



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JULIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA**



**PATRÍCIA DA SILVA LOPES**

**Avaliação dos efeitos antitumorais de extratos brutos  
produzidos por fungos endofíticos isolados de *Eugenia  
jambolana* em células de hepatocarcinoma murino  
(Hepa-1c1c7)**

**ARARAQUARA-SP**

**2015**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

PATRÍCIA DA SILVA LOPES

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” campus de Araraquara com parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Citologia Clínica e Biologia Celular.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christiane Pienna Soares**  
**Co-Orientador: Prof.Dr. Cleverton Roberto de Andrade**

**ARARAQUARA-SP**

**2015**

**Ficha Catalográfica**

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

L864a      Lopes, Patrícia da Silva  
              Avaliação dos efeitos antitumorais de extratos brutos produzidos por fungos endofíticos isolados de *Eugenia jambolana* em células de hepatocarcinoma murino (Hepa1c1c7) / Patrícia da Silva Lopes. – Araraquara, 2015  
              94 f.

              Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

              Orientador: Christiane Pienna Soares  
              Coorientador: Cleverton Roberto de Andrade

              1. Carcinoma hepatocelular. 2. Atividade antitumoral. 3. Fungos endofíticos. I. Soares, Christiane Pienna, orient. II. Andrade, Cleverton Roberto de, coorient. III. Título.

**CAPES: 40300005**

Dissertação de Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicada à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Câmpus de Araraquara como parte dos requisitos para o título de mestre em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia. Área de concentração: Citologia Clínica e Biologia Celular. Trabalho desenvolvido no laboratório de Citologia Clínica e Biologia Celular do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP/ Campus Araraquara. Fomento: Bolsa CNPq – Mestrado.

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTITUMORAIS DE EXTRATOS BRUTOS  
PRODUZIDOS POR FUNGOS ENDOFÍTICOS ISOLADOS DE *EUGENIA  
JAMBOLANA* EM CÉLULAS DE HEPATOCARCINOMA MURINO  
(HEPA-1C1C7)**

COMISSÃO EXAMINADORA

---

Prof. Christiane Pienna Soares  
Orientador e Presidente da Comissão Examinadora

---

Profa. Dra Angela Regina Araújo  
Membro Titular

---

Prof. Dra. Raquel Alves dos Santos  
Membro Titular

*Dedico este estudo,*

*A minha mãe, **Márcia**, pelo apoio incondicional sempre me incentivando em todos os momentos. Amo você!*

## **Agradecimentos**

*Em primeiro lugar a **Deus**, pela oportunidade dessa conquista.*

*Aos meus **pais, Márcia e Reginaldo** pela educação e por todo apoio.*

*À minha irmã, **Paula** por todas palavras de conforto e carinho.*

*Aos meus avós paternos **Mária Cícera e Juarez**, que sempre me apoiaram nesse caminho, demonstrando incentivo e valorização para os estudos.*

*Aos meus avós maternos **Helena e Bianor** pelo carinho e orações sempre demonstrando preocupação por me ver longe de casa e da família.*

*À toda minha família por toda força e incentivo, por valorizar a importância de uma formação profissional de qualidade.*

*Ao meu namorado, **Júlio Cesar** pelo carinho, compreensão e paciência, sempre me incentivando a lutar pelos meus sonhos. Pessoa com quem pude contar em todos os momentos, mesmo com a distância sempre esteve presente no meu dia a dia, sempre me acalmando e me dando forças para continuar.*

*À minha orientadora **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christiane Pienna Soares**, que me acolheu em seu laboratório, depositando sua confiança no meu trabalho e competência. Agradeço imensamente pela oportunidade dada, pois tenho certeza que essa experiência foi significativa na construção de conhecimento acadêmico e de vida.*

*Às amigas e companheiras de laboratório **Juliana Sorbo e Thais Moreira** por terem contribuído significativamente em todos os momentos de aprendizagem, a cerca da rotina do laboratório e experimentos, sempre dispostas a ajudar.*

*À todos colegas e companheiros de laboratório por todo auxílio durante todo o meu trabalho:*

*Felipe, Ana Emília, Geovana, Laura, Juliana Ferreira, Rodolfo, Luís, muito obrigada!*

*À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Valéria** pelo apoio dado e pelas valiosas sugestões.*

*À professora **Dr<sup>a</sup>. Angela Regina** e a **Dr<sup>a</sup>. Vanessa Chapla** pela colaboração desta pesquisa, fornecendo os extratos dos fungos endofíticos para realização dos testes.*

*À **Andressa e Carolina Rabal** do Instituto de Química pelo cultivo do fungo endofítico para identificação.*

*Ao **Dr. Cleverton Roberto de Andrade** do Departamento de Fisiologia e Patologia da UNESP, Faculdade de Odontologia de Araraquara, pela co-orientação.*

*A todas as pessoas do Departamento de Análises Clínicas pela disposição em ajudar sempre que preciso, em especial à dona **Mária** (da limpeza), **Rosemira**, **Márcia** (portaria) e **Hermes** (portaria).*

*À **Roberta Duarte** por sua amizade, pelos momentos de companhia dos finais de semanas de trabalho no laboratório, por todo apoio. Por compartilhar de suas experiências de trabalho e de vida.*

*À minha amiga **Josiane** por toda força e apoio durante todo período de mestrado, pelos conselhos e companheirismo que fizeram toda diferença mesmo apesar da distância, agradeço imensamente por todas suas contribuições.*

*Ao meu amigo **Mr. Eliezer** por sua verdadeira amizade, sempre me auxiliando em todos os momentos que precisei, grande exemplo de biólogo dedicado e competente.*

*À minha amiga **Nathália Pires** pelo carinho e apoio de sempre, me auxiliando e dando força para continuar.*

*À minha amiga **Maria Carolina** pela cumplicidade, sempre me dando forças, obrigada pelos momentos que ouviu meus desabafos e meus problemas, sempre me acalmando com seu jeitinho de ser.*

*Ao meu amigo **Lucas Queiroz (frôr roxa)** pelo carinho e apoio.*

*À minha grande amiga **Ana Paula** pelas visitas feitas em Araraquara durante meu mestrado, grande companhia.*

*À minha amiga **Tatiane Gregório**, companheira de moradia no primeiro ano de mestrado sempre disposta em me ouvir e aconselhar.*

*À minha amiga **Thaís Goulart**, companheira de moradia no segundo ano de mestrado, sempre disposta a ajudar, nunca mediu esforços para oferecer um pouco do seu tempo para ouvir meus desabafos sobre os difíceis momentos de rotina de trabalho. Também bióloga já com sua experiência de mestre contribuiu significativamente para ampliação de conhecimentos acadêmicos, bem como de experiências de vida.*

*À minha amiga **Dr<sup>a</sup> Sueli Gardim**, que desde o início do mestrado sempre se demonstrou disposta em ajudar em tudo, exemplo de mulher eficiente e competente, levarei comigo eterna gratidão por todos os momentos.*

*Aos meus amigos/parentes **Rosangela, Carlos, Wilder, Caio, Sebastião e Cláudia** que considero da minha família, desde o início do processo seletivo do mestrado me acolheram em suas casas, me auxiliando em todos momentos que precisei.*

*Ao pessoal do Laboratório de Parasitologia Básica, que foi minha linha de pesquisa inicial, obrigado por terem me acolhido e pelas experiências e conhecimentos*

*compartilhados, em especial à **Aline Rimold** que com muita paciência me ensinou tudo que aprendi nesse primeiro momento do meu mestrado.*

*Às minhas amigas do laboratório de Parasitologia Clínica **Letícia de Almeida e Thais Passalacqua** que sempre pude contar para trocar experiências de laboratório.*

*À minha amiga **Monalisa (Mona Mona)**, que se demonstrou uma grande companheira, amizade construída ao final do mestrado, mas que com certeza em pouco tempo se tornou uma pessoa muito importante e que fez toda diferença. Considero que seja um anjo colocado por Deus na minha vida nesse momento tão difícil.*

**Trecho música:**

**Posso, tudo posso Naquele que me fortalece**

**Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir**

**Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos**

**Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar**

**Padre Fábio de Melo**

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível”.

*Charles Chaplin*

## SUMÁRIO

**RESUMO**

**ABSTRACT**

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE ABREVIACÕES**

### **CAPÍTULO 1**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
1.1 Carcinoma Hepatocelular.....	20
1.2 Fungos Endofíticos e <i>Eugenia jambolana</i> .....	21
1.3 Morte Celular.....	23
1.4 Ciclo Celular.....	26
1.5 Genotoxicidade e Mutagenicidade.....	27
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1 Extração, isolamento e identificação dos fungos endofíticos.....	30
3.2 Cultivo dos fungos endofíticos em pequena escala para obtenção dos extratos..	31
3.3 Cultura de células.....	31
3.4 Tratamento das linhagens.....	33
3.5 Ensaio de Citotoxicidade.....	33
3.6 Avaliação da indução de apoptose.....	34
3.6.1 Método de Hoechst e Iodeto de Propídeo.....	34
3.6.2 Atividade de Caspase 3.....	35
3.7 Ensaio do Ciclo Celular.....	36
3.8 Ensaio de Genotoxicidade - Ensaio do Cometa.....	36
3.9 Ensaio de Mutagenicidade – Teste do Micronúcleo.....	37
<b>4. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>39</b>

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>40</b>
5.1 Ensaio de Citotoxicidade.....	40
5.2 Ensaio de Hoechst/ Iodeto de Propídeo.....	44
5.3 Atividade de Caspase 3.....	51
5.4 Ensaio do Ciclo Celular.....	53
5.5 Ensaio do Cometa.....	56
5.6 Ensaio do Micronúcleo.....	57
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>68</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>69</b>

## **CAPÍTULO 2**

<b>9. ARTIGO.....</b>	<b>81</b>
-----------------------	-----------

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Variação regional da Taxa de Mortalidade de câncer de fígado.

**Figura 2.** Fruto da árvore *Eugenia jambolana*.

**Figura 3.** Regulação dos caminhos intrínseco e extrínseco da ativação de caspases durante a apoptose.

**Figura 4.** Representação esquemática do ciclo celular.

**Figura 5.** Imagem da célula ensaio do cometa. Célula sem tratamento e células com dano no DNA após exposição por peróxido de hidrogênio.

**Figura 6.** Esquema mostrando o processo de formação do micronúcleo.

**Figura 7.** Etapas de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos.

**Figura 8.** Linhagens celulares: Hepatocarcinoma murinho, Hepatocarcinoma humano e queratinócito normal de pele.

**Figura 9.** Ensaio de citotoxicidade (Sulfarrodamina B). Extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1) nas linhagens celulares Hepa1c1c7, HepG2 e HaCat.

**Figura 10.** Ensaio de citotoxicidade (Sulfarrodamina B). Extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1) nas linhagens celulares Hepa1c1c7, HepG2 e HaCat.

**Figura 11.** Apoptose por coloração Hoechst/IP em células Hepa 1c1c7 após tratamento com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1).

**Figura 12.** Relação entre apoptose total e necrose de células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1).

**Figura 13.** Relação entre apoptose precoce e apoptose tardia de células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1).

**Figura 14.** Apoptose por coloração Hoechst/IP em células Hepa 1c1c7 após tratamento com extrato bruto de fungos endofíticos da *Eugenia jambolana* isolado do fruto maduro (Ej-fv1).

**Figura 15.** Relação entre apoptose total e necrose de células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1).

**Figura 16.** Relação entre apoptose precoce e apoptose tardia de células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1).

**Figura 17.** Fotomicrografias referentes às imagens de fluorescência utilizando Hoechst 33342, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína.

**Figura 18.** Fotomicrografias referentes às imagens de fluorescência utilizando Hoechst 33342, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína.

**Figura 19.** Atividade de caspase 3 em células Hepa 1c1c7 tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1) por 8 horas.

**Figura 20.** Atividade de caspase 3 em células Hepa 1c1c7 tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1) por 8 horas.

**Figura 21.** Atividade de caspase 3 em células Hepa 1c1c7 tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1) por 12 horas.

**Figura 22.** Atividade de caspase 3 em células Hepa 1c1c7 tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1) por 12 horas.

**Figura 23.** Ensaio do Ciclo Celular. Extrato bruto do fungo isolado do fruto maduro (Ej-fm1) nas linhagens celulares Hepa1c1c7, HepG2 e HaCat.

**Figura 24.** Ensaio do Ciclo Celular. Extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1) nas linhagens celulares Hepa1c1c7, HepG2 e HaCat.

**Figura 25.** Genotoxicidade de extratos brutos produzidos por fungos endofíticos isolados do fruto maduro (Ej-fm1) e fruto verde (Ej-fv1) de *Eugenia jambolana*, representada pela % de DNA na cauda em linhagem celular Hepa 1c1c7.

**Figura 26.** Mutagenicidade de extratos brutos produzidos por fungos endofíticos isolados do fruto maduro (Ej-fm1) e fruto verde (Ej-fv1) de *Eugenia jambolana*, representada pela frequência de micronúcleos na linhagem celular Hepa 1c1c7.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AcOEt – acetato de etila
- AMC – aminometilcumarina
- ANOVA – analysis of variance
- APAF-1 – proteína adaptadora
- ATCC – American Type Culture Collection
- ATV – associação de tripsina e versene
- BDA – batata dextrose agar
- CHC – carcinoma hepatocelular
- CI<sub>50</sub> – concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular
- CN – controle negativo
- CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono
- CP – controle positivo
- CV- controle de veículo
- DAF – diacetato de fluoresceína
- DMEM – Dulbecco`s modification of Eagle`s médium
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- DTT – ditioneitol
- EDTA – Ácido Etilenodiaminatetracético
- Ej-fm1 – extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *Pseudofusicoccum stromaticum* isolado do fruto maduro de *Eugenia jambolana*.
- Ej-fv1 – extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *Neofusicoccum* sp. isolado do fruto verde de *Eugenia jambolana*.
- ER – Retículo endoplasmático
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- HaCat – células de queratinócito de pele normal
- Hepa 1c1c7 – células de Hepatocarcinoma murinho
- HepG2 – células de Hepatocarcinoma humano
- HO – Hoechst 3342
- HVB – Vírus da hepatite B
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- IP – iodeto de propídeo

NaCl – cloreto de sódio

NaClO – hipóclorito de sódio

NaOH – hidróxido de sódio

OVAR – carcinoma de ovário

PBS – solução salina tamponada com fosfato

SF-295 – glioblastoma - humano

SFB – soro fetal bovino

SRB – sulfarrodamina B

TRIS –Tris hidroximetil aminometano

$\alpha$ MEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

$\mu$ g – microgramas

WHO – World Health Organization

## RESUMO

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um tumor primário mais frequente do fígado, sendo a terceira causa de mortalidade por câncer. Dentre os tumores hepáticos primários o CHC é responsável por quase 90% dos casos. Frente a busca para o desenvolvimento da produção de novos fármacos derivados de produtos naturais, os fungos endofíticos apresentam-se como fontes promissoras. Estudos recentes mostraram que os extratos de fungos endofíticos tem várias atividades, como propriedades anti-tumorais. O objetivo do presente estudo foi avaliar a capacidade de citotóxica dos extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos isolados de *Eugenia jambolana* nas linhagens hepatocarcinoma murinho (Hepa 1c1c7), linhagem humana de hepatocarcinoma (Hep G2) e queratinócito normal de pele (HaCat) e verificar a indução de apoptose, atividade de caspase, genotoxicidade, mutagenicidade e identificar a distribuição no ciclo celular. Nossos resultados indicam que ambos os extratos apresentaram atividade inibidoras. O extrato bruto do fungo *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) apresentou maior seletividade para Hepa1c1c7, apresentando  $CI_{50}$  de 58  $\mu\text{g/mL}$ , com uma inibição celular de 63,4% e 38,4% para as concentrações de 100  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$ . Enquanto HepG2 e HaCat não apresentaram morte celular significativa. O extrato de *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1) induziu alta citotoxicidade, apresentando inibição celular 67,83% apenas na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  com um valor de  $CI_{50}$  de 89  $\mu\text{g/mL}$ . HepG2 e HaCaT demonstraram inibição celular significativa (38,4% e 43,5%, respectivamente), mas também apenas na maior concentração (100  $\mu\text{g/mL}$ ). Na avaliação de apoptose usando o método Hoechst/Iodeto de propídeo em Hepa1c1c7, o extrato (Ej-fm1) apresentou diferença estatística para a presença de apoptose tardia, bem como necrose. Mas para o extrato (Ej-fv1) houve morte celular significativa apenas na concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  para a apoptose precoce e necrose, notando uma relação concentração-resposta para a apoptose precoce. Sobre as análises dos mecanismos de morte celular, sugerimos que os extratos induziram um perfil de morte celular imunogênica, pois foi identificado morte celular por apoptose e necrose. Não foi identificado atividade de caspase 3 em ambos os extratos, possivelmente sugerindo um mecanismo de morte celular independente de caspase. Não identificamos indução parada do ciclo celular nas linhagens tumorais. Também identificamos por meio dos ensaios do cometa e do micronúcleo que os extratos dos fungos endofitos não induziram efeitos genotóxicos e mutagênicos. Este é o primeiro relato do potencial bioativo de fungos endofíticos isolados de frutos de *Eugenia jambolana*, que revelou o tipo de morte causada em linhagens celulares de hepatocarcinoma e que verificou a possível causa de danos ao DNA extratos poderiam causar na célula. Em

conclusão, os extratos exibiram potencial citotóxico. Portanto, *Pseudofusicoccum stromaticum* e *Neofusicoccum* evidenciaram serem boa fonte de compostos bioativos e devem ser mais estudados frente a outras atividades biológicas, justificando assim mais estudos adicionais com essa classe de microrganismos.

