram atividade anti-inflamatória em modelo de edema de orelha induzida por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato. No mesmo estudo foi identificada a presença de três ésteres alifáticos, sendo tetradecanoato de hexila, tetradecanoato de heptil e tetradecanoato de octilo (SUSUNAGA-NOTARIO et al., 2014).

Campos e colaboradores (2016) mostraram que o extrato etanólico de folhas de *Senna velutina* apresenta atividade antioxidante e efeitos citotóxicos contra as linhagens leucêmicas Jurkat e K562, apresentando como mecanismos para promover a morte das células cancerígenas a ativação do cálcio intracelular e de pró-caspase-3, diminuição do potencial de membrana mitocondrial e parada do ciclo celular nas fases S e G2. Os autores atribuem estas

atividades à presença de epigalocatequina, epicatequina, rutina, heterosídeo de kaempferol e proantocianidinas identificados nas folhas de *S. velutina*.

Os alcaloides (-) - cassina e (-) - espectralina isolados das flores de *Senna spectabilis* reduzem a viabilidade celular nas linhagens tumorais A549 (carcinoma do pulmão), MCF-7 e Hs578T (carcinoma de mama), HepG2 (carcinoma hepatocelular), U138MG e U251MG (glioblastoma) de maneira dependente da concentração. Os alcaloides foram mais seletivos para a linhagem HepG2, apresentando a capacidade de induzir a parada do ciclo celular na transição da fase G1 / S, devido à inativação e da regulação negativa da expressão da ciclina D1 (PEREIRA et al., 2016).

Estudos de Sobeh e colaboradores (2017) demonstraram que o extrato metanólico da casca do caule de *Senna singueana* apresenta atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* no modelo animal *Caenorhabditis elegans*, pela capacidade de reduzir a produção de espécies reativas nos nematoides e apresentar atividade hepatoprotetora em modelo de lesão hepática induzida em ratos.

O extrato acetônico das folhas de *Senna italica* estimula a captação de glicose através da via PI3K e regula negativamente algumas das adipocinas associadas à obesidade, como a leptina, lipocalina-2, proteína ligante do retinol 4 (RBP4), IL-6, dipeptidil peptidase IV (DPPIV) e adiponectina (MALEMATJA et al., 2018).

Em outro estudo, Monteiro e colaboradores (2018) comprovaram a atividade antioxidante dos extratos etanólicos e hexânicos das folhas e pendulas de *Senna pendula*, e a inibição da atividade da acetilcolinesterase evidenciada para o extrato hexânico das flores.

Além disso, estudos químicos de diversas espécies do gênero *Senna* têm identificado metabólitos secundários já descritos na literatura por apresentarem importantes atividades farmacológicas. Dentre os compostos químicos já descritos destacamos emodina e crisofanol isolados do extrato de diclorometano das raízes de *Senna macranthera* (INOUE ANDRADE et al., 2015). Além disso, a presença de ácidos hidroxicinâmicos, ácidos hidroxibenzóicos e proantocianidinas e monômeros de (+) - catequina e (-) – epicatequina foram relatados no extrato metanolólico de *Senna reticulata* (NAVARRO et al., 2017), proantocianidinas dos quais monómeros, dímeros, trímeros de catequina, galocatequina, guibourtinidol, cassiaflavan e afzelechin também foram identificados no extrato metanólico da casca de *Senna singueana* e a presença de antraquinonas, triterpenos, flavonoides, taninos, saponinas e xantonas nos extratos etanólicos e hexânicos *Senna cana* e *S. pendula* (MONTEIRO et al., 2018; SOBEH et al., 2017).

A espécie *Senna velutina* também foi investigada quanto sua composição química e atividade anticancerígena. No extrato etanólico das raízes foi identificada a presença de catequina, antraquinona e piceatanol. Além disso, os autores demonstraram que o extrato apresenta ação citotóxica *in vitro* contra a linhagem tumoral de melanoma murino B16F10-Nex2 e que o extrato é capaz de reduzir o volume tumoral e a metástase pulmonar *in vivo* (CASTRO et al., 2019).

