

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL - UFMS  
*Campus de CAMPO GRANDE*  
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR - PMBqBM - SBBq

KAMYLLA FERNANDA SOUZA DE SOUZA

**EFEITOS DE COMPOSTOS CITOTÓXICOS DE LAURÁCEAS NA  
INDUÇÃO DE APOPTOSE E NA EXPRESSÃO DE GENES EM  
CÉLULAS NEOPLÁSICAS *IN VITRO***

CAMPO GRANDE- MS

2018

KAMYLLA FERNANDA SOUZA DE SOUZA

**EFEITOS DE COMPOSTOS CITOTÓXICOS DE LAURÁCEAS NA  
INDUÇÃO DE APOPTOSE E NA EXPRESSÃO DE GENES EM  
CÉLULAS NEOPLÁSICAS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos.

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo.

CAMPO GRANDE- MS

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

KAMYLLA FERNANDA SOUZA DE SOUZA

**EFEITOS DE COMPOSTOS CITOTÓXICOS DE LAURÁCEAS NA INDUÇÃO DE APOPTOSE E NA EXPRESSÃO DE GENES EM CÉLULAS NEOPLÁSICAS *IN VITRO*.**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular – PMBqBM – SBBq, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para a obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Biologia Molecular).

\_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2018

**Comissão Examinadora:**

---

Maria de Fatima Cepa Matos  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

---

Priscila de Matos Cândido Bacani  
Faculdades Integradas de Três Lagoas (AEMS)

---

Caio Fernando Ramalho de Oliveira  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

---

Alda Maria Teixeira Ferreira (Suplente)  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS)

Dedico este trabalho...

À minha mãe Lidia,

Ela, que por todas as batalhas vencidas nesta vida é digna de admiração. Ela, que muito cedo presenteou com um quadro negro, giz e apagador, excelentes brinquedos para uma futura professora. Ela, que usou esse mesmo quadro para me alfabetizar e desde então me mostrou que minha única opção era o estudo. Ela, que não mediu esforços para que eu tivesse todo o necessário para estudar e que, com orgulho, guarda os certificados de ótima aluna que ganhei nas séries iniciais. Ela, que se orgulha ao dizer “Kamylla?! Eu tinha que brigar para que ela guardasse os livros e fosse brincar.” Sim mãe, guardei os livros e fui brincar, fui viver e “te dar trabalho”. Grata sou por você conseguir, bravamente, me manter nos trilhos, no caminho dos estudos. Portanto, te dedico esta dissertação. Tudo o que sou, ou pretendo ser, devo a você.

A todos aqueles que sofrem ou sofreram convivendo com um tratamento cruel e aqueles que nem mesmo tiveram chances de se tratar.

*In memoriam:*

Nilza dos Santos Souza, vó Nilza

Maria Cristina Cabreira Sampaio, tia Cris

Aloísio Rodrigues de Oliveira, tio Aloísio

Tiago Barbosa Queiróz, Tiagão

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), pelo apoio financeiro sem o qual este trabalho não teria sido realizado, bem como pela bolsa de mestrado a mim concedida.

Ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular (PMBqBM - UFMS), à coordenadora Fabiana Fonseca Zanoelo e a todos os professores vinculados a ele.

À Profa. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos pela oportunidade que me deu de participar de seu grupo de pesquisa; pela dedicada orientação durante quase três anos; pela credibilidade a mim atribuída; por exigir sempre o máximo, fazendo com que eu me esforçasse para superar contratempos que surgissem, assim contribuindo imensamente para meu crescimento profissional. Também sou grata pela amizade que construímos, pelos momentos descontraídos, pela ajuda e palavras de conforto em várias ocasiões e pelo carinho que demonstrou em meio aos “puxões de orelha” (rs). Muito obrigada profe!!!

À Profa. Dra. Inês Aparecida Tozzetti, por ter acreditado na minha vontade em ingressar em um Programa de Pós-Graduação e ter me dado a oportunidade de um estágio inicial em seu laboratório.

À Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo por me ajudar a idealizar o projeto e por dirimir as dúvidas que surgiram.

À Profa. Dra. Alda Maria Teixeira Ferreira pelas contribuições na qualificação e dissertação; por me acolher como se eu fosse sua aluna; por me acalmar sempre que precisei, e por todo apoio, incentivo e confiança.

À colega Ana Paula Machado por compartilhar comigo seu conhecimento em Biologia Molecular; por me incentivar e me tranquilizar em momentos cruciais (lembra-se daquele áudio de 5 minutos?! rs... Obrigada!).

À técnica e amiga Rosianne Tsujisaki, minha “Parça da Biomol” e da vida, por todos os ensinamentos em Biologia Molecular e técnicas de laboratório; por me acolher como estagiária e me deixar participar de seu trabalho; por, mesmo de longe, continuar me socorrendo em minhas dúvidas; pela amizade e cumplicidade construídas que perduram mesmo à distância.

Ao Prof. Dr. Caio Fernando Ramalho de Oliveira, pelas contribuições na qualificação e dissertação; por todo o conhecimento e experiência compartilhados nos

experimentos de RT-qPCR; por toda a paciência e prontidão em responder aos meus questionamentos; por todo o apoio e incentivo.

Ao colega Edwin Torres, por todo o conhecimento e experiência em RT-qPCR a mim passados, pela paciência e prontidão em responder aos meus questionamentos, por todo o apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr Rodrigo Pires Dallacqua, pelas contribuições na qualificação; pelos ensinamentos no desenho de *primers*; por sempre me receber bem em sua sala e compartilhar seu conhecimento sanando minhas dúvidas.

Ao Dr. André Sampaio e às técnicas Lucia, Juliana e Eduarda por me receberem em Farmanguinhos-FIOCRUZ e compartilhar comigo seus conhecimentos em RT-qPCR.

À Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez e seu aluno Danilo Tófoli, por compartilhar os compostos químicos utilizados neste estudo.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira por disponibilizar o citometro de fluxo para a realização das análises e também à farmacêutica Dra. Vivianne Landgraf de Castro pela ajuda durante as leituras.

À Profa. Dra. Aline Pedroso Lorenz Lemke e técnica Leticia Albertti, por disponibilizarem o espectrofotômetro (nanodrop) para quantificação das amostras.

À Profa. Dra. Priscila de Matos Cândido Bacani pelas contribuições na redação da dissertação.

À Profa. Dra. Mariana da Silva Araújo, minha co-orientadora, pelas contribuições na redação da dissertação, pela atenção e apoio.

Às “Divas da Cultura de Células” Aleksandra Paolla, que me ensinou a cultivar células; Indira Pereira, Lanna Heemann e Claudia Stutz pela amizade, companheirismo e troca de ideias que foram além do laboratório. À Profa. Dra. Danielle Bogo e às colegas Caroline Alexandrino, Magali Costa e Giovana Bicudo pelo companheirismo no lab; e às técnicas da Hematologia, Regina e Débora por tornarem mais fácil nosso trabalho.

À Camilla Nantes, uma “Diva da Cultura” especial, por todas as trocas de ideia, todos os conhecimentos compartilhados, pelos experimentos felizes e fracassados, sem falar nas marmitas e caronas. Pela generosidade e pela amizade, do laboratório para a vida.

À Profa. Dra. Cláudia Araujo, por ter apontado minha capacidade em seguir com os estudos em Ciências Biológicas, tornando-se minha primeira orientadora; por ser uma excelente professora; por todo apoio e incentivo.

Às “Flores da Bio”, minhas queridas amigas da graduação, Graciele Silveira, Beatriz Ribeiro e Daniele Campói, por terem me aturado naqueles quatro anos (rs); por me incentivarem e por tornarem cada dia de estudo muito mais prazeroso.

Aos meus pais, Milton Domingos de Souza e Lidia dos Santos Souza, pela vida e pelos cuidados ao longo dela.

À minha avó Odelita, por me abrigar quando iniciei o Mestrado, pela dedicação e cuidados para comigo durante o tempo que estive em sua casa; pela paciência e incentivo nos meus estudos; pelas orações, ensinamentos e risadas e por ser tão querida.

À minha amada irmã Lisane Oliveira, por ter me acolhido como se fosse uma mãe quando cheguei nesta cidade; pela paciência e incentivo nos meus estudos; por me dar, além dos meus sobrinhos, uma afilhada linda; pela generosidade, respeito, amor e amizade. Muito obrigada, irmã!

Aos meus irmãos Junior, Brenda e Denise, pelo incentivo e amor.

Aos meus primos e amigos Priscilla, Helton e Luiz Augusto, por me incentivarem, me apoiarem e estarem sempre presentes.

Às minhas tias Denize e Sônia, aos meus tios Nelson, Vanderlei e Vanderlan (*in memoriam*), por todo o carinho e incentivo aos meus estudos.

Aos meus queridos amigos e amigas de Rondonópolis, Wagner, Naira, Bruna, Maria, Ketully, Zenilda, Waltencyr, Beatriz e Carol pela amizade, torcida e apoio; por me incentivarem a seguir sempre em frente em busca dos meus objetivos.

Por último e mais importante, ao meu Pai Amado, Deus, que se faz presente em minha vida guiando-me nas minhas escolhas e me mostrando que para todo fim há um começo e que nunca devo desistir dos meus objetivos. Até mesmo quando perco as forças para lutar, Nele me apoio para levantar e me lembro que estando com Ele nada devo temer.

## Efeitos de compostos citotóxicos de lauráceas na indução de apoptose e na expressão de genes em células neoplásicas *in vitro*

Kamylla Fernanda Souza de Souza

### RESUMO

*Mezilaurus crassiramea* e *Aniba heringeri* (Lauraceae), plantas encontradas no Cerrado de Mato Grosso do Sul, foram estudadas quanto à citotoxicidade em células neoplásicas, devido à demanda por estudos relacionados ao tratamento de câncer. O estudo guiado dos extratos e fases levou ao isolamento de dois compostos: majoranolídeo (butanolídeo) e dímero de desidrogoniotalamina (estiril-pirona), os quais apresentaram forte atividade citotóxica para as linhagens de leucemia promielocítica aguda (HL-60) e de carcinoma de mama triplo-negativo (MDA-MB-231), respectivamente, tornando-se relevante a avaliação dos efeitos que levaram à citotoxicidade nessas linhagens. O objetivo do trabalho foi investigar efeitos apoptóticos e o perfil de expressão de genes integrantes das vias intrínseca (BAX e BCL-2) e extrínseca (caspase-8) da apoptose, bem como de um gene de resistência à apoptose (BIRC-5). Para isso, foi avaliado o efeito de majoranolídeo, em quatro concentrações, no comprometimento da integridade de membrana plasmática (MP) nas células HL-60, através do ensaio de viabilidade celular por 7-AAD. Para quantificar a caspase-3, ativada por dímero de desidrogoniotalamina, em células MDA-MB-231, utilizou-se o anticorpo PE *Rabbit Anti-Active caspase-3*. A expressão gênica foi analisada nas duas linhagens em estudo, tratadas com seus respectivos compostos, seguindo-se os passos de extração do RNA total, síntese do cDNA e posterior quantificação relativa por PCR em tempo real (RT-qPCR). Os dados de expressão gênica foram normalizados pelo gene constitutivo  $\beta$ -actina e calculados com o *software* CFX Manager 3.1 (Bio-Rad). Após 48 h de tratamento, o majoranolídeo, na concentração de 50  $\mu$ M, causou permeabilização de MP em células HL-60, caracterizando inviabilidade/morte celular. Nesse mesmo período, o composto causou *up*-regulação de BAX e caspase-8 (pró-apoptóticos), além de *down*-regulação em BIRC-5 (antiapoptótico), sugerindo uma possível ativação das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Para células MDA-MB-231, após 48 horas de tratamento foi encontrada ativação significativa de caspase-3 com dímero de desidrogoniotalamina (63  $\mu$ M), bem como *up*-regulação de BAX, sem efeitos significativos para os demais genes em estudo. Os resultados obtidos somam-se aos conhecimentos disponíveis sobre os efeitos citotóxicos dos compostos majoranolídeo e dímero de desidrogoniotalamina em células leucêmicas e de câncer de mama, respectivamente, e impulsionam estudos subsequentes dessas espécies e de outras plantas do Cerrado, na busca de compostos bioativos anticâncer.

Palavras-chave: Lauraceae, Apoptose, HL-60, MDA-MB-231, RT-qPCR, Expressão gênica.