Palavras-chave: Carcinoma hepatocelular, atividade antitumoral, fungos endofíticos, citotoxicidade.

## ABSTRACT

Hepatocellular carcinoma (HCC) is more frequent primary liver cancer, and third most common cause of cancer mortality. Among primary liver tumors HCC is responsible for nearly 90% of cases. Compared to search for the development of production of novel drugs from natural products, the endophytic fungi have been presented as promising sources. Recent studies showed that extracts of endophytic fungi have various activities, such as, properties antitumor. The aim of this study was to evaluate cytotoxicity capacity of the crude extract isolated endophytic fungus ripe fruit, Ej-fm1 and unripe fruit, Ej-FV1 *Eugenia jambolana* in Murine hepatoma cell (Hepa 1c1c7), Human hepatocarcinoma cell line (Hep G2) and spontaneously immortalized human keratinocytes (HaCaT) and check the induction of apoptosis, caspase activity, genotoxic activity, mutagenic and distribution of cell cycle. Our findings indicate that demonstrated that both extracts showed inhibitory activities. The crude extract from *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) possessed more selectivity against Hepa1c1c7 showed IC<sub>50</sub>, value of 58 µg/mL, having a cellular inhibition 63.4% and 38.4% for the concentration 100µg / ml and 50µg/ml. While for HepG2 and HaCaT, no significant cell death. The extract of *Neofusicoccum* sp.(Ej-fv1) induced high cytotoxicity, showed cellular inhibition 67.83% just at concentration 100µg/ml with IC<sub>50</sub> value of 89 µg/mL. HepG2 and HaCaT cell also showed significant inhibition (38.4% and 43.5%, respectively) also only at the highest concentration. To evaluate apoptosis using Hoechst/Propidium iodide method in Hepa1c1c7 cells, the extract (Ej-fm1) showed statistical difference for presence of late apoptosis, as well as necrosis. But the extract (Ej-fv1) there are significant cell death only in the concentration of 100µg / mL for early apoptosis and necrosis, noting a concentration-response for early apoptosis. About the analyses of cell death mechanisms, we suggest that extracts a profile immunogenic cell death immunogenic induced, was identified death by apoptosis and necrosis. We not identified caspase 3 activity in both extracts, possibly suggesting a mechanism of cell death independent of caspase. We have not identified cell cycle arrest induction for tumor cell lines. The results also showed that the comet and micronucleus assays weren't able to reveal genotoxic and mutagenic effects induced with crude extracts of endophytic fungi. This is the first report of the bioactive potential of endophytic fungi isolated from fruits of *Eugenia jambolana*, that revealed the kind of death caused by these fungi in hepatoma cell lines and check about damage DNA that crude extracts could cause in cell. In conclusion, the extracts exhibited cytotoxic potential. Therefore, this endophytic fungi seems to be a good source of bioactive compounds and

should be studied further to showed their diverse bioactivities, thus justifying further studies of this class of microorganisms.

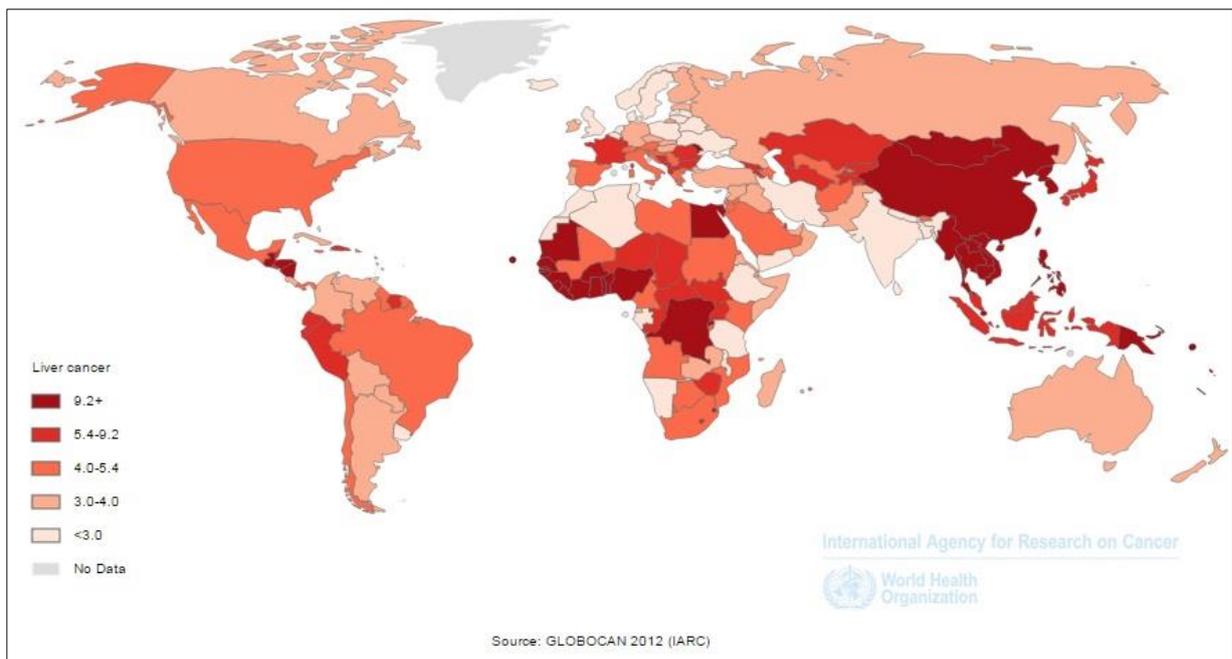
Key-words: Hepatocellular carcinoma, antitumor activity, endophytic fungi, cytotoxicity.

# ***CAPÍTULO 1***

## 1. Introdução

### 1.1. Carcinoma Hepatocelular

Dentre os tumores hepáticos primários o carcinoma hepatocelular (CHC) é o tumor mais frequente de fígado, representando 90% dos casos, sendo a segunda causa de morte por câncer no mundo. São diagnosticados aproximadamente 50.000 casos de carcinoma hepatocelular por ano, tendo maior incidência em países endêmicos pelo vírus da hepatite B (HVB) (EL-SERAG, 2011; BRUIX e SHERMAN, 2011; PARKIN, 2001). O câncer de fígado apresenta distribuição desigual ao redor do mundo com áreas com forte prevalência, como é o caso da África- subsaariana, Ásia-Oriental e a China (EL-SERAG e RUDOLPH, 2007; PARKIN, 2001; WHO, 2015) (Figura 1).



**Figura 1.** Variação regional da Taxa de Mortalidade de câncer de fígado. As taxas representam (números de casos por 100.000 pessoas) referem-se a ambos os sexos. Adaptado da Organização Mundial de Saúde.

Possivelmente, os conhecidos fatores de risco para o desenvolvimento de CHC devam estar envolvidos nesta desigualdade de distribuição, uma vez que os mesmos envolvem hepatopatia crônica por vírus B, C e D, toxinas (álcool e aflatoxina), hepatopatias hereditárias metabólicas (hemocromatose hereditária, alfa- 1- antitripsina), hepatite autoimune, obesidade e esteato-hepatite não alcoólica, tendo a cirrose hepática como o fator mais importante (BARBARA et al., 1996; CACCIOLA et al., 1999; EL-SERAG, 2011). De fato, a cirrose e o

carcinoma hepatocelular estão intimamente relacionados, sendo prevalente em 80% dos pacientes asiáticos e 50% dos pacientes europeus. Outros fatores também potenciais predisponentes para o carcinoma hepatocelular mais recorrentes nos países ocidentais, são as síndromes metabólicas e a obesidade associadas ao diabetes tipo II. (BARBARA et al., 1996; EL-SERAG, 2011; CACCIOLA et al., 1999; PIMENTA e MASSABKI, 2010).

No Brasil, os estados que possuem maiores incidências de carcinoma hepatocelular são: Amazonas, Bahia e Espírito Santo (SANTOS, 2005). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), as estimativas de mortalidade para esse tipo de carcinoma para o ano de 2011 foram de 8.100, sendo 4.556 homens e 3.544 mulheres (INCA, 2015). Diante desta condição, novas substâncias são estudadas para a produção de novos fármacos, principalmente, a partir de derivados de produtos naturais.

## **1.2. Fungos Endofíticos e *Eugenia jambolana***

É comum, principalmente, fungos e bactérias serem majoritariamente reconhecidos como patogênicos, porém muitos deles também são utilizados no desenvolvimento de fármacos como antibióticos, antitumorais, imunossuppressores e agentes redutores do colesterol sanguíneo (NEWMAN e CRAGG, 2007). Dentre esses microrganismos, os fungos endofíticos representam uma excelente fonte de produtos bioativos naturais. O termo endófito refere-se à qualquer microrganismo que coloniza o interior de plantas, mas não causam efeitos patogênicos sobre seu hospedeiro. Nessas interações, a planta hospedeira alimenta e protege o endófito, que por sua vez produz metabólitos bioativos para reforçar o crescimento e a competitividade do hospedeiro, bem como proporcionar proteção contra herbívoros e planta patogênicas (DREYFUSS e CHAPELA, 1994; GUO et al, 2008). Para Morais e colaboradores (2014) novas propostas biotecnológicas de compostos de origens de microbianos, principalmente os que são provenientes da interação de fungos e bactérias com plantas, são de grande importância para uma nova vertente na produção farmacêutica.

Um composto já bem conhecido é o Taxol, substância anticancerígena produzida pelo fungo endofítico *Taxomyces andrenae* isolado da planta *Taxus brevifolia*, que também é capaz de produzir essa substância. Outro anticancerígeno já bem descrito é a vincristina, isolada da planta *Catharanthus roseus*, e do fungo endofítico *Fusarium oxysporum*, fungo este proveniente da mesma planta. De fato, estudos recentes demonstram que extratos de fungos endofíticos apresentam atividade antitumoral (LI et al., 2013).

Vários estudos têm demonstrado a importância ecológica dos fungos endofíticos e as substâncias bioativas, como por exemplo, a produção de metabólitos secundários. Alguns mecanismos sobre a relação desses microrganismos com o hospedeiro já estão bem definidos, como a interferência do ambiente em que o hospedeiro se encontra com o metabolismo do fungo, bem como os benefícios que o fungo pode oferecer à planta hospedeira. Com esses e outros estudos a caracterização de diferentes associações dos endófitos podem fornecer subsídios para um melhor entendimento da evolução do mutualismo (JALGAONWALA et al., 2011).

*Eugenia jambolana*, conhecida popularmente no Brasil como jabolão, de origem na Indonésia, China e Antilhas, pode ser cultivada em diferentes regiões geográficas. No Brasil pode ser encontrada em praticamente todo o país, planícies litorâneas, serras e planaltos (GOMES, 1983). Em outros países tropicais *E. jambolana* é conhecida por suas propriedades hipoglicêmica e antidiabética, que estão intimamente relacionadas à atividade antioxidante e anti-inflamatória (VASI et al., 2009).

Os frutos de *E. jambolana* são comestíveis e utilizados como adstringente, estomáquico, diurético e antidiabético e, através deles, foi possível a identificação de várias antocianinas. Testes utilizando extrato bruto de frutos e folhas de *E. jambolana* obtiveram respostas interessantes, pois demonstraram atividade antioxidante, quimiopreventiva, antimalárica, antifúngica e, antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-ulcerogênica, cardioprotetora, anticarcinogênica, antialérgico, hepatoprotetora, antidiarréica, hipoglicêmica (BALIGA et al., 2011; DAMETTO, 2010; TIMBOLA et al., 2002).

Os benefícios observados a saúde foram atribuídos a presença de vários fitoquímicos como os polifenóis, terpenos, antocianinas e flavonoides. As antocianinas e os taninos presentes na polpa são importantes, pois estes reduzem o estresse oxidativo do organismo (BALIGA et al., 2011). E, neste contexto, nosso laboratório obteve resultados iniciais interessantes, demonstrando atividade citotóxica induzida por extratos de fungos endofíticos oriundos do fruto de *E. jambolana* na linhagem celular de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7) (BAVELONI, 2013) (Figura 2).

Nesse sentido, foi dada continuidade a mesma linha de pesquisa, a fim de continuar contribuindo para um melhor entendimento e ampliação de conhecimentos a cerca dos benefícios da utilização dos fungos endofíticos. Devido ao quadro do elevado índice de mortalidade por câncer de fígado no mundo, propomos a utilização de um modelo de hepatocarcinoma murinho *in vitro*, pois modelos tumorais de roedores são importantes fontes para estudos, substituindo a utilização de outros modelos mais demorados e mais caros. Esse

modelo viabiliza uma pré-seleção para identificação e seleção de produtos bioativos mais promissores para futuras avaliações desejáveis (EL-SAYED et al., 2007). Embora, o emprego de animais de laboratório ainda seja indispensável na etapa pré-clínica, a adoção de procedimentos alternativos, envolvendo o uso de modelos *in vitro*, permite realizar uma triagem possíveis substâncias candidatas a fármacos, aumentando as chances de melhores resultados nos ensaios pré-clínicos, além de reduzir o uso de animais. Desta forma, o emprego de modelos *in vitro*, em ensaios preliminares de metabolismo e toxicidade substâncias, apresenta grande utilidade para prever possíveis efeitos farmacológicos *in vivo*. (DAVILA et al., 1998).

Com o intuito de buscar agentes antineoplásicos a partir de substâncias isoladas de fontes naturais é necessário elucidar alguns mecanismos, principalmente com relação ao tipo de morte celular causada por essas substâncias. Tendo em vista que muitas terapias já disponíveis na clínica ainda causam fortes efeitos colaterais para os pacientes.