Dentre as várias espécies do gênero *Senna*, *Senna rugosa* é amplamente distribuída no Cerrado, cujos nomes populares são amendoirana, alcacuz bravo, bico-de-corvo, boi gordo e paratudo. *S. rugosa* é amplamente distribuída no Cerrado e conhecida por seu uso popular como vermífugo e no tratamento de acidentes ofídicos (RICARDO et al., 2017; RODRIGUES; CARVALHO, 2007). Sobre essa espécie foram encontrados dois trabalhos científicos, que relatam o isolamento e identificação de antraquinonas e naftopironas no extrato hexânico de suas raízes (BARBOSA et al., 2004) e a atividade larvicida do extrato aquoso das sementes de *S. rugosa* contra larvas de *Aedes aegypti* (FARIAS et al., 2010).

Além disso, há estudos sobre os extratos aquoso e etanólico das folhas de *S. rugosa*, demonstrando atividade antioxidante, hipoglicemiante *in vivo* utilizando ratos *Wistar* e antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 8739 e fúngica contra *Candida albicans* ATCC 10231 (EBERHARDT, 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. GERAL**

Determinar a composição química dos extratos etanólicos das folhas e raízes de *S. rugosa* e avaliar as atividades antioxidante e anticancerígena contra linhagens de leucemia e melanoma.

#### **3.2. ESPECÍFICOS**

- Determinar a composição química do EFSR;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos pelos métodos de ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>;
- Verificar a capacidade dos extratos de proteger a proteína albumina de soro bovino (BSA) contra a oxidação induzida por AAPH;

- Investigar se os extratos são capazes de proteger o DNA plasmidial contra a fragmentação induzida por peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mais radiação ultravioleta (UV);
- Determinar a atividade citotóxica dos extratos frente a linhagens de leucemia humana K562 e Jurkat;
- Investigar a atividade citotóxica dos extratos frente diferentes linhagens de melanoma humano Sk-Mel-19, Sk-Mel-28 e Sk-Mel-103 e em melanoma murino B16F10-Nex2.
- Verificar a viabilidade de células mononucleares de sangue periférico humano (PBMC) e de fibroblasto de pulmão humano (MRC-5) após tratamento com os extratos.
- Avaliar se os extratos são capazes de impedir a migração celular de diferentes linhagens de melanoma humano Sk-Mel-19, Sk-Mel-28 e Sk-Mel-103 e de melanoma murino B16F10-Nex2.

#### 4. REFERÊNCIAS

- ABOREHAB, N. M.; OSAMA, N. Effect of Gallic acid in potentiating chemotherapeutic effect of Paclitaxel in HeLa cervical cancer cells. **Cancer Cell International**, v. 19, n. 1, p. 154, 3 jun. 2019.
- BARBOSA, F. G. et al. Anthraquinones and naphthopyrones from *Senna rugosa*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 3, p. 363–365, 1 mar. 2004.
- BERLINCK, R. G. DE S. Bioprospecção no Brasil: um breve histórico. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 27–30, 2012.
- BOKARE, A. D.; CHOI, W. Review of iron-free Fenton-like systems for activating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in advanced oxidation processes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 275, p. 121–135, 30 jun. 2014.
- CALVANI, M.; PASHA, A.; FAVRE, C. Nutraceutical Boom in Cancer: Inside the Labyrinth of Reactive Oxygen Species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 6, mar. 2020.
- CAMPOS, J. F. et al. The Chemical Profile of *Senna velutina* Leaves and Their Antioxidant and Cytotoxic Effects. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- CASTRO, D. T. H. et al. Ethanolic Extract of *Senna velutina* Roots: Chemical Composition, In Vitro and In Vivo Antitumor Effects, and B16F10-Nex2 Melanoma Cell Death Mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.
- CISILOTTO, J. AVALIAÇÃO IN VITRO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTIMETASTÁTICOS DE SAIS DE ISOTIOURÔNIO, DE N-FENILISOTIOURÔNIO E DE ISOTIOSSEMICARBAZIDAS EM LINHAGENS DE MELANOMA. Mestre em Farmácia—Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.
- CUENDA, A.; ROUSSEAU, S. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Mitogen-Activated Protein Kinases: New Insights on Regulation, Function and Role in Human Disease. v. 1773, n. 8, p. 1358–1375, 1 ago. 2007.
- DALLE-DONNE, I. et al. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 601–623, 1 abr. 2006.
- DANAEI, G. et al. Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. **The Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1784–1793, 19 nov. 2005.
- DART, A. Fungi complements cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 19, n. 12, p. 665–665, dez. 2019.
- DE GIFFONI DE CARVALHO, J. T. et al. Medicinal Plants from Brazilian Cerrado: Antioxidant and Anticancer Potential and Protection against Chemotherapy Toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, 2019.
- DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687–699, nov. 2011.
- DOMINGUES, B. et al. Melanoma treatment in review. **ImmunoTargets and Therapy**, v. 7, p. 35–49, 7 jun. 2018.
- DOS SANTOS, J. M. et al. *Guazuma ulmifolia* Lam. Decreases Oxidative Stress in Blood Cells and Prevents Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, 2018.
- EBERHARDT, G. N. **Atividade Antioxidante, Antidiabética e Antimicrobiana de *Senna rugosa* (G. Don) H.S. Irwin & Barneby (1982) e *Senna velutina* (Vogel) H.S. Irwin & Barneby (1982)**. Mestrado em Ciências da Saúde—Dourados (MS): Universidade Federal da Grande Dourados, 2012.
- ESPINOSA-DIEZ, C. et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. **Redox Biology**, v. 6, p. 183–197, 1 dez. 2015.