## Effects of cytotoxic compounds from Lauraceae on apoptosis induction and gene expression in neoplastic cells *in vitro*

Kamylla Fernanda Souza de Souza

### ABSTRACT

Responding to the growing demand for knowledge related to cancer treatment, *Mezilaurus crassiramea* and *Aniba heringeri* (Lauraceae) – plant species found in the Cerrado biome in Mato Grosso do Sul state, Midwest Brazil – were investigated for cytotoxicity against neoplastic cells. The guided study of extracts and phases led to the isolation of two compounds – majoranolide (butanolide) and dehydrogoniothalamine dimer (styrylpyrone) – which exhibited strong cytotoxic activity against acute promyelocytic leukemia (HL-60) cells and triple-negative breast cancer (MDA-MB-231) cells, respectively. These findings justified evaluating the effects that manifested as cytotoxicity against these cell lines. The purpose of the present study was to investigate apoptotic effects and the expression profile of genes that play a role in the intrinsic (BAX and BCL-2) and extrinsic (caspase-8) pathways of apoptosis, as well as of an apoptosis resistance gene (BIRC-5). To this end, the effect of majoranolide at four concentrations on the impairment of plasma membrane integrity in HL-60 cells was assessed using the 7-AAD cell viability assay. PE rabbit anti-active caspase-3 antibodies were employed to quantify caspase-3 activated by dehydrogoniothalamine dimer in MDA-MB-231 cells. To examine gene expression, cells of both lines were treated with their respective compounds, with subsequent total RNA extraction, cDNA synthesis, and relative quantification by real-time PCR (RT-qPCR). Gene expression data were normalized to the constitutive  $\beta$ -actin gene and calculated using CFX Manager 3.1 software (Bio-Rad). After 48 h of treatment, majoranolide at 50  $\mu$ M caused plasma membrane permeabilization in HL-60 cells, characterizing cell inviability/death. Within the same period, the compound caused upregulation in BAX and caspase-8 (both pro-apoptotic), as well as downregulation in BIRC-5 (antiapoptotic), suggesting a possible activation of the intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis. For MDA-MB-231 cells, significant activation of caspase-3 with dehydrogoniothalamine dimer (63  $\mu$ M) and upregulation of BAX were observed after 48 h of treatment, without significant effects on the remaining genes investigated. The results obtained add to the knowledge base available on the cytotoxic effects of majoranolide and dehydrogoniothalamine dimer in leukemic and breast cancer cells, respectively, encouraging further investigation of these botanical species and other plants from the Cerrado biome as part of the search for bioactive anticancer compounds.

Keywords: Lauraceae, Apoptosis, HL-60, MDA-MB-231, RT-qPCR, Gene expression.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                        |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Características biológicas do câncer.....                                                                                                   | 21 |
| Figura 2 – Etapas da RT-qPCR.....                                                                                                                      | 26 |
| Figura 3 – Circuito básico de regulação da apoptose pela família BCL-2.....                                                                            | 30 |
| Figura 4 – Vias de sinalização extrínseca e intrínseca da apoptose.....                                                                                | 32 |
| Figura 5 – Plantas da família Lauraceae. A) Folhas e frutos de <i>Mezilaurus crassiramea</i> . B) Frutos e folhas de <i>Aniba heringueri</i> . ....    | 35 |
| Figura 6 – Estrutura molecular dos compostos majoranolídeo (1) e dímero de desidrogoniotalamina (2) e seus respectivos valores de massa molecular..... |    |
| Figura 7 – <i>Primers</i> correspondentes aos genes em estudo: BAX, BCL-2, Caspase-8 e BIRC-5; e genes normalizadores: $\beta$ -actina e GAPDH.....    |    |
| Figura 8 – Componentes das reações de qPCR.....                                                                                                        |    |
| Figura 9 – Efeito de majoranolídeo na alteração da integridade da membrana de células HL-60. ....                                                      |    |
| Figura 10 – Efeito de dímero de desidrogoniotalamina na ativação de caspase-3 em células MDA-MB-231. ....                                              |    |
| Figura 11 – Efeito de majoranolídeo na expressão de mRNA de BAX, BCL-2, BIRC-5 e caspase-8 em células HL-60.....                                       |    |
| Figura 12 – Efeito de dímero de desidrogoniotalamina na expressão de mRNA de BAX, BCL-2, BIRC-5 e caspase-8 nas células MDA-MB-231. ....               |    |

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Valores de Eficiência (E),  $R^2$  e *Slope* obtidos pelo *software* CFX Manager<sup>TM</sup> v.3.1, após curva de diluição seriada, para validação das reações de qPCR.....

## LISTA DE APÊNDICES

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| APÊNDICE A – Integridade do RNA total .....                                                                 | 62 |
| APÊNDICE B – Eficiência da amplificação do gene $\beta$ -actina, GAPDH, BAX, BCL-2, BIRC-5 e caspase-8..... | 63 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                 |                                                                                                                              |
|-----------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7-AAD           | 7- aminoactinomicina D                                                                                                       |
| A260/A230       | Razão da absorbância de A260 por A230                                                                                        |
| A260/A280       | Razão da absorbância de A260 por A280                                                                                        |
| AIF             | <i>Apoptosis-inducing factor</i> (Fator indutor de apoptose)                                                                 |
| APAF-1          | <i>Apoptotic protease activating factor 1</i> (Fator de ativação da peptidase apoptótica 1)                                  |
| BAD             | <i>Bcl-2 antagonist of cell death</i> (Bcl-2 antagonista de morte celular)                                                   |
| BAK             | <i>Bcl-2 antagonist killer 1</i> (Bcl-2 antagonista de assassinos 1)                                                         |
| BAX             | <i>Bcl-2-associated X protein</i> (Proteína X associada a Bcl-2)                                                             |
| BCL-2           | <i>B cell lymphoma protein 2</i> (Proteína do linfoma de células B2)                                                         |
| BCL-W           | <i>Bcl-2-like 2 protein</i> (Proteína 2 semelhante a Bcl-2)                                                                  |
| BCL-XL          | <i>Bcl-2-related protein long form of Bcl-x</i> (Proteína Bcl-2 relacionada à forma longa de Bcl-x)                          |
| BCL-XS          | <i>Bcl-2-related protein short isoform</i> (Isoforma reduzida de proteína relacionada com Bcl-2)                             |
| BFL-1           | <i>Bcl-2-related protein A1</i> (Proteína A1 relacionada a Bcl-2)                                                            |
| BH              | <i>Homology domain</i> (Domínio de homologia)                                                                                |
| BID             | <i>BH3-interacting domain</i> (Agonista da morte no domínio que interage com BH3)                                            |
| BIK             | <i>Bcl-2-interacting killer</i> (Assassino que interage com Bcl-2)                                                           |
| BIM             | <i>Bcl-2-interacting protein</i> (Proteína que interage com Bcl-2)                                                           |
| BIRC            | <i>Baculoviral IAP repeat containing</i> (Baculoviral contendo repetições de IAP)                                            |
| BMF             | <i>Bcl-2-modifying fator</i> (fator modificador de Bcl-2)                                                                    |
| Caspase         | <i>Cysteine dependent aspartate-specific protease</i> (Peptidases aspartato-específicas dependentes de cisteína)             |
| CDKs            | <i>Cyclin-dependent kinases</i> (Quinases dependentes de ciclinas)                                                           |
| cDNA            | <i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico complementar)                                          |
| CN              | Controle negativo – células não tratadas                                                                                     |
| CO <sub>2</sub> | Dióxido de carbono                                                                                                           |
| DIABLO          | <i>Direct IAP Binding Protein with low isoelectric point</i> (Proteína de ligação direta de IAP com baixo ponto isoelétrico) |
| DISC            | <i>Death-inducing signaling complex</i> (Complexo de sinalização indutor de morte)                                           |
| DMSO            | Dimetil sulfóxido                                                                                                            |

|                         |                                                                                                                                               |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DNA                     | <i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)                                                                                      |
| dNTP's                  | Desoxirribonucleotídeos trifosfato                                                                                                            |
| EDTA                    | <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> (Ácido etilenodiamino tetra-acético)                                                                  |
| Fas                     | <i>Fatty acid synthetase ligand, Fas ligand</i> (Ligante sintetase de ácido graxo, ligante Fas)                                               |
| g                       | Força gravitacional, força $g = 9,81 \text{ m/s}^2$                                                                                           |
| gDNA                    | Ácido desoxirribonucleico genômico                                                                                                            |
| GI <sub>50</sub>        | <i>Growth Inhibition 50</i> (concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular)                                                |
| h                       | Hora/horas                                                                                                                                    |
| H <sub>2</sub> O        | Água                                                                                                                                          |
| HRK                     | <i>Activator of apoptosis haraquiri</i> (Ativador de apoptose haraquiri)                                                                      |
| HTRA-2                  | <i>High-temperature requirement protease A2</i> (Proteína de alta temperatura A2)                                                             |
| IAP                     | <i>Inhibitor of apoptosis proteins</i> (Proteína inibidoras de apoptose)                                                                      |
| IARC                    | <i>International Agency for Research on Cancer</i> (Agência Internacional de Pesquisa em Câncer)                                              |
| INCA                    | Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva                                                                                   |
| MCA                     | Morte celular acidental                                                                                                                       |
| MCL-1                   | <i>Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1</i> (Proteína de diferenciação de células de leucemia mielóide induzida Mcl-1) |
| MCP                     | Morte celular programada                                                                                                                      |
| MgCl <sub>2</sub>       | Cloreto de magnésio                                                                                                                           |
| min                     | Minuto/minutos                                                                                                                                |
| MOMP                    | <i>Mitochondrial outer membrane permeabilization</i> (permeabilização da membrana externa mitocondrial)                                       |
| MP                      | Membrana plasmática                                                                                                                           |
| NOXA                    | <i>Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1</i> (Proteína 1 induzida por forbol-12-miristato-13-acetato)                             |
| NRT                     | <i>No transcriptase reversa</i> (Controle sem transcriptase reversa)                                                                          |
| NTC                     | <i>No template control</i> (Controle sem amostra)                                                                                             |
| Oligo(dT) <sub>15</sub> | Oligonucleotídeos de 15 desoxitimidinas                                                                                                       |
| P53                     | Gene/proteína supressora de tumor                                                                                                             |
| PARP                    | <i>Poli ADP-ribose polimerase</i> (Poli adenosina difosfato ribose polimerase)                                                                |
| PBS                     | Tampão fosfato-salino                                                                                                                         |
| PE                      | <i>Phycoerythrin</i> (Ficoeritrina)                                                                                                           |
| pH                      | Potencial hidrogeniônico                                                                                                                      |

|                  |                                                                                                                       |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| PUMA             | <i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i> (Modulador de apoptose regulado positivamente por p53)                  |
| RNA              | <i>Ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico)                                                                          |
| RNA <sub>m</sub> | <i>Messenger ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico mensageiro)                                                     |
| RNasin           | <i>Ribonuclease Inhibitor</i> (Inibidor de ribonuclease)                                                              |
| RPMI             | <i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> (Meio de cultura)                                                       |
| RT               | <i>Reverse transcriptase</i> (transcriptase reversa)                                                                  |
| RT-qPCR          | <i>Quantitative reverse transcription PCR</i> (Transcrição reversa seguida técnica de reação em cadeia da polimerase) |
| SEM              | <i>Standard error of the mean</i> (Erro padrão da média)                                                              |
| SFB              | Soro fetal bovino                                                                                                     |
| SMAC             | <i>Second mitochondria-derived activator of caspase</i> (Segundo ativador mitocondrial de caspase)                    |
| Taq              | Enzima polimerase extraída de <i>Thermus aquaticus</i>                                                                |
| TBE              | Tampão tris(hidroximetil)aminometano-borato-EDTA                                                                      |
| TNF              | <i>Tumor necrosis factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)                                                               |
| TNFR             | <i>Tumor necrosis factor receptor</i> (Receptor do Fator de Necrose Tumoral)                                          |
| UV               | Ultravioleta                                                                                                          |
| WHO              | <i>World Health Organization</i> (Organização Mundial da Saúde)                                                       |
| XIAP             | <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i> (Inibidor da apoptose ligado ao X)                                     |

## LISTA DE SIMBOLOS

|                         |                           |
|-------------------------|---------------------------|
| $\mu\text{g/mL}$        | Microgramas por mililitro |
| $\mu\text{L}$           | Microlitro                |
| $\mu\text{M}$           | Micromolar                |
| $\text{ng}/\mu\text{L}$ | Nanogramas por microlitro |
| $\emptyset$             | Diâmetro interno          |

## SUMÁRIO

|       |                                                                                    |                                      |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 1     | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                                                            | 19                                   |
| 2     | <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....                                                 | 21                                   |
| 2.1   | CÂNCER .....                                                                       | 21                                   |
| 2.2   | PRODUTOS NATURAIS .....                                                            | 23                                   |
| 2.3   | ESTUDO DE COMPOSTOS CITOTÓXICOS.....                                               | 23                                   |
| 2.3.1 | Cultura de células .....                                                           | 23                                   |
| 2.3.2 | Ensaio de avaliação da morte celular.....                                          | 24                                   |
| 2.3.3 | Expressão gênica por RT-qPCR .....                                                 | 25                                   |
| 2.4   | MORTE CELULAR - APOPTOSE .....                                                     | 28                                   |
| 2.4.1 | Famílias de genes BCL-2 e IAP .....                                                | 29                                   |
| 2.4.2 | Caspases .....                                                                     | 31                                   |
| 2.4.3 | Vias apoptóticas .....                                                             | 31                                   |
| 2.5   | BIODIVERSIDADE VEGETAL DE MATO GROSSO DO SUL .....                                 | 33                                   |
| 2.5.1 | Família Lauraceae.....                                                             | 34                                   |
| 3     | <b>OBJETIVOS</b> .....                                                             | 37                                   |
| 3.1   | OBJETIVO GERAL.....                                                                | 37                                   |
| 3.2   | OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                        | 37                                   |
| 4     | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                                    | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 4.1   | OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS-TESTE .....                                                  |                                      |
| 4.1.1 | Coleta, extração e isolamento dos compostos.....                                   |                                      |
| 4.1.2 | Preparo das amostras-teste .....                                                   | <b>Erro! Indicador não definido.</b> |
| 4.2   | CULTIVO E MANUTENÇÃO DAS LINHAGENS CELULARES. <b>Erro! Indicador não definido.</b> |                                      |
| 4.3   | ENSAIO DE INTEGRIDADE DE MEMBRANA EM LINHAGEM HL-60 .....                          |                                      |
| 4.4   | ENSAIO DE QUANTIFICAÇÃO DE CASPASE-3 EM LINHAGEM MDA-MB-231 .....                  |                                      |
| 4.5   | ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....                                                   |                                      |
| 4.5.1 | Extração do RNA total.....                                                         |                                      |
| 4.5.2 | Síntese de cDNA - Transcrição Reversa.....                                         |                                      |
| 4.5.3 | Avaliação da qualidade do RNA e cDNA obtidos .....                                 |                                      |
| 4.5.4 | Desenho dos <i>primers</i> .....                                                   |                                      |
| 4.5.5 | PCR quantitativo em tempo real .....                                               |                                      |
| 4.6   | ANÁLISE DE DADOS.....                                                              |                                      |

|       |                                                                                                   |    |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5     | <b>RESULTADOS</b> .....                                                                           |    |
| 5.1   | EFEITO DE MAJORANOLÍDEO NA INTEGRIDADE CELULAR EM HL-60<br><b>Erro! Indicador não definido.</b>   |    |
| 5.2   | EFEITO DE DÍMERO DE DESIDROGONIOTALAMINA NA ATIVAÇÃO DE<br>CASPASE-3 EM MDA-MB-231 .....          |    |
| 5.3   | ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....                                                                  |    |
| 5.3.1 | Efeito de majoranolídeo na expressão de genes apoptóticos em HL-60. ....<br>.....                 |    |
| 5.3.2 | Efeito de dímero de desidrogoniotalamina na expressão de genes<br>apoptóticos em MDA-MB-231 ..... |    |
| 6     | <b>DISCUSSÃO</b> .....                                                                            |    |
| 7     | <b>CONCLUSÃO</b> .....                                                                            | 54 |
|       | <b>REFERÊNCIAS</b> .....                                                                          | 55 |
|       | <b>APÊNDICES</b> .....                                                                            | 64 |

