



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELUAR

SUSANNE SUELY SANTOS DA FONSECA

‘

**ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA 1-DESOXINOJIRIMICINA EM MODELOS  
DE CÂNCER *IN VITRO***

BELÉM - PA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA  
CELULAR

SUSANNE SUELY SANTOS DA FONSECA

**ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA 1-DESOXINOJIRIMICINA EM MODELOS  
DE CÂNCER *IN VITRO***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular da UFPA como para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia Celular

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Prof. Dr. Antônio Pereira Junior

Coorientador: Prof. Dr. André Salim Khayat.

BELÉM - PA

2021

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD**  
**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará**  
**Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

---

- S944a Suely Santos da Fonseca, Susanne.  
Atividade Antineoplásica da 1-desoxinojimirina em modelos de  
câncer in vitro / Susanne Suely Santos da Fonseca. — 2021.  
84 f. : il. color.
- Orientador(a): Prof. Dr. Antonio Pereira Junior  
Coorientador(a): Prof. Dr. André Salim Khayat  
Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de  
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2021.
1. câncer. 2. 1-DNJ. 3. glioblastoma multifome. 4.  
adenocarcinoma gástrico. 5. 1-desoxinojimiricina. I. Título.

CDD 570

---

SUSANNE SUELY SANTOS DA FONSECA

ATIVIDADE ANTINEOPLÁSICA DA 1-DESOXINOJIRIMICINA EM MODELOS  
DE CÂNCER *IN VITRO*

Tese de Doutorado submetido ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará como requisito de obtenção do título de Doutora em Neurociências e Biologia Celular

Data da avaliação: 15/12/2021

Orientações

Prof. Dr. Antonio Pereira Junior  
Doutor em Neurociências (Orientador – ICB/UFPA)

Prof. Dr. André Salim Khayat  
Doutor em Genética (Co-orientador – ICB/UFPA)

Banca Examinadora  
Prof. Dr. Wandson Braacamp de Souza Pinheiro (membro Titular)  
Doutor em Química– ICEN/UFPA

Prof. Dr. Givago da Silva Souza (membro Titular)  
Doutor em Neurociências – ICB/UFPA

Profa. Dra. Bianca Cruz Neves (membro Titular)  
Doutora em Microbiologia– ICQ/ UFRJ

Profa. Dra. Ivanira Amaral Dias  
Doutora em Neurociências – FANUT/UFPA

BELÉM – PA

2021

Dedico este trabalho a minha  
família.

## AGRADECIMENTOS

Escrevo carinhosamente e muito agradecida por toda trajetória até aqui. Grata ao meu Deus que me manteve firme e forte em meio a inúmeras adversidades, por minhas conquistas e pelo cuidado com minha família em minha ausência. Com o passar do tempo essa tese passou a não ser mais para mim, mas sim para vocês que me ajudaram e lutaram comigo. É um extenso agradecimento, pois tive a sorte de ter tantas pessoas especiais em minha vida.

Agradeço ao meu orientador, Antônio Pereira, por ser um verdadeiro pai científico, por ser amigo, acreditar em mim como aluna e por me ajudar a controlar meus inúmeros medos. Por, verdadeiramente, me ensinar desde 2013, o que é fazer ciência, produzir ciência e ser aquele que dizia que ia beber um vinho a cada conquista no meu experimento. O senhor sempre será uma parte importante em minha vida que quero sempre manter pertinho. O senhor cultivava uma sementinha em cada um nós, que nos permite chegar cada vez mais longe, além de ouvir nossas ideias malucas e nos apoiar nelas. Obrigada por me presentear com o versículo que se tornou minha epígrafe nessa tese.

Ao meu co-orientador professor André André Khayat que é um dos professores mais relevantes do mundo; que topava igualmente minhas ideias malucas e que perdia a hora do almoço para cuidar dos seus alunos. O senhor me ensinou sobre uma área que eu não conhecia (o objeto de estudo desta tese), incentivou e também acreditou em meu potencial. Honrado o aluno que encontra o senhor como orientador. Eu serei eternamente grata professor.

Vocês dois são exemplos de professores que inspiram, transformam a vidas dos seus alunos e sentem orgulho a cada conquista. Isso é o verdadeiro professor, aquele mesmo pregado por Paulo Freire.

Agradeço aos meus Pais Antonia Fonseca e Raimundo Fonseca, aos meus irmãos que lutaram comigo e me forneceram educação, caráter, um amor sem medida e foram incansáveis me proporcionando o melhor. A minha tia Roseli, minha segunda mãe que foi parte fundamental e inspiradora.

Agradeço ao meu amado esposo Vitor Alves que foi minha fortaleza, minha proteção e com quem compartilho a vida. Amor, você me faz sorrir quando até mesmo estou sozinha lembrando de suas piadas. Para mim você é melodia, brisa e paz. Obrigada

por me proporcionar tantos momentos incríveis. Você foi à parte fundamental neste doutorado trazendo alegria e sendo meu "ic" nas horas não tão vagas, me tornando empreendedora com a nossa culinária inclusiva chamada Chicorita®. Obrigada por tanto meu amor.

Agradeço imensamente a minha segunda família científica, a Central de Extração da UFPA que me acolheu e me recebeu desde de 2009, não só me proporcionando momentos incríveis, mas também me ensinando tudo sobre extração e isolamentos de produtos naturais.

Aos meus amigos(a) de vida, muito obrigada aos querido(a)s Gisele Aguiar, Vanessa Marinho, Marius, Klebson, Ketelin, Tarcianne Garcia, Juliana Araujo, Ivanira, Mayara Francy pelos longos anos de amizade que vai muito além da ciência. Tenho a sorte de ter vocês como amigos.

À Professora Mara Arruda, obrigada por tanto carinho e pelos longos anos de confiança em meu trabalho. A senhora me proporcionou um lugar de trabalho alegre em que eu fui imensamente grata e feliz. Além de amar produtos naturais, também pude fazer amigos para uma vida inteira como o Wandson Pinheiro, Kyouk, Narnyson, Everton, Manolo, Carol, Geilson e Nádia que são amigos que me acompanham todos os dias, mesmo a distância me fazem sorrir pelo nosso amado e maluco grupo do *whatsApp* que é uma dose diária de músicas aleatórias e muita bagunça.

A Dra. Taissa Thomaz, minha também digital influencer nerd, uma amiga que o laboratório de oncologia me presenteou, nosso trevinho da sorte, a primeira a comprar meus pães de queijos saudáveis e me incentivar na vida empreendedora. Obrigada por seu carinho, por suas palavras sábias, por sua energia contagiante, por sua generosidade e por também dividir com o professor André a orientação deste trabalho. Tatá, obrigada por tudo.

Eu, imensamente, agradeço aos amigos de laboratório que eram incansáveis e me ajudavam também em meus experimentos em especial a Amanda, Eliel, Thaissa Victória, Marcelle, Ingrid, Michele e Gabriel e aos demais colegas do laboratório do núcleo de oncologia. Nós conquistamos momentos tão especiais, rimos e choramos juntos. Michico (Michele) e Thaissinha e Eliel a, obrigada por também tornar meus dias mais felizes na pós-graduação e por tanta parceria e cumplicidade, eu guardo vocês no coração.

Agradeço a todos os professores que fizeram parte da minha jornada acadêmica que foram imprescindíveis em minha formação da graduação ao doutorado. Especialmente o professor Anderson Manoel Herculano e a professora Karen Renata e aos demais professores que contribuíram positivamente.

Aos membros da banca por terem aceitado colaborar com esse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Universidade Federal do Pará (UFPA) por todo o suporte para a realização desse trabalho.

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu. Há tempo de nascer, e tempo de morrer; tempo de plantar, e tempo de arrancar o que se plantou; Tempo de matar, e tempo de curar; tempo de derrubar, e tempo de edificar; Tempo de chorar, e tempo de rir; tempo de prantear, e tempo de dançar; Tempo de espalhar pedras, e tempo de ajuntar pedras; tempo de abraçar, e tempo de afastar-se de abraçar; Tempo de buscar, e tempo de perder; tempo de guardar, e tempo de lançar fora; Tempo de rasgar, e tempo de coser; tempo de estar calado, e tempo de falar; Eclesiastes 3:1-7

## RESUMO

O câncer é uma das doenças que mais matam, atualmente, no Brasil, apresenta projeções alarmantes até 2030. Em face dos problemas relacionados ao tratamento oncológico, como o comprometimento de células saudáveis e, conseqüentemente, a presença de efeitos adversos, é imperativo a busca de substâncias alternativas que possam apresentar efeitos antineoplásicos e que sejam eficazes no tratamento dos pacientes com essa doença. Desta forma, o uso de compostos bioativos tem sido amplamente utilizado no combate as neoplásias. Assim, a substância 1-desoxinojimiricina (1-DNJ) isolada da *Bagassa guianensis* pode ter grande potencial anticancerígeno. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da 1-DNJ em diferentes linhagens celulares cancerígenas para investigar as possíveis ações antineoplásicas *in vitro* utilizando linhagens de células de câncer de adenocarcinoma gástrico (ACP02) e glioblastoma (A172). Para isto, foi avaliado o efeito da substância 1-DNJ na viabilidade celular *in vitro* após 72h de tratamento nas linhagens celulares ACP02 e a A172. Também avaliamos o efeito deste composto bioativo no padrão de migração celular, morte celular por apoptose e alterações no ciclo celular utilizando citometria de fluxo, na produção de oxigênio reativo e sua capacidade antioxidante em sistema livre de células. Os resultados demonstram que a 1-DNJ promove redução significativa da viabilidade celular com de cultura de células cancerígenas tanto em linhagens de células de glioblastoma (A172) na concentração de 6mM ( $65.88 \pm 6.89\%$ ) quanto de células gástricas cancerígenas (ACP02) na concentração de 8mM ( $82.6 \pm 3.13\%$ ) em relação aos seus respectivos controles negativos. A redução da viabilidade parece ser mais efetiva em linhagens de células de glioblastoma, comum  $ic_{50}$  de 5.3 mM quando comparado as outras linhagens ACP02 (19.3 mM) e MRC5 (21.8 mM). Propomos que a redução da viabilidade pode estar relacionada a diminuição da produção de oxigênio reativo em ambas as linhagens após o tratamento com 1-DNJ. Além disso, a 1-DNJ promove parada no ciclo celular, impede a migração celular e induz morte celular do tipo necrose na linhagem ACP02 e apoptose na linhagem A172. Desta forma, sugerimos que a 1-DNJ pode ser uma substância quimiopreventiva importante e eficaz para o tratamento do câncer do tipo glioblastoma e adenocarcinoma gástrico.

Palavras chaves: Câncer, 1-DNJ, adenocarcinoma gástrico, glioblastoma multifome

## ***ABSTRACT***

Cancer is one of the diseases that kill the most in Brazil, with alarming projections until 2030. In view of the problems related to cancer treatment, such as the compromise of healthy cells and, consequently, the presence of adverse effects, it is imperative to seek of alternative substances that may have antineoplastic effects and that are effective in the treatment of patients with this disease. In this way, the use of bioactive compounds has been widely used in the fight against neoplasms. Thus, the substance 1-deoxynojirimycin (1-DNJ) isolated from *Bagassa guianensis* may have great anticancer potential. In view of the problems related to cancer treatment, such as the impairment of healthy cells and, consequently adverse effects, it is necessary to search alternative substances that may have antineoplastic effects and they are effective in the treatment of patients with this disease. The objective of this study was to evaluate the effect of 1-deoxynojirimycin (1-DNJ) extracted from wood residue of the species *Bagassa guianensis* in different cancer cell lines to investigate possible antineoplastic actions in vitro using gastric adenocarcinoma and glioblastoma cancer cell lines. To do that, it was evaluated the effect of the substance 1-deoxynojirimycin on cell viability in vitro after 72h of treatment in cell lines ACP02 and A172. We also evaluated the effect of this bioactive compound on cell migration pattern, cell death by apoptosis and cell cycle changes using flow cytometry and reactive oxygen production. The results showed that 1-deoxynojirimycin makes a significant reduction in cell viability of cancer cell cultures in both glioblastoma (A172) and gastric cancer cell (ACP02) cell lines. The reduction in viability appears to be more effective in glioblastoma cell lines, with a common ic50 much lower when compared to other cell lines. We propose that the reduction in viability may be related to the decrease in reactive oxygen production in both lines after treatment with 1-DNJ. Besides that, 1-DNJ interrupts the cell cycle, prevents cell migration and induces necrosis-like cell death in the ACP02 lineage and apoptosis in the A172 lineage. Therefore, we suggest that 1-deoxynojirimycin may be an important and effective chemopreventive substance for the treatment of glioblastoma and gastric adenocarcinoma cancers.

**Keyword:** Cancer, 1-DNJ, glioblastoma multiform, gastric adenocarcinoma

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

	<b>Páginas</b>
Figura 1- Esquema representativo dos mecanismos do processo de iniciação do câncer.	13
Figura 2 -Mecanismo de morte celular induzida por dano oxidativo em células cancerígenas.	14
Figura 3- Neuroimagem do glioblastoma.	16
Figura 4- Desenho esquemático da conversão do $\alpha$ -cetogluturato em R-2-H-hidroxiogluturato (R-2-HG) pela mutação da isocitratodesidrogenase.	17
Figura 5 - Diferenciação de células tronca normais em células tronca de tumor neuroglial no processo de tumorigênese.	19
Figura 6- Constituição do microambiente celular do glioblastoma multiforme.	20
Figura 7 - Fotografia árvore da espécie <i>Bagassa guianensis</i> .	25
Figura 8- Fórmula estrutural da 1-DNJ.	26
Tabela 1- Máxima concentração inibitória da substância isolada 1-DNJ em linhagens celulares.	38
Figura 9 - Redução da viabilidade de cultura de linhagens celulares normais MRC5 após o tratamento por 72h com 1-DNJ.	40
Figura 10 - Redução da viabilidade de cultura de linhagens de células cancerígenas ACP02 após o tratamento por 72h com 1-DNJ	41
Figura 11 - Redução da viabilidade de cultura de linhagens de células cancerígenas A172 após o tratamento por 72h com 1-DNJ	42
Figura 12 Gráfico do ciclo celular do adenocarcinoma gástrico ACP02 tratadas com 1-DNJ nas concentrações de 5,3 e 2,6 mM.	44
Figura 13 – Gráfico do ciclo celular do glioblastoma A172 tratadas com 1-DNJ nas concentrações de 5,3 e 2,6 mM..	45

Figura 14 – Indução de morte celular por apoptose em culturas de células canceígenas após 72h de tratamento com 1-DNJ.	47
Figura 15- Quantificação da migração celular nas diferentes linhagens após tratamento com 1-DNJ	51
Figura 16- Redução da produção de oxigênio reativo após o tratamento de 72h com 1-DNJ em culturas de células cancerígenas	53
	55
Figura 17 - A 1-DNJ promove inibição do radical livre DPPH	56
	56
Figura 18- A 1-DNJ promove sequestro do cátion ABTS	
Figura 19 - Esquema representativo dos efeitos da 1-DNJ em linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico e glioblastoma multifome	61

## LISTA DE ABREVIATURAS/ SIGLAS

<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<b>PBS</b>	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
<b>NBT</b>	<i>Nitro Blue Tetrazolium</i>
<b>1-DNJ</b>	1-Desoxinojirimicina
<b>AKT</b>	Proteína cinase B
<b>CG</b>	Câncer Gástrico
<b>IC50</b>	Concentração máxima inibitória necessária para matar 50% da população de células
<b>DMEM/F-12</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12</i>
<b>IC25</b>	Concentração máxima inibitória necessária para matar 25% da população de células
<b>ERK</b>	Cinase regulada por sinal extracelular
<b>MAPK</b>	Proteína ativada por mitógeno
<b>MEK</b>	Cinase regulada por sinal extracelular ativada por mitógeno
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3' - cinase
<b>PKC</b>	Proteína cinase c
<b>RAS/MEK</b>	Cinase regulada por sinal extracelular ativada por mitógeno
<b>SBS</b>	Soro Bovino Fetal
<b>ACP02</b>	Adenocarcinoma gástrico difuso
<b>A172</b>	Glioblastoma multifome
<b>LA</b>	Laranja de acridina
<b>BE</b>	Brometo de etídio
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Fator 1-alfa induzível por hipóxia

<b>HDI</b>	Isocitrato de desidrogenase
<b>R-2-HG</b>	R-2H-hidroxiglutarato
<b>GBM</b>	Glioblastoma multiforme
<b>MTT</b>	3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5- difeniltetrazolium bromide
<b>DPPH</b>	1,1-difenil-2-picril-hidrazil
<b>ABTS</b>	Sal diamonium-2,2'-Azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

:

:

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	11
<b>2.1. Considerações gerais</b> .....	11
<b>2.2. MODELOS DE CULTURAS DE CÉLULAS CANCERÍGENAS</b> .....	15
<b>2.2.1. Glioblastoma multiforme</b> .....	15
<b>2.2.2. Câncer gástrico</b> .....	21
<b>2.3. Produtos naturais anticancerígenos</b> .....	23
2.3.1. Caracterização da espécie <i>Bagassa guianensis</i> Aubl (Tatajuba) .....	24
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3.1. Geral</b> .....	28
<b>3.2. Específicos</b> .....	28
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
<b>4.1. Obtenção da 1-desoxinoximirina isolada da planta <i>Bagassa guianensis</i> Aubl.</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2. Culturas secundárias de linhagens cancerígenas e não neoplásicas.</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3. Efeito da 1-desoxinojimericina na viabilidade celular de linhagem cancerígenas</b> .....	<b>31</b>
<b>4.4. Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.</b> .....	<b>32</b>
<b>4.5. Ensaio de apoptose e necrose por coloração diferencial de brometo de etídio / laranja de acridina.</b> .....	<b>33</b>
<b>4.6. Ensaio de migração celular pelo teste de wound healing.</b> .....	<b>34</b>
<b>4.7. Determinação da produção intracelular de ânion superóxido nas linhagens celulares tratadas com 1-DNJ.</b> .....	<b>35</b>
<b>4.8. Ensaio da capacidade antioxidante pelo sequestro do cátion radical <math>abts^{•+}</math>.</b> <b>36</b>	
<b>4.9. Ensaio da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical <math>dpph^{•}</math>.</b> .....	<b>37</b>
<b>4.10. Análise estatística</b> .....	<b>37</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
<b>5.1. 1-DNJ promove redução da viabilidade celular em culturas de células cancerígenas</b> .....	<b>38</b>
<b>5.2. Tratamento com o 1-DNJ interfere no ciclo celular de linhagens de células cancerígenas.</b> .....	<b>43</b>

<b>5.3. O composto 1-DNJ induz diferentes padrões de morte celular nas linhagens acp02 e a172.</b>	<b>46</b>
<b>5.4. A 1-DNJ altera o padrão de migração celular em modelos de linhagens de células.</b>	<b>49</b>
<b>5.5. O composto 1-DNJ reduz a produção de oxigênio reativo em linhagens cancerígenas.</b>	<b>52</b>
<b>5.6. A 1-DNJ apresenta capacidade antioxidante em sistemas livres de células...</b>	<b>54</b>
<b>6. DISCUSSÃO.</b>	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS.</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um grave problema de saúde pública e a segunda causa de morte na América do Norte e na Europa. Estima-se que até 2030, tanto o câncer de próstata quanto o de pulmão ainda serão as neoplasias malignas mais frequentes em todo mundo, enquanto que o câncer de estômago passará a ser o oitavo mais frequente (QUANTE et al., 2016).

Na América do Norte a estimativa é de 27.600 novos casos de câncer de estômago que estavam previstos para ocorrer no ano de 2020 em ambos os sexos, já que as análises desses dados referem-se aos últimos 4 anos (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020). Além disso, 23.890 novos casos de câncer do sistema nervoso central e periférico foram estimados para o mesmo ano. (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2020).

No Brasil, dados epidemiológicos referentes às mortes por câncer, no período de 1996 a 2010, em ambos os sexos e em diferentes regiões do País, demonstraram que as neoplasias ainda continuam sendo a segunda causa de morte, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, que se destacam em relação às demais regiões brasileiras pelo aumento do número de casos com a doença (BARBOSA et al., 2015). Nesse contexto, em face da alta prevalência e mortalidade desta neoplasia, é imperativo o desenvolvimento de novas medidas terapêuticas para enfrentar a doença e contribuir para o aumento da sobrevida dos pacientes.

Entre as novas medidas terapêuticas investigadas contra o câncer, uma tendência é investigar o potencial antineoplásico de compostos provenientes de plantas, por meio de substâncias isoladas ou extratos de plantas que contêm compostos com efeitos antioxidantes, antitumorais, e antiinflamatórios. Por exemplo, já foi demonstrado que o extrato de *Morus nigra* que possui alto teor de 1-DNJ pode prevenir os efeitos carcinogênicos em modelo *in vitro* de câncer gástrico (TANG et al., 2020).