**Figura 2.** Fruto da árvore *Eugenia jambola*. Fonte: <http://www.jardineiro.net/plantas/jambolao-syzygium-jambolanum.html>. Foto: Rita Barreto.

### 1.3. Morte Celular

Dentre os diversos tipos de morte celular, os mais conhecidos são apoptose e necrose. A apoptose é um mecanismo fisiológico de eliminação de células indesejáveis ao organismo, ocorrendo de forma controlada, onde as células que morrem são removidas por fagocitose e substituídas por células novas geradas por mitose (GUICCIARDI e GORES, 2005).

Células morrem por apoptose sob modificações morfológicas características, que podem ser observadas quanto ao fenótipo nuclear, organização do citoesqueleto e alteração de organelas (BRAS, QUEENAN e SUSIN, 2005).

Em geral a célula em apoptose apresenta diminuição do tamanho, fragmentação do DNA e condensação da cromatina, levando ao surgimento de um núcleo picnótico, formação de vacúolos autofágicos, dilatação de organelas citoplasmáticas, como mitocôndria e complexo de Golgi (BRAS, QUEENAN e SUSIN, 2005).

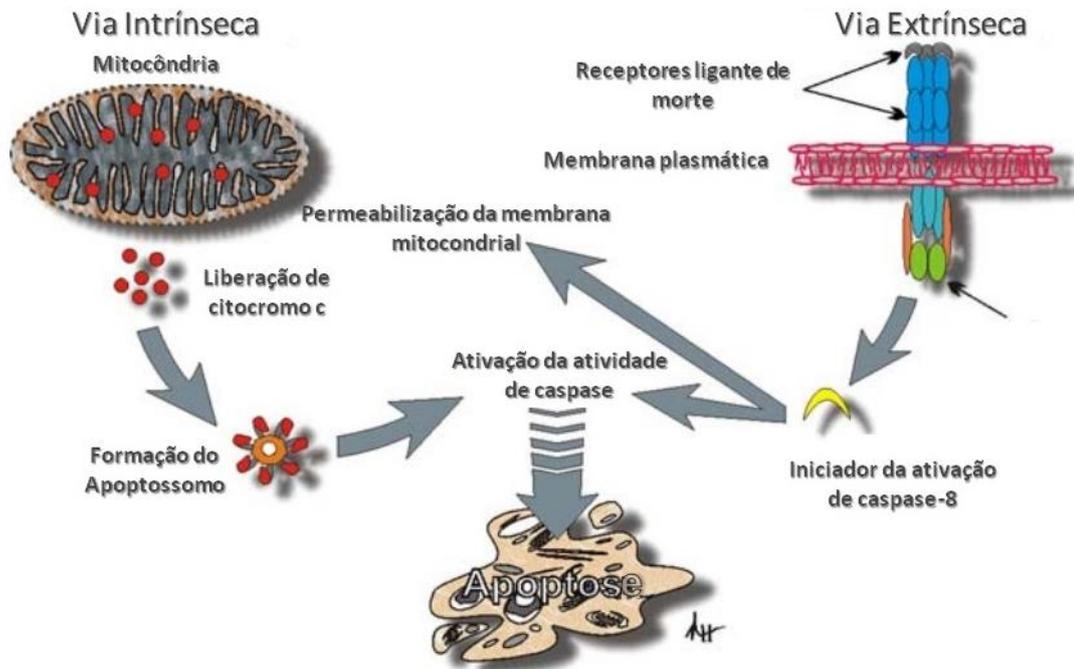
Por outro lado, o processo causado por um estímulo intenso que resulta na perda de controle por parte da célula, rápida interrupção dos processos de manutenção da integridade celular, rompimento da membrana plasmática, destruição do citoplasma e, como consequência, na morte da célula, é chamado de necrose, que pode ser definida como uma forma violenta de morte celular iniciada por estímulos ambientais que resultam em rápida desregulação da homeostasia (BRAS, QUEENAN e SUSIN, 2005). Nesse processo ocorre a liberação de componentes intracelulares, ocasionando uma reação inflamatória local (BOUJRAD et al., 2007, KERR et al., 1995). Mesmo que o material necrótico seja removido por fagócitos, a inflamação causa danos locais significativos (KERR et al., 1995).

De maneira geral, os fatores lesivos ao DNA como: hipoxia, desbalanço iônico e presença de citocinas podem desencadear a ativação de duas vias principais de morte celular programada por apoptose. A via extrínseca que é mediada por receptores de morte (TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e Fas), presente na membrana plasmática e via intrínseca que é desencadeada pela desestabilização da membrana mitocondrial, resultando na liberação do citocromo c (HAJRA e LIU, 2004; HAIL et al., 2006). O citocromo c é liberado no citosol funcionando como co-fator, que associa-se rapidamente com a região C-terminal de uma proteína adaptadora (Apaf-1), esta interação facilita a ligação ao dATP e pro-caspase 9 formando um complexo chamado de apoptossomo, e através da clivagem proteolítica a caspase 9 se torna ativa e subsequentemente ativando outras caspases (GREEN e KROMER, 1998; THORBERRY e LAZEBNIK, 1998; WATERHOUSE et al., 2002). O complexo catalítico gerado pelos sinais mitocondriais e a ação das caspases ativadas de via extrínseca, são sinais convergentes responsáveis pela ativação das caspases efetoras 3 e 7. Ambas as vias culminam no mesmo grupo de caspases efetoras, que por sua vez induz a morte celular programada (HAIL et al., 2006; HAJRA e LIU, 2004; ZHANG et al., 2004) (Figura 3).

Tumores malignos, como o CHC apresenta deficiência na ativação do processo de apoptose e aumento na atividade proliferativa, uma vez que genes ligados ao controle do ciclo

celular e genes envolvidos na inibição de crescimento e apoptose, apresentam-se usualmente mutados (RÖCKEN e CARL-MCGRATH, 2001).

Sendo assim, a apoptose é considerada um mecanismo regulador, pois provoca a morte da célula, caso haja alguma alteração no DNA que não foi reparada. Por essas razões, é de extrema importância a compreensão dos mecanismos e das alterações dos componentes das vias apoptóticas e sua correlação com a ocorrência do câncer. Nesse sentido, é necessário o desenvolvimento de estudos e estratégias para buscar novas terapias e métodos de prevenção do câncer (GRIVICICH et al., 2007; ZHOU e ELLEDGE, 2000).



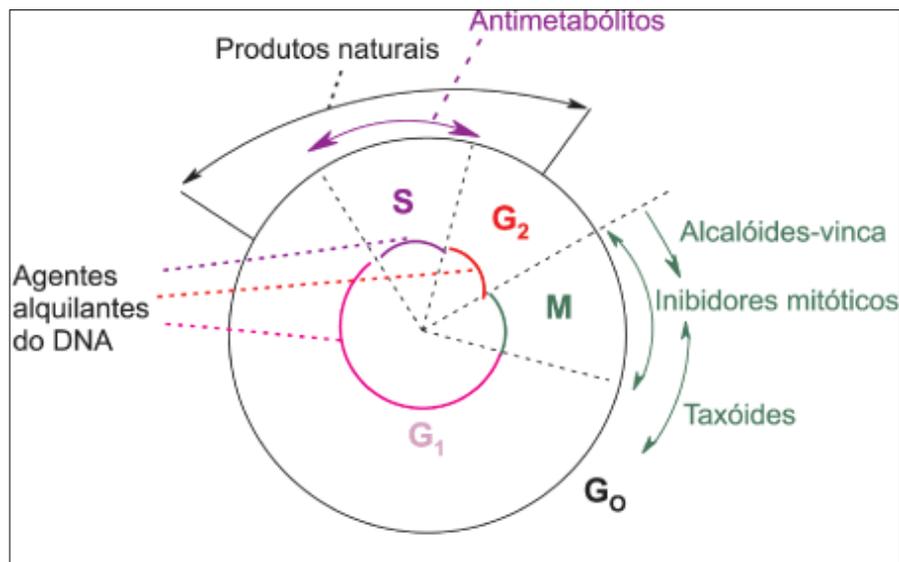
**Figura 3.** Regulação dos caminhos intrínseco e extrínseco da ativação de caspases durante a apoptose. Fonte: (Retirado e adaptado de HAIL et al., 2006).

#### 1.4. Ciclo Celular

Outro mecanismo regulador que está associado com a evolução de células malignas, ocorre na divisão celular, por essas razões o entendimento do ciclo celular e suas relações com a etiologia do câncer é de extra importância (HAHN e WEINBERG, 2002).

As células eucarióticas sofrem ciclos de divisão gerando células-filhas idênticas. A ocorrência dos eventos que envolvem o ciclo celular quando acontece de forma ordenada permitindo o desenvolvimento da sequência das fases que compõem o ciclo celular sem interrupção do processo. A interfase é a fase responsável pela multiplicação do material genético e síntese dos produtos necessários para mitose, que é a divisão celular propriamente dita. Todo o processo de divisão celular é um evento precisamente controlado e dividido em quatro fases: intervalo  $G_1$ , fase S ou de síntese do DNA, intervalo  $G_2$ , mitose (fase M) (GARRETT, 2001). Quando a célula não está replicando, ela se encontra na fase  $G_0$ , no momento em que há mudança de estágio a célula passa para  $G_1$ , onde ocorre a preparação da célula para multiplicação, bem como a produção de constituintes celulares necessários para a nova célula e preparação para a síntese de DNA, que ocorre dá na fase S. Nessas fases há vários mecanismos responsáveis pela regulação da multiplicação celular, os quais funcionam com checkpoint, que monitoram a presença de danos no DNA e possíveis alterações na sua replicação bloqueando a mitose quando o ocorre dano no DNA ou a replicação não pôde se completar. Esses controladores podem ser, por exemplo, genes supressores tumorais, que foram inativados. Na fase  $G_2$  ocorre síntese de componentes para mitose como a formação de fuso mitótico e na fase de mitose (M) ocorre a divisão celular com citocinese. Importantes classes de quimioterápicos antineoplásicos atuam durante o ciclo celular. Estes apresentam mecanismos de ação variados e exibem especificidade em termos da fase do ciclo em que têm atividade (DE ALMEIDA et al., 2005; HARTWELL e WEINERT, 1989; NIGG, 2001; PERDIGÃO e TAVARES, 2001) (Figura 4).

A progressão desregulada do ciclo celular tem sido considerada como das principais causas do aparecimento de câncer e, por isso, é relevante o desenvolvimento de pesquisas que busquem produtos antineoplásicos que possam atuar no ciclo celular “contornando” essa proliferação desregulada das células (COLLINS e GARRETT, 2005; SCHWARTZ e SHAH, 2005).



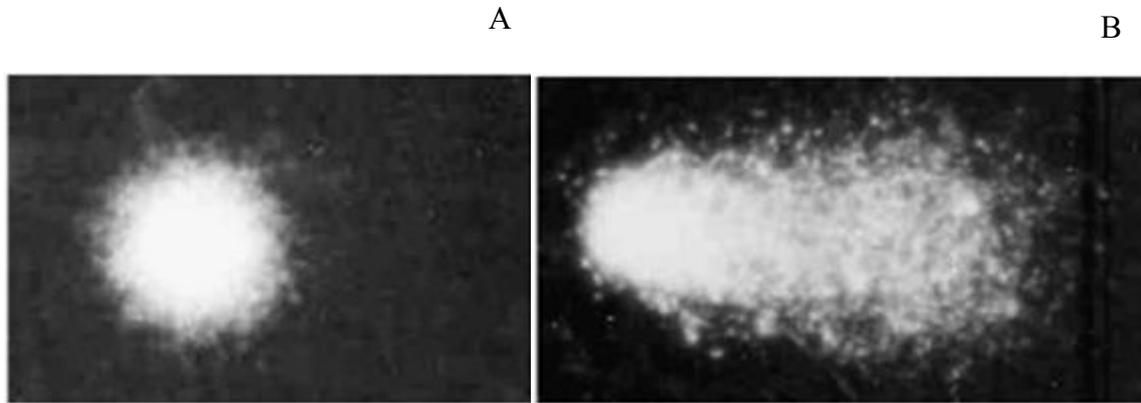
**Figura 4.** Ciclo Celular e suas respectivas fases de ação dos agentes quimioterápicos antineoplásicos Retirado de DE ALMEIDA et al., 2005.

### 1.5. Genotoxicidade e Mutagenicidade

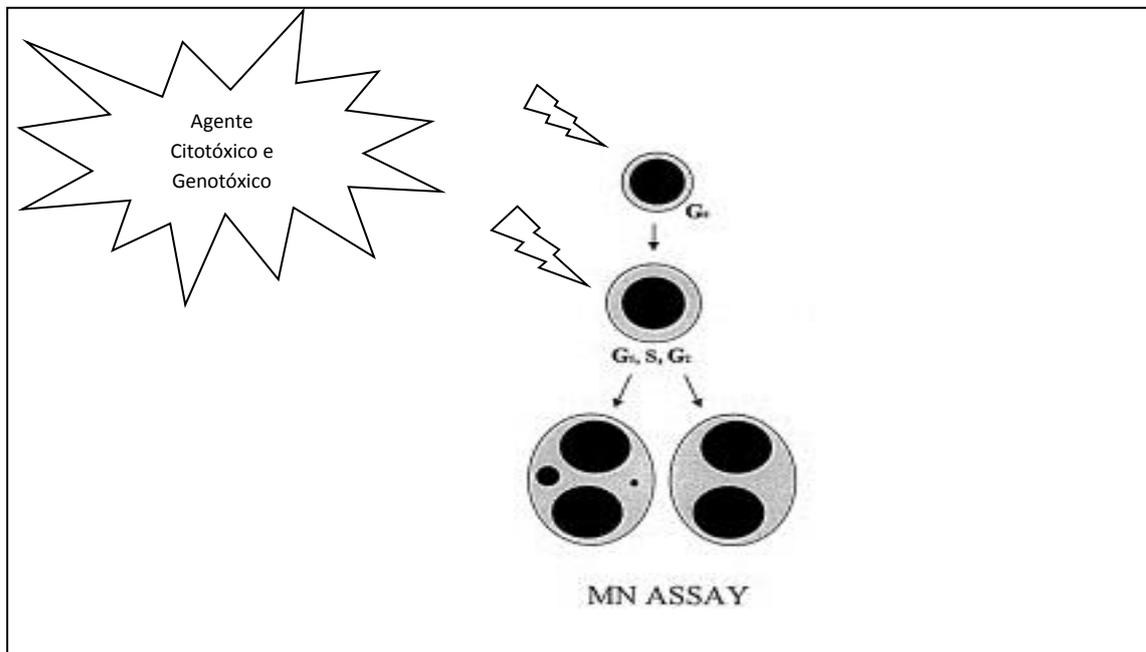
Para além dos experimentos de morte celular, também é necessário verificar o potencial da substância em propiciar danos ao DNA. O teste de genotoxicidade (ensaio do cometa) é um experimento capaz de detectar danos no DNA celular passíveis de serem reparados. Assim, por meio da medida de fragmentação do DNA na cauda distante do nucleóide pode-se sugerir se a substância é ou não capaz de induzir genotoxicidade na célula. Quando há genotoxicidade o DNA migra porque contém quebras que podem sofrer arraste, e esses danos aumentam frente à exposição a agentes genotóxicos (MOLLER, 2005) (Figura 5).