- FARIAS, D. F. et al. Water extracts of Brazilian leguminous seeds as rich sources of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 3, p. 585–594, set. 2010.
- FULDA, S.; DEBATIN, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798–4811, ago. 2006.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death and Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, mar. 2018.
- GANESAN, K.; XU, B. A Critical Review on Polyphenols and Health Benefits of Black Soybeans. **Nutrients**, v. 9, n. 5, 4 maio 2017.
- GÀO, X.; SCHÖTTKER, B. Reduction–oxidation pathways involved in cancer development: a systematic review of literature reviews. **Oncotarget**, v. 8, n. 31, p. 51888–51906, 16 abr. 2017.
- GIOIA, L. et al. A genome-wide survey of mutations in the Jurkat cell line. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 334, 8 maio 2018.
- GREENLEE, H. Natural Products for Cancer Prevention. **Seminars in oncology nursing**, v. 28, n. 1, p. 29–44, fev. 2012.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 7 jan. 2000.
- HASSANPOUR, S. H.; DEHGHANI, M. Review of cancer from perspective of molecular. **Journal of Cancer Research and Practice**, v. 4, n. 4, p. 127–129, 1 dez. 2017.
- ICHIM, G.; TAIT, S. W. G. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 8, p. 539–548, ago. 2016.
- IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 1 dez. 2018.
- INOUE ANDRADE, F. et al. Chemical Constituents and an Alternative Medicinal Veterinary Herbal Soap Made from *Senna macranthera*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.
- IQBAL, J. et al. Plant-derived anticancer agents: A green anticancer approach. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 12, p. 1129–1150, 1 dez. 2017.
- JIA, L. et al. A potential anti-tumor herbal medicine, Corilagin, inhibits ovarian cancer cell growth through blocking the TGF- $\beta$  signaling pathways. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 33, 15 fev. 2013.
- JIN, J. et al. Identification of Genetic Mutations in Cancer: Challenge and Opportunity in the New Era of Targeted Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 9, 2019.
- JONES, K. L.; BUZDAR, A. U. A review of adjuvant hormonal therapy in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer**, v. 11, n. 3, p. 391–406, 1 set. 2004.
- JÖNSSON, G. et al. Genomic profiling of malignant melanoma using tiling-resolution arrayCGH. **Oncogene**, v. 26, n. 32, p. 4738–4748, jul. 2007.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. 11
- LANDSKRON, G. et al. Chronic Inflammation and Cytokines in the Tumor Microenvironment. **Journal of Immunology Research**, 2014.
- LEE, E. Y. H. P.; MULLER, W. J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 10, out. 2010.

- LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.
- MALEMATJA, R. O. et al. Potential Hypoglycaemic and Antiobesity Effects of *Senna italica* Leaf Acetone Extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153–166, mar. 2009.
- MILLIMOUNO, F. M. et al. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer and Perspectives with Natural Compounds from Mother Nature. **Cancer Prevention Research**, v. 7, n. 11, p. 1081–1107, 1 nov. 2014.
- MIRONCZUK-CHODAKOWSKA, I.; WITKOWSKA, A. M.; ZUJKO, M. E. Endogenous non-enzymatic antioxidants in the human body. **Advances in Medical Sciences**, v. 63, n. 1, p. 68–78, 1 mar. 2018.
- MÓCSAI, A.; RULAND, J.; TYBULEWICZ, V. L. J. The SYK tyrosine kinase: a crucial player in diverse biological functions. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 6, p. 387–402, jun. 2010.
- MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Redox signalling in development and regeneration. v. 80, p. 50–64, 1 ago. 2018.
- MONTEIRO, J. A. et al. Bioactivity and Toxicity of *Senna cana* and *Senna pendula* Extracts. **Biochemistry Research International**, 2018.
- NAVARRO, M. et al. Proanthocyanidin Characterization, Antioxidant and Cytotoxic Activities of Three Plants Commonly Used in Traditional Medicine in Costa Rica: *Petiveria alliacea* L., *Phyllanthus niruri* L. and *Senna reticulata* Willd. **Plants**, v. 6, n. 4, 19 out. 2017.
- NISSAN, M. H. et al. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. **Cancer research**, v. 74, n. 8, p. 2340–2350, 15 abr. 2014.
- NOGUEIRA, V.; HAY, N. Molecular Pathways: Reactive Oxygen Species Homeostasis in Cancer Cells and Implications for Cancer Therapy. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 19, n. 16, p. 4309–4314, 15 ago. 2013.
- OSADA, H.; TAKAHASHI, T. Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer. **Oncogene**, v. 21, n. 48, p. 7421–7434, out. 2002.
- PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 29 dez. 2016.
- PANDAY, A. et al. NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5–23, jan. 2015.
- PEREIRA, R. M. et al. Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (-)-cassine and (-)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression. **Toxicology In Vitro**, p. 86–92, 1 mar. 2016.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 5 jun. 2015.
- POYTON, R. O.; BALL, K. A.; CASTELLO, P. R. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 20, n. 7, p. 332–340, 1 set. 2009.
- PYLAYEVA-GUPTA, Y.; GRABOCKA, E.; BAR-SAGI, D. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nature reviews. Cancer**, v. 11, n. 11, p. 761–774, 13 out. 2011.
- QURESHI, A. K.; HALL, G. W. Leukaemias: a review. **Paediatrics and Child Health**, v. 23, n. 11, p. 461–466, 1 nov. 2013.

RABBIE, R. et al. Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. **The Journal of Pathology**, v. 247, n. 5, p. 539–551, abr. 2019.

RAHAL, A. et al. Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay. **BioMed Research International**, 2014.

RALPH, A. C. L. **Avaliação do potencial citotóxico da biflorina em células de melanoma humano com diferentes padrões genéticos**. Mestrado em Ciências Farmacêuticas—MANAUS: Universidade Federal do Amazonas, 2014.

RASOULI, H.; FARZAEI, M. H.; KHODARAHMI, R. Polyphenols and their benefits: A review. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. sup2, p. 1700–1741, 29 dez. 2017.

RICARDO, L. M. et al. Plants from the Brazilian Traditional Medicine: species from the books of the Polish physician Piotr Czerniewicz (Pedro Luiz Napoleão Chernoviz, 1812–1881). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 3, p. 388–400, maio 2017.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. D. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 9, p. 17–35, 2007.

SAEDI, T. A. et al. **The Effects of Herbs and Fruits on Leukaemia**. Review Article. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ecam/2014/494136/>>. Acesso em: 17 fev. 2020.

SALES, M. M.; VASCONCELOS, D. D. M. **Citometria de Fluxo: Aplicações no Laboratório Clínico e de Pesquisa**. São Paulo: Atheneu, 2013.

SANTOS, M. T. DOS. **Prospecção de novos fármacos para melanoma em equivalente dérmico**. Mestrado em Farmácia—São Paulo: Universidade de São Paulo, 2011.