Outras substâncias isoladas de plantas, como a brosimina b proveniente da *Brosimum acutifolium*, podem apresentar efeito antineoplásico em linhagens de células de glioblastoma C6, alterando o padrão de migração e proliferação de células cancerígenas (MAUÉS et al., 2019). Sendo assim, esses estudos despertaram o nosso interesse em investigar o potencial antineoplásico de compostos isolados de outras plantas amazônicas, como a *Bagassa guianensis* Aubl. A *B. guianensis* é uma planta nativa da América do Sul bastante utilizada na indústria madeireira da região, pertencente à família Moraceae e possui um alto teor de aminosacarídeos, como o 1-DNJ, além de outros compostos bioativos como flavonóides e moracinas (ROYER et al., 2010).

Deste modo, sabendo que a *B. guianensis* pode produzir compostos bioativos capazes de combater os danos celulares induzidos pelo microambiente tumoral. O presente estudo busca avaliar o efeito da 1-DNJ contra o câncer, utilizando como modelo experimental linhagens de cultura células gástricas cancerígenas ACP02 e glioblastoma multiforme A172.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Considerações gerais

O câncer é uma das principais causas de morte por doenças não transmissíveis no mundo e continuará sendo umas das enfermidades que mais mata até 2030 (BRAY et al., 2012). O curso temporal da doença é caracterizado por estágios como iniciação, promoção e progressão de células tumorais, que são caracterizadas pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que contribuem para a proliferação e migração de células anormais que podem ter sofrido modificações genéticas e/ou epigenéticas e alterações no microambiente celular (KOH; HO; PAN, 2020).

O estágio de iniciação pode estar relacionado a agentes carcinogênicos que promovem mutações em células normais ocasionando dano ao DNA, alterações no número de cópias de DNA (CNAs) e alterações na expressão gênica (KOH; HO; PAN, 2020). Nesta fase, as lesões oxidativas também são importantes para a ocorrência de novas mutações, pois várias evidências mostram que a produção excessiva de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) é capaz de promover a proliferação de células cancerígenas favorecendo a progressão da doença (ASSI, 2017).

O aumento do estresse oxidativo está relacionado ao aumento excessivo da produção de radicais livres na célula como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e  $H_2O_2$ , que acaba sobrecarregando os sistemas de defesa antioxidante e que pode causar não só a morte de células normais, mas também a proliferação de células tumorais por vias diferentes das que ocorrem em condições homeostáticas (ASSI, 2017). O ânion superóxido encontra-se elevado em células cancerígenas e este radical é fundamental no processo de iniciação do câncer, uma vez que atua ativando vias de sinalização celular que levam a tumorigenesis, fatores de crescimento, diferenciação celular, morfogênese tecidual, angiogênese, metástase (SAIKOLAPPAN et al., 2019).

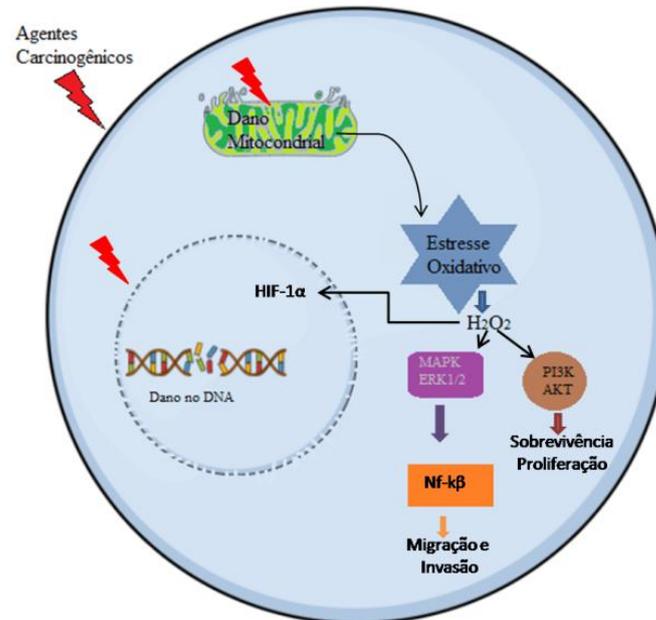
A produção excessiva de  $H_2O_2$  causa ativação de três vias de sinalizações bioquímicas importantes para o crescimento tumoral. A primeira é a via fosfatidilinositol 3-cinase PI3K/AKT que em células não neoplásicas são importante para crescimento e motilidade celular (TABIBZADEH, 2021). Essa via no câncer contribui para a proliferação celular evitando a morte por apoptose, assim como para invasão celular, sobrevivência e diferenciação das células tumorais (ZHANG et al., 2019).

Um ensaio *in vitro* em linhagens de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) usando o composto natural calicopterina isolado da planta *Dracocephalum kotschyi*, mostrou que este composto regula a via PI3K/AKT diminuindo a fosforização do AKT, cujo efeito pode estar associado com o aumento do número de células na fase G2 da mitose (G2/M), caracterizando parada no ciclo celular em comparação ao uso do inibidor LY294002 da via PI3K (ESMAEILI; FARIMANI; KIAEI, 2014). Em outros tipos de tumorais avaliados *in vitro*, como o câncer da vesícula biliar, também foi observado inibição da proliferação celular e aumento da apoptose, possivelmente regulada por essa via, quando tratadas com o composto natural dioscina isolado da espécie *Dioscorea sp* (SONG et al., 2017).

Além da via PI3K/AKT, outra via importante ativada por espécie reativas de oxigênio (EROS) no câncer é a via MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) e proteínas-serina/treoninas cinases tipo ERK<sup>1/2</sup>, que atua promovendo processos inflamatórios na célula dependente do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B) e alterando o microambiente celular (RAMALINGAM et al., 2020). Em cultura de células microgliais, um composto bioativo chamado de matairesinol foi capaz de proteger as células contra inflamação inibindo a via ERK1/2 e evitando que o NF- $\kappa$ B seja transportado para o núcleo promovendo inflamação (XU et al., 2017).

Por fim a terceira via envolve a ativação do fator indutor de hipóxia HIF-1 $\alpha$  que contribui para a sobrevivência das células cancerígenas durante privação de oxigênio e glicose (CORTES et al., 2019), (figura 1).

**Figura 1** - Esquema representativo dos mecanismos do processo de iniciação do câncer após exposição de uma célula normal a agentes carcinogênicos

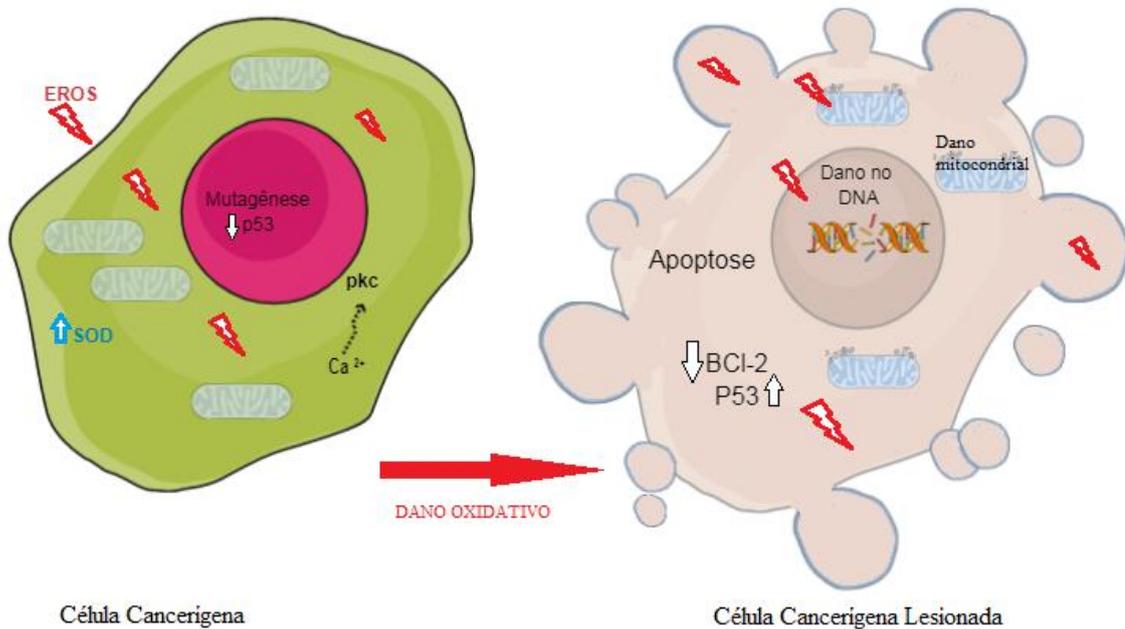


Legenda: No câncer as espécies reativas de oxigênio pode induzir a ativação de 3 vias importantes que favorecem a progressão do câncer como a via fosfatidilinositol 3-cinase PI3K/AKT que quando ativada promove a sobrevivência e proliferação. Também ativa a família de proteínas cinases MAPK/ERK 1/2 que favorece a migração e invasão celular. Além disso, ocorre a ativação do fator indutor de hipóxia HIF-1 $\alpha$ .

**Fonte:** Adaptado de KOH; HO; PAN, 2020.

Além da ativação dessas vias, as EROS no desenvolvimento da carcinogênese também contribuem para a regulação da resposta antioxidante, como através do fator nuclear do eritróide 2 (Nrf2), que nestas condições são translocados para o núcleo e contribuem com a produção de antioxidantes como a glutathiona (PERILLO et al., 2020). Isso mostra que as EROS ainda têm um efeito dual em células cancerígenas pela produção de estresse oxidativo que podem ocorrer mesmo em células cancerígenas. Assim, estudos com novas drogas podem induzir estresse oxidativo nessas células neoplásicas por sobrecarregando a atividade das enzimas antioxidantes, induzindo a morte celular e melhorando o prognóstico dos pacientes e impedindo a ativação de vias de sinalização que podem contribuir com o processo de tumorigênese (figura 2) (PERILLO et al., 2020).

**Figura 2** - Mecanismo de morte celular induzida por dano oxidativo em células cancerígenas



Legenda: A produção excessiva de EROS também pode promover a morte de células cancerígenas promovendo dano no DNA, dano mitocondrial, aumento da P53 e diminuição de proteínas como a Bcl-2 que pode levar a morte celular por apoptose.

**Fonte:** Adaptado de Perillo *et al.*, 2020.

A apoptose é caracterizada como morte celular programada que pode ser ativada por sinais externos ou internos e cujos sinais patológicos são o encolhimento celular, densificação do citoplasma e compactação das organelas (ELMORE, 2007). A fuga de mecanismos de morte celular por apoptose ou outros tipos de morte celular como necrose são muito evidentes em algumas neoplasias e a desregulação nesse processo pode favorecer a resistência a terapias farmacológicas, consequentemente, a progressão da doença (PISTRITTO *et al.*, 2016).

A cascata de sinais apoptóticos também foi descrita *in vitro* utilizando ovos do anfíbio *Xenopus laevis*, cultivados em tubos de ensaio, corados com o substrato da caspase 3/7 chamado de Z-DEVD-R110, um fluorocromo que ao ser misturado a esse sistema é hidrolisado pela caspase 3 e 7, revelando uma fluorescência que se espalha difusamente pelo citoplasma em uma velocidade constante (CHENG; FERRELL, 2018). Este experimento mostrou que a apoptose também pode ocorrer através de gatilhos autoregeneradores que englobam vários feedbacks positivos relacionados à ativação de proteínas citosólicas como caspase 3, 7, 9, Bax (proteína recombinante) e proteína BAK (CHENG; FERRELL, 2018).

Além dessas proteínas também foi relatada a proteína supressora tumoral p53 que no câncer apresenta-se mutada ou silenciada no câncer e está relacionada a apoptose e a parada do ciclo celular (WANG; SIMPSON; BROWN, 2015).

No processo de carcinogênese as mutações genéticas e instabilidades cromossômicas também contribuem para o processo de metástase que pode ser desencadeado pela invasão e migração destas células neoplásicas. A migração celular é uma das principais vias de investigação no câncer tanto para acompanhar a evolução da doença, quanto para avaliar a ação de fármacos que possam impedir o a migração celular. E o uso de compostos bioativos tem se mostrado promissor em modelos *in vitro* utilizando cultura de células de linhagens celulares cancerígenas.

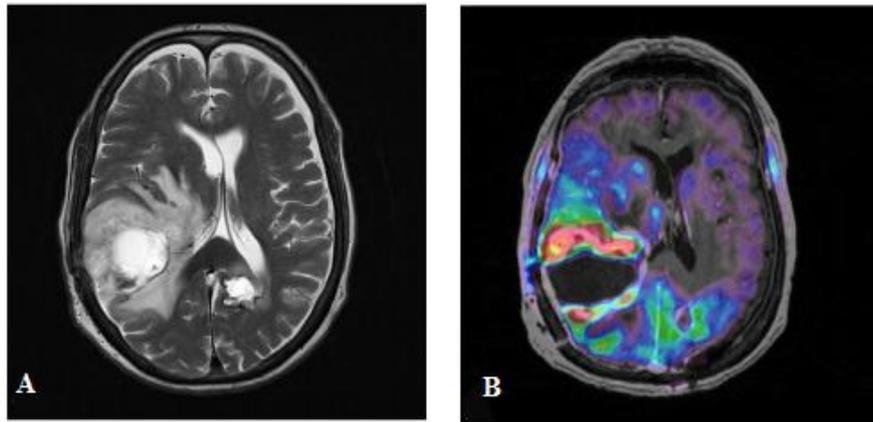
## 2.2. MODELOS DE CULTURAS DE CÉLULAS CANCERÍGENAS

### 2.2.1. Glioblastoma multiforme

As linhagens de células cancerígenas apresentam metabolismos similares aos tumores originais e, por isso, são bons modelos de estudo no combate ao câncer, principalmente no que se refere ao teste de novas drogas (BINDER et al., 2016). Uma das linhagens usadas em abordagens *in vitro* para o estudo de neoplasias que afetam o sistema nervoso são células derivadas de glioblastoma multiforme A172 isolado de um indivíduo adulto de 53 anos (KISELEVA et al., 2016; XIONG et al., 2019).

A origem celular do glioblastoma multiforme (GBM) ainda não está totalmente esclarecida, acredita-se que ele pode ser oriundo de células estaminais localizadas na substância branca subcortical, lobo temporal na zona subventricular e no giro denteado do hipocampo. As células cancerígenas dessas regiões podem se espalhar para outras áreas do encéfalo e é um tumor com alta resistência a radioterapia e a quimioterapia (OMURO, 2013; WIRSCHING; GALANIS, 2016) (figura 3).

**Figura 3** - Neuroimagem do glioblastoma.



Legenda: Em A, temos uma tomografia computadorizada de ressonância magnética, e em B, refere-se a uma tomografia (PET) pela emissão de pósitron  $^{18}\text{F}$ -fluoro-etil-tirosine (FET) mostrando a localização e a dimensão do tumor.

**Fonte :** Adaptada de Wirschingand Galanis (2016).

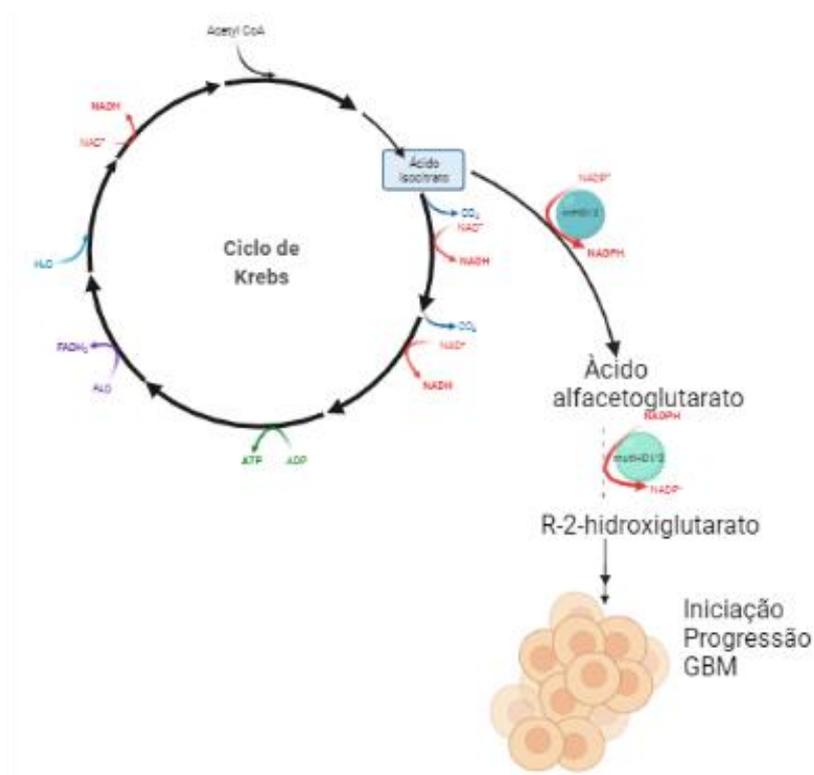
O glioblastoma é um câncer maligno cerebral primário que apresenta alta mortalidade quando comparado a outros cânceres do sistema nervoso central e periférico (OMURO, 2013). Os principais sintomas associados são dor de cabeça, aumento da pressão intracraniana e epilepsia secundária (GUAN et al., 2018). Além disso, estudos de casos revelaram que pacientes com GBM também apresentar transtornos psiquiátricos, que ainda em fase inicial do tumor, não são associados à neoplasia como sintomas de alteração de humor, déficit psicomotor e perda de apetite. Essas alterações provocadas pelo microambiente tumoral, muitas vezes não conseguem ser visualizadas no diagnóstico por imagens (LEO; FRODEY; RUGGIERI, 2020).

O GBM é o tumor mais comum do sistema nervoso central e atualmente são classificados molecularmente em tipo selvagem de isocitrato desidrogenase (HDI), com mutações de HDI e não específicos. São identificadas através de exames histopatológicos e por patogênese molecular por mutações no DNA, necrose pseudopapaliçada e proliferação endotelial (LOUIS et al., 2016; WIRSCHING; GALANIS, 2016). Essas alterações no gene HDI favorecem ativação de vias celulares que podem promover migração ou até mesmo reparo do DNA em GBM (VITOVCOVA et al., 2020).

A enzima isocitratodesidrogenase (HDI) é uma proteína fundamental para a respiração celular por participar da terceira etapa do ciclo do ácido cítrico e age como um catalisador da

reação de isocitrato para  $\alpha$ -cetogluturato, cuja conversão produz a forma reduzida de fosfato de dinucleotídeo nicotinamida e adenina ( $\text{NADP}^+$ ). Entretanto, a mutação de HDI promove o consumo de  $\text{NADP}^+$  e nestas condições ela converte o  $\alpha$ -cetogluturato em R-2-H-hidroxiogluturato (R-2-HG), que é presente em 70% dos GBM. O R-2-HG impede que prolil-hidroxilase 2 (PHD2) bloqueie a HIF-1 $\alpha$  (fator 1-alfa induzível por hipóxia) e favorece a iniciação e progressão do glioblastoma do tipo selvagem HDI (CLARK; YEN; MELLINGHOFF, 2016; WESTPHAL; LAMSZUS, 2011), (figura 4).

**Figura 4** - Desenho esquemático da conversão do  $\alpha$ -cetogluturato em R-2-H- hidroxiogluturato (R-2-HG) pela mutação da isocitratodesidrogenase.



Legenda: O ácido alfa-cetogluturato é convertido em R-2-hidroxiogluturato pelo consumo de  $\text{NADP}^+$  e essa conversão pode favorecer a iniciação e progressão do câncer.

**Fonte :** Dados da pesquisa (2021).

Além desta classificação o glioblastoma também subdivide-se em diferentes graus que variam de I a IV. O grau I é mais frequente em indivíduos acima de 50 anos, sendo caracterizado por um tumor benigno do tipo HDI selvagem; o grau II apresenta mutação HDI e é mais recorrente em indivíduos com idade inferior a 30 anos (LOUIS et al., 2016); o grau III apresenta mutação do gene HDI e é mais recorrente em indivíduos idosos. Já os de grau IV são os gliosarcoma, glioblastoma de células grandes e glioblastoma de células pequenas (OMURO, 2013), também são chamados de glioblastoma multiforme que apresentam mutação do HDI ou do tipo selvagem com grande ocorrência em adultos (VITOVCOVA et al., 2020).