Outra análise importante é ensaio do micronúcleo, capaz de avaliar a mutagenicidade de substâncias que podem interferir no ciclo celular de maneira irreversível (TOROUS et al., 1998). O micronúcleo ocorre quando há formação de DNA excedente, o núcleo tem capacidade de “sentir” que o excesso de DNA não se estabeleceu bem dentro da matriz nuclear e repele uma pequena massa nuclear, que pode emergir do núcleo como um brotamento formando um micronúcleo, esse processo indica reparação do DNA, pois pode ter ocorrido uma falha na replicação ou mecanismo de limpeza nuclear (SHIMIZU et al., 1998). Essas falhas podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de grande parte dos tumores malignos estando relacionada com o acúmulo de mutações. A diferença entre os testes de mutagenicidade e genotoxicidade consiste basicamente na variações no tipo de alterações detectadas no DNA: o teste micronúcleo detecta lesões irreparáveis que se apresentam como

aberrações cromossômicas, enquanto o ensaio do cometa detecta lesões primárias no DNA (FENECH, 2000; SCOLASTICI et al., 2008) (Figura 6).



**Figura 5.** Ensaio do cometa. (A) célula sem tratamento; (B) célula tratada com peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$  (controle positivo). Adaptado de: SCOLASTICI, et al. (2008).



**Figura 6.** Esquema mostrando o processo de formação do micronúcleo. Adaptado de: FENECH, (2000).

## 2. Objetivos

- ✓ Avaliar a citotoxicidade celular, utilizando o método Sulfarrodamina B, nas linhagens Hepatocarcinoma murinho (Hepa1c1c7), Hepatocarcinoma humano (HepG2) e queratinócito de pele normal (HaCat) tratadas com de extratos brutos de fungos endofíticos isolados , Ej-fm1 e do fruto verde, Ej-fv1 de *E. jabolana*.
- ✓ Avaliar qualitativamente e quantitativamente a apoptose e necrose celular, para diferenciação de apoptose precoce, tardia e necrose, utilizando os corantes de Hoechst e iodeto de propídio, na linhagem celular Hepa-1c1c7, tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro, Ej-fm1 e do fruto verde, Ej-fv1 de *E. jabolana*.
- ✓ Avaliar quantitativamente sinais intracelulares de ativação da apoptose, verificando os níveis de caspases efetoras de apoptose (Caspase 3), na linhagem celular de hepatocarcinoma murino Hepa-1c1c7, tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e do fruto verde (Ej-fv1) de *E. jabolana*.
- ✓ Identificação das células distribuídas pelas diferentes fases do ciclo celular após o tratamento com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e do fruto verde (Ej-fv1) de *E. jabolana*, pela da análise do conteúdo de DNA.
- ✓ Verificar o potencial genotóxico na linhagem celular Hepa-1c1c7 utilizando extrato bruto do fungo endofítico isolados dos frutos maduro, Ej-fm1 e verde, Ej-fv1 de *E. jabolana*, utilizando o ensaio do cometa.
- ✓ Detectar danos tardios no DNA na linhagem celular Hepatocarcinoma murino Hepa-1c1c7 tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e do fruto verde (Ej-fv1) de *E. jabolana* para avaliação da mutagenicidade por meio do teste do micronúcleo.

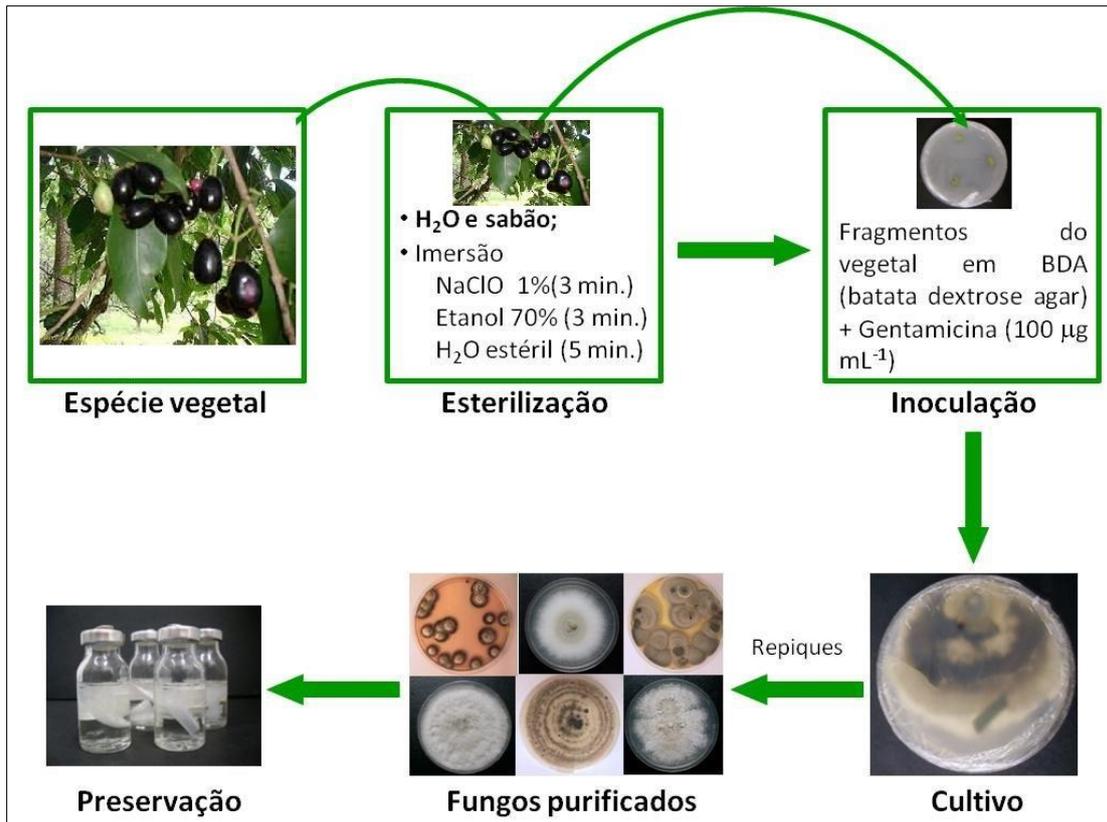
### 3. Material e Métodos

#### 3.1. Extração, isolamento e identificação dos fungos endofíticos

O processo de isolamento, purificação e cultivo dos fungos endofíticos, foram realizados nas dependências do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), sob supervisão do Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Angela Regina Araújo. O trabalho foi realizado durante o doutorado de Vanessa Mara Chapla (2014), que coletou frutos verdes e maduros, saudáveis, de *E. jambolana*, os quais foram coletadas na cidade de Araraquara-SP. A partir dos frutos foram obtidos os fungos isolados do fruto maduro (Ej-fm1) e do fruto verde (Ej-fv1) de *E. jambolana*. Os frutos saudáveis de *E. jambolana* foram submetidos ao isolamento dos endófitos seguindo os seguintes procedimentos: a superfície do material foi lavada com água corrente e sabão neutro, e esterilizada por imersão em uma solução de hipoclorito de sódio NaClO 1%, etanol aquoso 70% e dupla lavagem em água estéril foram realizadas em 3 min, 5 min e 5 min, respectivamente. A seguir, pedaços dos frutos foram seccionados assepticamente (3 a 4 de 0,5 cm) e inoculadas em placas de Petri contendo BDA, ao qual foi adicionado, após esterilização em autoclave, antibiótico sulfato de gentamicina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O crescimento dos fungos foi monitorado até cada cultura atingir 0,5-1,0 cm de comprimento, e submetidas a sucessivas repicagens até obtenção das linhagens puras (Figura 5).

A avaliação da pureza das linhagens foi realizada pela aparência uniforme das placas e pela utilização de microscópio. Foram obtidas duas linhagens puras, codificadas como Ej-fm1 e Ej-fv1 (Ej = *E. jambolana*, fm = fruto maduro, fv = fruto verde) sendo posteriormente preservados em “slants”, contendo água estéril e depositadas na micoteca do Departamento de Química Orgânica, IQ-UNESP.

Os fungos codificados como Ej-fm1 e Ej-fv1 foram identificados como *Pseudofusicoccum stromaticum* e *Neofusicoccum* sp, respectivamente, por taxonomia molecular, pela GENOTYPING BIOTECNOLOGIA - PROSPECTA em Botucatu-SP.



**Figura 7:** Etapas de isolamento, purificação e preservação dos fungos endofíticos. Fonte: (modificado de CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R., 2013).

### 3.2. Cultivo dos fungos endofíticos em pequena escala para obtenção dos extratos brutos

Os fungos endofíticos foram repicados para placas de Petri contendo BDA e incubados por 7, 7 e 6 dias, respectivamente. A seguir cada fungo foi inoculado em 2 frascos de Erlenmeyer (500 mL) contendo 200 mL de meio de cultivo Czapek, preparado na concentração de 35 g L<sup>-1</sup>, os quais foram mantidos sobre a bancada a 25°C por 28 dias, com agitações manuais a cada 24 horas. Após esse período o caldo foi separado do micélio por filtração, o filtrado foi submetido a uma partição líquido/líquido com acetato de etila (AcOEt) (3 x 200 mL) e concentrado, fornecendo o extrato bruto AcOEt de cada fungo.

### 3.3. Cultura de células

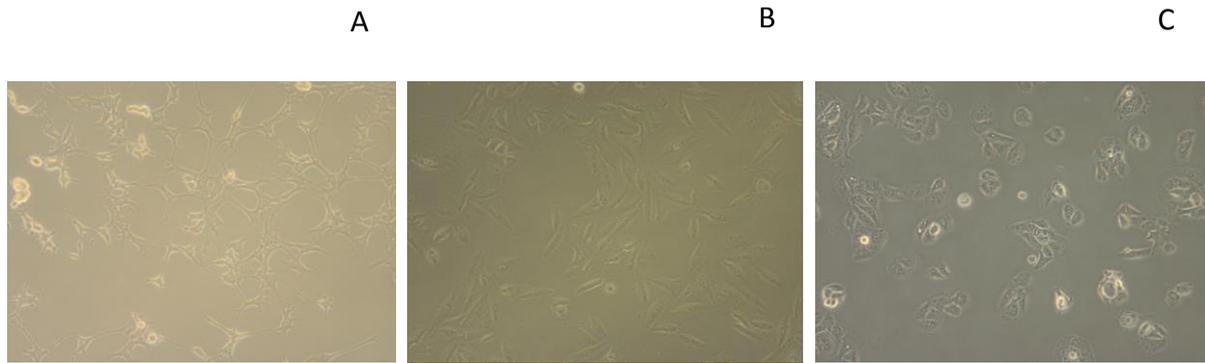
As células (HepG2 e HaCat) foram cultivadas utilizando meio de cultura Dulbecco Modified Eagle Medium (DMEM) (SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA) suplementado com soro fetal bovino 10% (SFB) (Cultilab, Campinas, SP) e solução de antibiótico/antimicótico

(penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e anfotericina B 0,25 µg/mL) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) a 37° C em atmosfera com CO<sub>2</sub> 5%.

Para o cultivo celular da linhagem Hepa-1c1c7 foi utilizado o meio de cultura  $\alpha$ MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) suplementado com soro fetal bovino 10%, penicilina 100U/mL, estreptomicina 100µg/mL e anfotericina B 0,25µg/mL. As linhagens foram cultivadas em frascos de cultura de células, em ambiente estéril, a 37°C, sob atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>.

As células HepG2 (ATCC n. HB-8065) foram gentilmente cedidas pela Dra. Daisy Maria Favero Salvadori do Depto. de Patologia da Faculdade de Medicina – UNESP, Campus Botucatu. Células de hepatocarcinoma murinho, Hepa 1c1c7 (ATCC n. CRL-2026) foram gentilmente cedidas pelo Prof. John M. Pezzuto do College of Pharmacy, University of Hawai'i at Hilo e cultivadas em meio  $\alpha$ MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) e a linhagem normal de queratinócito de pele HaCaT foi gentilmente cedida pela Dra. Luiza Lina Villa, do Laboratório de Virologia, do Instituto Ludwig de Pesquisa do Câncer.

As linhagens foram mantidas em condições de cultivo até a obtenção da concentração ideal, ou seja, até que a monocamada estivesse confluenta para a realização dos ensaios, as quais são lavadas com solução salina de Hanks (0,4 g de KCl, 0,06 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,35 g de NaHCO<sub>3</sub>, 1 g de glicose, H<sub>2</sub>O q.s.p. 1000 mL) e tripsinizadas acrescentado-se 1 mL de ATV (Associação de Tripsina (0,2 %) e Versene (0,02 %) – Instituto Adolpho Lutz, São Paulo, Brasil). Após o desprendimento do tapete celular, as células foram homogeneizadas com volumes variados do meio acrescido de 10 % de soro fetal bovino. A suspensão celular obtida em um frasco foi transferida para outros frascos, de modo a obter 10<sup>5</sup> células/frasco. Esse procedimento foi repetido até que houvesse quantidade de células suficientes para realização dos experimentos (Figura 8).



**Figura 8.** Linhagens celulares: (A) Hepatocarcinoma murinho (Hepalcl1c7), (B) Hepatocarcinoma humano (HepG2) e (C) queratinócito normal de pele (HaCat). Aspecto da cultura à microscopia de luz invertida. Aumento 20X.

### 3.4. Tratamento das linhagens

Para os ensaios de citotoxicidade (Sulfarrodamina B), foi utilizada uma suspensão de  $8,0 \times 10^4$  células/poço para as linhagens Hepalcl1c7, HepG2 e HaCaT. As células foram cultivadas em placas de 96 poços, e após 24 horas de cultivo, foram tratadas com os extratos brutos oriundo dos fungos endofíticos de *E. jambolana* isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e do fruto verde (Ej-fv1). Para todos os experimentos as células foram tratadas nas seguintes concentrações: 100  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 25  $\mu\text{g/mL}$ , 12,5  $\mu\text{g/mL}$ , 6,3  $\mu\text{g/mL}$  e 3,1  $\mu\text{g/mL}$ , procurando avaliar o potencial efeito concentração-resposta para citotoxicidade. Cada ensaio foi acompanhado de um controle positivo (doxorubicina 50  $\mu\text{g/mL}$ ) e controle negativo (células não tratadas).

### 3.5. Ensaio de Citotoxicidade (SFB)

O método de Sulfarrodamina B (SRB) é usado para determinar a densidade celular, baseada na mensuração do conteúdo de proteína celular. A Sulfarrodamina B (SRB) é um corante aniônico que se combina eletrostaticamente às proteínas. O corante fixado, medido espectrofotometricamente após a solubilização, é correlacionado com a taxa de síntese proteica total e, então, com a proliferação celular. Todo o protocolo técnico foi seguido conforme o Kit (sigma-aldrich S 1402). Sendo assim, nesse ensaio o corante se liga aos aminoácidos básicos das proteínas das células para quantificar a proliferação celular (SKEHAN et al., 1990; VOIGT, 2005).

Após o tratamento descrito no item 3.4, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (50%), 50  $\mu\text{L}$  por poço e armazenadas por uma hora a  $-4^\circ\text{C}$ . Depois as células

são lavadas com água destilada por três vezes (400µL por poço) e ressuspendidas em solução de Tris (10mM), 100µL por poço. A leitura da absorvância é feita no espectrofotômetro de placas por espectrofotometria, em comprimento de onda de 570nm, realizada em leitor de placas (Bio-Tek Powerwave X, BioTek Instruments, Inc.,USA).