SCHAFER, K. A. The Cell Cycle: A Review. **Vet Pathol**, v. 35, p. 461–478, 1998.

SCHIRRMACHER, V. From chemotherapy to biological therapy: A review of novel concepts to reduce the side effects of systemic cancer treatment (Review). **International Journal of Oncology**, v. 54, n. 2, p. 407–419, 10 dez. 2018.

SECA, A. M. L.; PINTO, D. C. G. A. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, 16 jan. 2018.

SILVA, V. DE O. **Estudos Cinéticos da Catálise da Reação de Fenton por 3,5-Di-terc-Butil-Catecol**. Doutorado em Química—São Paulo: Universidade de São Paulo, 2010.

SINGH, K. et al. Antioxidants as precision weapons in war against cancer chemotherapy induced toxicity – Exploring the armoury of obscurity. **Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ**, v. 26, n. 2, p. 177–190, fev. 2018.

SINGH, R.; LETAI, A.; SAROSIEK, K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 175–193, mar. 2019.

SOBEH, M. et al. Senna singueana: Antioxidant, Hepatoprotective, Antiapoptotic Properties and Phytochemical Profiling of a Methanol Bark Extract. **Molecules : A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, v. 22, n. 9, 8 set. 2017.

SOURANI, Z. et al. Gallic Acid Inhibits Proliferation and Induces Apoptosis in Lymphoblastic Leukemia Cell Line (C121). **Iranian Journal of Medical Sciences**, v. 41, n. 6, p. 525–530, nov. 2016.

SOUZA, F. DA C. **Generation and characterization of isogenic cell lines harboring p53 mutants: A model for the evaluation of p53 and p16INK4A replacement in the presence of 053R17H and p53R248Q**. Mestrado em Biologia Celular e Tecidual—São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2011.

SUSUNAGA-NOTARIO, A. DEL C. et al. Bioassay-Guided Chemical Study of the Anti-Inflammatory Effect of *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae) in TPA-Induced Ear Edema. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10261–10278, 15 jul. 2014.

VAN ELSLAND, D.; NEEFJES, J. Bacterial infections and cancer. **EMBO Reports**, v. 19, n. 11, nov. 2018.

VERMEULEN, K.; BOCKSTAELE, D. R. V.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131–149, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer Tomorrow**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: 17 out. 2019.

XING, F. et al. Concurrent loss of the PTEN and RB1 tumor suppressors attenuates RAF dependence in melanomas harboring V600EBRAF. **Oncogene**, v. 31, n. 4, p. 446–457, 26 jan. 2012.

YANG, H. et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research : CR**, v. 37, 1 nov. 2018.

YILDIRIM, I.; KUTLU, T. Anticancer Agents: Saponin and Tannin. **International Journal of Biological Chemistry**, v. 9, n. 6, p. 332–340, 1 jun. 2015.

YOUNG, I. S.; WOODSIDE, J. V. Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 3, p. 176–186, 1 mar. 2001.

YUE, X. et al. Mutant p53 in cancer: accumulation, gain-of-function and therapy. **Journal of molecular biology**, v. 429, n. 11, p. 1595–1606, 2 jun. 2017.

ZHAO, Y.; WANG, Y.; MA, S. Racial Differences in Four Leukemia Subtypes: Comprehensive Descriptive Epidemiology. **Scientific Reports**, v. 8, 11 jan. 2018.