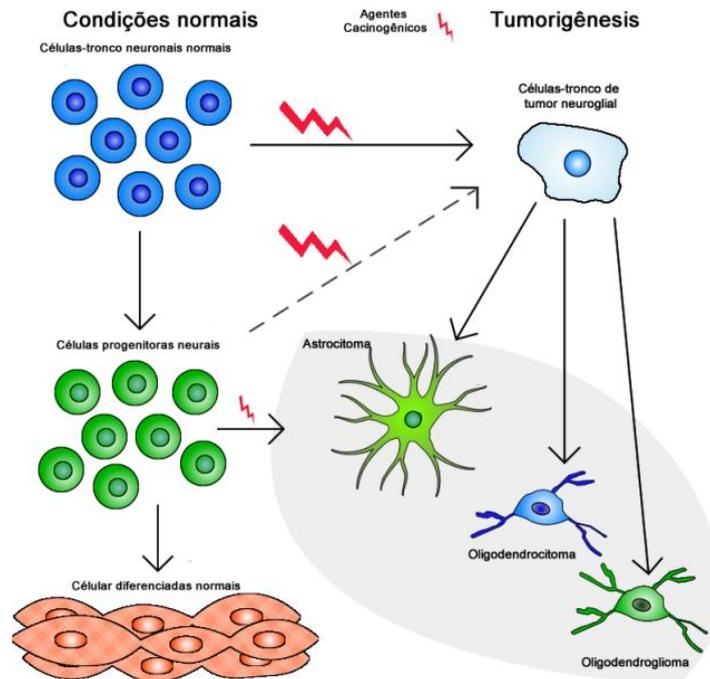
O GBM, conforme observa-se, possui uma grande heterogeneidade molecular e além das mutações HDI, podem apresentar alterações estruturais, como deleções no braço curto e longo dos cromossomos 1(1p) e 9 (9q), respectivamente, que levam a expressão de marcadores gliais, alta taxa de mitose, atipia nuclear, entre outros fatores que os tornam de alta malignidade (GRIMM; CHAMBERLAIN, 2016). Adicionalmente, foram encontradas mutações no gene do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (ESKILSSON et al., 2018), proteína tumoral 53 (TP53) (HAM et al., 2019) e deleção na neurofibronina tipo 1 (NF1) (FORTUNATO et al., 2018), os quais estimulam fenótipos malignos em GBM.

Essas mutações em GBM também favorecem alterações significativas que levam a via aeróbica de glicose, conhecida como efeito Warburg, no qual as células usam a lactato desidrogenase A para a produção de energia e lactato, com isso, evitam vias geradoras de estresse oxidativo (BAYLEY; DEVILEE, 2012; VALVONA et al., 2016). Assim, as espécies reativas de oxigênio no glioblastoma encontram-se naturalmente elevadas e favorecem estágios de iniciação do tumor, o que não ocorre em condições basais em células não neoplásicas (ORLICKA-PŁOCKA et al., 2021).

Além disso, o GBM possui uma constituição celular muito heterogênea, certamente, possui a presença de células infiltrantes no parênquima encefálico e que podem promover edema vasogênico (NARO; NOVERATI; CRAIG, 2020; VAN DEN BENT; CHANG, 2018).

Conforme figura 5, as células tumorais são originadas a partir de modificações genéticas em células-troncos neuronais normais. Esse processo de transformação confere aos clones celulares recém-modificados características tumorigênicas que podem favorecer invasão, migração e proliferação celular exacerbada (WESTPHAL; LAMSZUS, 2011).

**Figura 5** - Diferenciação de células troncos normais em células tronco de tumor neuroglial no processo de tumorigênese.



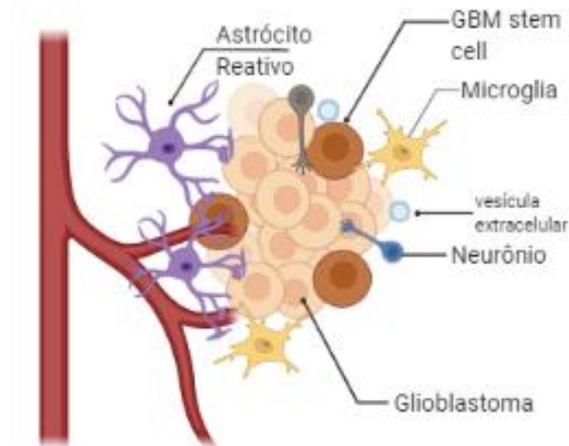
Legenda: A presença de agentes carcinogênicos promove alterações que podem induzir tumorigênese em células tronco normais e as transformando em células tronco de tumor e/ou agir nas células progenitoras neurais que podem se diferenciar em diversos tipos de câncer, se um deles o astrocitoma.

**Fonte:** Dados da pesquisa (2021).

Entre essas células presentes no GBM, podemos encontrar, no microambiente tumoral, astrócitos e outras células gliais que desempenham um papel fundamental na manutenção da homeostase iônica pela ativação de canais de cálcio e potássio na célula tumoral, que quando ativados contribuem com a progressão e iniciação deste tipo de tumor (GUAN et al., 2018).

Essa neoplásia pode ativar astrócitos associados ao tumor (AAT) que por sua vez irão contribuir com o processo de invasão celular em outros tecidos (BRANDAO et al., 2019). Recrutamento de outras células, como neurônios, células do sistema imunológico e componentes como vesículas extracelulares, que promovem a ativação da via PI3K/AKT (BRANDAO et al., 2019), (figura 6).

**Figura 6** - Constituição do microambiente celular do glioblastoma multiforme.



Legenda: Representação do microambiente tumoral do glioblastoma multiforme com presença de células do tipo neurônios, astrócitos, microglia, além da presença de vesículas extracelular e vasos sanguíneos.

**Fonte:** Dados da pesquisa (2021).

Ademais, o paciente portador do glioblastoma multiforme possui uma sobrevida baixa de pouco mais de um ano, mesmo com a disponibilidade de terapias como e a ressecção cirúrgica, ainda é necessário a busca de novos tratamentos, a fim de aumentar a taxa de sobrevida e as chances de cura do paciente (HANASHIMA et al., 2020).

### 2.2.2. Câncer gástrico

O câncer gástrico (CG) ainda é considerado um problema de saúde pública, visto que é a quinta patologia que mais mata em todo mundo, sendo mais prevalente em homens em relação às mulheres, (SMYTH et al., 2020). Em alguns países, observa-se a diminuição do número de casos de CG, tal fato pode estar relacionado a estratégias de prevenção que foram adotadas para o tratamento de indivíduos com infecção por *Helicobacter pylori*, a qual está presente em 90% dos pacientes diagnosticados com esse câncer (EUSEBI et al., 2020).

No Brasil, ainda é preocupante a taxa de mortalidade associada à essa patologia. Infelizmente, um dos principais fatores que corroboram o aparecimento do CG é modo de vida da população, tal como a peculiaridades gastronômicas, que por vezes são alimentos ricos em nitritos e nitratos (DE SOUZA GIUSTI et al., 2016), tendo em vista que uma dieta pobre em vegetais e o consumo excessivo de alimentos salgados podem contribuir com o aparecimento do câncer gástrico (STRONG, 2018).

Na região norte do Brasil, o câncer de estômago é o segundo mais frequente. Conforme o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima-se, para o triênio de 2020 a 2022, que o número de novos casos seja maior em homens do que em mulheres (INCA, 2020). Esse tipo de câncer é comumente encontrado na região estomacal, órgão fundamental no processo digestivo que compreende 3 regiões, cárdia, corpo e antro (ENGEVIK; KAJI; GOLDENRING, 2020).

Um dos tipos de câncer gástrico mais recorrente é o adenocarcinoma gástrico, que apresentam alterações histopatológicas e genotípicas importantes para a progressão do tumor que prejudicam diversas áreas do estômago (AJANI et al., 2017). Esta neoplasia, que inicia-se em células glandulares do estômago, caracteriza-se por ser de alta malignidade, com baixa sobrevida e pode afetar indivíduos a partir dos 40 anos (YAKIREVICH; RESNICK, 2013), que, no geral, podem apresentar o diagnóstico tardio, contribuindo com um prognóstico ruim devido ao potencial de invasão e metástase (YOUN et al., 2010). Uma das principais medidas de tratamento é o combate à infecção por *H. pylori* ou em estadiamentos mais avançados do tumor faz-se necessário uso da ressecção cirúrgica acompanhada de quimioterapia e radioterapia (AJANI et al., 2017).

Anatomicamente o adenocarcinoma, pode ser subdividido em 3 subtipos chamados: cárdia; não cárdia (fundo, corpo, antro curvatura pilórica menor e maior) e intestinal (THRIFT; EL-SERAG, 2020). Esse tumor ainda é classificado em tipo I, II e III. O tipo I é

localizado na área esofágica. Já o subtipo II é mais comum na área esofágica e cárdia e o tipo III são localizados na área de cárdia e corpo do estômago (AJANI et al., 2017).

Conforme a classificação histológica de Láuren, o adenocarcinoma é dividido em intestinal e difuso (LÁUREN, 1965). O adenocarcinoma do tipo intestinal está mais localizado na região antral e pilórica que compreende a região distal do estômago e apresenta um crescimento glandular (VAN DER POST et al., 2019), enquanto que tipo difuso é encontrado na região proximal do estômago e compreende em células que tem capacidade de infiltrar difusamente no estroma e podem apresentar infiltração profunda na parede deste órgão (ANSARI et al., 2018; ASSUMPCÃO et al., 2020).

Vários grupos de pesquisa buscam montar banco de células para estudar o perfil de células provenientes de câncer gástrico. Em nosso grupo foi possível obter novas linhagens de células de adenocarcinoma, como a ACP02 que é classificado como tipo difuso (LEAL et al., 2009b) que tem sido um excelente modelo *in vitro* para avaliar o papel das combinações de fármacos como alvos terapêuticos contra a progressão e iniciação desta neoplasia (PORFÍRIO-DIAS et al., 2020)

Assumpção e colaboradores (2020) mostraram em sua revisão que, apesar de ainda ocorrer uma generalização de classificação do adenocarcinoma entre os tipos difusos e intestinais, é importante compreender que existem diferenças entre os dois tipos como: localização, epidemiologia, prognósticos, alterações moleculares e infecção por períodos prolongados de *H. pylori*.

Estudos também têm demonstrando que compostos bioativos presentes nos extratos de plantas são capazes de induzir morte celular e impedir a migração e proliferação das linhagens de células acp02 (CALANDRINI DE AZEVEDO et al., 2020; SERPELONI et al., 2020).

O uso de plantas para tratamento de sintomas gástricos é amplamente utilizado pela população por meio de chás ou infusões e muitas dessas espécies de plantas utilizadas apresentam importância clínica, principalmente por combater e prevenir a infecção por de *H. pylori* e conseqüentemente podem atuar como prevenção de aparecimento de neoplasias, já que como mencionado a infecção por esta bactéria é um dos preditivo importante para o desenvolvimento do adenocarcinoma gástrico (SAVARIN; BERGMANN, 2017).

### 2.3. Produtos naturais anticancerígenos

A medicina alternativa tem sido mundialmente utilizada como uma via de tratamento anticancerígeno, que pode se dar, pelo uso de produtos naturais, principalmente os provenientes de plantas que podem contribuir com o tratamento oncológico em conjunto com as quimioterapias e radioterapias, a fim de promover a redução de sintomas e visar o bem-estar do paciente (FARAHMAND et al., 2016).

Os produtos naturais são compostos derivados de microrganismos e/ou vegetais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003). Nos vegetais esses compostos podem possuir propriedades bioativas com inúmeras funções importantes no metabolismo da planta, como por exemplo, nas vias de sinalização celulares, no processo de fotossíntese e até mesmo na defesa contra pragas (OSBOURN; LANZOTTI, 2009).

No câncer, os compostos bioativos tem sido amplamente utilizado como agentes para a promoção a quimioprevenção, que é caracterizada pelo uso de compostos bioativos que ajudam a combater os processos carcinogênicos (KO; MOON, 2015). Algumas classes de substâncias como os alcalóides da espécie *Catharanthus roseus* (Vinca), as epipodofilotoxinas bioativos da *Podophyllum peltatum* (mandrágora americana), e as substâncias paclitaxel e docetaxel presentes na espécie *Taxusbaccata* (Teixo) são uns dos primeiros compostos já considerados como quimioterápicos e também são quimiopreventivos, pois provocam parada no ciclo celular de replicação e inibição dos microtúbulos de células cancerígenas (DESAI et al., 2008), principalmente a lignana extraída da mandrágora, que impede a polimerização da tubulina e como consequência provoca a parada no ciclo celular na metáfase em células cancerígenas (ZHANG et al., 2018b).

Os alcalóides de Vinca, apesar da sua citotoxicidade e várias reações adversas já relatadas e outras substâncias como paclitaxel e docetaxel são os mais usados contra a carcinogênese (MOUDI et al., 2013), já existem 4 tipos de alcalóides de Vinca aprovados nos Estados Unidos e na Europa para o tratamento oncológico do câncer, como os linfomas de Hodgkin e não-Hodgkin (MOUDI et al., 2013).

Além disso, os alcalóides de Vinca também podem atuar contra câncer do sistema nervoso por meio da combinação com avincristina como um inibidor seletivo para a serina/treonina cinase (PLk1), que podem promover apoptose pela ativação da caspase 3 e 9 através da inativação de Bcl2, além de inibir o crescimento celular em linhagens de células de neuroblastoma (CZAPLINSKI et al., 2016).

Outras espécies de plantas, como as da família Moraceae apresentam vários metabólitos secundários e primários que podem ser utilizados contra o câncer com potencial antineoplásico (LEE et al., 2016; ORACZ et al., 2020). Estudos evidenciam que uma dieta rica em compostos secundários juntamente com o tratamento da medicina tradicional pode ser uma excelente estratégia no tratamento do câncer (TOMKO et al., 2020).

Uma dessas plantas pertencente a família moraceae é o *Ficus hispida* Lf (figo tropical), ele apresenta 5 compostos bioativos isolados que são capazes de produzir efeitos citotóxicos em linhagens de células de leucemia humana (ZHANG et al., 2018a).

No figo também encontramos o flavonoide, como a morin, que possui efeitos antiproliferativos e reduz a adesão celular de adenocarcinoma de mama pela inibição da expressão de fatores pró-inflamatórios e da redução da expressão da molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1) promovendo uma ação antimetástática (LEE et al., 2016).

Estudos demonstram que o extrato *Morus nigra* L. (amoreira negra) é eficaz contra o adenocarcinoma de próstata, promovendo parada do ciclo celular na fase G1, morte celular pela via intrínseca da apoptose desencadeada pelo o aumento da atividade da caspase 3/7 (TURAN et al., 2017).

A *Morus sp* possui uma variedade de compostos bioativos que podem atuar como antioxidantes (IQBAL et al., 2012), anti-hiperglicêmicos (YAZDANKHAH; HOJJATI; AZIZI, 2019), anti-inflamatórios (DE PÁDUA LÚCIO et al., 2018) e anticancerígeno (TURAN et al., 2017).

A 1-desoxinojimiricina (1-DNJ) é composto bioativo também encontrado nas folhas *Morus sp* (MARCHETTI et al., 2021) e pode também ser sintetizado por bactérias do tipo *Bacillus velezensis* (LEE et al., 2021), insetos como bicho-da-seda (YIN et al., 2010), entretanto ainda não são considerados métodos de alto rendimento (PARIDA et al., 2019), como o obtido pela primeira vez na *Bagassa guianensis* (PINHEIRO, 2021). Nossos estudos mostram os efeitos biológicos da 1-DNJ em linhagens celulares de câncer, a partir do isolamento de alto rendimento da espécie *Bagassa guianensis*.

### 2.3.1. Caracterização da espécie *Bagassa guianensis* Aubl (Tatajuba)

A *Bagassa guianensis* Aubl é popularmente conhecida como Tatajuba, uma árvore que mede aproximadamente 30 a 50 metros de altura e está presente em várias regiões do

Brasil, como na região Norte (Estados do Pará, Amapá, Rondônia, Roraima) e Nordeste (Maranhão) do país. Esta espécie tem sido amplamente explorada para fins madeireiros e pode apresentar propriedades medicinais (ROYER et al., 2010) (figura 7).

**Figura 7** – Foto da planta *Bagassa guienensses*



**Fonte:** Imagem cedida de acervo pessoal

Hodiernamente, essa espécie está classificada na família Moraceae, a qual apresenta uma variedade de compostos bioativos (BOSSU *et al.*, 2016). A organização das células vegetais, localizada no cerne dessa planta, contribuem para a maior durabilidade da madeira, prolongando a sua vida útil, sendo essa uma característica importante para o extrativismo vegetal (BOSSU *et al.*, 2016; ROYER *et al.*, 2012). Essa durabilidade é conferida pela presença de uma classe de compostos chamados de estibenos (SCHULTZ *et al.*, 1990).

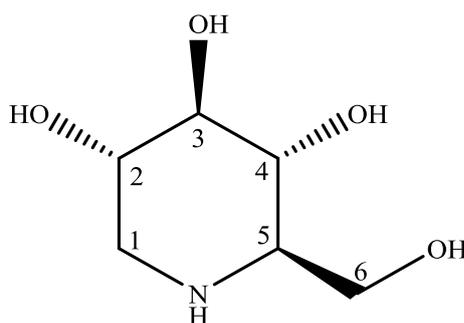
Ainda existem poucos estudos sobre a *Bagassa guienensses* e, por isso, as descobertas de novos compostos bioativos a partir de seus metabólitos são extremamente relevantes, pois é possível o reaproveitamento da madeira para fins medicinais. Algumas substâncias já foram encontradas nessa planta, são eles: os compostos bioativos com propriedades antioxidantes (NAIK *et al.*, 2015), antitumorais (GEORGE; DELLAIRE; RUPASINGHE, 2017) e anti-inflamatórios (NYAMBE *et al.*, 2019) e, assim, podem ter grande potencial na terapia anticâncer.

Nesta planta, alguns compostos bioativos permanecem mesmo após dias da coleta do material proveniente de resíduo madeireiro, tal como os compostos metabólitos secundários 2-aril-benzofuranos, flavonóides, como a flavanona eucronona A7 (S2), estibenos, a substância 3,5-diidroxibenzoico (A4), aminoaçúcares, como a 1-desoxinojirimicina (Pinheiro, 2016), e moracinas (ROYER et al., 2010).

A 1-DNJ é um composto fitoquímico (figura 8), análogo da D-glicose, que apresenta um anel piperidínico e pertence a classe do iminociclitol (HONG et al., 2021; NAKAGAWA et al., 2007). A 1-DNJ é composto bioativo inibidor da  $\alpha$ -glucosidase intestinal (YU et al., 2012), uma vez que compete pelo seu sítio ativo, impedindo a ligação do carboidrato a proteína  $\alpha$ -glucosidase e promovendo a redução da absorção da glicose, desta forma, impede a digestão e/ou conversão de dissacarídeos em monossacarídeos no intestino, impedindo o aumento das taxas glicêmicas (HOSSAIN et al., 2020).

Análises de sangue, provenientes de modelos animais de diabetes tipo 2 que apresentavam mutação do receptor leptina, mostraram que o tratamento com 1-DNJ melhora o quadro hiperglicêmico desses animais pela ativação da via PI3K/AKT e a inibição da  $\alpha$ -glucosidase (LIU et al., 2015).

**Figura 8** - Fórmula estrutural da 1-Desoxinojirimicina.



**Fonte:** Dados da pesquisa (2021)

Alterações da via PI3K/AKT/MTOR são frequentes em indivíduos com diabetes tipo 2 (ZONCU; EFEYAN; SABATINI, 2011). Alguns fármacos, que atuam como inibidores desta via, como o medicamento Metformina, usado no tratamento da diabetes, também têm sido estudados em modelos animais pelos indícios de sua atividade anticâncer em processos de migração e progressão celular (CHEN; LI; WANG, 2020; LV; GUO, 2020). Além disso,

outro medicamento aprovado para o tratamento da doença de Gaucher, chamado de Miglustat (Zavesca<sup>TM</sup>), tem como precursor a 1-DNJ e apresenta efeitos anticancerígenos no glioma do tipo difuso (WINGERTER et al., 2021). Esses achados na literatura mostram que o Miglustat quando absorvido apresenta maior concentração no cérebro do que em outros órgãos (TREIBER; MORAND; CLOZEL, 2007).

Ademais, ensaios experimentais com administração oral de 1-DNJ na dose 110mg/kg em camundongos mostraram que este bioativo é rapidamente absorvido após 30 minutos da administração. Logo, é possível que ela seja absorvida por todo trato gastrointestinal sem degradação da sua molécula, e logo é excretado pelo organismo (NAKAGAWA et al., 2007).

Além dos seus efeitos antiglicêmicos, a 1-DNJ tem apresentando efeitos antimetastáticos em células cancerígenas, como observado em ensaio de culturas de células de melanoma, no qual o composto bioativo reduziu significativamente a expressão de proteínas de adesão, impediu a migração e invasão do celular (WANG; YANG; HU, 2010).