A porcentagem de células vivas foi calculada em relação ao controle veículo, representando a citotoxicidade de cada tratamento. A estimativa de células vivas é obtida pela fórmula:

$$\text{Células vivas (\%)} = \frac{(\text{absorv. do teste} - \text{absorv. do branco})}{(\text{absorv. CV} - \text{absorv. branco})} \times 100$$

Onde absorv. CV é a média da absorvância dos poços com controle veículo (DMSO 0,5%), absorv. do branco é a média da absorvância dos poços com branco (sem células) e absorv. do teste é a média da absorvância dos poços com a substância testada. Foram feitos três ensaios independentes, com triplicatas, e calculou-se a média  $\pm$  desvio padrão (M  $\pm$  SE).

### 3.6. Avaliação da indução de apoptose

#### 3.6.1. Método de Hoechst e Iodeto de Propídeo

A diferenciação entre a ocorrência de células apoptóticas e necróticas foi realizada pelo método de exclusão por fluorocromos, utilizando-se uma solução fluorescente, contendo diacetato de fluoresceína (DAF), iodeto de propídeo (IP), e Hoescht 33342 (HO). O Hoechst 3342 (HO) é um corante livremente permeável às membranas celulares, que emite fluorescência quando se liga ao DNA, por isso é utilizado para determinar a concentração do DNA e corar os núcleos. (KIECHLER et al., 2003). Esse corante é absorvido pelas células nas fases iniciais da apoptose, já a membrana citoplasmática íntegra permanece impermeável a outros corantes. Já o iodeto de propídeo (IP), corante que se liga adeninatimina quando a membrana celular apresenta-se permeável (células necróticas). É uma molécula de alto peso molecular que se intercala no DNA de células apoptóticas com a membrana plasmática permeável. Além disso, os corpos apoptóticos em fase tardia, apresentam aumento da permeabilidade da membrana celular, o que proporciona a entrada de IP nas células. Dessa forma, a combinação destes corantes fluorescentes é utilizada para diferenciar os estágios da apoptose (precoce ou tardia), e ainda apoptose de necrose (CIANCIO et al., 1988). O corante diacetato de fluoresceína (DAF) que marca células de membrana intacta também é adicionado, pois ele funciona como marcador de citoplasma (HASHIMOTO et al., 2003).

Foram plaqueadas 5.000 células por poço ( $5,0 \times 10^4$  cél/mL) em placa de 96 poços, incluindo controle negativo, controle positivo para apoptose (curcumina), controle positivo para necrose (doxorubicina) e tratamentos. Para o tratamento foram utilizadas as 3 maiores concentrações utilizadas na citotoxicidade 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, que foram as concentrações que apresentaram morte, bem como concentrações abaixo da concentração mais citotóxica. Os controles positivos utilizados foram curcumina 25 µM e doxorubicina 50 µg/mL, por 12 horas.

Ao completar o tempo de incubação do tratamento (12 horas), a placa foi centrifugada a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C, para sedimentar as células flutuando. Em seguida foi removido o meio com tratamento e adicionado 100 µL de PBS 1X gelado a cada poço, centrifugando a placa novamente a 2.500 rpm por 5 minutos a 4°C. O PBS foi removido com muito cuidado para não formar turbilhão e, no escuro foi adicionado 100 µL a cada poço da solução de corantes preparada nas seguintes proporções: HO 0,15%, PI 0,25%, FITC ou DAF 0,35%. A placa foi incubada por 10 minutos em papel alumínio à temperatura ambiente. Por último, a placa foi centrifugada (com o papel alumínio) por 30 segundos a 3700 rpm (spin de 30 segundos) e levada ao IN Cell Analyzer 2000. Foram solicitados a captura de 12 campos por poço na objetiva de 20X.

Em seguida, a apoptose foi avaliada qualitativa e quantitativa, estabelecendo-se a porcentagem de células em apoptose precoce, tardia e em necrose, levando-se em consideração a morfologia e coloração das células. As células foram classificadas como normais (núcleo azul esférico corado pelo HO, citoplasma verde), apoptóticas (núcleo esférico picnótico em azul com corpos apoptóticos corado pelo HO, citoplasma verde), e necróticas (núcleo vermelho esférico ou em vesículas corado pelo IP, citoplasma vermelho). Ainda, as células foram classificadas em apoptose precoce (núcleo em azul e morfologia nuclear com corpos apoptóticos), apoptose tardia (núcleo corado em vermelho e com presença de corpos apoptóticos) e necrótica (núcleo preservado e com coloração em vermelho) segundo proposto por KOROSTOFF et. al. (1998) e HASHIMOTO et al. (2003).

### **3.6.2. Atividade de Caspase 3**

Para este ensaio, as células foram plaqueadas a uma concentração de  $2 \times 10^5$  cél./mL em placa de 96 poços de fundo preto, própria para leitura fluorimétrica, e foram incubadas por 24 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera úmida. As células foram tratadas com o extrato bruto de fungos endofíticos de *E. jambolana* isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e do fruto

verde (Ej-fv1). As células foram tratadas por 8 e por 12 horas utilizando as concentrações: 100µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e, imediatamente ao término do tempo de tratamento, a placa foi colocada em gelo. O meio contendo as substâncias de tratamento foi removido e cada poço recebeu 100 µL de tampão de lise (50 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,5% Triton X-100; EDTA 2 mM; DTT 5 mM). A placa foi então incubada em gelo por 20 minutos e, em seguida, cada poço recebeu 100 µL do substrato Ac-DMQD-AMC a 20 µM, preparado no mesmo tampão. Durante o tempo de incubação foi preparada a curva padrão de aminometilcumarina (AMC), com concentrações decrescentes em 50% partindo de 4 µM. A placa foi levada para leitura *top* em fluorímetro (FLx800™ *Fluorescence Reader*, BioTek - Winooski, VT, EUA; excitação 360/40 nm e emissão 460/40 nm) e agitada automaticamente pelo equipamento antes do início da leitura de fluorescência, que foi feita a 37°C. Os resultados foram expressos em concentração de AMC, com base na curva padrão. Este ensaio foi realizado em colaboração com o Laboratório de Bioquímica Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

### 3.7. Ensaio do Ciclo Celular

A análise do ciclo celular foi realizada de acordo com o protocolo modificado descrito por Boquest et al., 1999. As células hepatocarcinoma murinho (Hepa1c1c7), hepatocarcinoma humano (HepG2) e queratinócito de pele normal (HaCat) foram plaqueadas na concentração  $10^5$  células/ poço em placas de 24 poços. Após 24 horas foi feito o tratamento utilizando as concentrações: 25µg/mL, 50 µg/mL, para o extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro e verde, respectivamente. Após o tratamento por 12 horas, o meio de cultura foi retirado e substituído por um novo meio. A célula ficou em recuperação e o experimento foi revelado após 24 e 48 horas contadas do início do tratamento. O meio foi retirado, cada poço foi lavado com 300 µL de PBS-EDTA, as células foram tripsinizadas e recolhidas para eppendorfs de 1,5 mL, sendo um eppendorf para cada poço. As células foram centrifugadas à 1400 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. Em seguida o pellet foi ressuspenso com 300µL de PBS1X-EDTA 5mM. Posteriormente as células foram fixadas com 700 µL de etanol absoluto gelado, cada eppendorf foi vortexado e armazenado em temperatura -20°C. Após o período de armazenamento das amostras que pode ser de até um mês as células foram centrifugadas e lavadas em PBS contendo 5mM EDTA e ressuspendidas após lavagem, com 1mL de PBS 5mM EDTA, 50µg/mL de iodeto de propídio (PI) e 0,3mg/mL de RNase A. Posteriormente as células foram incubadas por 1 hora em temperatura

ambiente. A leitura foi realizada Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP utilizando o Citômetro de fluxo FACS Calibur da BD®. O método foi realizado com a colaboração do aluno de doutorado Rodolfo Serafim, sob orientação da professora Valéria Valente.

### **3.8. Ensaio de Genotoxicidade – Ensaio do Cometa**

O ensaio do cometa foi realizado segundo protocolo estabelecido por Sing e colaboradores (1988). Primeiramente foi realizado o plaqueamento das células da linhagem Hepa-1c1c7 em uma concentração de  $2 \times 10^5$  células/mL em placas de 24 poços. Para a avaliação da atividade genotóxica as células foram tratadas por 6 horas nas concentrações de 50 µg/mL; 25 µg/mL; 12,5 µg/mL com extrato bruto produzido pelo fungo isolado do fruto verde Ej-fv1 e 25 µg/mL; 12,5 µg/mL; 6,3 com o extrato bruto produzido pelo fungo isolado do fruto maduro Ej-fm1, que são as concentrações não citotóxicas determinadas pelo ensaio Sulfarrodamina B. Como controle positivo, foi utilizado o peróxido de hidrogênio 1mM, diluído em meio de cultura sem soro fetal. Após a tripsinização das células da placa, as mesmas foram ressuspensas com agarose de baixo ponto de fusão e colocadas em lâminas limpas de microscopia óptica contendo uma fina camada de agarose ponto de fusão normal. Em seguida as lâminas preparadas foram lisadas com sal e detergente (NaCl 2,5 mM, EDTA 100mM, Tris 10 mM) no mínimo por 3 horas e máximo 24 horas para a formação de nucleóides ligados à matriz nuclear foram submetidas à uma eletroforese alcalina (pH 13) nas condições de 25V, 280mA por 20 minutos em uma solução de eletroforese, composta por ácido etilenodiaminatetracético (EDTA) e hidróxido de sódio (NaOH). Por fim, as lâminas foram coradas com brometo de etídio na concentração de 0,8 mg/mL observadas ao microscópio de fluorescência para que sejam capturadas imagens de 50 células por lâmina, totalizando 150 células por concentração, incluindo os controles positivo, negativo e veículo. Assim, as imagens foram mensuradas por meio do software TRiTekComet Score™ v1.5, utilizando como parâmetro a medida da porcentagem de DNA na cauda, avaliando assim o grau de genotoxicidade dos extratos brutos, Ej-fm1 e Ej-fv1. De acordo com o perfil de migração, é possível avaliar o dano causado por cada substância, já que células sem danos em seu genoma ficariam com seu DNA retido na região anteriormente ocupada pelo núcleo da célula, e células com danos em seu genoma apresentariam caudas como consequência da migração de fragmentos do DNA.

### 3.9. Ensaio de Mutagenicidade- Teste do Micronúcleo

A avaliação da atividade mutagênica foi realizada por meio da quantificação de micronúcleos de acordo com Heddle e colaboradores (1991). Nesse teste são originados fragmentos acêntricos de cromossomos, causados por ação mecânica ocasionando quebra cromossômica, bem como danos cromossômicos causados por atraso ou ruptura do filamento mitótico durante a anáfase.

O ensaio do micronúcleo foi realizado segundo protocolo do IN Cell Analyzer 2000. As células hepatocarcinoma murinho, Hepa- 1c1c7 foram plaqueadas na concentração  $5 \times 10^4$  células/mL em placas de 96 poços, após 24 horas foi feito o tratamento com 50 µg/mL, 25 µg/mL do extrato bruto produzido pelo fungo endofítico isolado do fruto verde e 12,5 µg/mL, 6,3 µg/mL do extrato produzido pelo fungo isolado do fruto maduro de *E. jambolana*. Como controle positivo foi utilizado o etoposídeo na concentração de 0,8 µM e controle veículo (dimetilsulfóxido 1%). Após o tratamento por 24 horas, foi feito o bloqueio da citocinese com 10 µl/poço de citocalasina B na concentração de 30 µM por 36 horas. Após o bloqueio da citocinese celular, a placa foi lavada com PBS e as células foram fixadas com 100 µL de etanol absoluto por poço por 30 minutos, em temperatura ambiente. Após a fixação das células foi adicionado FITC diluído em PBS (marcador de citoplasma) na concentração de 10 µM por 30 minutos, em seguida os poços foram lavados por 3 vezes com PBS e adicionado o outro marcador, o Hoechst 33342 na concentração de 5 µM por 15 minutos, afim de marcar o núcleo e o citoplasma da célula. As imagens foram capturadas no aparelho IN cell Analyser modelo 2000, no laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp-Araraquara. Foram capturadas no mínimo 1000 células por concentração dos testes e controles. Os resultados refletem na frequência de formação de micronúcleos em 1000 células analisadas por concentração testada. Foram realizados 3 ensaios independentes e a variância foi calculada pelo Kruskal-Wallis teste com pós teste de Dunns.

#### 4. Análises Estatísticas

O método estatístico para o ensaio do Cometa e micronúcleo foi feito por meio de comparação entre as concentrações através do teste não paramétrico de Kruskal Wallis com pós teste de Dunn's. No ensaio Hoechst/IP e Atividade de Caspase 3 foi realizado o teste de análise de variância *oneway* (ANOVA) com pós-test de Tukey. Para o ensaio do ciclo celular foi realizado o teste de análise de variância *oneway* (ANOVA) com pós-test de Bonferroni. As análises foram realizadas com o auxílio do software Microsoft Excell®, versão 2010 e do programa estatístico GraphPad Prism® Version 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

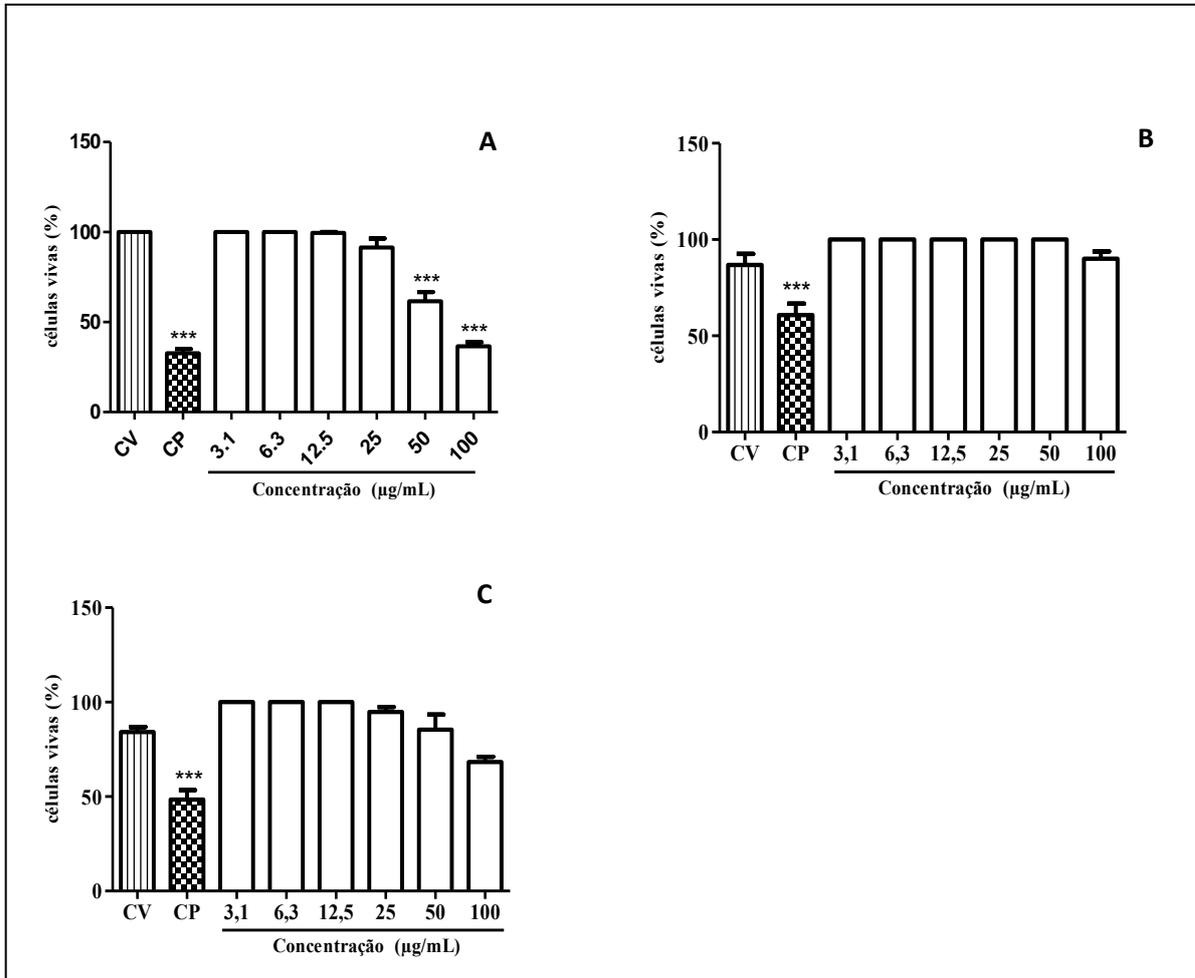
## 5. Resultados

### 5.1. Ensaio de Citotoxicidade

Inicialmente foi realizado o ensaio de citotoxicidade por meio do método sulfarrodamina B, com os extratos brutos obtidos a partir do fungo endofítico isolado do fruto maduro, Ej-fm1 e do fruto verde, Ej-fv1 de *E. jabolana* nas linhagens celulares Hepal1c17 (hepatocarcinoma murinho), HepG2 (linhagem humana de hepatocarcinoma) e HaCat (queratinócito normal de pele).