## 1 INTRODUÇÃO

Uma das principais dificuldades na diminuição da morbimortalidade causadas pelo câncer é o tratamento. A maioria das terapias existentes são pouco específicas no intuito de matar ou controlar o crescimento de células neoplásicas e causam danos às células normais, gerando efeitos colaterais desagradáveis e nocivos. Além da baixa especificidade, recidivas e farmacoresistência são outros problemas enfrentados na terapêutica do câncer. Essa problemática estimula a busca por moléculas potentes e seletivas que possam ser usadas como medicamentos direta ou indiretamente (KAMB; WEE; LENGAUER, 2007; WHO, 2017).

A atividade anticâncer de um composto pode ser identificada em ensaios de citotoxicidade em células neoplásicas. O cultivo celular torna possível o *screening* de compostos naturais ou sintéticos. Esse modelo experimental também é a base para ensaios mais específicos, que elucidam o mecanismo de ação de um bioativo, caracterizando o tipo de morte celular e vias bioquímicas envolvidas em seu efeito citotóxico (CHIDLEY et al., 2016; FRESHNEY, 2016; HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; SHOEMAKER, 2006). Uma das técnicas que pode ser utilizada para avaliar esse efeito é a transcrição reversa seguida da técnica de reação em cadeia da polimerase (RT-qPCR). A partir dela, é possível quantificar o RNA mensageiro transcrito de genes de interesse em amostras biológicas (BUSTIN, 2000), possibilitando o estudo, por exemplo, da expressão de genes apoptóticos.

Diversos são os tipos de morte celular, bem como os mecanismos que levam uma célula a se tornar inviável. Um dos tipos de morte celular programada desejado para um efeito terapêutico anticâncer é a apoptose (GALI-MUHTASIB et al., 2015; GALLUZZI et al., 2018; WONG, 2011). Essa, compreende um processo seletivo natural de remoção fisiológica de células e desempenha um papel importante no equilíbrio entre replicação e morte celular. É ativada quando há ameaças impedindo que a homeostasia tecidual seja mantida, sendo então, um dos mecanismos de defesa do organismo (ICHIM; TAIT, 2016; DASGUPTA et al., 2017).

Dentre os compostos bioativos são destacados os produtos naturais. Newman e Cragg (2016) enfatizam que ao menos metade de todos os medicamentos anticâncer, desenvolvidos desde 1940, são produtos naturais e seus

derivados. Os vegetais possuem uma diversidade química de estruturas e grupos funcionais que os permite produzir numerosos compostos orgânicos que são estudados, entre outras finalidades, para o desenvolvimento de fármacos (PAN et al., 2013; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A família Lauraceae é conhecida pela riqueza de seus metabólitos secundários. São relatados 52 gêneros com 2.750 espécies, sendo que no Brasil encontram-se aproximadamente 22 gêneros com 390 espécies (ALVES; SARTORI, 2009) e dentre estas estão *Aniba heringeri* Vattimo-Gil e *Mezilaurus crassiramea* (Meissner) Taubert ex Mez.

*M. crassiramea* é conhecida como canela-branca, cumbuquinha, itaúba-abacate e canela-de-goiás, sendo encontrada no Cerrado do Planalto Central Brasileiro (MORAES, 2005). O composto rubrenolídeo foi isolado das folhas dessa espécie e apresentou citotoxicidade em várias linhagens neoplásicas (TÓFOLI et al, 2016). Outro butanolídeo, majoranolídeo, foi isolado dos frutos dessa espécie (TÓFOLI, 2018). Frente à linhagem de leucemia promielocítica aguda (HL-60), os dois compostos apresentaram forte atividade citotóxica com 50% de inibição do crescimento celular ( $GI_{50}$ ) de 0,8  $\mu$ M para rubrenolídeo (FILIPPIN, 2016) e 0,41  $\mu$ M para majoranolídeo (HEEMANN, 2018).

*A. heringeri*, é popularmente conhecida como canela de remédio ou pau-louro sendo encontrada no Cerrado e na Caatinga (MORAES, 2005; MORS et al., 1962). Essa espécie apresentou citotoxicidade frente a várias linhagens neoplásicas (TÓFOLI, 2013). Três estilil-pironas – desidrogoniotalamina e dois dímeros desse composto – foram avaliados em teste de citotoxicidade frente à várias linhagens neoplásicas. Um de seus dímeros apresentou  $GI_{50}$  de 4,4  $\mu$ M em células de mama triplo-negativo (MDA-MB-231) (PEREIRA, 2017).

Os resultados de citotoxicidade de majoranolídeo e do dímero de desidrogoniotalamina despertaram o interesse em avaliar a expressão de genes relacionados a apoptose contribuindo para o conhecimento do mecanismo de ação que levou ao seu efeito citotóxico nas linhagens em que foram mais ativos.

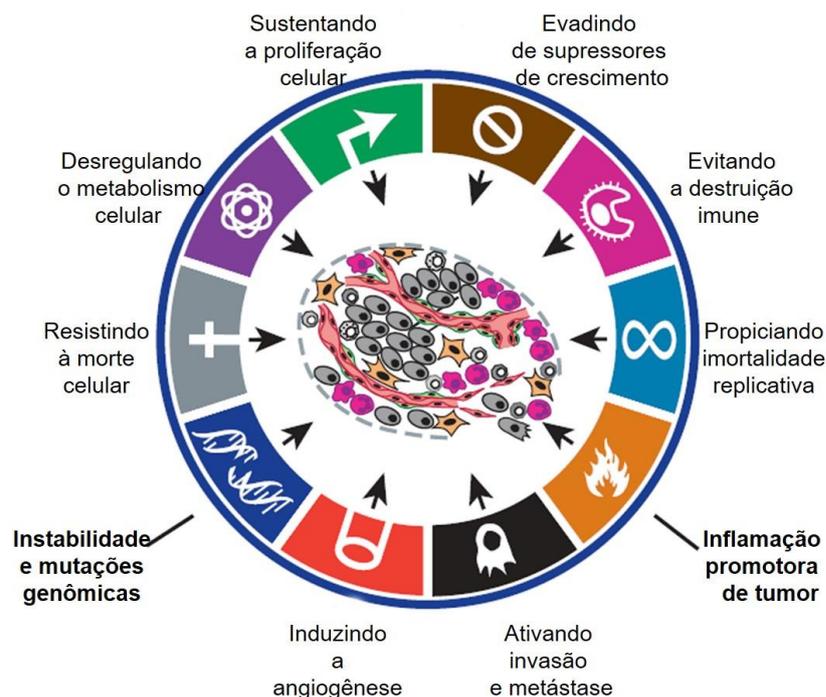
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CÂNCER

Centenas de doenças possuem em comum células anormais, com proliferação descontrolada, que adquirem imortalidade e capacidade de extrapolar o seu tecido de origem, alcançando e invadindo outros tecidos e órgãos. Essas doenças são genericamente denominadas câncer (INCA, 2017; WHO, 2018).

Hanahan e Weinberg (2017), ao revisar as marcas registradas (*hallmarks*) do câncer (**Figura 1**), listaram oito capacidades biológicas adquiridas por células neoplásicas ao longo do processo de progressão maligna; são elas: manter constante a sinalização proliferativa; burlar as sinalizações dos genes supressores; resistir à morte celular; permitir a imortalidade replicativa reativando a telomerase; induzir a angiogênese criando novos vasos para a manutenção do tumor; invadir outros tecidos e causar metástase; desregular o metabolismo energético e celular; evitar a defesa imunológica. A instabilidade do genoma devido às mutações e a inflamação promovida pelo tumor facilitam a aquisição dessas oito características pelas células.

**Figura 1** – Características biológicas do câncer.



Fonte: HANAHAN; WEINBERG, p. 8, 2017 (modificado).

A homeostasia celular e tecidual pode ser comprometida devido a múltiplos fatores químicos, físicos ou biológicos (internos e externos) que interfiram na replicação do DNA, causando alterações genéticas, epigenéticas e/ou cromossômicas. Essas alterações culminam na oncogênese, processo composto pelos estágios de iniciação, promoção, progressão e manifestação do tumor (VINEIS; STEWART, 2016; FOUAD; AANEI, 2017).

O câncer é considerado um problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento, devido à grande morbidade e mortalidade e o impacto que elas causam na economia dos países. Em 2015, foram contabilizadas 8,8 milhões de morte pela doença em nível mundial o que torna essa doença a segunda maior causa de mortes (WHO, 2018). Para 2017 e 2018, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) estimou a ocorrência de aproximadamente 1 milhão e 200 mil novos casos de câncer no Brasil.

As principais ferramentas de controle da doença são a prevenção e o tratamento. A prevenção consiste em evitar as causas, diminuindo exposição a fatores de risco relacionados ao estilo de vida dos indivíduos; e diagnosticar precocemente a doença, incentivando a busca por exames de rastreamento de forma que o diagnóstico seja feito na fase assintomática da doença. O diagnóstico precoce influencia diretamente os tipos de tratamentos aos quais o paciente será submetido, bem como as possibilidades de cura do mesmo. As modalidades terapêuticas frequentemente utilizadas consistem em cirurgia, radioterapia, quimioterapia, transplante de medula (INCA, 2017; WHO, 2018). O progresso na descoberta e desenvolvimento das terapias é notório, mas os índices de morbimortalidade continuam aumentando (GALI-MUHTASIB et al., 2015).

A problemática que envolve o tratamento, especialmente a quimioterapia, consiste basicamente em três fatores: recidivas locais e/ou metastáticas, farmacoresistência e baixa especificidade. As terapias são pouco seletivas na finalidade de matar as células neoplásicas ou controlar sua proliferação, e causam efeitos colaterais nocivos às células normais. Essas complicações são eminentes e estimulam estudos relacionados às moléculas com atividade potente e seletiva, que sirvam diretamente como fármacos ou possam ter sua estrutura otimizada pela química medicinal (GUIDO et al., 2010; KAMB; WEE; LENGAUER, 2007; LONGLEY; JOHNSTON, 2005; MITRA; MISHRA; LI, 2015).

## 2.2 PRODUTOS NATURAIS

Os benefícios do uso de produtos naturais são conhecidos desde a antiguidade. A partir de vegetais, na área da saúde humana, se destacam as tinturas, chás, cataplasmas e outras formulações de ervas (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). A evolução dos conhecimentos mais específicos em Agronomia, Botânica, Química, Farmacologia, Toxicologia e Biologia Molecular, aprimorou a descoberta de inúmeras propriedades curativas ou tóxicas sendo que o sucesso na purificação de moléculas foi imprescindível para o desenvolvimento da indústria farmacêutica (BALUNAS; KINGHORN, 2005; VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006; BRANDÃO, 2010; PINTO, et al. 2002).

O estudo químico de produtos naturais se baseia na diversidade estrutural e nos grupos funcionais presentes nas milhares de moléculas encontradas na natureza. Muitos medicamentos de uso comercial são derivados direta ou indiretamente de vegetais, micro-organismos, organismos marinhos e invertebrados terrestres. A maior fonte de substâncias ativas usadas na terapêutica, incluindo o câncer, são os vegetais e esse fato está relacionado ao grande número de metabólitos produzidos nesse reino (BOLZANI, 2016; PAN et al., 2013; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001). De 1940 até o final de 2014, Newman e Cragg (2016) relataram 175 moléculas aprovadas para o tratamento de câncer, sendo que 85 delas são produtos obtidos de fontes naturais ou derivados diretamente destes. Das 175, apenas 25% são totalmente sintéticas.