A 1-DNJ também promove estresse no retículo endoplasmático pela inibição da alfa-1,2-monosidases em testes realizados em culturas de células de hepatocarcinoma humano resultando em morte celular impedindo sua progressão (LU et al., 2006). Essas evidências científicas reforçam o quanto é necessários mais estudos acerca da ação da 1-DNJ no câncer, justamente por se apresentar tão promissor e como um ótimo candidato no tratamento de neoplasias malignas.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Avaliar o efeito do 1-desoxinojirimicina proveniente da espécie *Bagassa guianensis* Aubl. como agente antineoplásico em linhagens de células de câncer gástrico e glioma

#### 3.2. Específicos

- Obtenção da 1-DNJ a partir do resíduo madeireiro da *B. guianensis*
- Verificar o efeito citotóxico de diferentes concentrações de 1-DNJ na viabilidade de culturas de células de câncer gástrico e glioblastoma;
- Avaliar o efeito da 1-DNJ na viabilidade celular de células não neoplásicas de fibroblasto MRC5
- Analisar padrões de alterações na cinética do ciclo celular de células cancerígenas ACP02 e A172 tratadas com o 1-DNJ;
- Analisar o padrão de morte celular por Apoptose / Necrose induzido por 1-DNJ nas linhagens celulares ACP02 e A172.
- Avaliar a capacidade inibitória de 1-DNJ no padrão de migração celular na linhagem ACP02 e A172.
- Avaliar os efeitos da 1-DNJ na produção de ânion superóxido nas linhagens MRC5, ACP02 e A172.
- Avaliar a capacidade antioxidante no sequestro de radicais livres em sistemas livres de células.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Obtenção da 1-desoxinojirimicina isolada da planta *Bagassa guianensis* Aubl.

Para o isolamento da 1-desoxinojirimicina foram obtidos 500g de resíduo da casca do caule da *Bagassa guianensis* Aubl proveniente de silvicultura. O material seco e macerado foi cedido pelo laboratório central de extração da Universidade Federal do Pará.

A extração foi realizada de 500g de resíduo da casca moída utilizando extração etanoica com etanol 96 °Gl de 24 em 24 horas. Após cada período a amostra foi filtrada e o conteúdo extraído presente no solvente foi reservado e logo em seguida submetidos a concentração do extrato por rotaevaporação. A amostra resultante da rotaevaporação foi novamente pesada e submetida à secagem em capela, obtendo ao final 50g de extrato bruto e seco.

O extrato bruto foi submetido ao fracionamento seguido de isolamento da substância em coluna cromatográfica de via úmida (CCVU) utilizando uma fase estacionária de sílica e uma fase móvel com solventes na proporção 1:1 de acetona e metanol que foram passados 2 vezes na coluna cromatográfica. Para o total isolamento da substância em coluna foi adicionado somente metanol na fase estacionária. A amostra obtida na CCVU foi seca em capela, obtendo um rendimento de 10g de substância isolada e a confirmação da sua molécula foi realizada em ressonância magnética nuclear

#### 4.2. Culturas secundárias de linhagens cancerígenas e não neoplásicas.

Para o desenvolvimento das culturas de células secundárias de linhagens celulares cancerígenas foram utilizadas as células: A172 (tumor astrocítico grau IV/ glioblastoma multiforme) que foram, gentilmente, doadas pelo laboratório de citopatologia clínica da faculdade de ciências farmacêuticas da Universidade Federal de São Paulo; e o adenocarcinoma gástrico primário ACP02 desenvolvida e estabelecida pelo próprio grupo no laboratório de citogenética humana da Universidade Federal do Pará (UFPA) (LEAL et al., 2009c) e a linhagem celular MRC5 (fibroblasto de pulmão humano), do núcleo de oncologia da UFPA, como modelos de culturas não neoplásicas.

Em condições assépticas, as linhagens celulares foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> previamente tratadas e livre de RNAases, com meio de cultura contendo 10% de soro bovino fetal (SBF), utilizou-se o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium F12* (DMEM-F12) para a linhagem gástrica ACP02 e meio DMEM para as linhagens de glioblastoma A172 e MRC5, suplementado com 0.1% de antibiótico e antimicótico (Gibco). As garrafas foram mantidas em estufa com atmosfera de 95% de O<sub>2</sub> e 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C até a obtenção da confluência ideal para a realização dos experimentos.

Após atingir a confluência, as garrafas de cultura foram submetidas à dissociação química com solução de tripsina 0.25% (ACP02 e MRC5) e 0.125% com EDTA a 0.02% (A172) diluídas em Tampão Fosfato Salino (PBS, do acrônimo em inglês *Phosphate Buffered Saline*) por 3 min em estufa de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, foram inativadas com meio de cultura seguido de uma dissociação mecânica com sucessivas aspirações com pipetador e foi realizada a contagem de células em câmara de Neubauer para posterior plaqueamento e tratamento com 1-DNJ em placas de culturas

### 4.3.Efeito da 1-desoxinojimericina na viabilidade celular de linhagem cancerígenas

A avaliação do efeito do composto 1-desoxinojimericina nas linhagens celulares foi obtida pela técnica de viabilidade celular. Primeiramente, as linhagens foram plaqueadas em placas de 96 poços contendo 3 mil células por poço para MRC5 e ACP02, enquanto para a linhagem glial A172 foi plaqueada cinco mil células por poço. As culturas foram utilizadas após atingirem a confluência mínima de 70%, ao atingir essa confluência as células foram tratadas com as seguintes concentrações de 1-DNJ: 0,5; 1; 2; 4;6;8;12;16;18;24 e 32 mM, diluída em 0.01% de dimetilsulfóxido (DMSO) em meio DMEM/F12 para a linhagem ACP02, MRC5 e DMEM para a A172 (ambas as soluções continham 5% Soro Bovino Fetal). As culturas foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> por 72h até a análise da viabilidade celular.

Após o intervalo de tratamento de 72h com o composto natural 1-DNJ, as culturas foram submetidas à análise colorimétrica com o corante *Thiazolil Blue Tretazolium* (MTT) para avaliar a viabilidade celular. Essa técnica baseia-se na capacidade de que as células viáveis apresentam de reduzir a forma oxidada do MTT a um composto de cor azulada. A análise desta redução é feita com auxílio de um aparelho de espectrofotometria em um comprimento de onda de 570nm (WILSON; SPIER, 1987).

Para a realização do experimento, o meio de incubação foi descartado e as células foram lavadas com PBS estéril para posterior adição de 200 µl de MTT (0.5mg/ml) seguida de incubação por 3 h em estufa de CO<sub>2</sub>. Após este período, as células foram homogeneizadas com DMSO para solubilizar os cristais de formazan para permitir leituras da absorbância em espectrofotômetro de microplaca no comprimento de onda de 570nm, sendo o branco da reação de DMSO.

Também a partir dos resultados obtidos pelo MTT, foi possível medir o índice de seletividade da 1-DNJ nas linhagens de celulares através da razão do ic<sub>50</sub> obtido por regressão não linear da cultura de células normais no caso MRC5 pelo ic<sub>50</sub> das linhagens de células cancerígenas A172 e /ou ACP02. Os dados obtidos deste índice determinam a seletividade da droga que deve ser igual ou superior a 3 (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021).

As análises dos dados foram realizadas pelo programada Grafpad prisma 5.0 por Anova a um critério, seguida de pós-teste tukey e foi considerado um p valor  $\leq 0.05$ , o

experimento foi feito em triplicata. E a medida do ic50 foi analisada pelo teste de regressão não linear, dose reposta inibitória.

#### **4.4.Avaliação do ciclo celular por citometria de fluxo.**

Para avaliar o efeito do composto 1-DNJ no ciclo celular das linhagens ACP02 e A172, as células foram plaqueadas em placas de 12 poços, com uma densidade de um milhão de células/poço. Após 24h de plaqueamento e aderência das células, as culturas foram tratadas com o 1-DNJ (9.6 e 19.3 mM para o câncer gástrico ACP02 e 2.6 e 5.3 mM para o glioblastoma A172), já as culturas controles ficaram sem tratamento, contendo apenas meio com soro bovino fetal a 5% por 72h e mantidas em estufa com ar atmosférico contendo 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> a 37° C.

Posteriormente, as culturas foram lavadas com PBS, seguida de tripsinização por 3 minutos em estufa de CO<sub>2</sub> e coradas com 50µg/mL de iodeto de propídeo por, no mínimo, 12h para análise de dez mil eventos em citometria de fluxo (BD FACSVerse™), conforme descrito por Keyvanloo Shahrestanaki e colaboradores (2019), sendo considerado um n amostral de 4 por grupo.

As análises dos dados foram realizadas pelo programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software) por anova a dois critérios de Matching e foi considerado um p valor  $\leq 0.05$ , o experimento foi feito em triplicata.

#### **4.5. Ensaio de apoptose e necrose por coloração diferencial de brometo de etídio / laranja de acridina.**

O ensaio de apoptose e necrose foi realizado pelo método do brometo de etídio/laranja de acridina, que consiste em diferenciar as células viáveis das células em processo de morte celular. Para avaliar o efeito da 1-DNJ no padrão de morte celular após o tratamento nas linhagens ACP02 e A172, utilizou-se o corante laranja de acridina (LA), que é capaz de atravessar as membranas celulares intactas promovendo a intercalação com o DNA, emitindo, assim, uma fluorescência de cor verde no núcleo. Para a marcação do núcleo em células em processo de morte celular, no qual há a degradação da membrana celular, foi usado o corante fluorescente brometo de etídio (BE), que intercala ao DNA das células em processo de morte celular e emite uma fluorescência de coloração vermelha.

As células foram cultivadas em placas de 12 poços a uma densidade de dez mil células/poço e mantidas por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C para aderência. Após este período, foi realizado o tratamento com a droga nas concentrações correspondentes à CI50 e à metade da CI50 para a linhagem A-172 e ACP02 em triplicata por 72 horas. O controle negativo não foi tratado.

Após a incubação, o sobrenadante foi coletado em um tubo de 2 mL e as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 15 µL *Phosphate Buffered Saline* (PBS). Em seguida, foi adicionado 1 µL da solução de BE:LA ao tubo e preparada a lâmina para contagem em microscópio de fluorescência. Foram contadas 300 células de cada amostra para quantificar o percentual de eventos celulares (viáveis, apoptóticas e necróticas).

Para a análise de dados, foram obtidos a média e o erro padrão dos três experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre os grupos, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

#### 4.6. Ensaio de migração celular pelo teste de wound healing.

O teste *Wound healing* foi realizado para avaliar o potencial migratório das linhagens de células cancerígenas durante o tratamento com 1-DNJ nas concentrações de 19,3 mM e 9,6mM para as células ACP02 e 5,3mM e 2,6mM para células A172. Além disso, nesse ensaio, também, foram utilizadas culturas de células controle contendo as linhagens sem o tratamento com 1-DNJ. Para ambos os tratamentos foi considerado um n = 3 por grupo.

No plaqueamento das culturas foram adicionadas duzentos mil células por poço em uma placa de 12 poços. Após atingir a confluência, as placas de cultura foram preparadas para o ensaio, no qual foi feito um “risco” com uma ponteira de 10 $\mu$ l no interior da placa. Posteriormente, a placa foi lavada, cuidadosamente, com meio de cultura para retirar as células que podem ter se soltado, deixando a área do risco livre de células para a melhor visualização do processo migratório.

Em seguida, as culturas foram tratadas com 1-DNJ nas concentrações equivalentes para cada linhagem. Após o tratamento com 1-DNJ, as placas de cultura foram levadas ao microscópio invertido para o registro fotográfico do padrão de migração das células a partir do “risco” realizado nos tempos de 0h (logo imediatamente após o tratamento), 6h, 12h, 24h, 36h e 48h para a linhagem ACP02 e A172 de tratamento e/ou controles. Posteriormente, a fim de mediar as áreas do “risco” utilizou-se o software ImageJ para avaliar a diminuição desta área ao longo do tempo com ou sem tratamento.

Os dados foram comparados por ANOVA a dois critérios seguida por Teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

#### **4.7. Determinação da produção intracelular de ânion superóxido nas linhagens celulares tratadas com 1-DNJ.**

Para determinar a produção intracelular de ânion superóxido foi utilizado o ensaio de quantificação de *Nitro Blue Tetrazolium* (NBT) adaptado de Choiet *al* (2006). O NBT apresenta coloração amarela e em contato com oxigênio reativo em meio intracelular ( $O_2^-$ ) é reduzido a formazam de NBT apresentando coloração púrpura. Esses cristais de formazam podem ser solubilizados na presença de hidróxido de potássio 2M e DMSO e quantificado em espectrofotômetro de microplaca usando comprimento de onda de 620 nm (WILSON; SPIER, 1987).

Foi preparado uma solução de 1mg/ml de NBT protegida da luz para serem adicionados em culturas previamente tratadas por 72h com 1-DNJ nas concentrações de 9,6 e 19,3 mM para ACP02 e 2.6 e 5.3 para A172. Adicionalmente, também foram utilizadas culturas controles sem tratamento com 1-DNJ.

Para isso, as placas de culturas foram cuidadosamente lavadas com PBS e adicionado 100  $\mu$ l de NBT e as células foram incubadas por 2h. Em seguida, o meio de incubação foi removido e as células foram novamente lavadas com PBS e rapidamente lavadas com metanol para fixação, seguida de solubilização da membrana celular com 2M hidróxido de potássio e acrescido DMSO para solubilização dos cristais. Posteriormente, foi feita leitura das microplacas por espectrofotômetro em um comprimento de onda de 620 nm.

As análises dos dados foram comparadas no Prisma 5.0 (GraphPad Software) por anova a um critério seguida de pós-teste tukey e foi considerado um p valor  $\leq 0.05$  e o experimento foi feito em triplicata.

#### 4.8. Ensaio da capacidade antioxidante pelo sequestro do cátion radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

Foi avaliado a atividade do sequestro dos cátions radicais  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  pela 1-DNJ, os dados foram determinados por espectrofotometria, utilizando leitor de ELISA EspectraMax i3 a partir da adaptação do método descrito por Sridhar Charles (2019).

Para isso, foi preparada uma solução estoque de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  produzida por uma reação da solução aquosa do sal diamônio-2,2'-Azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) – ABTS (7 mM) com solução aquosa 140 mM de persulfato de potássio. Após 16 horas de reação a solução foi utilizada nos testes.

A capacidade antioxidante da 1-DNJ foi determinada a partir do decaimento da absorbância nas concentrações de 10 a 1000  $\mu\text{M}$  de 1-DNJ e antioxidante padrão trolox, nas mesmas concentrações, com a solução de ABTS após 16h de reação. A mistura foi incubada no escuro por 10 minutos e suas absorbâncias determinadas no comprimento de onda de 734 nm.

As análises dos dados foram comparadas no Prisma 5.0 (GraphPad Software) por anova a dois critério seguido de pós-teste Bonferroni e foi considerado um p valor  $\leq 0.05$  e o experimento foi feito em triplicata. Para a obtenção do  $\text{ic}_{50}$  utilizamos o teste de regressão não-linear.

#### **4.9. Ensaio da capacidade antioxidante pelo sequestro do radical dpph•**

Para a avaliação da capacidade antioxidante da 1-DNJ em sequestrar os radicais DPPH• (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) utilizamos o método adaptado descrito por Sridhar Charles (2019). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria em microplaca de 96 poços.

Neste ensaio foi preparado uma solução de 120 mM de DPPH, que foi utilizado na curva padrão de DPPH nas concentrações de 0 a 60  $\mu$ M. Também utilizamos como padrão a solução de Trolox nas concentrações de 10 a 1000  $\mu$ M. A 1-DNJ foi diluída em solução aquosa nas concentrações de 10 a 1000 $\mu$ M. Para o branco da reação utilizamos metanol e/ou água e os controles positivos 1-DNJ/água, DPPH/metanol e trolox/metanol.

As diferentes concentrações de 1-DNJ e ou Trolox foram incubadas por 30 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Após o período de incubação as absorbâncias das soluções foram obtidas adotando comprimento de onda de 517 nm. Os resultados foram expressos como a concentração efetiva para o sequestro da metade dos radicais livres (IC50). Os experimentos foram conduzidos em triplicata e as análises dos dados foram comparadas no Prisma 5.0 (GraphPad Software) por anova a dois critérios seguidos de pós-teste de Bonferroni e foi considerado um p valor  $\leq 0.05$  e o experimento foi feito em triplicata. Para a obtenção do ic50 utilizamos o teste de regressão não-linear.

#### **4.10. Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Para análise estatística utilizamos análise de variância (ANOVA) a 1 e/ou 2 critérios. A significância estatística foi estabelecida em 0.05 (95% de significância) e todos os experimentos foram realizados em triplicata.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. 1-DNJ promove redução da viabilidade celular em culturas de células cancerígenas

A substância 1-desoxinojirimicina apresenta um padrão de redução de viabilidade celular diferente quando se compara o efeito nas linhagens de células cancerígenas e normais. Observamos que na linhagem celular não neoplásica de fibroblasto MRC5 não houve uma redução da viabilidade celular nas concentrações (0.5 mM até 18 mM), já nas concentrações de 24 mM ( $0.03 \pm 0.003\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $F = 77.14$ ) e 32mM ( $0.001 \pm 0.0017\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $F = 77.14$ ) (figura 9) houve uma redução significativa da viabilidade em comparação ao seu controle negativo. Desta forma, a concentração inibitória necessária para inibir a atividade celular em 50% (ic50) para a linhagem MRC5 foi de 21.8mM ( $R^2 0.9145$ ,  $p \leq 0.0001$ , Tabela 1).

Também conseguimos obter o índice de seletividade da 1-DNJ nas linhagens de células cancerígenas A172 e AC02 em função da razão dos seus respectivos ic50 com o ic50 da linhagem de células normais MRC5. A linhagem A172 apresentou um índice de seletividade de 4,13, quanto que a ACP02 apresentou um índice de 1,13. Os resultados mostram que a 1-DNJ apresenta maior seletividade para a linhagem A172 e não apresenta seletividade para ACP02 segundos os valores de referência para o índice de seletividade que deve ser igual ou superior a 3, Tabela 1 (INDRAYANTO; PUTRA; SUHUD, 2021).

**Tabela 1** - Máxima concentração inibitória e seletividade da substância isolada 1-DNJ em linhagens celulares.

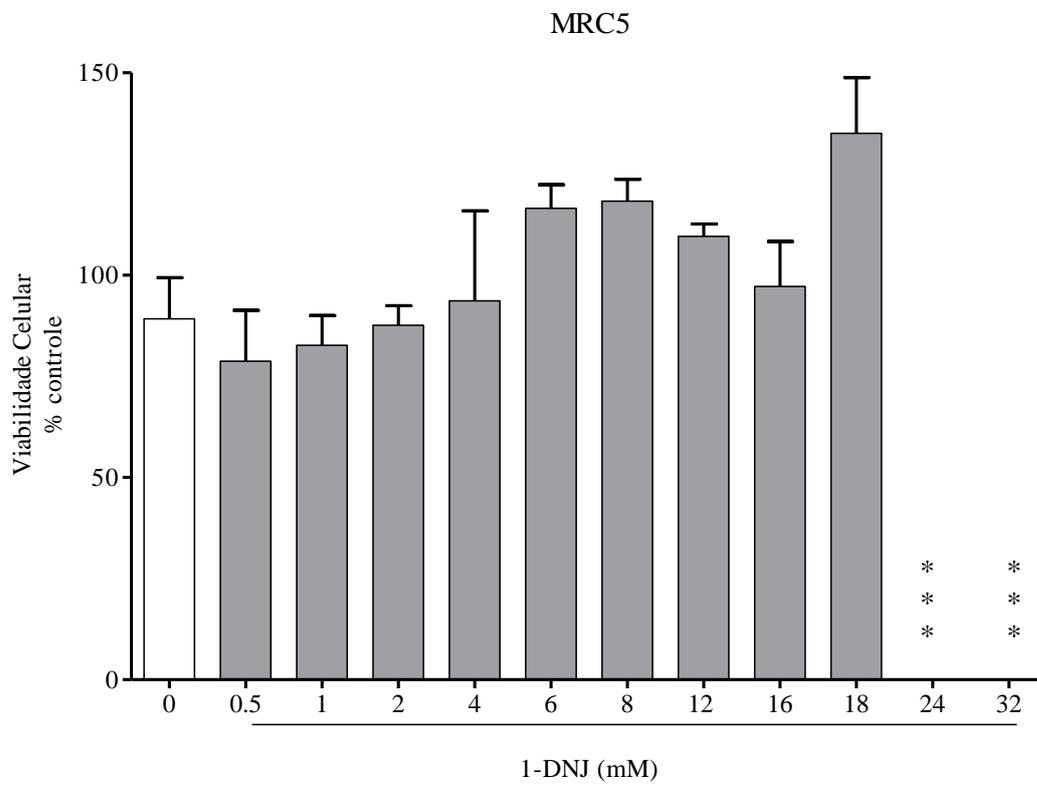
<b>Linhagens</b>	<b>IC25(mM)</b>	<b>IC50(mM)</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Seletividade</b>
MRC5	10.9	21.8	0.953	
ACP02	9.6	19.3	0.9498	1,13
A172	2.6	5.3	0.9527	4,13

**Fonte:** Dados da pesquisa (2021)

Na linhagem celular de adenocarcinoma ACP02, a 1-DNJ reduziu significativamente a viabilidade celular a partir da concentração de 8mM ( $82.6 \pm 3.13\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $F = 164.3$ ) a 32 mM ( $5.9 \pm 1.06\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $F = 164.3$ ) em relação ao controle negativo ( $100 \pm 3.21\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $F = 164.3$ ) (Figura 9A). Também medimos o ic50 de 1-DNJ nesta linhagem, e o composto apresentou um IC50 de 19.3 mM e IC25 de 9.6 mM (Figura 10 e Tabela 1).