A atividade citotóxica foi avaliada nas concentrações de 100µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,3 µg/mL e 3,1 µg/mL, no tempo de tratamento de 24 horas para a determinação da  $CI_{50}$ , concentração capaz de reduzir em 50 % a viabilidade celular. O  $CI_{50}$  foi determinado a partir de linhas de tendências lineares e por meio das equações das retas, os valores foram definidos quando possível.

O extrato do fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm1) apresentou atividade citotóxica concentração-resposta para a linhagem Hepal1c17, com valor de  $CI_{50}$  de 58µg/mL, apresentando uma inibição celular de 63,4% e 38,4% para as concentrações 100µg/mL e 50 µg/mL, respectivamente. Enquanto que para HepG2 e HaCat, não houve morte celular significativa (Figura 9).

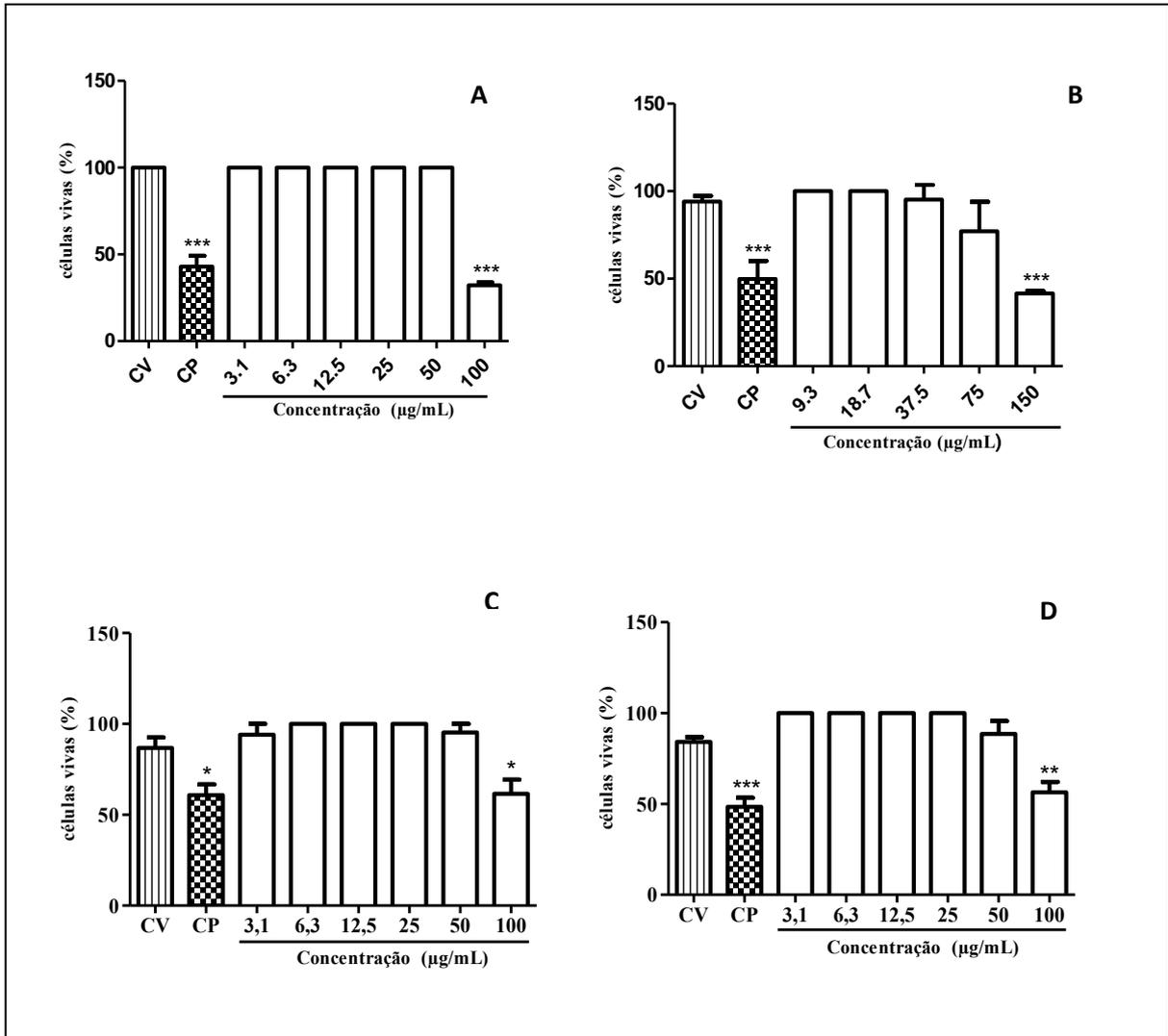


**Figura 9.** Ensaio de citotoxicidade (Sulfarrodamina B). Extrato bruto do fungo endofítico isolado do **fruto maduro (Ej-fm1)** de *Eugenia jambolana* nas linhagens celular de (A) Hepa-1c1c7- hepatocarcinoma murino, (B) HepG2- linhagem humana de hepatocarcinoma e (C) HaCat -queratinócito normal de pele, nas concentrações de 100µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,3 µg/mL e 3,1 µg/mL, tratadas por 24 horas. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ). CV (controle de veículo – DMSO 1%) e CP (controle positivo, doxorrubicina 50 µg/mL ). *Oneway* ANOVA com pós-teste de Tukey. \*\*\*  $p < 0,001$ .

O extrato produzido pelo fungo *Neofusicoccum* sp (Ej-fv1) foi citotóxico para a linhagem Hep1c1c7 apenas na maior concentração (100 µg/mL) com viabilidade celular de 32,14% e  $CI_{50}$  89 µg/mL. Tendo em vista o perfil de morte para o extrato bruto produzido pelo fungo do fruto verde (Ej-fv1), foram realizados outros testes de citotoxicidade com diferentes concentrações (150 µg/mL, 75 µg/mL, 37,5 µg/mL, 18,7 µg/mL e 9,3 µg/mL), a fim de demonstrar se havia citotoxicidade em 50 e 100 µg/mL. Pois para as concentrações determinadas nos tratamentos, a morte foi significativa apenas na maior concentração (100 µg/mL), apresentando 100% de viabilidade celular nas demais concentrações testadas. Para as novas concentrações testadas observamos que também houve morte celular significativa apenas na maior concentração testada (150 µg/mL), apresentando inibição celular de 58,41%.

A linhagem celular HepG2 apresentou-se mais resistente, pois os extratos foram inativos nas concentrações testadas. Esse resultado pode-se dar devido a sua capacidade de metabolizar xenobióticos e potencialmente os produtos metabólicos perdem a atividade citotóxica. Podemos observar que não houve citotoxicidade para o fruto maduro em todas as concentrações testadas. Já para o fruto verde, houve citotoxicidade apenas na maior concentração (100 µg/mL), com 38,4% de morte celular.

Para a linhagem celular HaCat, apenas a maior concentração do extrato bruto produzido pelo fungo do fruto verde Ej-fv1 de *E. jambolana* apresentou atividade citotóxica significativa, com uma morte celular em média de 43,5% na maior concentração testada, 100 µg/mL (Figura 10).



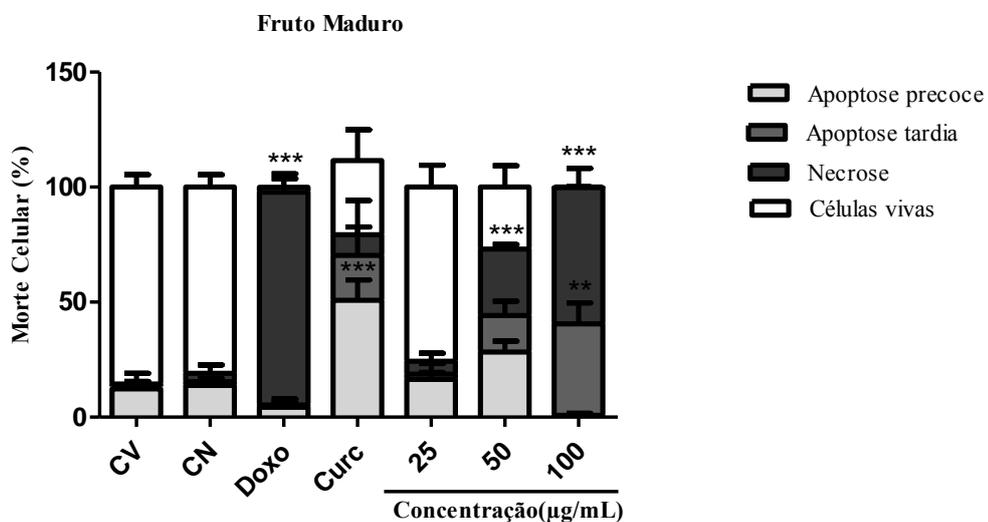
**Figura 10.** Ensaio de citotoxicidade (Sulfarrodamina B). Extrato bruto do fungo endófito isolado do **fruto verde (Ej-fv1)** de *Eugenia jambolana* nas linhagens celular de (A) Hepa-1c1c7- hepatocarcinoma murino, (C) HepG2- linhagem humana de hepatocarcinoma e (D) HaCat -queratinócito normal de pele, nas concentrações de 100µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,3 µg/mL e 3,1 µg/mL, tratadas por 24 horas. E também (B) Hepa-1c1c7- hepatocarcinoma murino, nas concentrações de 150µg/mL, 75 µg/mL, 37,5 µg/mL, 18,7 µg/mL e 9,3 µg/mL. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ). CP (controle positivo, doxorubicina 50 µg/mL) e CV (controle de veículo – DMSO 1%). *Oneway* ANOVA com pós-teste de Tukey \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 5.2. Ensaio de Hoechst / Iodeto de Propídeo

O ensaio citomorfológico para detecção de células apoptóticas utilizando os corantes Hoechst 33342 e Iodeto de propídio foi realizado na linhagem Hepa1c1c7 tratadas com 100µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, concentrações próximas ao CI<sub>50</sub> anteriormente determinado pelo ensaio de citotoxicidade, das células tratadas por 12 horas.

Ao analisar o experimento todas as células contadas foram comparadas à sua imagem no campo claro para verificação de critérios morfológicos, pois células em apoptose perdem sua capacidade de adesão celular ao substrato, tornando-se células retraídas, enquanto células em necrose permanecem firmemente ligadas ao substrato e também podem apresentar bolhas em sua superfície, as quais são decorrentes da perda da integridade da membrana plasmática (RELLO et al., 2005).

O gráfico abaixo demonstra a apoptose (precoce e tardia) e necrose por coloração Hoechst / IP em células de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7) (Figura 11).

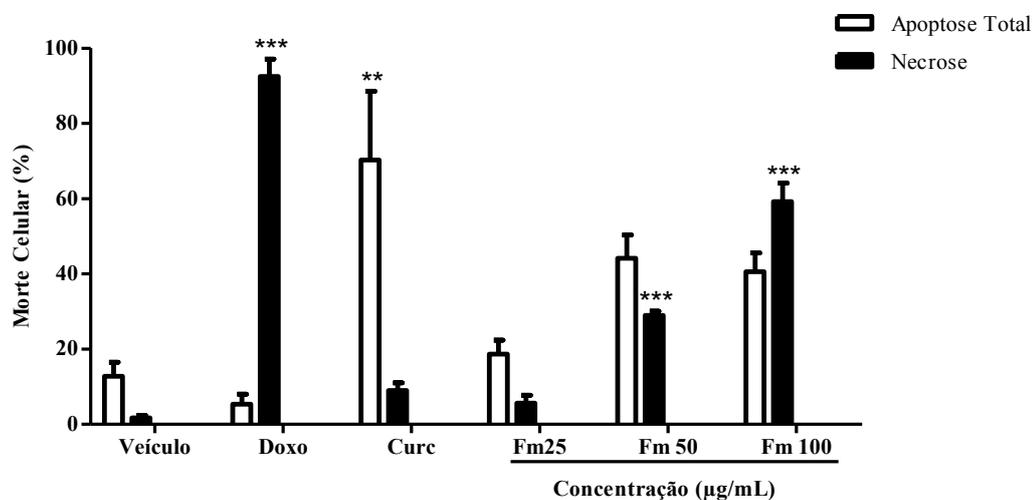


**Figura 11:** Apoptose por coloração Hoechst/IP em células Hepa 1c1c7 após tratamento com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1). Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ), analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ .

No tratamento com extrato bruto fungo do endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1), não houve indução significativa de apoptose em relação ao controle de veículo (DMSO 1%) para as concentrações de 25 µg/mL e 50 µg/mL. Na maior concentração testada (100

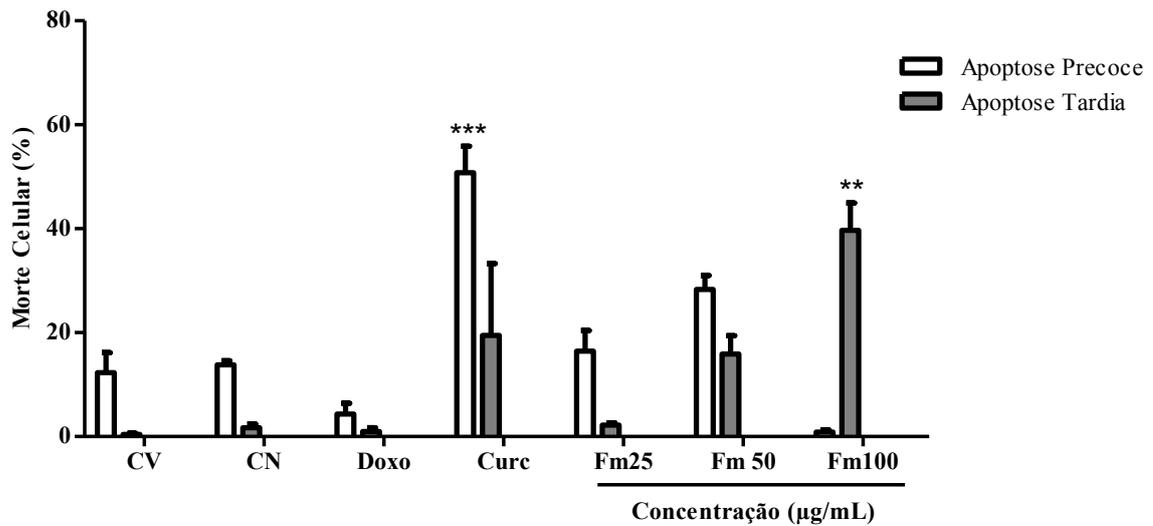
$\mu\text{g/mL}$ ) podemos observar que houve diferença estatística para presença de apoptose tardia ( $p < 0,01$ ), bem como para necrose ( $p < 0,001$ ).