## 2.3 ESTUDO DE COMPOSTOS CITOTÓXICOS

### 2.3.1 Cultura de células

A prática de cultivar células *in vitro* permite que sejam realizados ensaios biológicos como testes de citotoxicidade e de biologia molecular. Essa ferramenta é muito utilizada para evidenciar o efeito dos compostos sobre as células cultivadas e, através dos resultados obtidos, ser possível a descoberta de novos compostos bioativos (FRESHNEY, 2016; HOUGHTON et al., 2007).

A vantagem do uso da cultura de células está relacionada ao conceito dos 3R's estabelecidos por Russell e Burch (1956) nos princípios da técnica

experimental humana: 1) redução (*Reduction*), 2) refinamento (*Refinement*) e 3) substituição (*Replacement*) cuja finalidade é diminuir os ensaios *in vivo* reduzindo o uso de animais na fase de *screening* (CAZARIN; CORRÊA; ZAMBRONE, 2004; GOLDBERG, 2010).

Essa ferramenta demonstra boa reprodutibilidade, facilidade na execução e baixo custo em relação a sua relevância científica (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; SKEHAN et al., 1990). Outra vantagem é que condições fisiológicas podem ser mantidas como, por exemplo, o controle do pH, temperatura, níveis de CO<sub>2</sub> e umidade. Isso permite o estudo do comportamento da célula em diferentes condições bem como a exposição das células a concentrações definidas de amostra-teste (FRESHNEY, 2016). Dessa forma, a cultura de células é um importante modelo no desenvolvimento de fármacos anticâncer.

### 2.3.2 Ensaios de avaliação da morte celular

No decorrer do estudo com moléculas bioativas, é importante elucidar o mecanismo de ação do composto nas células. Quando evidenciado o efeito citotóxico, deve-se avaliar se este efeito leva à morte celular e analisar as vias envolvidas por meio de técnicas como análises morfológicas e bioquímicas. Essas análises contribuirão para a elucidação completa do mecanismo de ação. Muitas moléculas derivadas de produtos naturais têm bioatividade relatada, mas o mecanismo de ação que leva a essa atividade permanece desconhecido, sendo esse um trabalho longo e desafiador (CHIDLEY et al., 2016; PAN et al., 2013).

A morte celular ocorre quando a célula perde irreversivelmente a integridade da membrana plasmática (MP), ou quando suas organelas e moléculas são completamente fragmentadas, ou ainda quando seu metabolismo se encontra diminuído. Sendo assim, os ensaios de morte celular são subdivididos em dois grupos: os que avaliam a integridade física das células e os que avaliam o metabolismo e sinalização celular (GALLUZZI et al., 2015; KEEP et al., 2011).

A citometria de fluxo é amplamente utilizada na avaliação de morte celular sendo possível mensurar simultaneamente múltiplas características morfológicas e bioquímicas da célula; entre essas, tamanho, granulosidade, potencial de membrana, fragmentação e quantidade de DNA, quantidade de proteínas e externalização da fosfatidilserina. Nesse método são utilizados corantes ou

anticorpos monoclonais de moléculas localizadas no exterior (MP) e interior das células (ADAN, et al 2017; VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000).

A análise da integridade de membrana plasmática nas células inviáveis pode ser feita pelos corantes vitais ou de exclusão. Entre esses, estão os que medem a cor, como o azul de tripan (STROBER, 2015), vermelho neutro (REPETTO; ZURITA, 2008) e eosina (WAHEED; GUPTA 2000) e os que emitem fluorescência, como por exemplo o 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (GOUGEON, 2002; LECOEUR; DE OLIVEIRA-PINTO; ZEMBRUSKI et al., 2012). Os fluoróforos podem ser quantificados por citometria de fluxo o que torna a avaliação mais robusta em relação aos corantes colorimétricos analisados por microscopia óptica. Colorações diferenciais para analisar o tipo de morte celular também são utilizadas, mesclando iodeto ou brometo de etídeo com laranja de acridina ou *Hoechst* (CROWLEY; MARFELL; WATERHOUSE, 2016; KASIBHATLA et al, 2006).

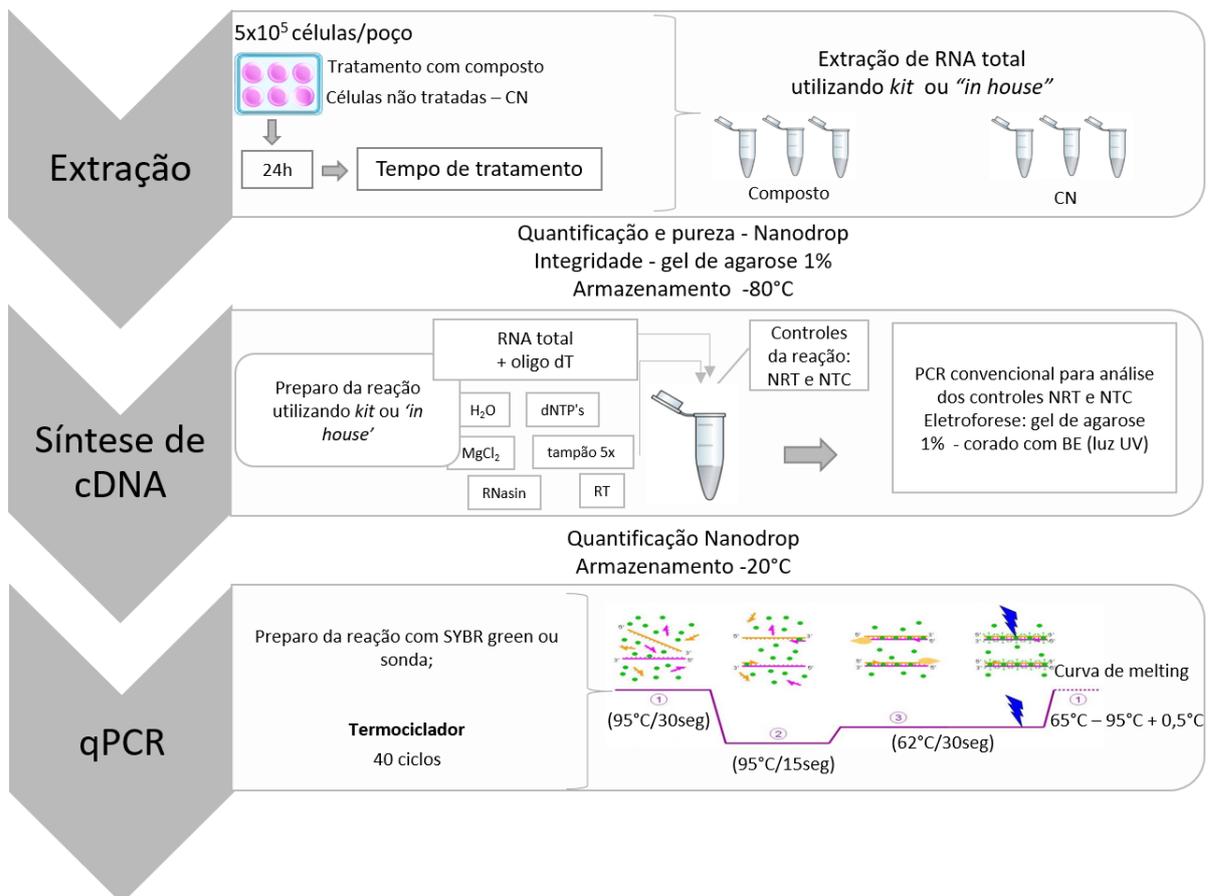
### 2.3.3 Expressão gênica por RT-qPCR

Uma das análises bioquímicas que auxilia na elucidação do mecanismo de ação é a avaliação dos genes expressos por um organismo, após tratamento com um determinado composto. Alterações na expressão gênica são determinadas por vias de sinalização complexas, compostas por genes e proteínas. Essas alterações podem ser detectadas pela análise da quantidade de genes transcritos em RNA mensageiro (RNAm) que devem levar à síntese de produtos gênicos funcionais, ou seja, proteínas. A regulação da expressão gênica em eucariotos pode ser efetuada nos níveis de transcrição, pós-transcrição, tradução e pós-tradução e, portanto, avaliações em mais de um nível podem ser efetuadas a fim de se obter uma resposta concreta sobre alterações na expressão gênica (ALBERTS et al, 2017).

A análise de expressão gênica a nível transcricional é feita pela amplificação do RNAm transcrito sob diferentes condições experimentais através da técnica de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR). Na PCR convencional o produto deve ser analisado após a reação por eletroforese; enquanto que na qPCR, o produto amplificado é quantificado durante a reação, por meio da adição de um corante ou sonda que emitem sinais fluorescentes capturados pelo equipamento, obtendo-se resultados em tempo real (BUSTIN, 2000; HIGUCHI et al., 1992; HEID et al., 1996; LOCKEY; OTTO; LONG, 1998).

Sendo o RNAm uma molécula instável, altamente lábil, anteriormente à reação de qPCR, deve ser realizada a síntese de DNA complementar (cDNA) pela enzima transcriptase reversa (RT). Durante as etapas (**Figura 2**) de processamento da amostra para uso da RT-qPCR, são necessários alguns passos para a otimização das reações, entre as quais; tratamento do RNA extraído com DNase para eliminar a contaminação por DNA genômico (gDNA); evitar contaminação por RNase, se possível, utilizar soluções tratadas com pirocarbonato de dietila (DEPC); verificação da integridade do RNA; uso de quantidade padronizada de RNA na transcrição reversa; análise da eficiência da reação e dos *primers*; e uso de quantidade padronizada de cDNA na reação de qPCR (BUSTIN et al., 2009; HUGGETT et al., 2005; GIBSON; HEID; WILLIAMS, 1996).

**Figura 2** – Etapas da RT-qPCR.



Fonte: autoria própria. CN: células não tratadas; cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar; dNTP's: desoxirribonucleotídeos trifosfato; MgCl<sub>2</sub>: cloreto de magnésio; RT: transcriptase reversa; NRT: controle sem transcriptase reversa; NTC: controle sem amostra; PCR: reação em cadeia da polimerase; BE: brometo de etídeo; qPCR: UV: ultravioleta; reação em cadeia da polimerase quantitativo.

A emissão de sinal fluorescente pode ser feita por corantes ligantes de DNA como o *SYBR<sup>®</sup> green* ou por sistemas de sondas e *primers* específicos como a *TaqMan<sup>®</sup>*. O sistema *SYBR<sup>®</sup> green* se liga ao sulco menor da dupla fita de DNA e, quando ele está intercalado ao DNA, sua fluorescência é aumentada, conforme a amplificação do DNA. Esse tipo de ensaio é considerado mais simples, de menor custo, mas devido a sua baixa especificidade é necessário analisar a curva de *melting* da reação para se verificar a amplificação de produtos inespecíficos. O ensaio com *TaqMan<sup>®</sup>* permite uma especificidade maior, por ser utilizada uma sonda marcada em sua extremidade 5' por um *reporter* fluorescente e por um *quencher*, silenciador de fluorescência, na extremidade 3'. A sonda hibridiza de maneira específica a uma das fitas do cDNA alvo e durante a extensão da fita no sentido 5'-3' pela Taq polimerase o *reporter* é clivado e separado de seu silenciador (*quencher*), e a fluorescência é então emitida (GINZINGER, 2002; MORRISON; WEIS; WITTEW 1998).

A quantificação de cDNA por RT-qPCR pode ser absoluta ou relativa. A quantificação absoluta mensura o número de cópias de cDNA (ou seja, que representam o RNAm transcrito). A base para determinar a quantidade absoluta é a curva padrão, que deve ser realizada com parâmetros específicos, de forma que se possa detectar o maior e/ou menor número de cópias possíveis. A quantificação relativa avalia alterações entre dois grupos experimentais distintos, sendo um deles a amostra controle; por exemplo, células tratadas *versus* células não tratadas ou células neoplásicas *versus* células normais. A relação de maior (*up*) ou menor (*down*) expressão do RNAm transcrito é calculada a partir da expressão basal determinada pela amostra controle e pela normalização da técnica que é feita utilizando-se um controle endógeno. Para isso, genes endógenos (*housekeeping*), integrantes do metabolismo ou da estrutura celular são utilizados por apresentarem menor variação em sua expressão. A variação do nível de expressão desses genes deve ser avaliada, uma vez que essa expressão deve se manter praticamente constante independentemente das condições experimentais aplicadas (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008; VANDESOMPELE et al., 2002).

A RT-qPCR se mostra uma técnica robusta na detecção e amplificação dos cDNAs provenientes de transcritos de RNAm, por ser específica e sensível a quantidades mínimas de ácidos nucleicos (BUSTIN et al. 2009; HEID et al., 1996; LOCKEY; OTTO; LONG, 1998).

## 2.4 MORTE CELULAR - APOPTOSE

A morte celular ocorre por estímulos variados podendo desencadear uma morte celular programada (MCP) ou levar a uma morte instantânea e catastrófica, também chamada de morte celular acidental (MCA). Alguns dos estímulos que desencadeiam a MCP são: radiação ultravioleta, drogas, privação de fatores de crescimento, danos ao DNA, estresse oxidativo, excesso de cálcio no citosol e acúmulo de proteínas malformadas e mal dobradas no retículo endoplasmático. Estímulos extremos como alta pressão, temperatura ou força osmótica; variações extremas de pH e tensões de cisalhamento culminam em MCA (FUCHS; STELLER, 2015; GALLUZZI et al, 2015).

Uma das principais funções da MCP é manter o equilíbrio entre replicação e morte celular, eliminando células que de alguma forma possam representar risco ao organismo. São processos muito bem regulados, que não causam malefícios para as demais células e tecidos, sendo eficientes na manutenção da homeostasia tecidual (FUCHS; STELLER, 2015).