Na linhagem A172, também observamos uma redução significativa da viabilidade no tratamento com 1-DNJ a partir da concentração de 6mM ( $65.88 \pm 6.89\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $F = 144.1$ ) a 32mM ( $27.21 \pm 1.22\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $F = 144.1$ ) em relação ao seu controle negativo ( $100 \pm 6.46\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ,  $F = 144.1$ ). Na A172, o composto 1-DNJ apresentou um IC50 de 5.3 mM e um IC25 de 2.6 mM, sendo esse significativamente menor comparado as demais linhagens (Figura 11 e Tabela 1).

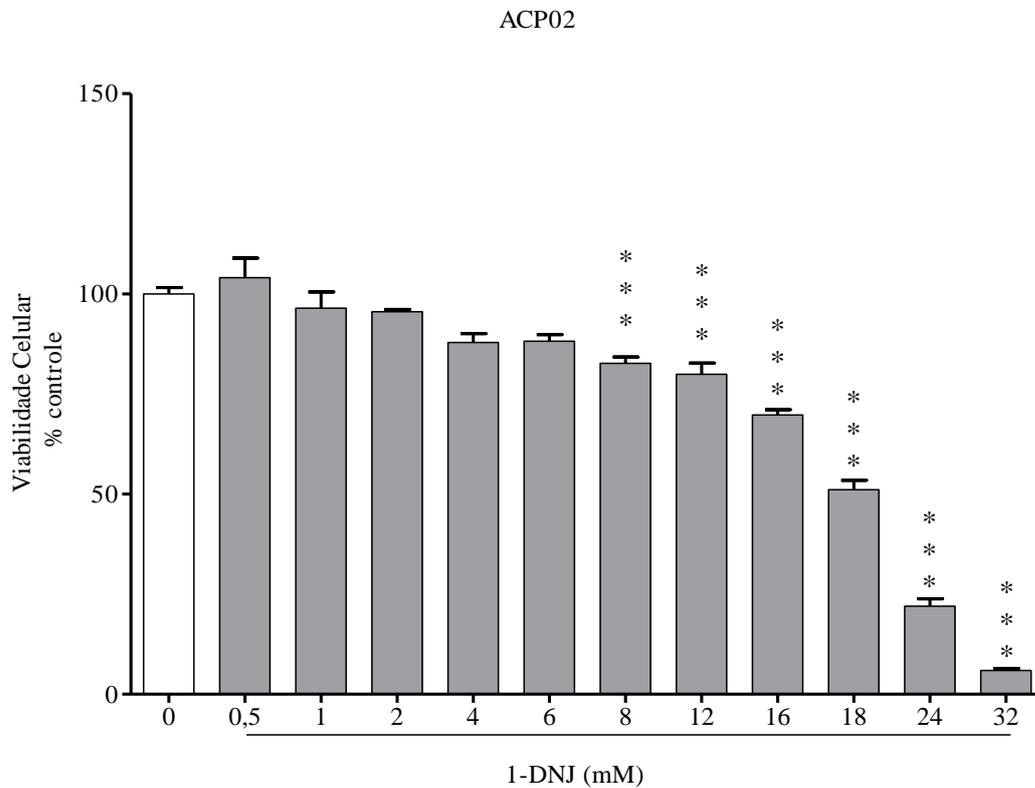
**Figura 9** - Redução da viabilidade celular em linhagem de célula não neoplásica de fibroblasto após o tratamento por 72h com 1-desoxinojirimicina.



Legenda: Em A figura mostra, respectivamente, o tratamento da linhagem celular MRC5 nas concentrações de 0 a 32 mM. As barras brancas representação culturas controles e as barras cinzas representam as culturas tratadas com o composto, foi considerado um  $*p \leq 0.0001$  e  $F=77.14$ .

**Fonte:** Dados da pesquisa (2021).

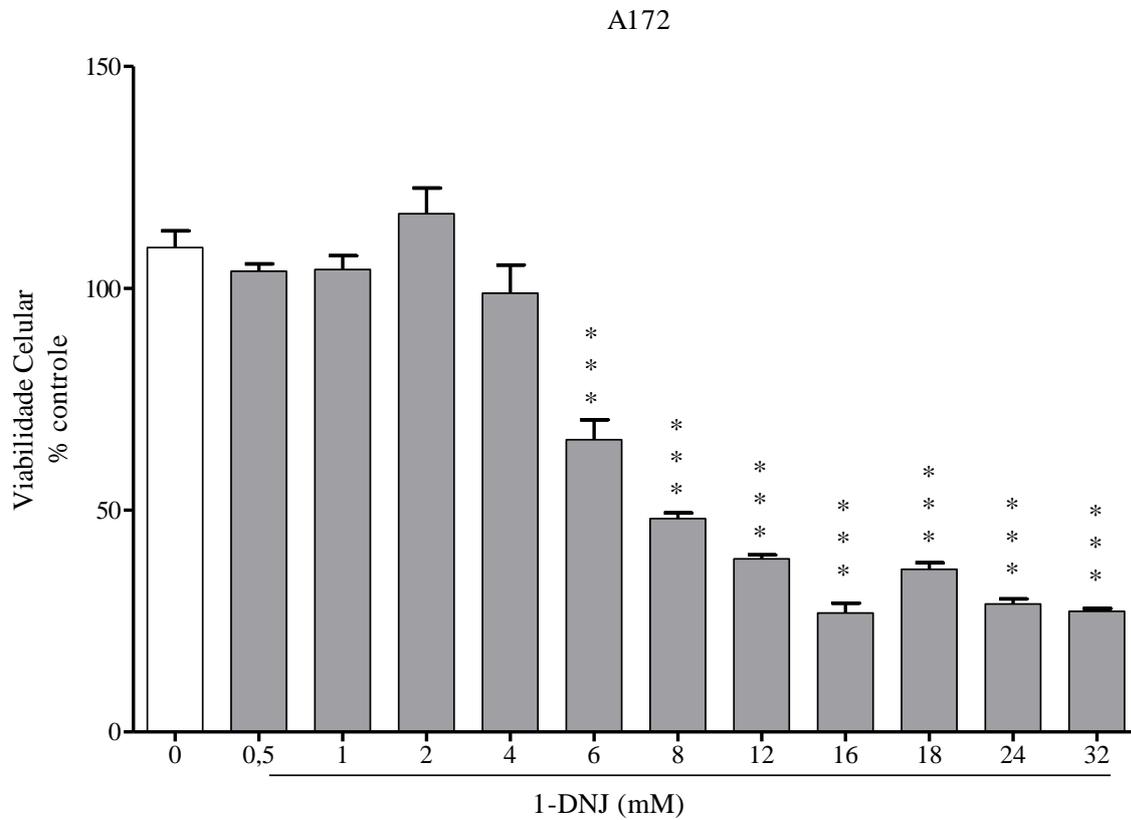
**Figura 10** - Redução da viabilidade celular na linhagem ACP02 após o tratamento por 72h com 1-desoxinojirimicina.



Legenda: A figura mostra o tratamento da linhagem celular gástrica ACP02 nas concentrações de 0 a 32 mM, respectivamente. As barras brancas representam as culturas controles e as barras cinzas representam as culturas tratadas com o composto, foi considerado um\*  $p \leq 0.0001$  e  $F=164.3$ .

**Fonte:** Dados da Pesquisa (2021).

Figura 11 - Redução da viabilidade celular em linhagem de célula A172 no tratamento por 72h com 1-desoxinojiramicina.



Legenda: A figura mostra respectivamente o tratamento da linhagem celular A172 nas concentrações de 0 a 32 mM. As barras brancas representação culturas controles e as barras cinzas representam as culturas tratadas com o composto, foi considerado um  $*p \leq 0.0001$  e  $F=144.1$ .

**Fonte:** Dados da Pesquisa (2021).

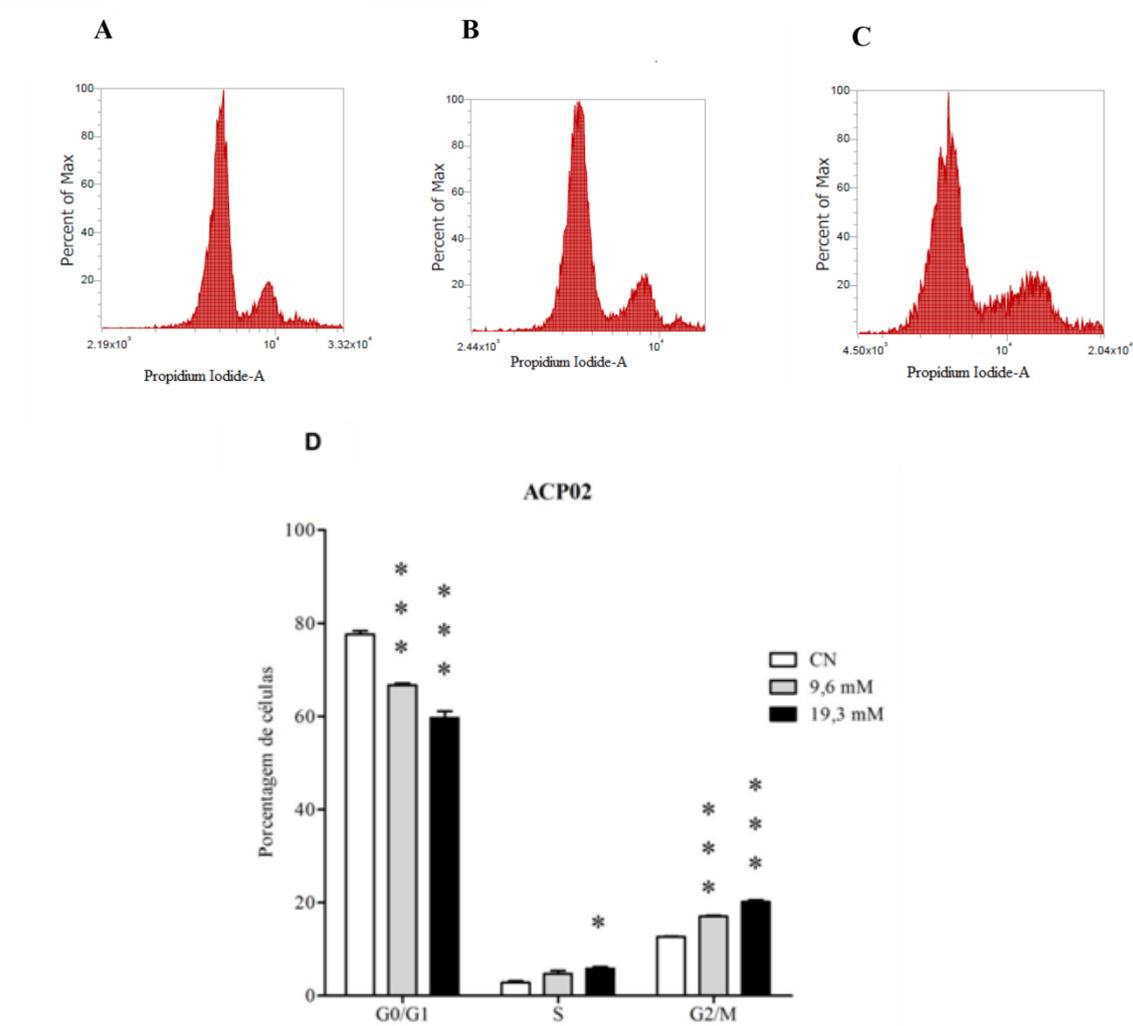
## **5.2. Tratamento com o 1-DNJ interfere no ciclo celular de linhagens de células cancerígenas.**

Na avaliação do ciclo celular, a 1-DNJ foi capaz de induzir parada na fase G2/M do ciclo celular nas concentrações testadas nas linhagens ACP02 (figura 12) e A172 (figura 13) ( $p < 0.0001$ ) em comparação com culturas controle.

Os resultados alcançados neste trabalho mostram um aumento significativo do percentual de células ACP02 (figura 12) de 4.4% ( $p < 0,001$ ,  $F = 97,1$ ) na fase G2/M e uma redução de 10,95% ( $p < 0,001$ ,  $F = 97,1$ ) na fase G0/G1 na concentração de 9,6 Mm (figura 12B). Entretanto, na concentração de 19,3 mM (figura 12C), foi observado um aumento de 7.5% ( $p < 0,001$ ,  $F = 97,1$ ) de células na fase G2/M e de 3% ( $p < 0,05$ ,  $F = 97,1$ ) na fase S. Também houve uma redução significativa de 18% ( $p < 0,001$ ,  $F = 97,1$ ) de células na fase G0/G1 (figura 12 D).

Nas células A172 (figura 13) obtivemos um percentual de 3,343 % ( $p < 0,001$ ,  $F = 99,3$ ) na fase G0/G1 na concentração de 2,2 mM (figura 13B) quando comparado ao controle negativo sem tratamento (figura 13A). Na concentração de 5,5 mM (figura 13C) houve uma redução de células em G0/G1 de 4.8% ( $p < 0,001$ ,  $F = 99,3$ ) e na fase S uma diminuição de 3.2% ( $p < 0,001$ ,  $F = 99,3$ ) e um relativo aumento de células na fase G2/M DE 4.2 % ( $p < 0,001$ ,  $F = 99,3$ ) caracterizado parada do ciclo celular nesta fase (figura 13D).

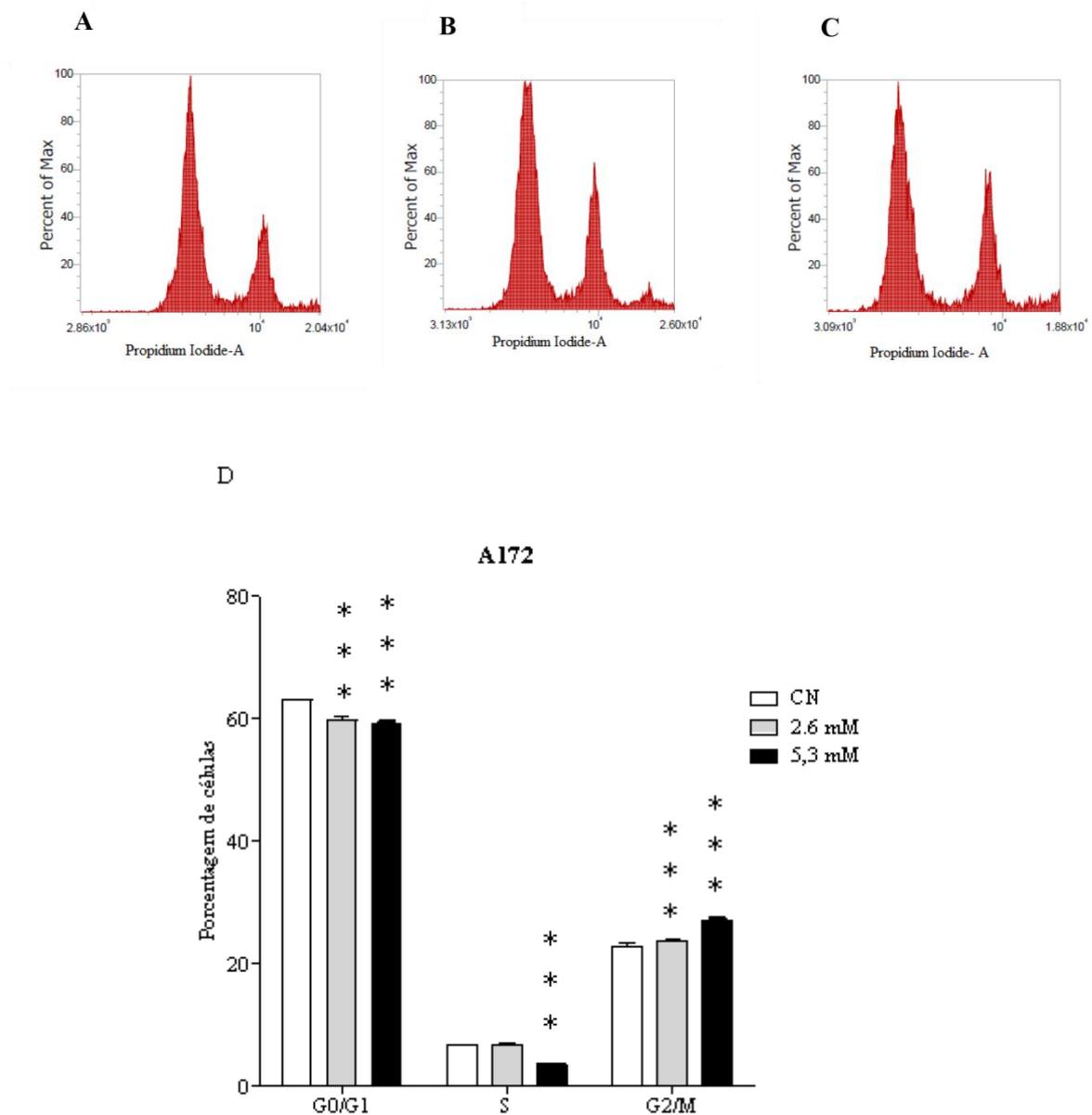
**Figura 12** - Gráfico do ciclo celular de câncer gástrico ACP02 tratadas com 1- DNJ nas concentrações de 9,6 e 19,3 mM.



Legenda: A representa o grupo controle; B células tratadas com 9,6 mM; C tratadas com 19,3 mM e em D têm-se o gráfico comparativo mostrando as alterações induzidas após o tratamento. A barra branca representa o grupo controle; a barra cinza representa o grupo 9,6 mM e a barra preta a concentração de 19,3 mM, \* $p \leq 0.0001$ .

Fonte: Dados da pesquisa (2021).

**Figura 13** - Gráfico do ciclo celular de glioblastoma humano A172 tratadas com 1-DNJ nas concentrações de 2.6 e 5.3 mM.



Legenda: Em A representa o grupo controle; B células tratadas com 2.6 mM; C tratadas com 5.3mM e em D temos o gráfico comparativo mostrando as alterações induzidas após o tratamento. A barra branca representa o grupo controle; a barra cinza representa o grupo 2.6mM e a barra preta a concentração de 5.3mM, \*  $p \leq 0.0001$ .