Foi observado um total de 40,6%, 44,2% e 18,6% de células em apoptose, respectivamente, após os tratamentos nas concentrações 100 $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$ . Porém, quando comparamos as células em necrose, nota-se que o extrato (Ej-fm) apresentou uma diferença significativa nas maiores concentrações ( $p < 0,001$ ). Embora não haja significância estatística observamos uma tendência para apoptose total na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 12).



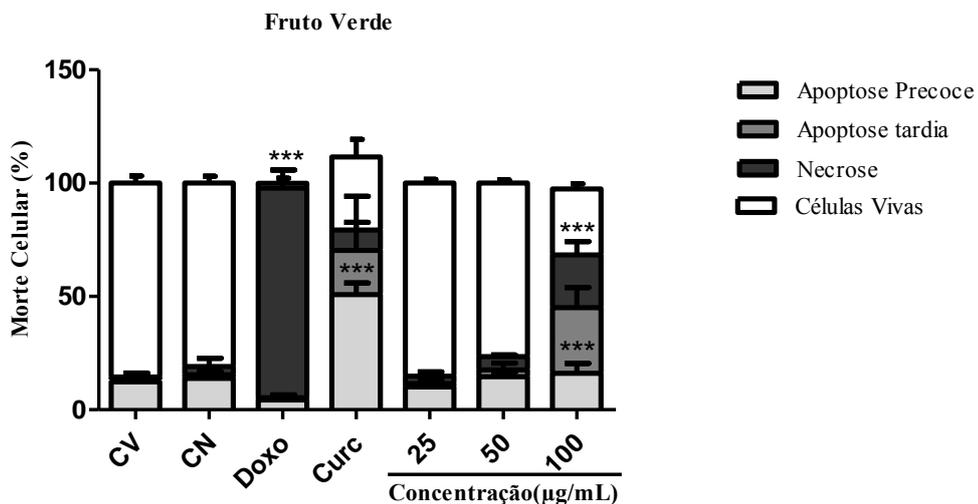
**Figura 12:** Apoptose por coloração Hoechst/IP em células Hepa 1c1c7. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ . Relação entre apoptose total e necrose de células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1).

Quando comparamos as células em apoptose precoce e tardia, nota-se que o extrato (Ej-fm1) apresentou uma diferença significativa para apoptose tardia na maior concentração. Em relação a apoptose precoce nenhuma diferença significativa foi observada. Apesar de não haver significância estatística observamos uma tendência para apoptose precoce nas menores concentrações, 25  $\mu\text{g/mL}$  e 50  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 13).



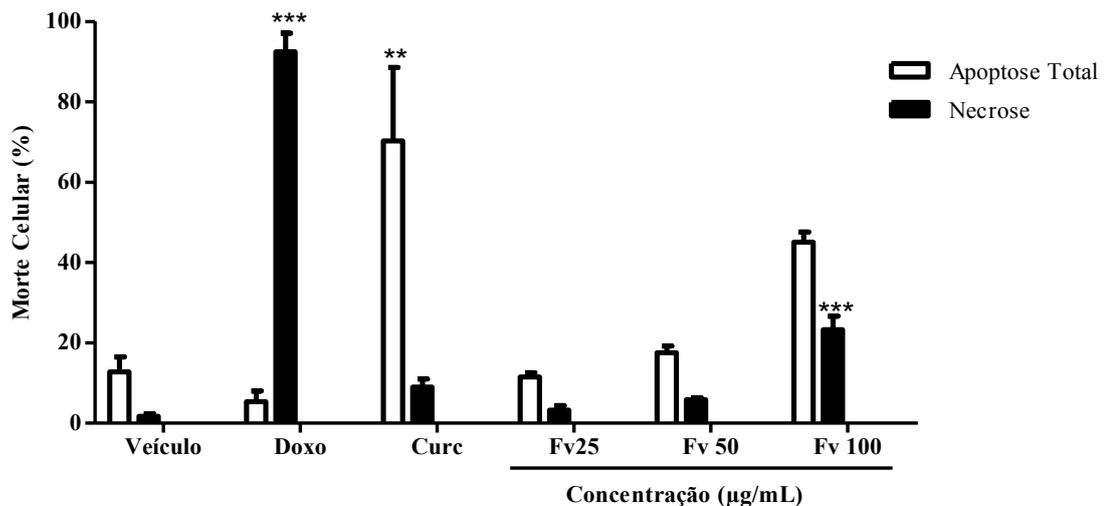
**Figura 13:** Apoptose por coloração Hoechst/IP em células Hepa 1c1c7. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ . Relação entre apoptose precoce e apoptose tardia de células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1).

Ao avaliar o tratamento com extrato bruto produzido pelo fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1), que estão demonstradas no gráfico abaixo. Pode-se observar que para a maior concentração testada (100 µg/mL), houve indução significativa de apoptose precoce e necrose ( $p < 0,001$ ) (Figura 14).



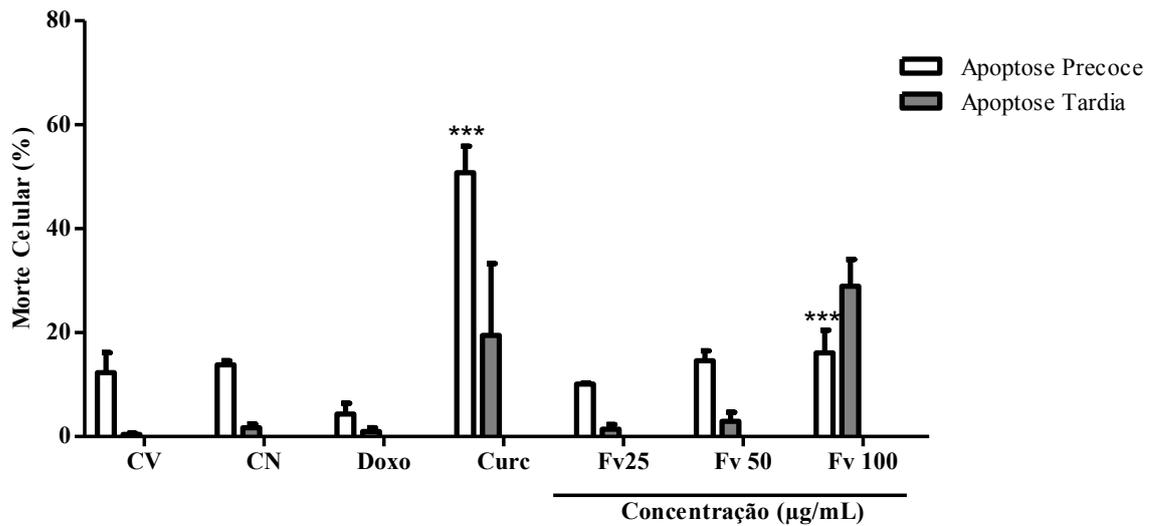
**Figura 14:** Apoptose por coloração Hoechst/IP em células Hepa 1c1c7 após tratamento com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fv1). Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey \*\*\*  $p < 0,001$ .

Ao avaliar a relação de células em apoptose e necrose induzidas pelo tratamento com o extrato bruto produzido pelo fungo do fruto verde (Ej-fv1) na linhagem Hepa 1c1c7, foi possível observar uma diferença significativa apenas na concentração de 100µg/mL apenas para necrose ( $p < 0,001$ ). Ainda podemos notar um aumento concentração-resposta para apoptose embora não estatisticamente significativa (Figura 15).



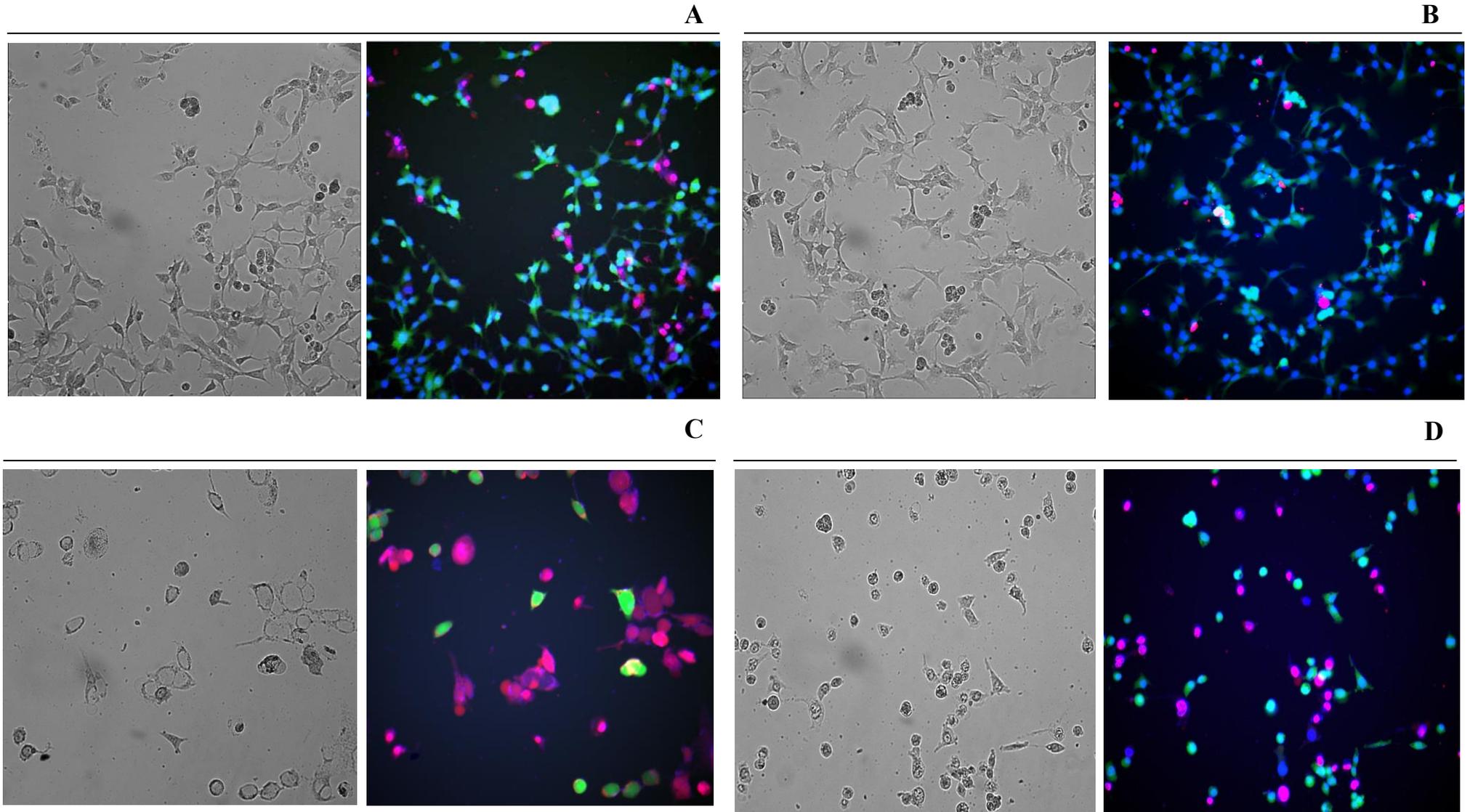
**Figura 15:** Apoptose por coloração Hoechst/IP em células Hepa 1c1c7. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey \*\*  $p < 0,01$  \*\*\*  $p < 0,001$ . A) Relação entre apoptose total e necrose de células tratadas com extrato bruto do fungos endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1).

Quando verificado a relação de células em apoptose precoce e tarde induzidas pelo tratamento com o extrato bruto produzido pelo fungo do fruto verde (Ej-fv1) na linhagem Hepa 1c1c7 foi observado diferença significativa de morte celular por apoptose precoce para a maior concentração (100µg/mL) ( $p < 0,001$ ). No geral pode-se notar que houve um perfil evidente de morte mista (apoptose e necrose) em ambos os extratos para as maiores concentrações testadas (Figura 16).



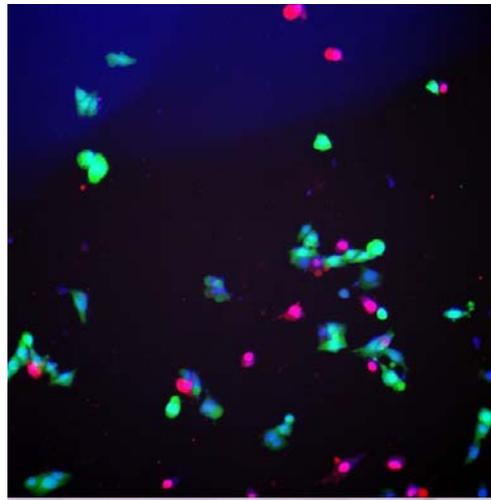
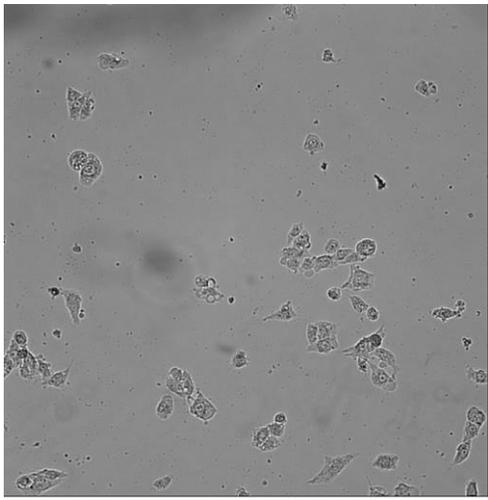
**Figura 16:** Apoptose por coloração Hoechst/IP em células Hepa 1c1c7. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey\*\*\*  $p < 0,001$ . Relação entre apoptose precoce e apoptose tardia de células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1).

Nas figuras 17 e 18 estão demonstradas as fotomicrografias de imagens de fluorescência na linhagem celular de hepatocarcinoma murinho (Hepa1c1c7) submetidas ao tratamento com os extratos brutos produzido por fungos endofíticos isolados do fruto verde (Ej-fv1) e maduro (Ej-fm1) de *E. jambolana*. As imagens foram capturadas no aparelho IN Cell Analyser modelo 2000, no laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp Araraquara com auxílio da técnica Cláudia.