Células neoplásicas adquirem capacidade de sobrevivência através de mutações genéticas ou alterações epigenéticas, nas quais vias de sinalização relacionadas à MCP são afetadas. A capacidade de um composto em reativar ou reparar o mecanismo molecular danificado em células com divisão e sobrevivência anormais fazendo com que elas se autodestruam, é essencial para o tratamento do câncer. Frequentemente associa-se a ação de agentes antineoplásicos à MCP, principalmente à apoptose (DE BRUIN e MEDEMA, 2008; GUAMÁN-ORTIZ; ORELLANA; RATOVIJSKI 2017).

GALLUZZI et al (2018), em sua revisão mais recente, apresentaram as recomendações do Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular de 2018 esclarecendo todos os tipos de MCP já descritos. Aqui o enfoque será dado ao tipo de MCP denominado apoptose.

As características observadas na morfologia de uma célula apoptótica incluem encolhimento citoplasmático, condensação nuclear (*pyknosis*), fragmentação internucleossomal do DNA, ondulações (*blebbing*) na membrana plasmática, exposição de fosfatidilserinas e formação de corpos apoptóticos, que são capturados por células vizinhas com atividade fagocitária e posteriormente

digeridos em lisossomos (GALLUZZI et al., 2018; WYLLIE, KERR; CURRIE, 1980; TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

#### 2.4.1 Famílias de genes BCL-2 e IAP

Duas famílias de genes/proteínas responsáveis pela regulação da apoptose são identificadas em células de mamíferos – a família de proteínas do linfoma de células B2 (BCL-2) e a família de proteínas inibidoras de apoptose (IAP). Em conjunto, esses genes e proteínas compõem vias de sinalização que convergem na efetivam a morte celular ou que impedem que a morte aconteça.

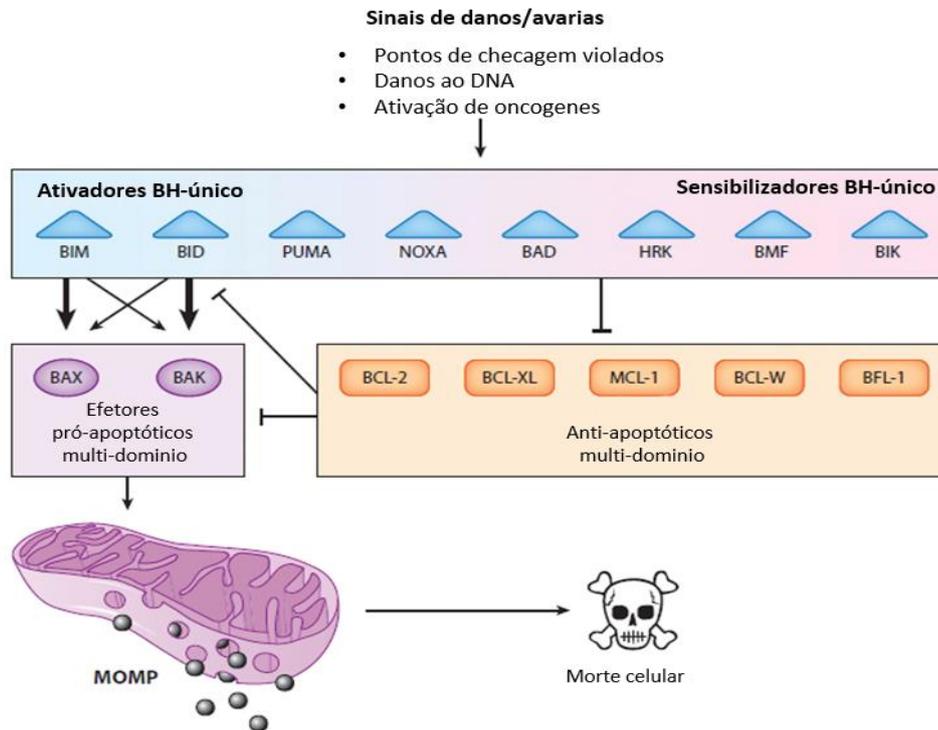
A família BCL-2 é constituída por genes que codificam principalmente proteínas integrantes da via intrínseca da apoptose. Nessa família existem duas categorias, classificadas em dois grupos, de acordo com seu domínio de homologia (BH). Ao primeiro grupo pertencem proteínas de domínio BH-único, ao qual pertencem proteínas pró-apoptóticas que estão relacionadas ao início da via, captando sinais de estresse intracelular. No segundo grupo encontram-se as proteínas multi-BH, que apresentam três ou quatro regiões de homologia e podem ser de caráter anti ou pró-apoptótico. As interações entre as proteínas dos dois grupos determinam a ativação ou inibição da apoptose (ASHKENAZI; SALVESEN, 2014).

As proteínas pró-apoptóticas de domínio BH-único são BAD, HRK, BMF e BIK (sensibilizadoras), bem como BIM, BID, PUMA e NOXA que tem função de ativar as proteínas de domínio multi-BH – BAX, BAK. A proteínas com caráter anti-apoptótico são BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BCL-W, BFL-1 que podem inibir o funcionamento tanto de proteínas BH-único quanto proteínas multi-BH (ASHKENAZI; SALVESEN, 2014; LETAI, 2017; HARDWICK; YOULE, 2009).

Proteínas sensibilizadoras e ativadoras captam sinais de danos à célula como, por exemplo, a violação de pontos de checagem do ciclo celular; danos ao DNA e ativação de oncogenes. Após captar esses estímulos letais, as proteínas BIM e BID ativam as proteínas efetoras pró-apoptóticas BAX e BAK, ao mesmo tempo que proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 e BCL-XL são impedidas de funcionar. Esse circuito de eventos, em conjunto, leva à permeabilização da membrana mitocondrial (MOMP) pela formação de poros, permitindo a liberação de substâncias

que darão continuidade à cascata de sinalização culminando na morte celular (**Figura 3**) (LETAI, 2017).

**Figura 3** – Circuito básico de regulação da apoptose pela família BCL-2.



Fonte: LETAI, p. 297, 2017 (modificado).

Genes codificantes de proteínas inibidoras de apoptose (IAP) integram a segunda família de genes relacionada a esse tipo de morte. Em humanos, os principais genes pertencentes à família IAP são XIAP, c-IAP1 e 2 e survivina (BIRC-5). As proteínas codificadas por esses genes possuem em sua estrutura regiões de repetições IAP baculovírus (BIR) e um domínio de recrutamento de caspases. Essas proteínas atuam recrutando as caspase para inibi-las e impedir a apoptose dependente da mitocôndria. Proteínas liberadas durante a permeabilização da membrana mitocondrial denominadas SMAC/DIABLO (segunda proteína ativadora de caspase derivada da mitocôndria / proteína de ligação direta a IAP) regulam a ação das IAP's. Dessa forma, para que a apoptose ocorra, é necessário que as SMAC/DIABLO se liguem às IAP's e impeçam seu funcionamento (ALTIERI, 2015; DASGUPTA et al, 2017; SINGH, 2015; TAMM,1998).

#### 2.4.2 Caspases

As caspases são peptidases aspartato-específicas dependentes de cisteína (*cysteine-dependent aspartate-specific protease*) e, portanto, agem clivando proteínas específicas após resíduos de aspartato com uso de cisteína para catalisar essa clivagem (POP; SALVESEN, 2009).

Entre outras funções, as caspases desempenham papel fundamental na execução da apoptose. No ser humano, elas são divididas em dois grupos: iniciadoras e executoras de morte. No primeiro grupo estão incluídas as caspases (-2-8-9-10), que estão localizadas no ápice da via de sinalização (a montante), e funcionam ativando as caspases pertencentes ao segundo grupo – caspases (3-6-7). Também chamadas de efetoras, elas se encontram no decorrer da via, ou seja, a jusante (DASGUPTA, et al., 2017; ICHIM; TAIT, 2016).

As caspases são sintetizadas em formas precursoras inativas, chamadas pró-caspases; sua ativação pode ser advinda de auto-catalização ou de clivagem por outras enzimas. As pró-caspases iniciadoras (-8 e -9) normalmente são monômeros inativos e passam a ser ativas após a dimerização. Ao receber sinalizações específicas, as pró-caspases são reunidas e a proximidade entre elas facilita a formação dos dímeros e a autoclivagem necessária para a estabilização do dímero tornando-se ativas. Já as pró-caspases executoras (-3 -6 e -7) são compostas por um domínio amino-terminal e duas subunidades. Sua ativação depende da clivagem dessas subunidades para formar uma estrutura dimerizada funcional. As caspases executoras não fazem auto-catalização e necessitam de clivagem pelas caspases iniciadoras. Esse mecanismo serve como controle, já que à ativação de uma única caspase executora pode levar a ativação das demais pois elas executam clivagem entre si (DASGUPTA et al., 2017; MCILWAIN; BERGER; MAK, 2013).

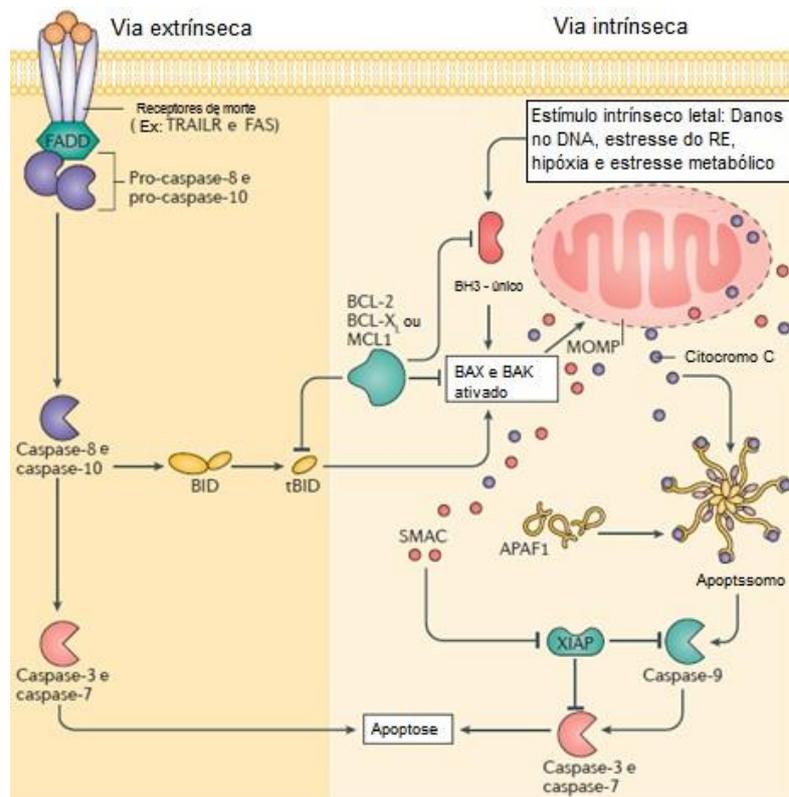
#### 2.4.3 Vias apoptóticas

Dois principais vias de sinalização bioquímica da apoptose são relatadas (**Figura 4**). A via extrínseca é iniciada por sinais externos enviados, por exemplo, pelo fator de necrose tumoral (TNF) ou Fas que são ligantes específicos de receptores de membrana plasmática. Ao se ligar, o ligante desencadeia uma mudança de conformação em seu receptor, resultando no recrutamento de proteínas

para a formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC) que sinaliza para atrair a pró-caspase-8 (ASHKENAZI; SALVESEN, 2014). Após a clivagem e liberação da caspase-8 ativa ela poderá ativar diretamente as caspases executoras (-3 e -7) ou ativar indiretamente por meio da via intrínseca. Nesse caso, a proteína BID é clivada para a liberação de tBID, proteína iniciadora que por sua vez, irá ativar BAX.

A ativação da via intrínseca na maioria das vezes não depende de ligantes externos. Os danos internos, ao prejudicarem a homeostasia celular, são captados e convergem para desencadear a permeabilização da membrana mitocondrial e a criação de poros por BAX e BAK. Entre outras moléculas, o citocromo-c é liberado para o citoplasma e, juntamente com fator de ativação da protease apoptótica 1 (APAF-1), formam o apoptossomo. Esse complexo funciona recrutando caspase-9 para sua ativação e, a seguir, ocorre a ativação das caspases executoras 3 e 7. Moléculas denominadas SMAC/DIABLO também são liberadas dos poros mitocondriais e agem impedindo o funcionamento das IAP's para que a apoptose aconteça.

**Figura 4** – Vias de sinalização extrínseca e intrínseca da apoptose.



Fonte: ICHIM; TAIT, p. 540, 2016 (modificado).

Essas reações bioquímicas levam à fragmentação das organelas e moléculas celulares, visto que essas caspases executoras funcionam como peptidases e clivam alvos específicos para que outras peptidases sejam liberadas. Um exemplo é a clivagem de poli ADP-ribose (PARP) que é responsável por manter as enzimas DNases inativas. Após clivado, PARP perde a função de inativar as DNases que, na forma ativa, passam a clivar o DNA nuclear para fragmentá-lo (DASGUPTA et al., 2017; ICHIM; TAIT, 2017).

Uma outra forma da regulação da via intrínseca apoptótica é o gene supressor de tumor p53. Esse gene exerce um efeito pró-apoptótico após detectar danos ao DNA. Nesse caso, o ciclo é parado na fase G1 através de sinalizações entre ciclinas e CDKs bem como as proteínas P21 e Prb que leva a liberação de P53, fator de transcrição de PUMA, NOXA e BAX dentre outros genes (NAKANO; VOUSDEN, 2001; ODA et al., 2000; VILLUNGER et al., 2003).