**Fonte:** Dados da pesquisa (2021).

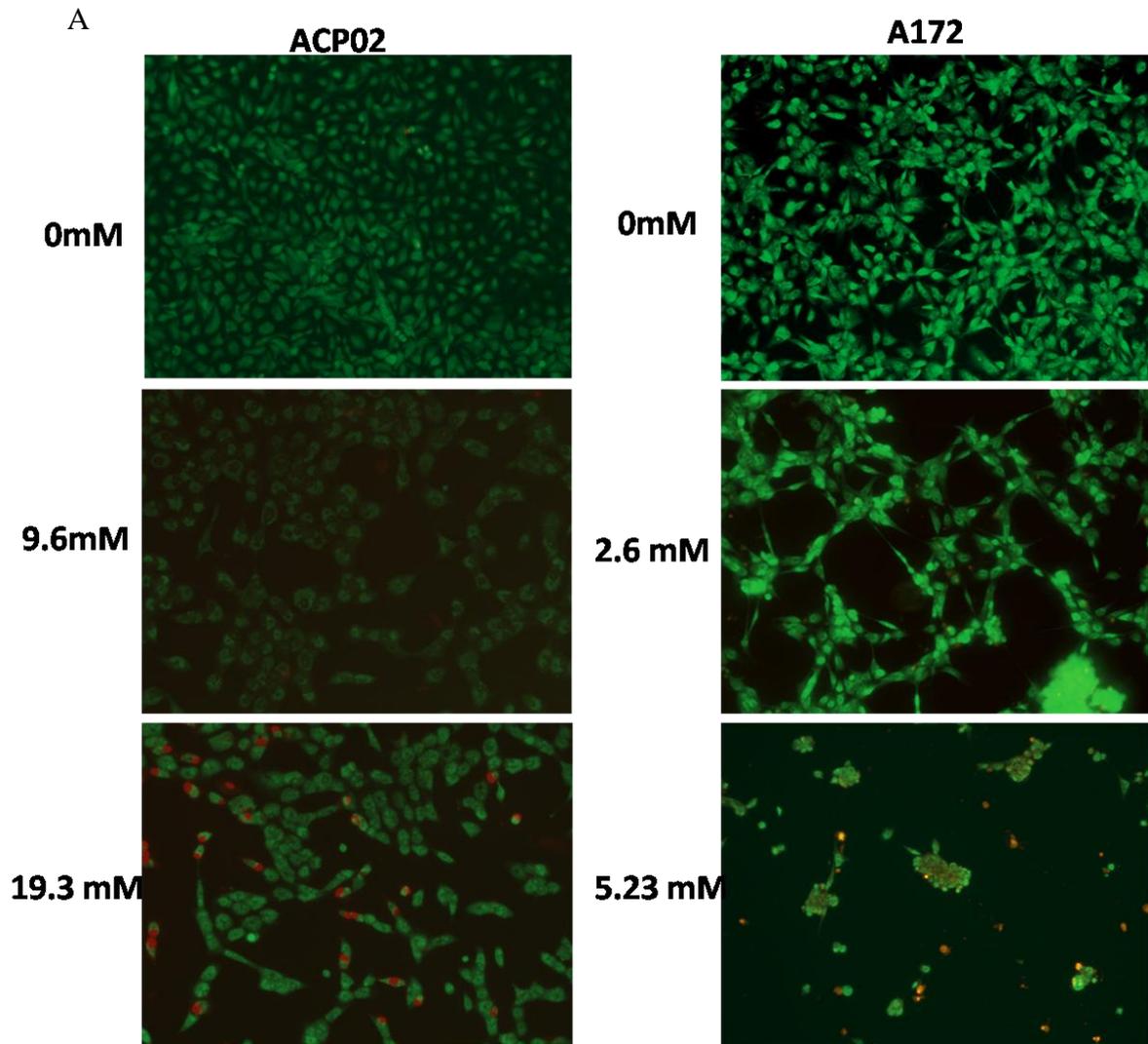
### **5.3. O composto 1-DNJ induz diferentes padrões de morte celular nas linhagens acp02 e a172.**

Avaliamos se a 1-DNJ induzia morte celular nas linhagens de células cancerígenas ACP02 e A172 pela coloração diferencial de laranja de acridina. Os resultados obtidos mostram que o composto bioativo induziu diferentes padrões de morte celular nas linhagens de células.

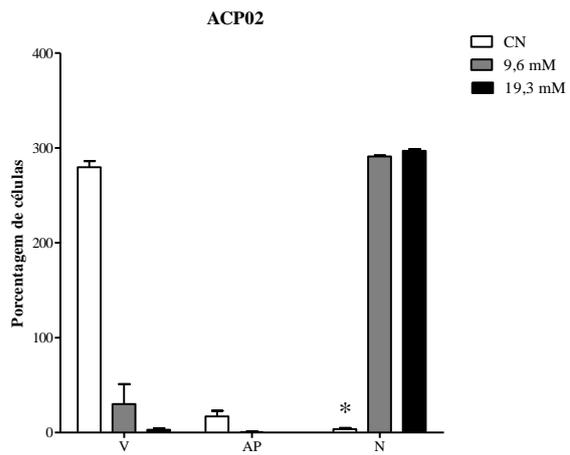
Tratamos a linhagem celular de adenocarcinoma gástrico ACP02 com 9.6 e 19.3 mM de 1-DNJ por 72h e observamos que esse composto induziu morte celular por necrose como observado na micrografia (Figura 14A) em ambas as concentrações testadas pela marcação em vermelho no interior dessas células nas concentrações de 9.6 e 19.3 mM, além de um possível inchaço celular observado na concentração de 9.6 mM.

Nas linhagens A172, entretanto já foi observado que a 1-DNJ induziu morte celular do tipo apoptose pelo número elevado de células marcadas em laranja, além da morfologia alterada na membrana celular tanto em ambas as concentrações testadas de 2.6 mM e 5.3 mM.

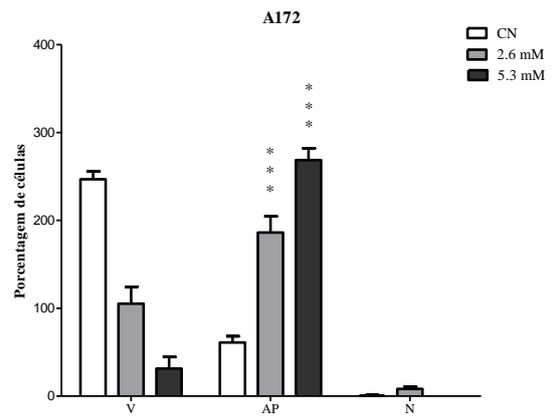
**Figura 14** - Indução de morte celular por apoptose em culturas de células cancerígenas após 72h de tratamento com 1-DNJ.



B



C



Legenda: Em A é a fotomicrografia de culturas coradas com laranja de acridina e brometo de etídio após o tratamento com 1-DNJ nas culturas de células ACP02 e A172, aumento de 10x. Já em B representa a quantificação do tratamento de 1-DNJ na cultura ACP02 e em C a quantificação do tratamento da linhagem de célula A17.

Fonte: Dados da pesquisa (2021)

#### 5.4. A 1-DNJ altera o padrão de migração celular em modelos de linhagens de células.

As linhagens celulares cancerígenas foram tratadas com o composto isolado 1-DNJ nos tempos de 0h (T0), 6h (T6), 12h (T12), 24h (T24), 36h (T36) e 48h (T48) para avaliar seus efeitos no padrão de migração celular

O tratamento com o composto isolado promoveu alterações significativas no padrão de migração celular em todas as linhagens testadas em comparação aos seus respectivos controles negativos (CN), apenas no tempo de 48h. Nesse ensaio, as culturas foram tratadas com as concentrações 19.3 e 9.6 mM para ACP02 (Figura 15A) e 5.3 e 2.6 mM para a linhagem de A172 (Figura 15B).

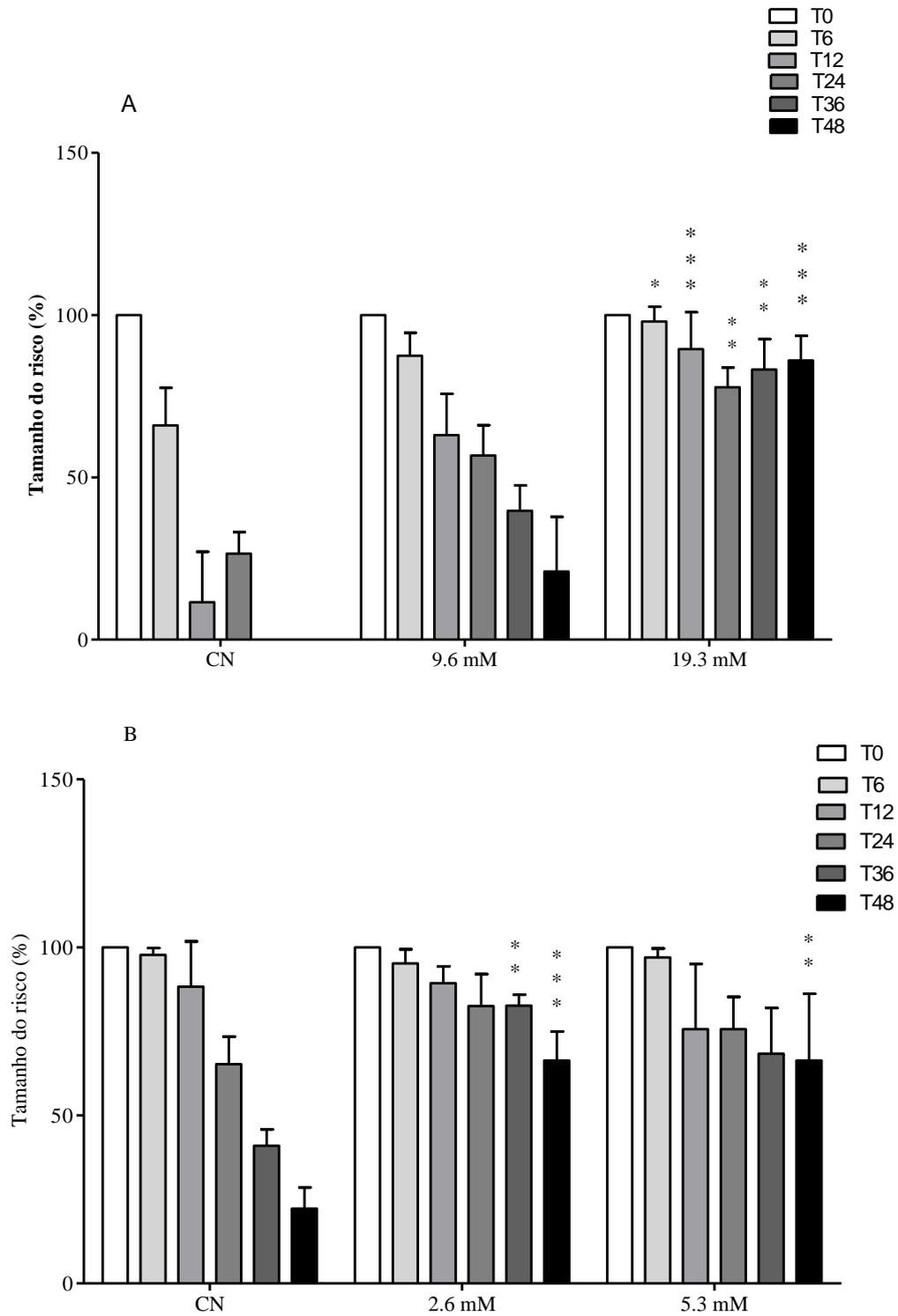
Observamos na linhagem ACP02 (Figura 15A) que, ao longo do tempo, o risco diminuiu no controle negativo, mostrando a atividade normal das células no processo de migração celular como observado no tempo 0h ( $100 \pm 0.0\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ) em relação ao tempo 48h, que houve o fechamento completo do risco. Tal efeito não ocorreu quando as culturas foram tratadas nas concentrações de 9.6 e 19.3mM com 1-DNJ. No tratamento com a concentração de 9.6mM não foi significativamente diferente em relação ao tempo 48h ( $0.00 \pm 0.0\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ) do controle negativo. Entretanto, observamos migração celular sem ocorrer o fechamento completo do tamanho risco em 48h de tratamento ( $21.0 \pm 16.0\%$ ,  $p \leq 0.005$ ), como foi observado no controle negativo no mesmo tempo (Figura 15A).

Já no tratamento na concentração de 19.3 mM de 1-DNJ na linhagem ACP02, observamos que houve diferença significativa em relação ao controle negativo em comparação ao tempo de 48h ( $0.00 \pm 0.0\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ), já no tempo de 48h na concentração de 19.3mM ( $79.5 \pm 16.8\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ) não houve o fechamento da área do risco, mostrando que nesta concentração o tratamento com 1-DNJ foi capaz de impedir o padrão de migração celular e que essa redução é tempo dependente (Figura 15A).

Na linhagem de células A172 (Figura 15B), observamos a redução do tamanho do risco ao longo do tempo de 0h a 48h de tratamento com 1-DNJ nas concentrações de 2.6 ( $100 \pm 0.0\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ) e em 48h ( $70 \pm 10.9\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ) e 5.3 mM em 0h ( $100 \pm 0.0\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ) e em 48h ( $73.5 \pm 21.6\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ) em relação ao controle negativo 0h ( $100 \pm 0.0\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ) e em 48h ( $22.25 \pm 6.29\%$ ,  $p \leq 0.0001$ ) (Figura 15B), indicando que a 1-DNJ impediu a migração celular do glioblastoma nas concentrações testadas. Entretanto não ouve

diferença significativa entre as concentrações mostrando que essa alteração no padrão de migração independe da concentração, mas depende do tempo de exposição ao composto bioativo.

Figura 15.



Legenda: Em A representa o tratamento da linhagem celular ACP02. Em B representa a migração celular da A172,  $p \leq 0.005$ .

**Fonte:** Dados da pesquisa (2021).

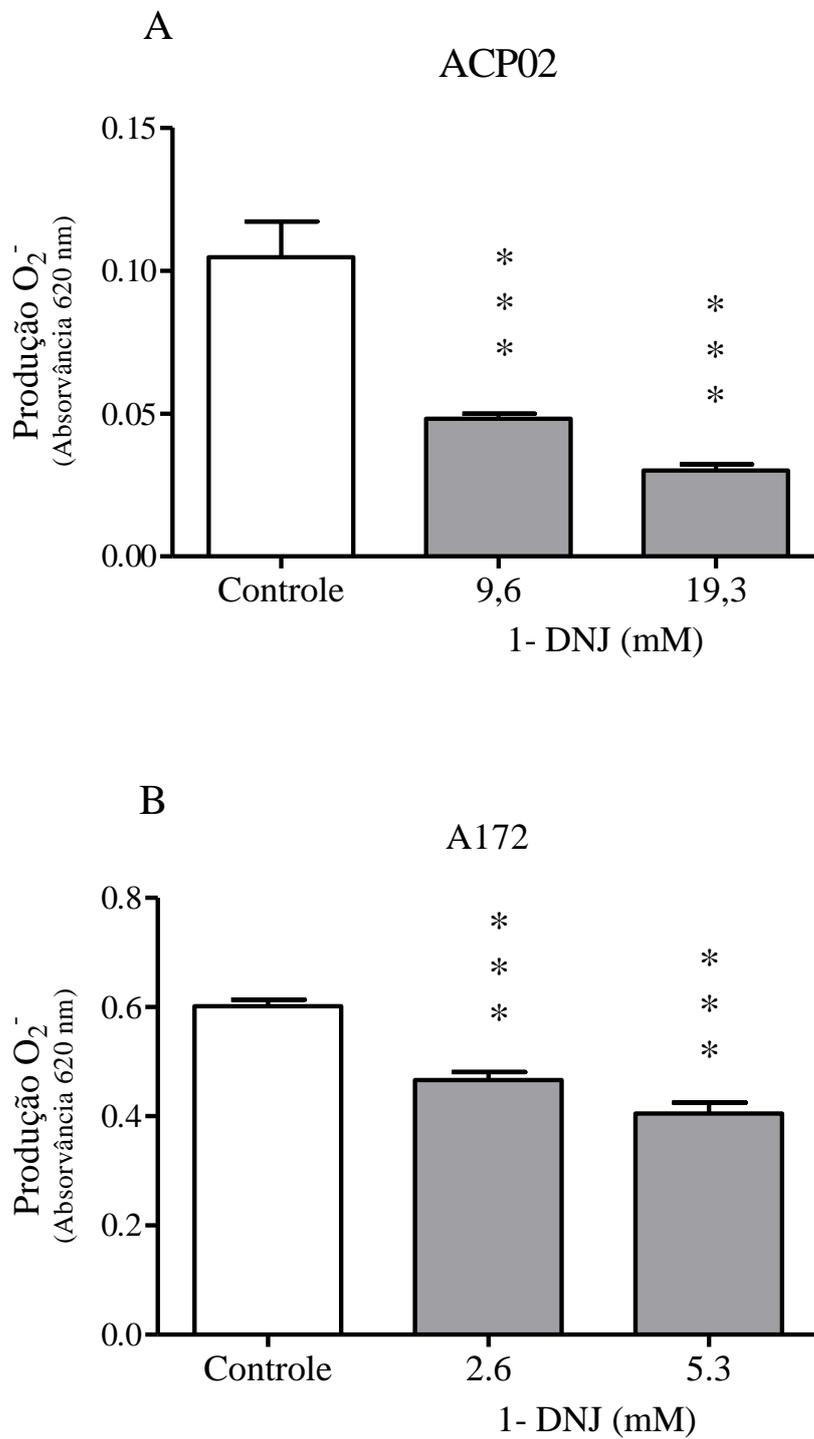
### **5.5. O composto 1-DNJ reduz a produção de oxigênio reativo em linhagens cancerígenas.**

Avaliamos se a 1-DNJ era capaz de diminuir a produção de oxigênio reativo em linhagens de células na concentração de 9.6 e 19.3 mM na ACP02 e nas concentrações de 2.6 e 5.3 mM na linhagem A172.

Na cultura de células ACP02 o grupo controle negativo apresentou aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio ( $0.106 \pm 0.024\%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 28,6). Entretanto, após o tratamento de 72h da linhagem com 1-DNJ observamos uma redução significativa da produção de oxigênio reativo comparada às culturas controle negativo de ACP02 em ambas as concentrações 9,6 mM ( $0.048 \pm 0.035\%$ ,  $p \leq 0.001$ , F 28,6) e 19.3mM ( $0.03 \pm 0.004\%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 28,6), figura 16A.

Tais resultados também foram observados na linhagem A172, uma vez que o controle negativo apresentava ( $0.602 \pm 0.02\%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 41,46); a concentração de 2.6 mM ( $0.466 \pm 0.028\%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 41,46) e 5.3 mM ( $0.405 \pm 0.039\%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 41,46). Esses dados mostram que a linhagem A172 também foi capaz de reduzir a produção de oxigênio reativo no glioblastoma humano, figura 16B.

**Figura 16** - Redução da produção de oxigênio reativo após o tratamento de 72h com 1-DNJ em culturas de células cancerígenas.



Legenda. Em A temos a linhagem de celular A172 tratada com 9.6 e 19.3 mM de 1-DNJ,  $p \leq 0.0001$ . E em B representa o tratamento de 2.6 e 5.3 mM de 1-DNJ em culturas de glioblastoma A172,  $p \leq 0.0001$ .

**Fonte:** Dados da pesquisa (2021).

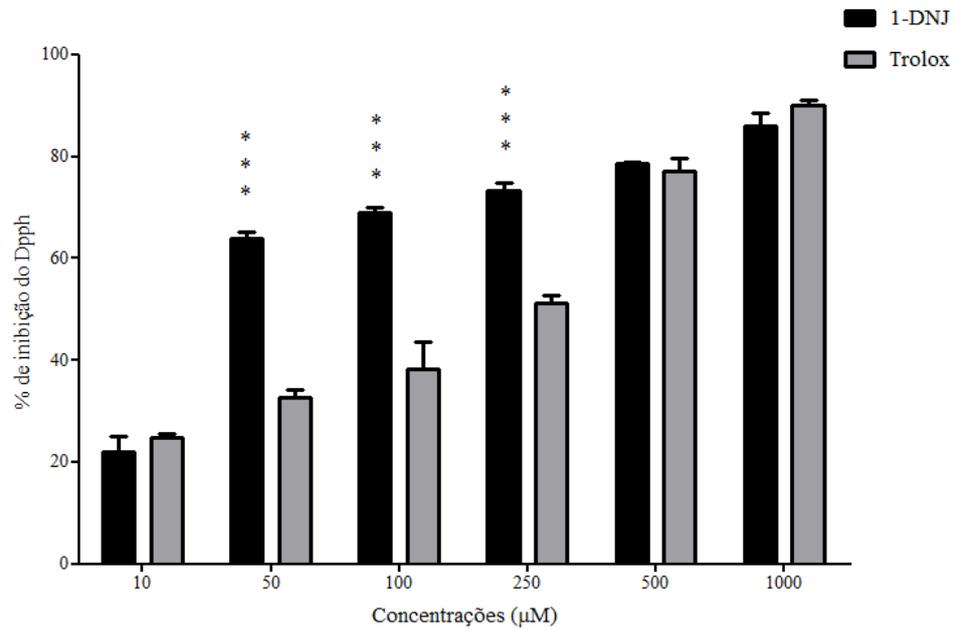
### 5.6. A 1-DNJ apresenta capacidade antioxidante em sistemas livres de células

Os resultados obtidos da capacidade antioxidante através do ensaio de transferência de elétrons pela técnica do DPPH e ABTS mostraram que a 1-DNJ apresenta capacidade inibitória aos dois radicais utilizados em comparação ao antioxidante padrão trolox.

Na inibição do radical DPPH os resultados demonstram que a 1-DNJ inibi significativamente o radical em todas as concentrações testadas de 10 a 100  $\mu\text{M}$  e que esse efeito é dependente da concentração, assim como, para antioxidante trolox. Entretanto, observamos que a 1-DNJ apresenta efeitos significativos nas concentrações de 50  $\mu\text{M}$  ( $63.85 \pm 1.44 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 80.66), 100  $\mu\text{M}$  ( $68.93 \pm 0.98\%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 80,66) e 250  $\mu\text{M}$  ( $73.44 \pm 1.51 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 80.66) em comparação ao trolox nas mesmas concentrações 50  $\mu\text{M}$  ( $32.75 \pm 0,87 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 80.66), 100  $\mu\text{M}$  ( $38.22 \pm 5.33 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 80.66) e 250  $\mu\text{M}$  ( $51.15 \pm 1.70 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 80.66), figura 17, sugerido que nestas concentrações a 1-DNJ apresenta uma capacidade antioxidante maior para o radical de DPPH.