## **5. ANEXOS**

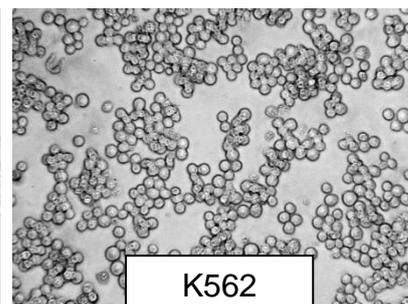
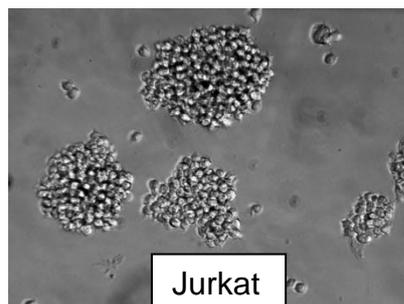
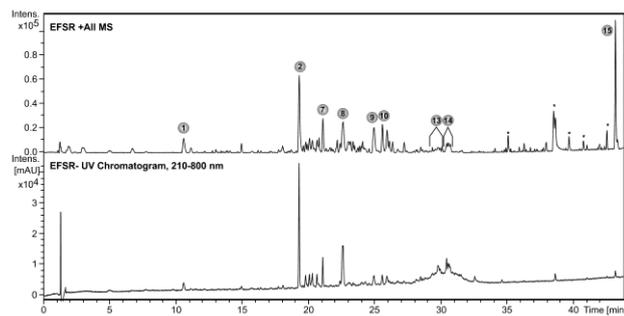
## Artigo 1

### Composição química, propriedades antioxidante e citotóxica dos extratos de *Senna rugosa* sobre linhagens de leucemia humana



Fonte: Eberhardt (2012)

Fonte: Santos (2019)



Fonte: Baldivia: 2019

## Artigo 2

### Atividade anticancerígena das folhas e raízes de *Senna rugosa* contra melanoma *in vitro*



Flores e folhas de *S. rugosa*



Raízes de *S. rugosa*

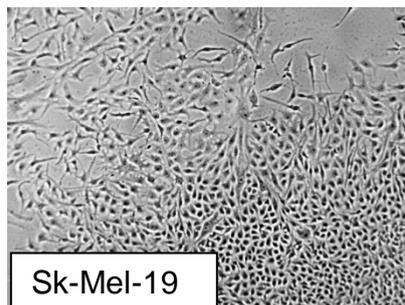


EFSR

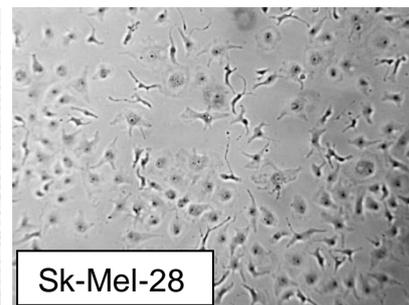
ERSR

Fonte: Eberhardt (2012)

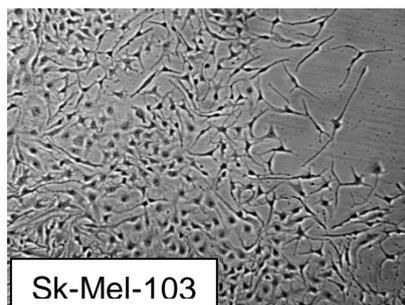
Fonte: Santos (2019)



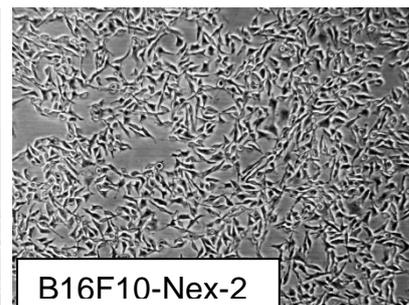
Sk-Mel-19



Sk-Mel-28

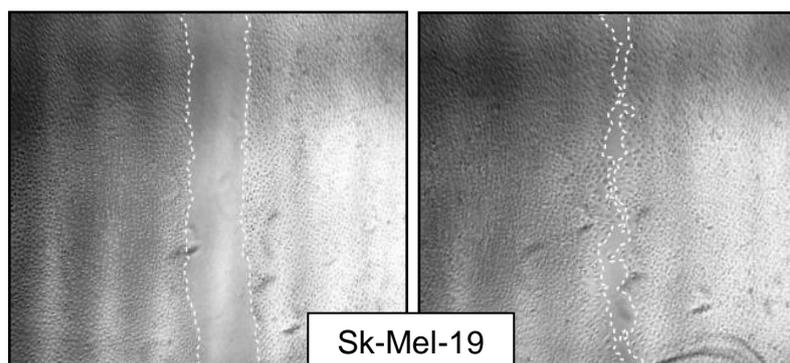


Sk-Mel-103



B16F10-Nex-2

Fonte: Baldivia, 2019



Sk-Mel-19

Fonte: Santos, 2020