Existem outras formas de início e/ou execução da apoptose. A via intrínseca, dependente de sinais de estresse interno, pode ocorrer de maneira dependente ou independente de caspases. Quando independente, a execução da apoptose é realizada, por AIF (fator indutor de apoptose), endonuclease-G e proteína dependente de alta temperatura A2 (HTRA-2). Já a ativação da via extrínseca geralmente ocorre por receptores específicos de morte, mas pode ser iniciada por ligantes específicos em outros receptores (GALLUZZI et al, 2012).

## 2.5 BIODIVERSIDADE VEGETAL DE MATO GROSSO DO SUL

Ocupando quase metade da América do Sul, o Brasil possui sete zonas biogeográficas terrestres (biomas) que o torna o país com a maior biodiversidade do mundo. São elas: Cerrado, Mata Atlântica, Amazônia, Caatinga, Pampa, Pantanal e Zona Costeira e Marinha, sendo que os dois primeiros pertencem unicamente ao território brasileiro (MMA, 2017).

Aproximadamente 46 mil espécies vegetais já foram identificadas no país. Essas espécies apresentam caráter diversificado, devido às características geológicas e climáticas intrínsecas de seu bioma de origem. A diversidade de espécies, bem como as particularidades de cada bioma possibilitam estudos relacionados aos numerosos metabólitos gerados no reino vegetal (FLORA DO BRASIL, 2018; PIMENTEL et al., 2015).

O Estado de Mato Grosso do Sul (MS) apresenta uma enorme biodiversidade, por abrigar três biomas distintos – a Mata Atlântica, o Pantanal e o Cerrado – que abrangem, respectivamente, 14%, 25% e 60% do território estadual (IBGE, 2004). Ao contabilizar e caracterizar as coleções botânicas pertencentes ao estado, Alves et al. (2016) indicaram 4213 espécies de plantas distribuídas em 1299 gêneros e 246 famílias.

O cerrado é a mais rica savana tropical do mundo e o segundo maior bioma do país e detém mais de 11.600 de plantas nativas já catalogadas distribuídas em aproximadamente 90 famílias de angiospermas e gimnospermas (DA SILVA; BATES, 2002; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2017; RIBEIRO; WALTER, 2008). Em Mato Grosso do Sul, um levantamento feito por Bueno et al. (2018) demonstrou a considerável riqueza da flora arbórea do Cerrado do estado. Enfatizaram ainda que, apesar dos baixos índices de coleta, 546 espécies arbóreas de 255 gêneros e 84 famílias botânicas foram registrados.

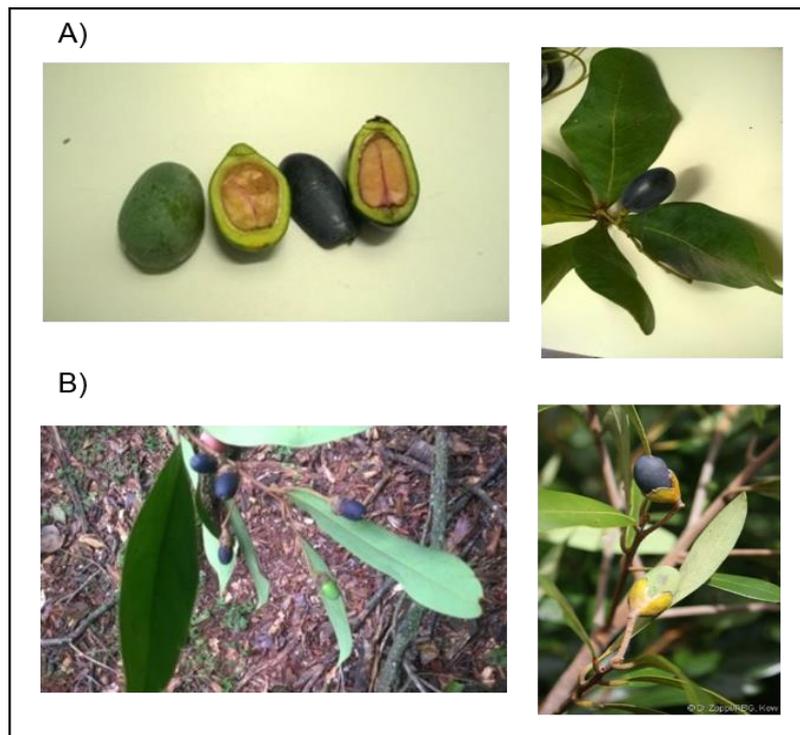
Garcez et al. (2016) relatam o estudo químico e a avaliação de atividade biológica em extratos de aproximadamente 120 espécies de dez famílias do estado de Mato Grosso do Sul. No estudo específico de bioativos contra o câncer *in vitro*, a cultura de células vem sendo utilizada em estudos multidisciplinares das áreas de Química, Farmácia e Biologia (BOGO et al., 2010; BRANDÃO et al., 2013; CANDIDO-BACANI et al., 2015; GARCEZ et al., 2005; MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002; MATOS et al., 2006; FIGUEIREDO et al., 2016; MICHELETTI et al., 2011; SIMIONATTO et al., 2011; TÓFOLI et al., 2016; FILIPPIN et al., 2018; LIMA e SILVA et al., 2018). Dentre as famílias de plantas estudadas encontra-se a família Lauraceae.

### 2.5.1 Família Lauraceae

Lauráceas são encontradas em regiões tropicais e subtropicais, principalmente nas Américas e na Ásia. Essas plantas são lenhosas, em sua grande maioria, e as árvores podem chegar a 50 metros de altura. Possuem folhas simples e flores actinomorfas com pétalas pequenas de várias cores. Nessa família encontram-se 52 gêneros com 2.750 espécies, sendo que no Brasil são relatados aproximadamente 22 gêneros com 390 espécies que habitam florestas pluviais, restingas e o Cerrado (ALVES; SARTORI, 2009; EDRALLI, 1987; MORAES, 2005;

VAN DER WERFF; RICHTER, 1996). Várias espécies apresentam atividades biológicas como analgésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e citotóxica (ADEYEMI; OKPO; OGUNTI, 2002; YAMAGUCHI et al., 2011; RAMOS et al., 2012; LOIZZO et al., 2007; SIMIĆ, 2004). Em sua ampla gama de espécies, encontram-se *Mezilaurus crassiramea* (Figura 5-A) e *Aniba heringueri* (Figura 5-B).

**Figura 5** – Plantas da família Lauraceae. A) Folhas e frutos de *Mezilaurus crassiramea*. B) Frutos e folhas de *Aniba heringueri*.



Fonte: TÓFOLI, 2018; *Neotropical Plants Image Database*, Disponível em: [https://www.kew.org/science/tropamerica/imagedatabase/large1/cat\\_single1-212.htm](https://www.kew.org/science/tropamerica/imagedatabase/large1/cat_single1-212.htm)

Os extratos e fases de partição dessas espécies foram avaliados quanto a sua atividade anticâncer *in vitro* e seletividade em linhagens de células neoplásicas humanas: carcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de próstata (PC-3), carcinoma de rim (786-0), carcinoma de cólon (HT-29), melanoma humano (UACC-62) e ovário com fenótipo de resistência (NCI/ADR-RES) (MARTINS, 2014).

*M. crassiramea* apresentam folhas são ovaladas, ápice arredondado, base atenuada, possuem pelos concentrados nas nervuras. É observado nessa e nas demais espécies do gênero *Mezilaurus* o agrupamento das folhas na extremidade, os ramos e flores em cachos (GOMES-BEZERRA; SOARES-SILVA; GOMES, 2011). Nessa espécie são encontrados metabólitos secundários policetídicos, os butanolídeos, caracterizados por conterem uma lactona cíclica derivada do ácido 4-

hidroxibutanoico. Tais compostos também estão presentes em outras espécies da família Lauraceae com atividades antiproliferativa e indutora de apoptose já descritas (CHEN et al., 2007; CHEN et al., 2008; SHEN et al., 2011).

Uma desses butanolídeos é o majoranolídeo. Esse composto já foi isolado da raiz (CHANG et al., 2008) e do caule de lauráceas e apresentou atividade citotóxica em células de carcinoma de pulmão, mama e colón (MA et al., 1990). Sua estrutura foi inicialmente descrita como  $\delta$ -lactona (delta-lactona) e após correções estruturais foram descritas como  $\gamma$ -lactonas (gama-lactonas) (FRAGA; TERRERO, 1996). Majoranolídeo foi avaliado por Heemann (2018), através de teste de citotoxicidade utilizando o corante Sulforrodamina-B (SRB) em células aderentes e o corante 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difenil brometo de tetrazólio (MTT) em células não aderentes. O composto foi testado nas linhagens neoplásicas humanas MCF-7, HT-29, PC-03, 786-0, carcinoma de mama triplo-negativo (MDA-MB-231), leucemia promielocítica aguda (HL-60) e em uma linhagem de fibroblasto murino não-neoplásica (NIH-3T3). Na linhagem HL-60 apresentou 50% de inibição do crescimento ( $GI_{50}$  de 0,41  $\mu$ M) e não foi citotóxico para células NIH-3T3.

*A. heringeri* é uma das 41 espécies do gênero *Aniba*, sendo popularmente conhecida como canela de remédio ou pau-louro e encontrada no Cerrado e na Caatinga (MORAES, 2005; MORS et al., 1962). O uso popular, atividades antimicrobiana e antiparasitária de espécies do gênero *Aniba* já foram descritas (MARQUES, 2001).-É relatado para esse gênero uma subdivisão fitoquímica com base no grupo de metabólitos secundários produzidos entre as espécies. Essa subdivisão está relacionada à ecogeografia, de forma que as espécies com caráter primitivo apresentam a síntese de neolignanas e estão localizadas predominantemente no centro da Amazônia. O outro grupo, incluindo *A. heringeri*, ao alcançar a periferia da Amazônia, passou a produzir pironas em substituição às neolignanas. Além de neolignanas e aril ou estiril-pironas, são encontrados outros constituintes químicos como alcaloides, terpenoides, benzofenonas e flavonoides (GOTTLIEB; KUBITZKI, 1981a; 1981b).

Pereira (2017), avaliou três estiril-pironas isoladas de *A. heringeri* – desidrogoniotalamina e dois dímeros de desidrogoniotalamina – frente às linhagens MCF-7, MDA-MB-231, HT-29, PC-03, 786-0, NCI/ADR-RES e a linhagem NIH-3T3, sendo que um dos dímeros de desidrogoniotalamina apresentou  $GI_{50}$  de 4,4  $\mu$ M na linhagem MDA-MB-231 e não foi citotóxico para as células não-neoplásicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos dos compostos citotóxicos majoranolídeo e dímero de desidrogoniotalamina, isolados de duas espécies da família Lauraceae na indução de apoptose e na expressão de genes em células neoplásicas *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o efeito do composto majoranolídeo, isolado da espécie *Mezilaurus crassiramea*, no comprometimento da integridade da membrana plasmática em linhagem de leucemia promielocítica aguda (HL-60);
- Investigar o efeito do composto dímero de desidrogoniotalamina, isolado da espécie *Aniba heringeri*, na ativação de caspase-3 em linhagem de carcinoma de mama triplo-negativo (MDA-MB-231);
- Avaliar a expressão dos genes BAX, BCL-2, BIRC-5 e caspase-8 em HL-60, após tratamento com o composto majoranolídeo;
- Avaliar a expressão dos genes BAX, BCL-2, BIRC-5 e caspase-8 em MDA-MB-231, após tratamento com o composto dímero de desidrogoniotalamina.

## 4 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi possível verificar os efeitos de compostos citotóxicos na indução de apoptose e na expressão de genes em células neoplásicas *in vitro*.

Esses efeitos são:

- O majoranolídeo, em baixas concentrações, não comprometeu a integridade da membrana plasmática de células HL-60 em nenhum dos tempos; somente após 48 horas de tratamento, na maior concentração, o composto foi capaz de causar perda da integridade da membrana plasmática.

- O dímero de desidrogoniotalamina após 48 h de tratamento ativou caspase-3 em células MDA-MB-231.

- O majoranolídeo, em 48 h de tratamento, causou *up*-regulação de genes pró-apoptóticos BAX e caspase-8; *down*-regulação de BIRC-5, relacionado à resistência à morte por apoptose; e nenhum efeito significativo sobre o gene anti-apoptótico BCL-2. Não houve alteração nos genes no tratamento em 12 e 24 h.

- O dímero de desidrogoniotalamina foi capaz de causar *up*-regulação do gene pró-apoptótico BAX, mas não causou alterações significativas nos genes BCL-2, caspase-8, BIRC-5.

- A atividade citotóxica em células neoplásicas, aliada aos dados de expressão gênica sugerem um processo apoptótico, um mecanismo de morte desejável para agentes quimioterápicos, tornando esses compostos possíveis candidatos para o tratamento do câncer.