Em relação ao radical ABTS, também podemos observar a inibição do radical após reação com a 1-DNJ e/ou trolox. Essa inibição também é concentração dependente. Todavia a 1-DNJ continua apresentando maior potencial de inibição do radical ABTS nas concentrações 50  $\mu\text{M}$  ( $53.66 \pm 1.25 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 89.62) e 100  $\mu\text{M}$  ( $62.9 \pm 1,001 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 89.62) em comparação com ao trolox 50  $\mu\text{M}$  ( $19 \pm 1.7 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 89.62) e em 100  $\mu\text{M}$  ( $40.58 \pm 0.196 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 89.62). E podemos observar que para este radical o trolox tem maior potencial de inibição nas concentrações 250  $\mu\text{M}$  ( $92.54 \pm 5.98 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 89.62) e 500  $\mu\text{M}$  ( $99.21 \pm 0.408 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 89.62) comparado com a 1-DNJ 250  $\mu\text{M}$  ( $66.72 \pm 7.71 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 89.62) e 500  $\mu\text{M}$  ( $81,00 \pm 2 \%$ ,  $p \leq 0.0001$ , F 89.62), figura 18.

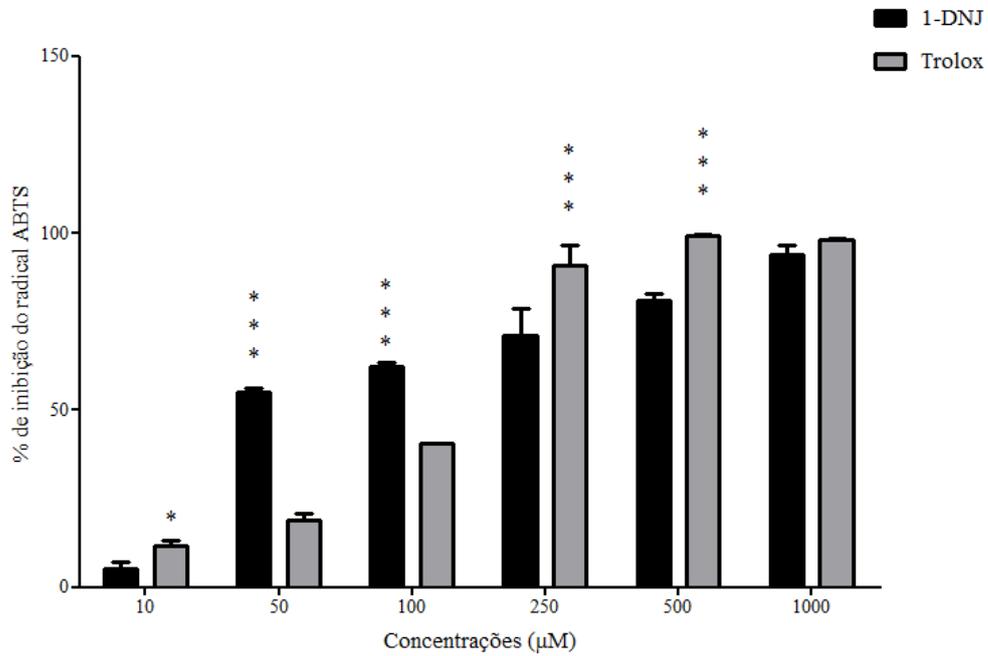
**Figura 17** – A 1-DNJ promove inibição do radical livre DPPH



Legenda: As barras de cor preta representam os efeitos da 1-DNJ em diferentes concentrações (10 a 1000 μM). E as barras cinzas mostram a capacidade inibitória do antioxidante padrão trolox contra o radical DPPH. Anova a dois critérios, seguid de pós teste de bonferroni.  $p \leq 0.0001$ .

Fonte: Dados da pesquisa (2021).

**Figura 18** – A 1-DNJ promove sequestro do cátion ABTS.



Legenda: As barras de cor preta representam os efeitos da 1-DNJ em diferentes concentrações ( 10 a 1000 µM) capacidade inibitória do radical DPPH . E as barras cinzas mostram a capacidade inibitória do antioxidante padrão trolox contra o radical.  $p \leq 0.0001$ .

Fonte: Dados da pesquisa (2021)

## 6. DISCUSSÃO

O câncer ainda é a segunda causa de morte no Brasil e um problema de saúde pública (LEONARDO; ADRIANO, 2020), apesar dos avanços nos tratamentos com a utilização de alguns fármacos, infelizmente, essas substâncias usadas na clínica ainda apresentam efeitos colaterais que também acabam agredindo células normais (SCHLICHTIG et al., 2019).

As linhagens celulares são ótimos modelos pré-clínicos para avaliar o perfil de novas drogas contra o câncer, por mimetizar condições do ambiente tumoral similar ao câncer primário em humanos. Haja vista que é muito importante a investigação de compostos anticâncer que tenham o mínimo de efeitos citotóxicos em células normais (HAGLUND et al., 2012).

Nesse estudo, investigamos o efeito da 1-desoxinojimirina em culturas de células cancerígenas de adenocarcinoma gástrico e de glioblastoma humano. Realizamos ensaios de viabilidade celular pelo método MTT e comparamos a ação da 1-DNJ após 72h de tratamento em linhagem de células normais MRC5. Identificamos que o tratamento com 1-DNJ induziu um efeito citotóxico nas linhagens de células cancerígenas de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso (ACP02) e glioblastoma multiforme (A172). Enquanto na linhagem de célula normal (MRC5) houve somente uma redução da viabilidade em concentrações elevadas. Os dados obtidos sugerem que a 1-DNJ tem seletividade em reduzir a viabilidade das células cancerígenas sem provocar a morte das células normais nas concentrações testadas.

Estes dados estão de acordo com a literatura, a qual tem mostrado que os produtos naturais da classe dos iminociclitol como N-Decil-1,5-imino-L-fucito (N-Decyl-DFJ) também apresentam efeitos citotóxicos e antiproliferativos em linhagens celulares de câncer de mama e de próstata após 72h de tratamento com este bioativo (ZHOU et al., 2019). Assim como a N-(8-(3-etinilfenoxi) octil-1-desoxinojirimicina na concentração 100  $\mu$ M promoveu inibição do crescimento e migração celular de linhagens de células de carcinoma de pulmão após 72h de tratamento e ainda induziu a morte celular por apoptose (ZHAO et al., 2010).

Também foi observado em experimento de culturas de câncer gástrico tratadas com nanopartículas de óxido de zinco carregadas com extrato de *Morus Nigra* por 24h nas concentrações de 5 a 25  $\mu$ g/mL que essas concentrações reduziram significativamente a viabilidade celular, além de induzir alteração no potencial de membrana dessas células nas concentrações de 5 e 10  $\mu$ g/mL (TANG et al., 2020).

O papel da 1-DNJ tem sido amplamente investigado por atuar como um inibidor da proteína de superfície celular  $\alpha$ -glucosidase (HEDRINGTON; DAVIS, 2019), como verificado em estudos anteriores utilizando a técnica de docagem, com derivados da 1-DNJ marcados por sonda fluorescente, no qual foi identificado que seus derivados possuem alta afinidade por essa proteína em linhagens de células Caco2-a de adenocarcinoma de colorretal (HATANO et al., 2019). Além disso, a maior absorção de 1-DNJ ocorre no intestino e rins (PARIDA et al., 2019) e seus derivados como DNJ N-Alquilados são capazes de passar pela membrana celular e pelo lúmen do retículo endoplasmático em linhagem de células de leucemia humana HL60, inibindo a biossíntese de glucosfingolipídeos e alfa-glucosidase do tipo I e II (HOWARD R. MELLOR, 2004).

Dessa forma, hipostenizamos que a 1-DNJ tem grande potencial de interferir em outras vias de sinalizações celulares, especialmente em células cancerígena, conforme a figura 19. Em nosso estudo, o foco foi avaliar a produção de oxigênio reativo, também chamado de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), já que ele é um componente primordial para a progressão e iniciação do câncer.

No tratamento de 72h com 1-DNJ nas culturas de células cancerígenas, tanto em linhagens de glioblastoma multiforme quanto em adenocarcinoma gástrico, identificamos que o tratamento promoveu uma redução significativa na produção de oxigênio reativo pela técnica de NBT, em contrapartida nos controles negativos apresentavam níveis aumentados da produção deste radical.

Estes resultados corroboram os estudos que mostram que em células cancerígenas esse radical apresenta níveis basais diferentes dos encontrados em células normais, que são ideais para o seu perfeito funcionamento e favorecem um ambiente pró-oxidante, entretanto a desregulação na produção de  $O_2^-$  pode provocar a morte das células cancerígenas (BRONSART; STOKES; CONTAG, 2016; LIBERTI; LOCASALE, 2016; MOLONEY; COTTER, 2018; PARK, 2018).

Essa diferença na produção, possivelmente, exacerbada de EROS em células cancerígenas se dá principalmente pela alteração funcional da mitocôndria, que contribui nessas células para o processo de reprogramação genômica promovendo o aumento das espécies reativas a fim de contribuir para iniciação e progressão do câncer (YANG et al., 2016).

É na mitocôndria que ocorre a maior produção de  $O_2^-$ , sendo fundamental para a formação de várias espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Entretanto em células normais

essa produção de ânion superóxido é inicialmente controlada por defesas antioxidantes como a própria superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) que elimina a EROS mitocondrial (TURRENS, 2003). Mas em célula cancerígena a MnSOD podem estar superexpressas e apresentar um efeito dual, seja para suprimir o tumor ou favorecer sua proliferação e metástase (HOLLEY; DHAR; CLAIR, 2013).

Outros compostos, como o fármaco bortezomibe (BTZ) promoveu redução significativa do número de células NBT-positivas em linhagens de células de leucemia HL60 (ZHOU et al., 2013). Além deste, a tetrahydrobiopterina (BH4) induziu apoptose em linhagens de células de melanoma pelo aumento da produção de óxido nítrico e redução de células NBT-positivas (GONÇALVES et al., 2019). Essa desregulação da produção de oxigênio reativo em células cancerosas possa induzir estresse oxidativo nessas células e não mais produzir efeitos pró-oxidantes.

Esses resultados corroboram com os dados obtidos da capacidade antioxidante da 1-DNJ em inibir os radicais DPPH e ABTS por transferência de elétrons e diminuir o potencial oxidativo destes radicais em sistemas livres de células, sugerindo então que o composto bioativo pode apresentar efeitos antioxidantes similares em modelos celulares.

Os ensaios de DPPH e ABTS são amplamente utilizados para medir a capacidade antioxidante de compostos bioativos. Na técnica de DPPH, os compostos antioxidantes doam elétron para este radical o deixando menos oxidativo e mais estáveis (AKAR; KÜÇÜK; DOĞAN, 2017). Estudos realizados com as espécies *Morus e Broussonetia* pertencente a família moráceas, também mostraram que compostos bioativos presentes nestas plantas possuem capacidade de eliminação destes radicais (CAO et al., 2020).

Estes dados também corroboram com resultados obtidos do extrato das folhas da amoreira (*Morus alba* L e *Morus nigra*) que são ricos em 1-DNJ, nesse estudo os resultados mostram que a amoreira branca possui um ic<sub>50</sub> de 80,60 µg / mL e a preta 114,94 µg / mL (ERUYGUR; DURAL, 2019).

Em nossos resultados, a 1-DNJ além alterar a produção do radical superóxido também induziu parada no ciclo celular na G2/M em ambas as linhagens cancerígenas. A fase G2M (fase de *gap* da mitose) é primordial para a formação do fuso mitótico e replicação do DNA e o completo sincronismo das fases do ciclo celular que também incluem a G0 (fase de repouso), G1 (pré-sináptica) e S (fase de síntese) são indispensáveis para que a célula possa manter sua integridade genômica (SCHMIDT et al., 2017).

Os danos de DNA sofridos por células cancerígenas pela parada do ciclo celular na fase G2/M geram alterações significativas na próxima fase da mitose (M), que promovem ativação de vias de morte celular (CASTEDO et al., 2004). Esses danos no DNA acabam impedindo o crescimento e a proliferação destas células, como observado em células de câncer de próstata tratadas com o produto natural da classe das cholconas à Flavokawain A, que induz alteração na vias de sobrevivência celular, parada no ciclo celular na fase G2/M e morte celular por apoptose desencadeada pelo estresse oxidativo gerado pela redução dos níveis de glutathiona e aumento das espécies reativas de oxigênio (WANG et al., 2020).

Como sugerido, a desregulação nos níveis de espécies reativas de oxigênio pode ativar fatores de morte celular. Em nosso trabalho a 1-DNJ ativou vias de morte celular diferentes em adenocarcinoma gástrico e glioblastoma multiforme após 72h de tratamento, o qual foi verificado pela coloração laranja de acridina. Nas linhagens de células ACP02 a 1-DNJ induziu morte celular por necrose e na A172 provocou morte celular por apoptose.

Nossa hipótese é de que o padrão de morte celular diferente nas linhagens, certamente, pode estar associado não somente por causa da localização anatômica dessas células, mas também pela expressão de genes que são fundamentais para a agressividade do tumor e de seu potencial metastático como os genes da família Myc.

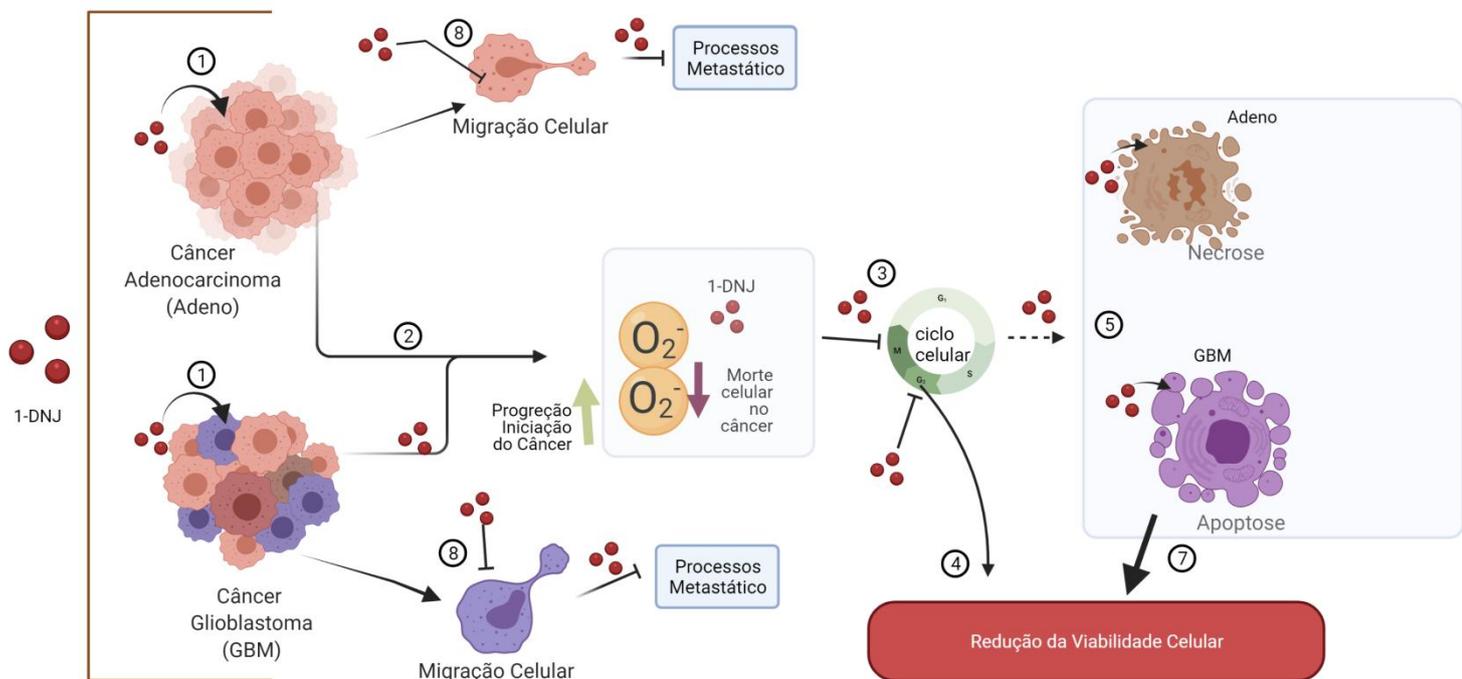
Tal hipótese corrobora com os dados da literatura que mostram que linhagens de células ACP02 tratadas com biflorina, obtida da raiz da *Capraria biflora*, promoveu a diminuição da expressão do gene Myc e levou à morte celular por necrose (BARBOSA-JOBIM et al., 2020). Além disso, vários estudos têm mostrado a relação de drogas com a diminuição da expressão do deste gene Myc nessas células (DANIELLE QUEIROZ CALCAGNO, 2013; LEAL et al., 2009c; PORFÍRIO- DIAS et al., 2020; VALERO et al., 2014). Entretanto, embora existam evidências que suportem esse pensamento, sem dúvida, mais estudos precisam ser realizados para relacionar a ligação deste gene no tratamento da 1-DNJ nestas células.

Em nossos estudos, os efeitos gerados pela 1-DNJ também foram capazes de alterar o padrão de migração celular diminuindo, ao longo do tempo, a área do risco em relação ao controle negativo de cada linhagem. A inibição da migração celular é outra maneira pela qual os compostos bioativos podem atuar, conforme relatados pela literatura com derivados da 1-DNJ que promovem esse bloqueio da motilidade celular pela diminuição da expressão de metaloproteínases de matrix (COSTA et al., 2021; WANG; YANG; HU, 2010).

No câncer tem-se a necessidade de medicamentos que atuem com estratégias de

quimioprevenção, com redução de efeitos colaterais e sem danos das células normais. Sendo assim, à luz dos problemas hodiernos, em especial os encontrados na terapia oncológica, e diante dos resultados promissores levantados por esse estudo, 1-DNJ apresenta-se como uma excelente candidata para o tratamento do câncer, é claro, sendo necessários mais estudos para a melhor elucidação de suas vias de sinalização celular envolvidas tanto no adenocarcinoma gástrico quanto no glioblastoma multiforme.

**Figura 19** – Esquema representativo dos efeitos da 1-DNJ em linhagens celulares de adenocarcinoma gástrico e glioblastoma multiforme.



Legenda: Em (1) A 1-DNJ possivelmente pode entrar na célula tanto do adenocarcinoma gástrico quanto GBM e (2) impedir a progressão e iniciação do câncer pela redução do ânio superóxido e consequentemente a 1-DNJ induz parada no ciclo celular na fase G2/M (3) e resultando na redução da viabilidade celular (4). A 1-DNJ também induz padrão de morte celular diferente nas linhagens celulares como necrose no adenocarcinoma gástrico e apoptose no glioblastoma multiforme (5) o que também promove a redução da viabilidade. Além disso, a 1-DNJ também altera o padrão de migração celular (8), impedindo a motilidade celular e a ativação de possíveis vias que possam favorecer os processos metastáticos.

**Fonte:** Dados da pesquisa (2021).

## REFERÊNCIAS

- AJANI, J. A. et al. Gastric adenocarcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–19, 1 jun. 2017.
- ALESSANDRA-PERINI, J. et al. Euterpe oleracea extract inhibits tumorigenesis effect of the chemical carcinogen DMBA in breast experimental cancer. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2018.
- ANSARI, S. et al. Diffuse gastric cancer: A summary of analogous contributing factors for its molecular pathogenicity **International Journal of Molecular Sciences**, 2018.
- ASSI, M. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, 2017.
- ASSUMPÇÃO, P. P. et al. The diffuse-type gastric cancer epidemiology enigma. **BMC Gastroenterology**, 2020.
- BARBOSA, I. R. et al. Cancer mortality in Brazil: Temporal trends and predictions for the year 2030. **Medicine (United States)**, 2015.
- BARBOSA-JOBIM, G. S. et al. Biflorin inhibits the proliferation of gastric cancer cells by decreasing MYC expression. **Toxicology in Vitro**, v. 63, p. 104735, 1 mar. 2020.
- BAYLEY, J.-P.; DEVILEE, P. The Warburg effect in 2012. **Current Opinion in Oncology**, v. 24, n. 1, p. 62–67, jan. 2012.
- BINDER, Z. A. et al. Establishment and biological characterization of a panel of glioblastoma multiforme (GBM) and GBM variant oncosphere cell lines. **PLoS ONE**, 2016.
- BOSSU, J. et al. New insights on wood dimensional stability influenced by secondary metabolites: The case of a fast-growing tropical species *Bagassa guianensis* aubl. **PLoS**

ONE, 2016.

BRANDAO, M. et al. Astrocytes, the rising stars of the glioblastoma microenvironment. **Glia**, v. 67, n. 5, p. 779–790, maio 2019.

BRAY, F. et al. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008–2030): a population-based study. **The Lancet. Oncology**, v. 13, n. 8, p. 790–801, ago. 2012.

BRONSART, L. L.; STOKES, C.; CONTAG, C. H. Multimodality Imaging of Cancer Superoxide Anion Using the Small Molecule Coelenterazine. **Molecular Imaging and Biology**, v. 18, n. 2, p. 166–171, 1 abr. 2016.

CALANDRINI DE AZEVEDO, L. F. et al. Aqueous ethanol extract of *Libidibia ferrea* (Mart. Ex Tul) L.P. Queiroz (juca) exhibits antioxidant and migration-inhibiting activity in human gastric adenocarcinoma (ACP02) cells. **PloS One**, v. 15, n. 1, p. e0226979, 2020.

CASTEDO, M. et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2825–2837, 12 abr. 2004.

CHEN, Y. C.; LI, H.; WANG, J. Mechanisms of metformin inhibiting cancer invasion and migration. **Journal of Translational Research**, 2020.

CHENG, X.; FERRELL, J. E. Apoptosis propagates through the cytoplasm as trigger waves. **Science**, 2018.

CLARK, O.; YEN, K.; MELLINGHOFF, I. K. Molecular pathways: Isocitrate dehydrogenase mutations in cancer. **Clinical Cancer Research**, 2016.

CORTES, E. et al. Tamoxifen mechanically reprograms the tumor microenvironment via HIF-1A and reduces cancer cell survival. **EMBO reports**, 2019.

COSTA, T. et al. Combined 1-Deoxyojirimycin and Ibuprofen Treatment Decreases Microglial Activation, Phagocytosis and Dopaminergic Degeneration in MPTP-Treated Mice.

**Journal of Neuroimmune Pharmacology: The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology**, v. 16, n. 2, p. 390–402, jun. 2021.

CZAPLINSKI, S. et al. Polo-like kinase 1 inhibition sensitizes neuroblastoma cells for vinca alkaloid-induced apoptosis. **Oncotarget**, 2016.

DANIELLE QUEIROZ CALCAGNO, V. M. F. MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in Gastric Cancer. **BMC Gastroenterology**, v. 13, p. 141, 2013.

DE PÁDUA LÚCIO, K. et al. Anti-Inflammatory and Antioxidant Properties of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) in a Model of LPS-Induced Sepsis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 5048031, 2018.

DESAI, A. et al. Medicinal Plants and Cancer Chemoprevention. **Current Drug Metabolism**, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, 2007.

ESKILSSON, E. et al. EGFR heterogeneity and implications for therapeutic intervention in glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 20, n. 6, p. 743–752, 18 maio 2018.

ESMAEILI, M. A.; FARIMANI, M. M.; KIAEI, M. Anticancer effect of calycopterin via PI3K/Akt and MAPK signaling pathways, ROS-mediated pathway and mitochondrial dysfunction in hepatoblastoma cancer (HepG2) cells. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2014.

FARAHMAND, L. et al. Naturally occurring compounds acting as potent anti-metastatic agents and their suppressing effects on Hedgehog and WNT/ $\beta$ -catenin signalling pathways. **Cell Proliferation**, v. 50, n. 1, p. e12299, 27 set. 2016.

FORTUNATO, J. T. et al. Brainstem Glioblastoma Multiforme in a Patient with NF1. **Anticancer Research**, v. 38, n. 8, p. 4897–4900, ago. 2018.

GEORGE, V. C.; DELLAIRE, G.; RUPASINGHE, H. P. V. Plant flavonoids in cancer

chemoprevention: role in genome stability. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 2017.

GONÇALVES, D. A. et al. Imbalance between nitric oxide and superoxide anion induced by uncoupled nitric oxide synthase contributes to human melanoma development. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 115, p. 105592, 1 out. 2019.

GRIMM, S. A.; CHAMBERLAIN, M. C. **Anaplastic astrocytoma CNS oncology**, 2016.

GUAN, X. et al. Reactive Astrocytes in Glioblastoma Multiforme. **Molecular Neurobiology**, v. 55, n. 8, p. 6927–6938, ago. 2018.

HAGLUND, C. et al. In vitro evaluation of clinical activity and toxicity of anticancer drugs using tumor cells from patients and cells representing normal tissues. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 697–707, 1 mar. 2012.

HAM, S. W. et al. TP53 gain-of-function mutation promotes inflammation in glioblastoma. **Cell Death & Differentiation**, v. 26, n. 3, p. 409–425, mar. 2019.

HANASHIMA, Y. et al. Antitumor effect of lenalidomide in malignant glioma cell lines. **Oncology Reports**, 2020.

HATANO, A. et al. Use of a deoxynojirimycin-fluorophore conjugate as a cell-specific imaging probe targeting  $\alpha$ -glucosidase on cell membranes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 5, p. 859–864, 1 mar. 2019.

HEDRINGTON, M. S.; DAVIS, S. N. Considerations when using alpha-glucosidase inhibitors in the treatment of type 2 diabetes. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 18, p. 2229–2235, dez. 2019.

HOLLEY, A. K.; DHAR, S. K.; CLAIR, D. K. S. Curbing Cancer's Sweet Tooth: Is There a Role for MnSOD in Regulation of the Warburg Effect? **Mitochondrion**, v. 13, n. 3, p. 170, maio 2013.

HONG, K.-Q. et al. Advances in the Extraction, Purification and Detection of the Natural

Product 1-Deoxynojirimycin. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 51, n. 3, p. 246–257, 3 jun. 2021.

HOSSAIN, U. et al. An overview on the role of bioactive  $\alpha$ -glucosidase inhibitors in ameliorating diabetic complications. **Food and Chemical Toxicology**, 2020.

HOWARD R. MELLOR, D. C. A. N. Cellular effects of deoxynojirimycin analogues: inhibition of N-linked oligosaccharide processing and generation of free glucosylated oligosaccharides. **Biochemical Journal**, v. 381, n. Pt 3, p. 867, 1 ago. 2004.

IQBAL, S. et al. Proximate Composition and Antioxidant Potential of Leaves from Three Varieties of Mulberry (*Morus* sp.): A Comparative Study. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 6651, 2012.

KEYVANLOO SHAHRESTANAKI, M. et al. Centaurea cyanus extracted 13-O-acetylsolstitialin A decrease Bax/Bcl-2 ratio and expression of cyclin D1/Cdk-4 to induce apoptosis and cell cycle arrest in MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cell lines. **Journal of Cellular Biochemistry**, 2019.

KISELEVA, L. N. et al. A172 and T98G cell lines characteristics. **Cell and Tissue Biology**, 2016.

KO, E.-Y.; MOON, A. Natural Products for Chemoprevention of Breast Cancer. **Journal of Cancer Prevention**, 2015.

KOH, Y. C.; HO, C. T.; PAN, M. H. Recent advances in cancer chemoprevention with phytochemicals. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 28, n. 1, p. 14–37, 2020.

LEAL, M. F. et al. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, 2009a.

LEAL, M. F. et al. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 195, n. 1, p. 85–91, nov. 2009b.

LEAL, M. F. et al. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 195, n. 1, p. 85–91, nov. 2009c.

LEE, H. et al. Genome analysis of 1-deoxynojirimycin (1-DNJ)-producing *Bacillus velezensis* K26 and distribution of *Bacillus* sp. harboring a 1-DNJ biosynthetic gene cluster. **Genomics**, v. 113, n. 1, Part 2, p. 647–653, 1 jan. 2021.

LEE, J. et al. Morin, a Flavonoid from Moraceae, Inhibits Cancer Cell Adhesion to Endothelial Cells and EMT by Downregulating VCAM1 and Ncadherin. **Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP**, v. 17, n. 7, p. 3071–3075, 2016.

LEO, R. J.; FRODEY, J. N.; RUGGIERI, M. L. Subtle neuropsychiatric symptoms of glioblastoma multiforme misdiagnosed as depression. **BMJ Case Reports**, v. 13, n. 3, p. e233208, mar. 2020.

LEONARDO, L. G. F.; ADRIANO, D. A. Cancer Estimates in Brazil Reveal Progress for the Most Lethal Malignancies. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 22, p. 1962–1966, 31 ago. 2020.

LIBERTI, M. V.; LOCASALE, J. W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 3, p. 211–218, 1 mar. 2016.

LIU, Q. et al. 1-deoxynojirimycin alleviates insulin resistance via activation of insulin signaling PI3K/AKT Pathway in skeletal muscle of db/db mice. **Molecules**, 2015.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, 2016.

LU, Y. et al. 1-Deoxymannojirimycin, the alpha1,2-mannosidase inhibitor, induced cellular endoplasmic reticulum stress in human hepatocarcinoma cell 7721. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 344, n. 1, p. 221–225, 26 maio 2006.

LV, Z.; GUO, Y. Metformin and Its Benefits for Various Diseases. **Frontiers in Endocrinology**, 2020.

MARCHETTI, L. et al. Determination of 1-Deoxynojirimycin (1-DNJ) in Leaves of Italian or Italy-Adapted Cultivars of Mulberry (*Morus sp.pl.*) by HPLC-MS. **Plants**, v. 10, n. 8, ago. 2021.

MAUÉS, L. A. L. et al. Flavonoids from the Amazon plant *Brosimum acutifolium* induce C6 glioma cell line apoptosis by disrupting mitochondrial membrane potential and reducing AKT phosphorylation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 2019.

MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 80, p. 50–64, ago. 2018.

MOUDI, M. et al. Vinca alkaloids. **International Journal of Preventive Medicine**, 2013.

NAIK, R. et al. Bioactive benzofuran derivatives: Moracins A-Z in medicinal chemistry. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2015.

NAKAGAWA, K. et al. Occurrence of Orally Administered Mulberry 1-Deoxynojirimycin in Rat Plasma. research-article. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf071559m>>. Acesso em: 11 out. 2021.

NARO, G. R.; NOVERATI, N.; CRAIG, T. The Role of C1-Esterase Inhibitors in the Management of Vasogenic Edema in Glioblastoma. **Case Reports in Medicine**, 2020.

NYAMBE, M. et al. In Vitro Evaluation of the Phytopharmacological Potential of *Sargassum incisifolium* for the Treatment of Inflammatory Bowel Diseases. **Medicines**, 2019.

OMURO, A. Glioblastoma and Other Malignant Gliomas. **JAMA**, 2013.

ORACZ, J. et al. Bioavailability and metabolism of selected cocoa bioactive compounds: A comprehensive review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 12, p. 1947–1985, 3 jul. 2020.

ORLICKA-PŁOCKA, M. et al. Implications of Oxidative Stress in Glioblastoma Multiforme Following Treatment with Purine Derivatives. **Antioxidants**, v. 10, n. 6, p. 950, 12 jun. 2021.

OSBOURN, A. E.; LANZOTTI, V. (EDS.). **Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function, and Application**. New York: Springer-Verlag, 2009.

PARIDA, I. S. et al. Physiological Effects and Organ Distribution of *Bacillus amyloliquefaciens* AS385 Culture Broth Powder Containing 1-Deoxynojirimycin in C57BL/6J Mice. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 65, n. 2, p. 157–163, 2019.

PARK, W. H. MAPK inhibitors, particularly the JNK inhibitor, increase cell death effects in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated lung cancer cells via increased superoxide anion and glutathione depletion. **Oncology Reports**, v. 39, n. 2, p. 860–870, 1 fev. 2018.

PERILLO, B. et al. ROS in cancer therapy : the bright side of the moon. **Experimental & Molecular Medicine**, 2020.

PINHEIRO. Tese—Universidade Federal do Pará: [s.n.].

PISTRITTO, G. et al. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic. **strategiesAging**, 2016.

PORFÍRIO-DIAS, C. L. et al. Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl) shows cytotoxicity but no mutagenicity in the ACPP02 gastric cancer cell line. **Journal of Applied Toxicology**, 2020.

PORFÍRIO-DIAS, C. L. et al. Andiroba oil ( *CARAPA GUIANENSIS* Aubl) shows cytotoxicity but no mutagenicity in the ACPP02 gastric cancer cell line. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1060–1066, ago. 2020.

QUANTE, A. S. et al. Projections of cancer incidence and cancer-related deaths in Germany

by 2020 and 2030. **Cancer Medicine**, 2016.

RAFEHI, H. et al. Clonogenic assay: adherent cells. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, n. 49, p. 2573, 13 mar. 2011.

RAMALINGAM, P. et al. Chronic activation of endothelial MAPK disrupts hematopoiesis via NFkB dependent in fl ammatory stress reversible by SCGF. **Nature Communications**, n. 2020, p. 1–20, 2020.

REMALIAH, N. et al. Green synthesis of gold nanoparticles using Acai berry and Elderberry extracts and investigation of their effect on prostate and pancreatic cancer cells. **Nano Biomedicine**, v. 8, p. 1–8, 2021.

ROYER, M. et al. Secondary metabolites of *Bagassa guianensis* Aubl. wood: A study of the chemotaxonomy of the Moraceae family. **Phytochemistry**, 2010.

ROYER, M. et al. Efficacy of *Bagassa guianensis* Aubl. extract against wood decay and human pathogenic fungi. **International Biodeterioration and Biodegradation**, 2012.

SAIKOLAPPAN, S. et al. Reactive oxygen species and cancer: A complex interaction. **Cancer Letters**, v. 452, p. 132–143, jun. 2019.

SAVARIN, C.; BERGMANN, C. C. Viral-induced suppression of self-reactive T cells: Lessons from neurotropic coronavirus-induced demyelination. **Journal of Neuroimmunology**, v. 308, p. 12–16, 2017.

SCHLICHTIG, K. et al. New Oral Anti-Cancer Drugs and Medication Safety. **Deutsches Arzteblatt International**, v. 116, n. 46, p. 775–782, 15 nov. 2019.

SCHMIDT, M. et al. Regulation of G2/M Transition by Inhibition of WEE1 and PKMYT1 Kinases. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 22, n. 12, p. E2045, 23 nov. 2017.

SCHULTZ, T. P. et al. Role of stilbenes in the natural durability of wood: Fungicidal

structure-activity relationships. **Phytochemistry**, 1990.

SERPELONI, J. et al. Fridericia platyphylla (Cham.) L.G. Lohmann root extract exerts cytotoxic and antiproliferative effects on gastric tumor cells and downregulates BCL-XL, BIRC5, and MET genes. **Human & Experimental Toxicology**, v. 39, n. 3, p. 338–354, 1 mar. 2020.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2020. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 70, n. 1, p. 7–30, 2020.

SONG, X. et al. Dioscin induces gallbladder cancer apoptosis by inhibiting ros-mediated PI3K/AKT signalling. **International Journal of Biological Sciences**, 2017.

TABIBZADEH, S. Signaling pathways and effectors of aging. **Frontiers in Bioscience**, v. 26, n. 1, p. 50–96, 2021.

THRIFT, A. P.; EL-SERAG, H. B. Burden of Gastric Cancer. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, 2020.

TOMKO, A. M. et al. Anti-cancer potential of cannabinoids, terpenes, and flavonoids present in cannabis. **Cancers**, 2020.

TREIBER, A.; MORAND, O.; CLOZEL, M. The pharmacokinetics and tissue distribution of the glucosylceramide synthase inhibitor miglustat in the rat. **Xenobiotica**, 2007.

TURAN, I. et al. Antiproliferative and apoptotic effect of Morus nigra extract on human prostate cancer cells. **Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ**, v. 25, n. 2, p. 241, fev. 2017.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **The Journal of Physiology**, v. 552, n. Pt 2, p. 335, 15 out. 2003.

VALERO, M. L. et al. E1a promotes c-Myc-dependent replicative stress: implications in glioblastoma radiosensitization. **Cell Cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 13, n. 1, p. 52–61, 2014.

VALVONA, C. J. et al. The Regulation and Function of Lactate Dehydrogenase A: Therapeutic Potential in Brain Tumor. **Brain Pathology**, v. 26, n. 1, p. 3–17, jan. 2016.

VAN DEN BENT, M. J.; CHANG, S. M. Grade II and III Oligodendroglioma and Astrocytoma. **Neurologic Clinics**, 2018.

VAN DER POST, R. S. et al. Hereditary gastric cancer: what's new? Update 2013–2018. **Familial Cancer**, 2019.

VITOVCOVA, B. et al. Biology of Glioblastoma Multiforme—Exploration of Mitotic Catastrophe as a Potential Treatment Modality. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 15, p. 5324, 27 jul. 2020.

WANG, K. et al. Flavokawain A inhibits prostate cancer cells by inducing cell cycle arrest and cell apoptosis and regulating the glutamine metabolism pathway. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 186, p. 113288, 15 jul. 2020.

WANG, R.-J.; YANG, C.-H.; HU, M.-L. 1-Deoxynojirimycin Inhibits Metastasis of B16F10 Melanoma Cells by Attenuating the Activity and Expression of Matrix Metalloproteinases-2 and -9 and Altering Cell Surface Glycosylation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 16, p. 8988–8993, 25 ago. 2010.

WANG, X.; SIMPSON, E. R.; BROWN, K. A. p53: Protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis. **Cancer Research**, 2015.

WESTPHAL, M.; LAMSZUS, K. The neurobiology of gliomas: From cell biology to the development of therapeutic approaches. **Nature Reviews Neuroscience**, 2011.

WILSON, R.; SPIER, R. E. Biochemistry of hybridoma technology. **Developments in biological standardization**, v. 66, p. 161–7, 1987.

WINGERTER, A. et al. Exploiting gangliosides for the therapy of ewing's sarcoma and h3k27m-mutant diffuse midline glioma. **Cancers**, 2021.

WIRSCHING, H.-G.; GALANIS, E. Chapter 23 – Glioblastoma. In: **Handbook of Clinical Neurology**. [s.l: s.n.].

XIONG, Z. S. et al. Effect of metformin on cell proliferation, apoptosis, migration and invasion in A172 glioma cells and its mechanisms. **Molecular Medicine Reports**, v. 20, n. 2, p. 887–894, 2019.

XU, P. et al. Matairesinol Suppresses Neuroinflammation and Migration Associated with Src and ERK1/2-NF- $\kappa$ B Pathway in Activating BV2 Microglia. **Neurochemical Research**, 2017.

YANG, Y. et al. Mitochondria and Mitochondrial ROS in Cancer: Novel Targets for Anticancer Therapy. **Journal of Cellular Physiology**, v. 231, n. 12, p. 2570–2581, 2016.

YAZDANKHAH, S.; HOJJATI, M.; AZIZI, M. H. The Antidiabetic Potential of Black Mulberry Extract-Enriched Pasta through Inhibition of Enzymes and Glycemic Index. **Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)**, v. 74, n. 1, p. 149–155, mar. 2019.

YIN, H. et al. Accumulation of 1-deoxynojirimycin in silkworm, *Bombyx mori* L. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 11, n. 4, p. 286–291, abr. 2010.

YIN, J. et al. MiR-181b suppress glioblastoma multiforme growth through inhibition of SP1-mediated glucose metabolism. **Cancer Cell International**, v. 20, n. 1, p. 69, dez. 2020.

YU, W. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of N-Alkylated deoxynojirimycin (DNJ) derivatives for the treatment of dengue virus infection. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2012.

ZHANG, J. et al. Potential cancer chemopreventive and anticancer constituents from the fruits of *Ficus hispida* L.f. (Moraceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 214, p. 37–46, 25 mar. 2018a.

ZHANG, T. et al. Targeting the ROS/PI3K/AKT/HIF-1 $\alpha$ /HK2 axis of breast cancer cells:

Combined administration of Polydatin and 2-Deoxy-d-glucose. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 2019.

ZHANG, X. et al. Podophyllotoxin derivatives as an excellent anticancer aspirant for future chemotherapy: A key current imminent needs. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2018b.

ZHAO, Y. et al. N-(8-(3-ethynylphenoxy)octyl)-1-deoxynojirimycin suppresses growth and migration of human lung cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 24, p. 7540–7543, 15 dez. 2010.

ZHOU, J. et al. N-Alkyl-1,5-dideoxy-1,5-imino- $\beta$ -D-fucitols as fucosidase inhibitors: Synthesis, molecular modelling and activity against cancer cell lines. **Bioorganic Chemistry**, v. 84, p. 418–433, 1 mar. 2019.

ZHOU, X. et al. Involvement of mitogen-activated protein kinase in signal transducer and activator of transcription-1 mediated differentiation induced by bortezomib in acute myeloid leukemia cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 52, n. 1, p. 18–28, 2013.

ZONCU, R.; EFEYAN, A.; SABATINI, D. M. MTOR: From growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 2011.

Atualizações de citação automática estão desativadas. Para ver a bibliografia, clique em Atualizar na aba do Zotero.