## REFERÊNCIAS

- ADAN, A. et al. Flow cytometry: basic principles and applications. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 2, p. 163-176, 2017.
- ADEYEMI, O. O.; OKPO, S. O.; OGUNTI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* mill (Lauraceae). **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 375-80, 2002.
- ALBERTS B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. Capítulo 7 - Controle da expressão gênica, p. 369-435.
- ALTIERI, D. C. Survivin—the inconvenient IAP. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Academic Press, v. 39, p. 91-96. 2015.
- ALVES, F. M. et al. Coleções botânicas do estado de Mato Grosso do Sul: situação atual e perspectivas. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 1, p. 93-100, 2018.
- ALVES, F. M.; SARTORI, Â. L. B. *Nectandra* Rol. ex Rottb. (Lauraceae) in Mato Grosso do Sul State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, n. 1, p. 119-129, 2009.
- ARANDA, P. S.; LAJOIE, D. M.; JORCYK, C. L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. **Electrophoresis**, v. 33, n. 2, p. 366-369, 2012.
- ASHKENAZI, A.; SALVESEN, G. Regulated cell death: signaling and mechanisms. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, p. 337-356, 2014.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431-441, 2005.
- Bio-Rad Laboratories. **Real-Time PCR Applications Guide**. Bulletin 5279, Revista B, Estados Unidos, 2006. [Internet] Disponível em <<http://www.gene-quantification.com/real-time-pcr-guide-bio-rad.pdf>> Acesso em: 21 março 2018.
- BOGO, D. et al. In vitro antitumour activity of orsellinates. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 65, n. 1-2, p. 43-48, 2010.
- BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Ciência e Cultura**, v. 68, n. 1, p. 04-05, 2016.
- BRANDÃO, H.N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, 2010.
- BRANDÃO, L. F. G. et al. Cytotoxic evaluation of phenolic compounds from lichens against melanoma cells. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 61, n. 2, p. 176-183, 2013.
- BUENO, M. L. et al. Flora arbórea do Cerrado de Mato Grosso do Sul. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. 1, p. 53-64, 2018.

- BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 25, n. 2, p. 169-193, 2000.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-622, 2009.
- CANDIDO-BACANI, P. M. et al. Cytotoxic orbitide from the latex of *Croton urucurana*. **Journal of Natural Products**, v.78, n. 11, p. 2754-2760, 2015.
- CAZARIN, K.C.C; CORRÊA, C.L; ZAMBRONE, F.A.D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 289-299, 2004.
- CHANG, S.Y. et al. Antimycobacterial butanolides from the root of *Lindera akoensis*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 12, p. 2690-2698, 2008.
- CHEN, C.-Y. et al. Isokotomolide A, a new butanolide extracted from the leaves of *Cinnamomum kotoense*, arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of p53/p21 and the initiation of mitochondrial system in human non-small cell lung cancer A549 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 574, n. 2, p. 94-102, 2007.
- CHEN, C.-Y. et al. Kotomolide A arrests cell cycle progression and induces apoptosis through the induction of ATM/p53 and the initiation of mitochondrial system in human non-small cell lung cancer A549 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 7, p. 2476-2484, 2008.
- CHEN, W.-Y. et al. Goniotalamin induces cell cycle-specific apoptosis by modulating the redox status in MDA-MB-231 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 522, n. 1-3, p. 20-29, 2005.
- CHIDLEY, C. et al. The anticancer natural product ophiobolin A induces cytotoxicity by covalent modification of phosphatidylethanolamine. **Elife**, v. 5, p. e14601, 2016.
- CHIEN, A. L. T.; PIHIE, A. H. L. Styrylpyrone derivative induces apoptosis through the up-regulation of Bax in the human breast cancer cell line MCF-7. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 3, p. 269-274, 2003.
- CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; WATERHOUSE, N. J. Analyzing cell death by nuclear staining with Hoechst 33342. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 9, p. pdb. Prot 087205, 2016.
- DA SILVA, J.M.; BATES, J. M. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot: The Cerrado, which includes both forest and savanna habitats, is the second largest South American biome, and among the most threatened on the continent. **AIBS Bulletin**, v. 52, n. 3, p. 225-234, 2002.
- DASGUPTA, A. et al. Cancer's Achilles' Heel: Apoptosis and Necroptosis to the Rescue. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 23, 2017.

DE BRUIN, E.C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, n. 8, p. 737-749, 2008.

DE FÁTIMA, Â. et al. Cytotoxicity of goniotalamin enantiomers in renal cancer cells: involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy. **Chemico-biological interactions**, v. 176, n. 2, p. 143-150, 2008.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.

EDRALLI, G. A família Lauraceae Lindley no RS, Brasil: gêneros *Endlicheria* Nees, *Laurus* L. e *Cryptocarya* R. Br. **Acta Botânica Brasileira**, v. 1, n. 1, p. 27-41, 1987.

FERREIRA, J. R. O. et al. Induction of G2/M arrest, caspase activation and apoptosis by  $\alpha$ -santonin derivatives in HL-60 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 5, p. 1458-1466, 2013.

FIGUEIREDO, P. O. et al. Rubiaceae-type cyclopeptides from *Galianthe thalictroides*. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 4, p. 1165-1169, 2016.

FILIPPIN, K. J. Atividade citotóxica e pró-apoptótica de substâncias isoladas das espécies *Mezilaurus crassiramea* (Lauraceae) e *Pogonopus tubulosus* (Rubiaceae). 2016. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande-MS, 2016.

FILIPPIN, K. J. et al. Cytotoxic alkaloids from *Pogonopus tubulosus*: G2/M cell cycle arrest and inhibition of DNA topoisomerase II  $\alpha$  by isotubulosine. **Phytotherapy Research**, v. 32, n. 5, p. 934-948, 2018.

**Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. [internet] disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 02. maio. 2018.

FOUAD, Y. A.; AANEI, C. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, v. 7, n. 5, p. 1016, 2017.

FRAGA, B. M.; TERRERO, D. Alkene- $\gamma$ -lactones and avocadofurans from *Persea indica*: a revision of the structure of majorenolide and related lactones. **Phytochemistry**, v. 41, n. 1, p. 229-232, 1996.

FRESHNEY, I.R. **Culture of animal cells.** A manual of Basic Technique and Specialized Applications. 7 ed. New York: Wiley-Liss, 2016.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Live to die another way: modes of programmed cell death and the signals emanating from dying cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 329, 2015.

GALI-MUHTASIB, H. et al. Cell death mechanisms of plant-derived anticancer drugs: beyond apoptosis. **Apoptosis**, v. 20, n. 12, p. 1531-1562, 2015.

GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 1, p. 58, 2015.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death and Differentiation**, p. 1, 2018.

GARCEZ, F. R. et al. A diversidade dos constituintes químicos da flora de Mato Grosso do Sul e sua relevância como fonte de substâncias bioativas. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 1, p. 97-129, 2016.

GARCEZ, F.R. et al. Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. **Planta Médica**, v.71, n. 10, p. 923-927, 2005.

GIBSON, U. E.; HEID, C. A.; WILLIAMS, P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. **Genome Research**, v. 6, n. 10, p. 995-1001, 1996.

GINZINGER, D. G. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. **Experimental Hematology**, v. 30, n. 6, p. 503-512, 2002.

GOLDBERG, A. M. The principles of humane experimental technique: Is it relevant today. **Altex**, v. 27, p. 25-27, 2010.

GOMES-BEZERRA, K. M.; SOARES-SILVA, L. H.; GOMES, S. M. Leaf venation of the Lauraceae of the Distrito Federal, Brazil, and new proposed venation patterns. **Gayana Botanica**, v. 68, n. 1, p. 1-15, 2011.

GOTTLIEB, O. R.; KUBITZKI, K. Chemogeography of Aniba (Lauraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 137, n. 4, p. 281-289, 1981a.

GOTTLIEB, O. R.; KUBITZKI, K. Chemosystematics of Aniba. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 9, n. 1, p. 5-12, 1981b.

GUAMÁN-ORTIZ, L. M.; ORELLANA, M. I. R.; RATOVIČSKI, E. Natural compounds as modulators of non-apoptotic cell death in cancer cells. **Current Genomics**, v. 18, n. 2, p. 132-155, 2017.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Revista Estudos Avançados**, v.24, n.70, p.81-98, 2010.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, n.12, p.3864-3874, 1991.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Biological hallmarks of cancer. **Holland-Frei Cancer Medicine**, v. 9, p.7-16, 2017.

HARDWICK, J. M.; YOULE, R. J. SnapShot: BCL-2 proteins. **Cell**, v. 138, n. 2, p. 404-404, 2009.

- HEEMANN, L. M. Busca de substâncias citotóxicas de *Aniba heringeri* e *Mezilaurus crassiramea*, com identificação de composto indutor de apoptose em células neoplásicas *in vitro*. **Dissertação (mestrado)** - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande-MS, 2018.
- HEID, C.A. et al. Real time quantitative PCR. **Genome Res**, v.6, n. 10, p.986-994, 1996.
- HIGUCHI, R. et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Nature Biotechnology**, v. 10, n. 4, p. 413, 1992.
- HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, n. 4, p. 377-387, 2007.
- HUGGETT, J. et al. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. **Genes and Immunity**, v. 6, n. 4, p. 279-284, 2005.
- 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, 2016.
- INAYAT-HUSSAIN, S. H. et al. Caspases-3 and-7 are activated in goniiothalamine-induced apoptosis in human Jurkat T-cells. **FEBS letters**, v. 456, n. 3, p. 379-383, 1999.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Mapa de Biomas e de Vegetação**, 2004. [Internet]. Disponível em: <<https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>> Acesso em 15. abril. 2018.
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 3. ed. Revista Atual. Rio de Janeiro: Inca, 2017. [internet] Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc\\_do\\_cancer.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf)> Acesso em 18 abril 2018.
- KAMB, A.; WEE, S.; LENGAUER, C. Why is cancer drug discovery so difficult. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 2, p. 115-120, 2007.
- KASIBHATLA, S. et al. Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) staining to detect apoptosis. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2006, n. 3, p. pdb. Prot 4493, 2006.
- KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 3, p. 221, 2011.
- LECOEUR, H.; DE OLIVEIRA-PINTO, L. M.; GOUGEON, M-L. Multiparametric flow cytometric analysis of biochemical and functional events associated with apoptosis and oncosis using the 7-aminoactinomycin D assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1-2, p. 81-96, 2002.

LETAI, A. Apoptosis and cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, p. 275-294, 2017.

LI, H. et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. **Cell**, v. 94, n. 4, p. 491-501, 1998.

LI, L. K. et al. Goniotalamin induces cell cycle arrest and apoptosis in H400 human oral squamous cell carcinoma: A caspase-dependent mitochondrial-mediated pathway with downregulation of NF- $\kappa$ B. **Archives of oral biology**, v. 64, p. 28-38, 2016.

LIMA E SILVA, M. C. B. et al. Antiproliferative activity of extracts of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg and isolated compound dimethylchalcone against B16-F10 murine melanoma. **Journal of Medicinal Food**, v.0, n.0, p. 1–11, 2018.

LOCKEY, C.; OTTO, E.; LONG, Z. Real-time fluorescence detection of a single DNA molecule. **Biotechniques**, v.24, n. 5, p.744-746, 1998.

LOIZZO, M. R. et al. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. **Anticancer Res**, v. 27, n. 5A, p. 3293-9, 2007.

LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **The Journal of pathology**, v. 205, n. 2, p. 275-292, 2005.

MA, W.-W. et al. Majoranolide: a  $\delta$ -lactone from *Persea major*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 8, p. 2698-2699, 1990.

MACIEL M. A. M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MARTINS, L.A. Avaliação do potencial anticâncer de espécies vegetais de Mato Grosso do Sul. **Dissertação (mestrado)** – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande-MS, 2014.

MATOS, M.F.C. et al. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 3, p. 227-229, 2006.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n. 4, p. a008656, 2013.

MICHELETTI, A. C. et al. Chemical modifications of a natural xanthone and antimicrobial activity against multidrug resistant *Staphylococcus aureus* and cytotoxicity against human tumor cell lines. **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1014-1020, 2011.

Ministério do Meio Ambiente (MMA). **Biodiversidade Brasileira**. 2017. [Internet] Disponível em <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>> Acesso em: 17 abril. 2018.

MITRA, A.; MISHRA, L.; LI, S. EMT, CTC's and CSC's in tumor relapse and drug-resistance. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 10697, 2015.

MORAES, P. L. R. Sinopse das lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5, n. 2, p. 253-270, 2005.

MORRISON, T. B.; WEIS, J. J.; WITTEWER, C. T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. **Biotechniques**, v. 24, n. 6, p. 954-8, 960, 962, 1998.

MORS, W. B.; MAGALHAES, M. T.; LIMA, O. A.; BITTENCOURT, A. M.; GOTTLIEB, O. R. A química do gênero *Aniba*. XI. Isolamento e síntese de 11-metoxi-iangonina e de 5,6-dehidrometisticina. **Anais da Associação Brasileira de Química**. v.21, p 7-12, 1962.

NAKANO, K.; VOUSDEN, K. H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. **Molecular Cell**, v. 7, n. 3, p. 683-694, 2001.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

ODA, K. et al. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. **Cell**, v. 102, n. 6, p. 849-862, 2000.

PAN, Si-Y. et al. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-25, 2013.

PEREIRA, I.C. Atividade antiproliferativa de pironas isoladas de *Aniba heringeri* em células neoplásicas humanas: potencial efeito em células de adenocarcinoma de mama. 2017. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande-MS, 2017.

PIMENTEL, V. P. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, n. 43, p. 41-89, 2015.

PINTO, A. C. et al. Current status, challenges and trends on natural products in Brazil. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

POP, C.; SALVESEN, G. S. Human caspases: activation, specificity, and regulation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 33, p. 21777-21781, 2009.

RAMOS, C. et al. Antioxidant and antibacterial activity of essential oil and extracts of bay laurel *Laurus nobilis* Linnaeus (Lauraceae) from Portugal. **Journal Natural Product Research**, v. 26, n. 6, p. 518-29, 2012.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125, 2008.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S.M. et al. (Eds.). Cerrado: ecologia e flora. **Embrapa Cerrados e Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, 2008. n.1, p. 151-209.

SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101, 2008.

SHEN, K.-H. et al. Isolinderanolide B, a butanolide extracted from the stems of *Cinnamomum subavenium*, inhibits proliferation of T24 human bladder cancer cells by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Integrative Cancer Therapies**, v. 10, n. 4, p. 350-358, 2011.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 813-823, 2006.

SILVA, M. M. et al. Synthesis, antiproliferative activity and molecular properties predictions of galloyl derivatives. **Molecules**. v. 20, P. 5360-5373, 2015.

SIMIĆ, A. et al. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 9, p. 713-717, 2004.

SIMIONATTO, E. et al. Chemical composition and biological activities of leaves essential oil from *Schinus molle* (Anacardiaceae). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v.14, n. 5, p. 590-599, 2011.

SINGH, N. et al. Clinical aspects for survivin: a crucial molecule for targeting drug-resistant cancers. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 578-587, 2015.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, n. 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.

TAMM, I. et al. IAP-family protein survivin inhibits caspase activity and apoptosis induced by Fas (CD95), Bax, caspases, and anticancer drugs. **Cancer Research**, v. 58, n. 23, p. 5315-5320, 1998.

TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 3, p. 231, 2008.

TÓFOLI, D. Busca de substâncias bioativas em lauráceas de Mato Grosso do Sul: constituintes fixos e voláteis de *Aniba heringerii* Vattimo-Gil e *Mezilaurus crassiramea* (Meissner) Taubert ex Mez. **Dissertação (Mestrado)** – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-MS, 2013.

TÓFOLI, D. Tese de doutorado (em fase de elaboração). Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-MS, 2018.

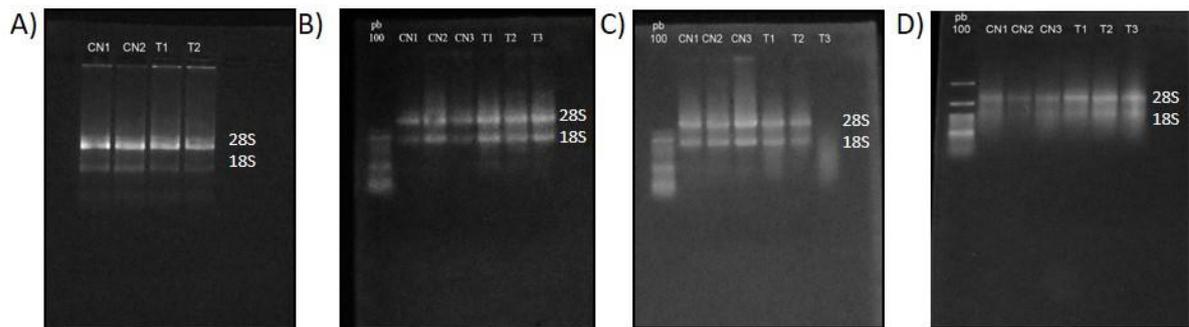
TÓFOLI, D. et al. Antyproliferative butyrolactones from *Mezilaurus crassiramea*. **Planta Médica**, v. 3, n.1, p.14-16, 2016.

- VAN DER WERFF, H.; RICHTER, van der H.G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 83, n. 3, p. 409-418, 1996.
- VANDESOMPELE, J. et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n. 7, p. 0034. 1, 2002.
- VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of Immunological Methods**, v. 243, n. 1-2, p. 167-190, 2000.
- VIEGAS J. R. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, p. 326-337, 2006.
- VILLUNGER, A. et al. p53-and drug-induced apoptotic responses mediated by BH3-only proteins puma and noxa. **Science**, v. 302, n. 5647, p. 1036-1038, 2003.
- VINEIS, P.; STEWART, B.W. How do we judge what causes cancer? The meat controversy. **International Journal of Cancer**, v. 138, n. 10, p. 2309-2311, 2016.
- WAHEED, A. A.; RAO, K. S.; GUPTA, P. D. Mechanism of dye binding in the protein assay using eosin dyes. **Analytical Biochemistry**, v. 287, n. 1, p. 73-79, 2000.
- WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.
- World Health Organization. **Cancer**. 2018. [Internet] Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 25.abril. 2018.
- WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.R; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, v. 68, p. 251-306, 1980.
- YAMAGUCHI, M. U. et al. Antifungal effects of Ellagitannin isolated from leaves of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 99, n. 3, p. 507-14, 2011.
- YANG, S. et al. Mitochondrial-mediated apoptosis in lymphoma cells by the diterpenoid lactone andrographolide, the active component of *Andrographis paniculata*. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 19, p. 4755-4768, 2010.
- YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.
- ZEMBRUSKI, N. C.L. et al. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Analytical Biochemistry**, v. 429, n. 1, p. 79-81, 2012.
- ZHONG, L. et al. Induction of leukemia cell apoptosis by cheliensisin A involves downregulation of Bcl-2 expression. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 26, n. 5, p. 623, 2005.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A – Integridade do RNA total extraído.

Integridade das bandas 28S e 18S de RNA ribossomal após eletroforese em gel de agarose 1%. Células HL-60 tratadas com majoranolídeo em A) 12h; B) 24h; C) 48h; e C) Células MDA-MB-231 tratadas com dímero de desidrogoniotalamina.

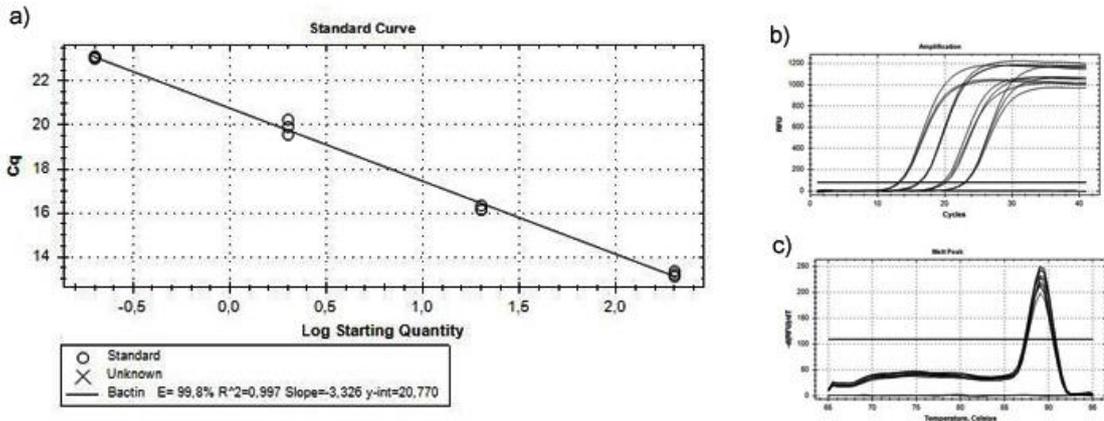


Fonte: autoria própria; CN1, CN2, CN3 amostras não tratadas; T1, T2, T3: amostras tratadas. pb: pares de base;

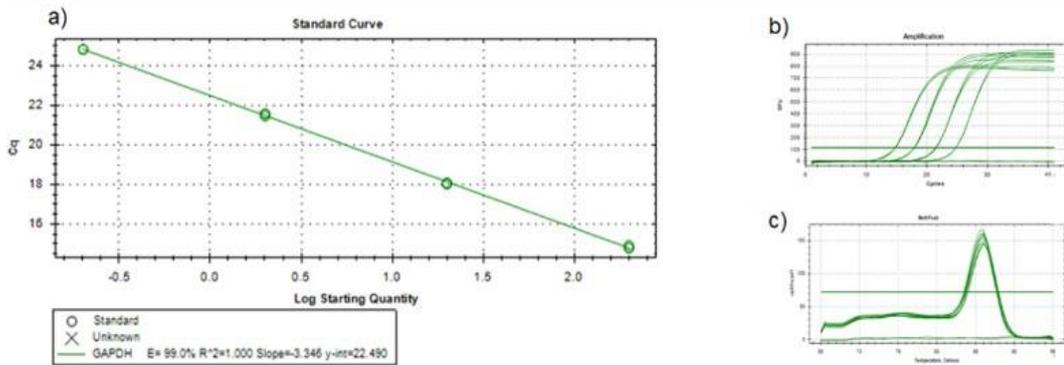
APÊNDICE B – Eficiência da amplificação do gene  $\beta$ -actina, GAPDH, BAX, BCL-2, BIRC-5 e caspase-8.

As curvas e os valores foram gerados no *software* CFX Manager™ v.3.1, para validação das reações de qPCR. a) Gráfico de regressão linear; b) Curva de amplificação da diluição seriada; c) Curva de melting.

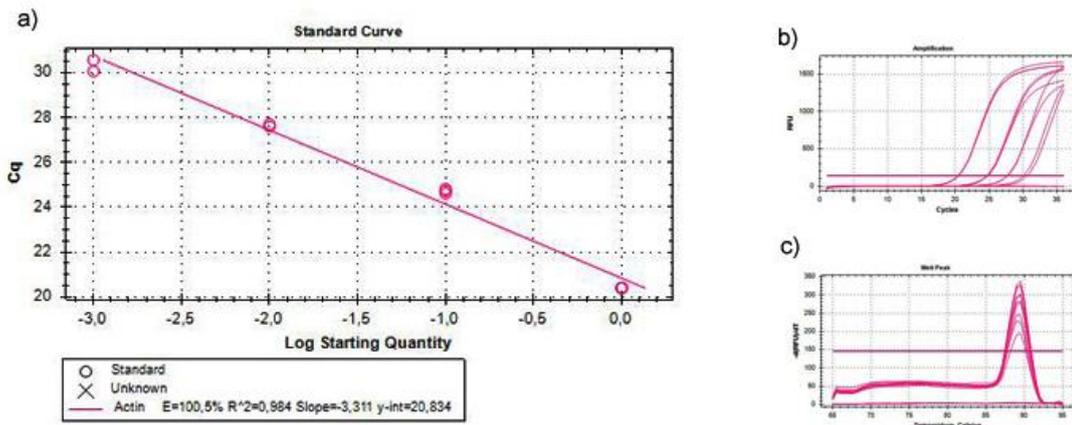
**$\beta$ -actina**



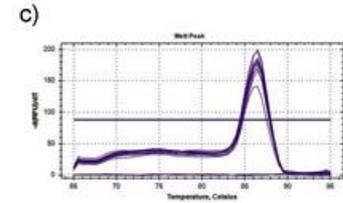
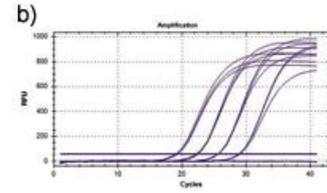
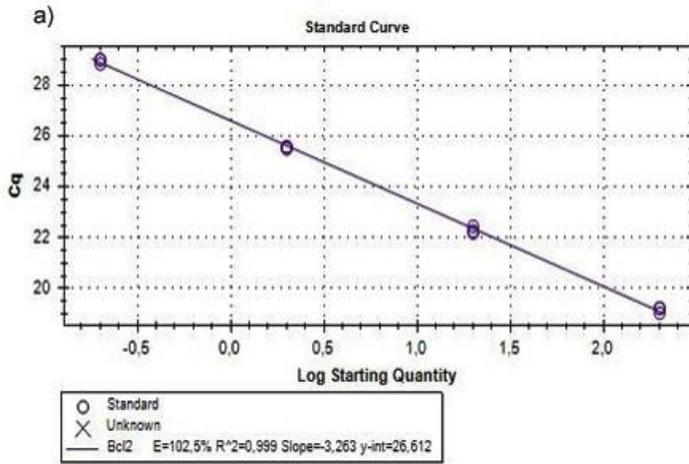
**GAPDH**



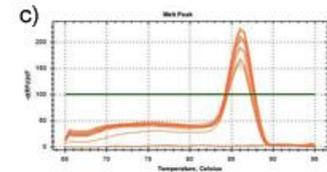
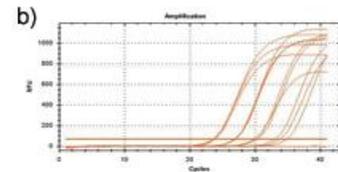
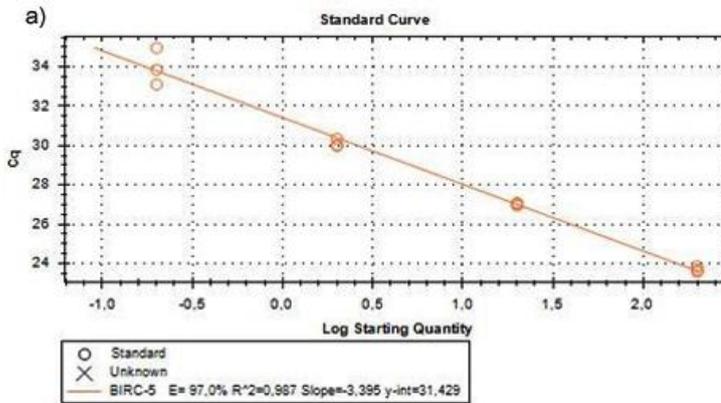
**BAX**



### BCL-2



### BIRC-5



### CASP-8