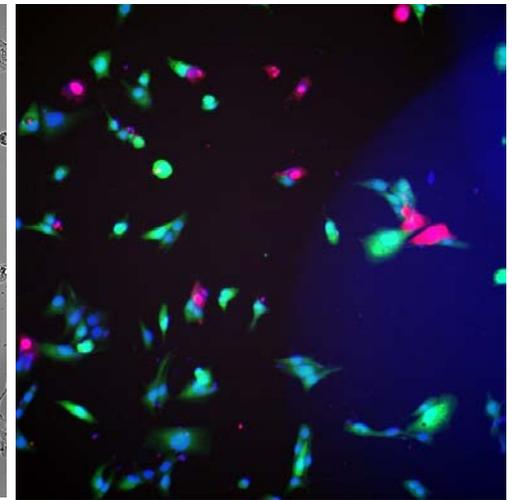
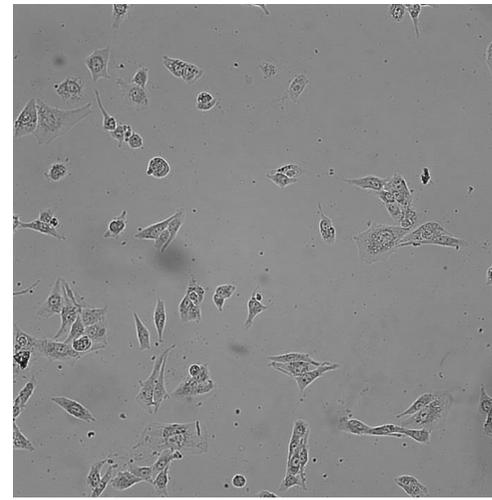


**Figura 17.** Fotomicrografias referentes às imagens de fluorescência utilizando Hoechst 33342, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína. Aumento 20X, sendo (A) Ej-fv1 (100µg/mL); (B) Ej-fv1 (50µg/mL)- Fruto Verde (C) Ej-fm1 (100µg/mL); (D) Ej-fm1(50µg/mL)-Fruto Maduro.

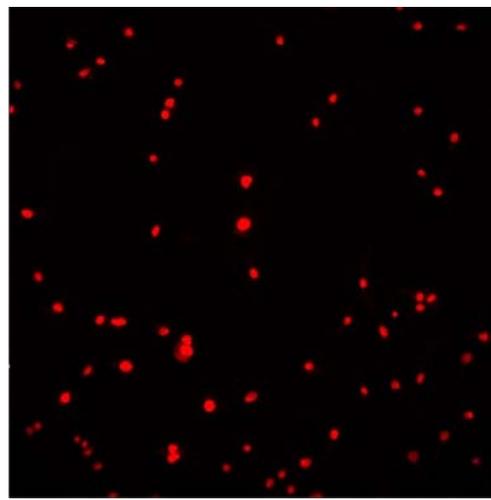
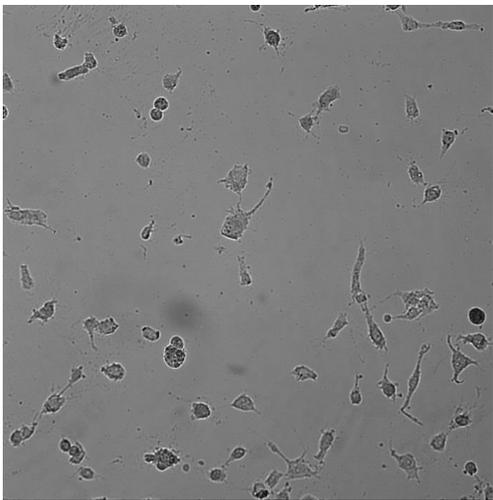
A



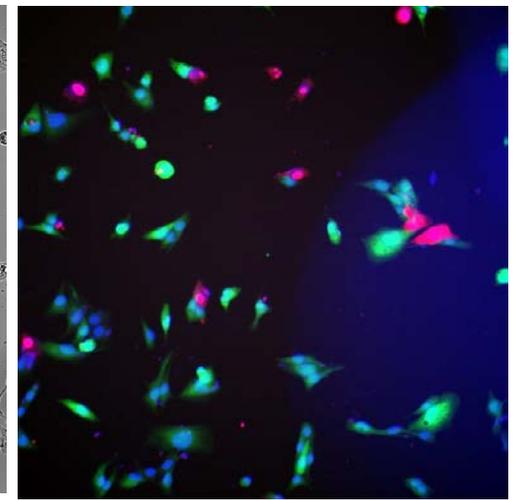
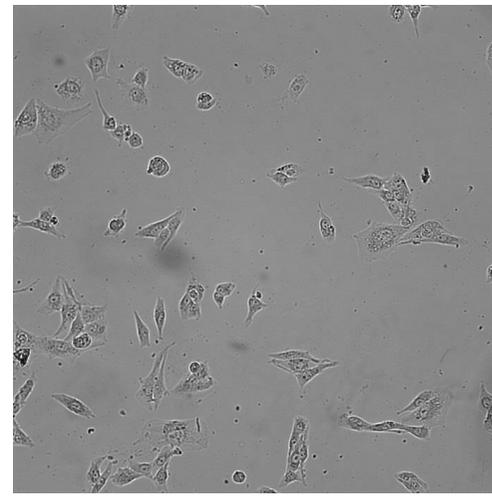
B



C



D

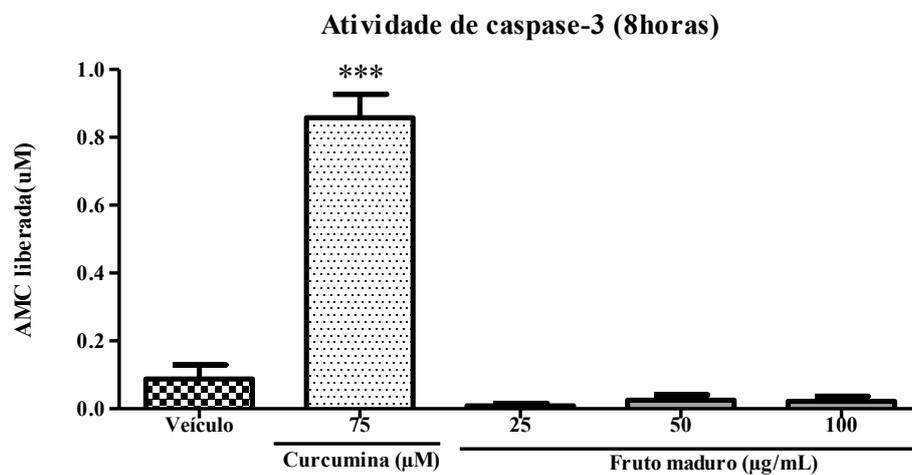


**Figura 18.** Fotomicrografias referentes às imagens de fluorescência utilizando Hoechst 33342, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína. Aumento 20X, sendo (A) Ej-fv1 (100µg/mL); (B) Ej-fv1 (50µg/mL)- Fruto Verde (C) Ej-fm1 (100µg/mL); (D) Ej-fm1(50µg/mL)-Fruto Maduro.

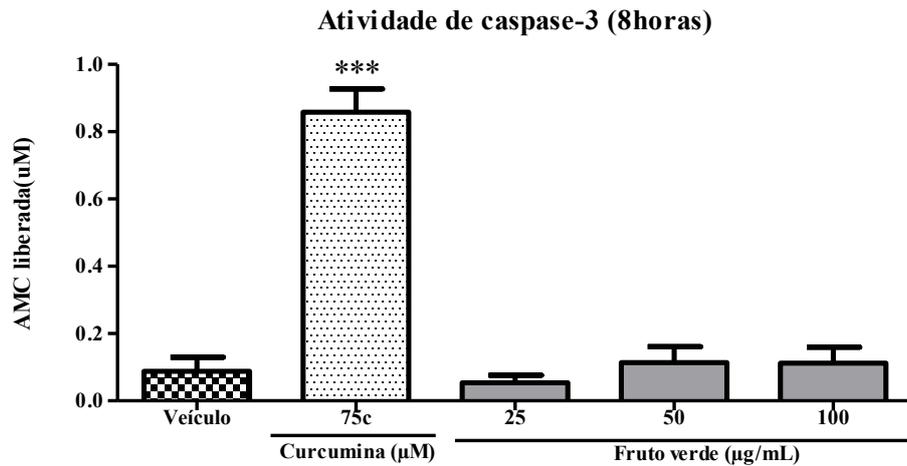
### 5.3. Atividade de Caspase 3

A avaliação da atividade de caspase 3 como um indicador de apoptose foi determinada pela liberação de aminometilcumarina (AMC), medida em comprimentos de excitação e emissão 360/40 nm e 460/40 nm, respectivamente. O ensaio foi realizado por fluorescência, utilizando um substrato, contendo a sequência peptídica Ac-DMQD-AMC, que após a clivagem pela caspase libera AMC resultando em fluorescência, a qual é quantificada pela ativação de caspase 3 nas células.

As figuras 19 e 20 referem-se a resposta da atividade da enzima caspase na linhagem celular hepa1c1c7, exposta ao tratamento com o extratos de fungos endofíticos de *E. jambolana* isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e do fruto verde (Ej-fv1) por 8 horas. Nenhuma das concentrações testadas (100µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL) apresentaram atividade de caspase 3 para o extrato (Ej-fm1). Embora não haja diferença significativa também para o extrato do (Ej-fv1), podemos notar uma pequena tendência para indução de atividade de caspase 3.

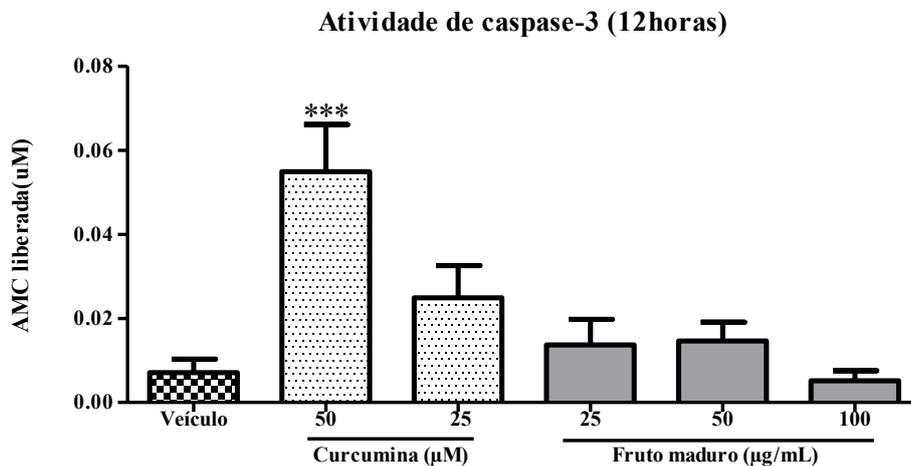


**Figura 19:** Atividade de caspase 3 em células Hepa 1c1c7. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey \*\*\*  $p < 0,001$ . Células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm) por 8 horas.

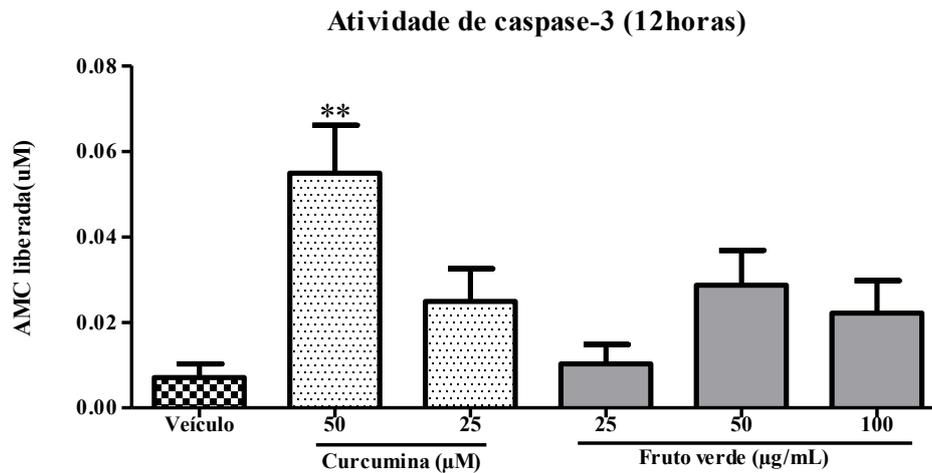


**Figura 20:** Atividade de caspase 3 em células Hepa 1c1c7. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey \*\*\*  $p < 0,001$ . Células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1) por 8 horas.

Para o tempo de exposição de 12 horas aos extratos (Ej-fm1) e (Ej-fv1) também não pode-se observar atividade de caspase significativa, somente o controle positivo induziu atividade de caspase 3 ( $p < 0,001$ ) (Figuras 21-22).



**Figura 21:** Atividade de caspase 3 em células Hepa 1c1c7. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey \*\*\*  $p < 0,001$ . Células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1) por 12 horas.

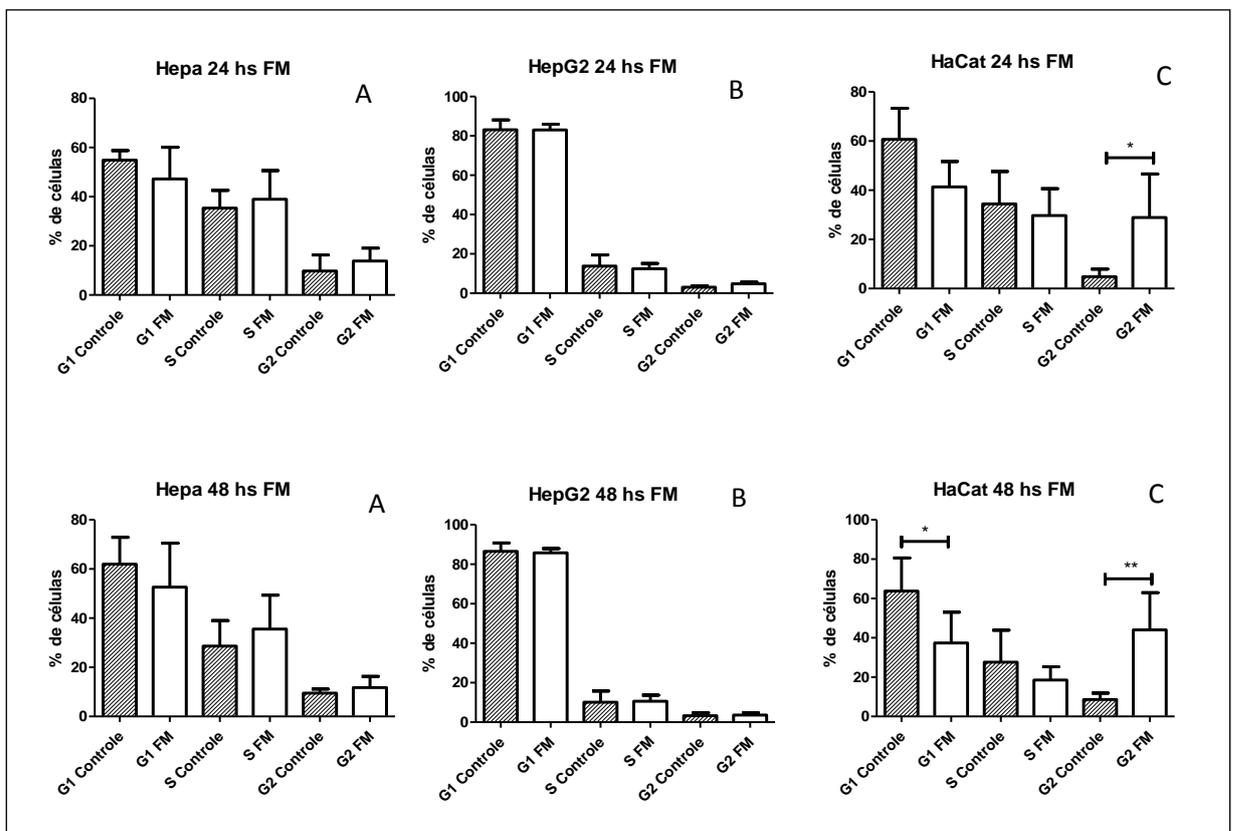


**Figura 22:** Atividade de caspase 3 em células Hepa 1c1c7. Resultados estão expressos como a média de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey\*\*  $p < 0,01$ . Células tratadas com extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1) por 12 horas.

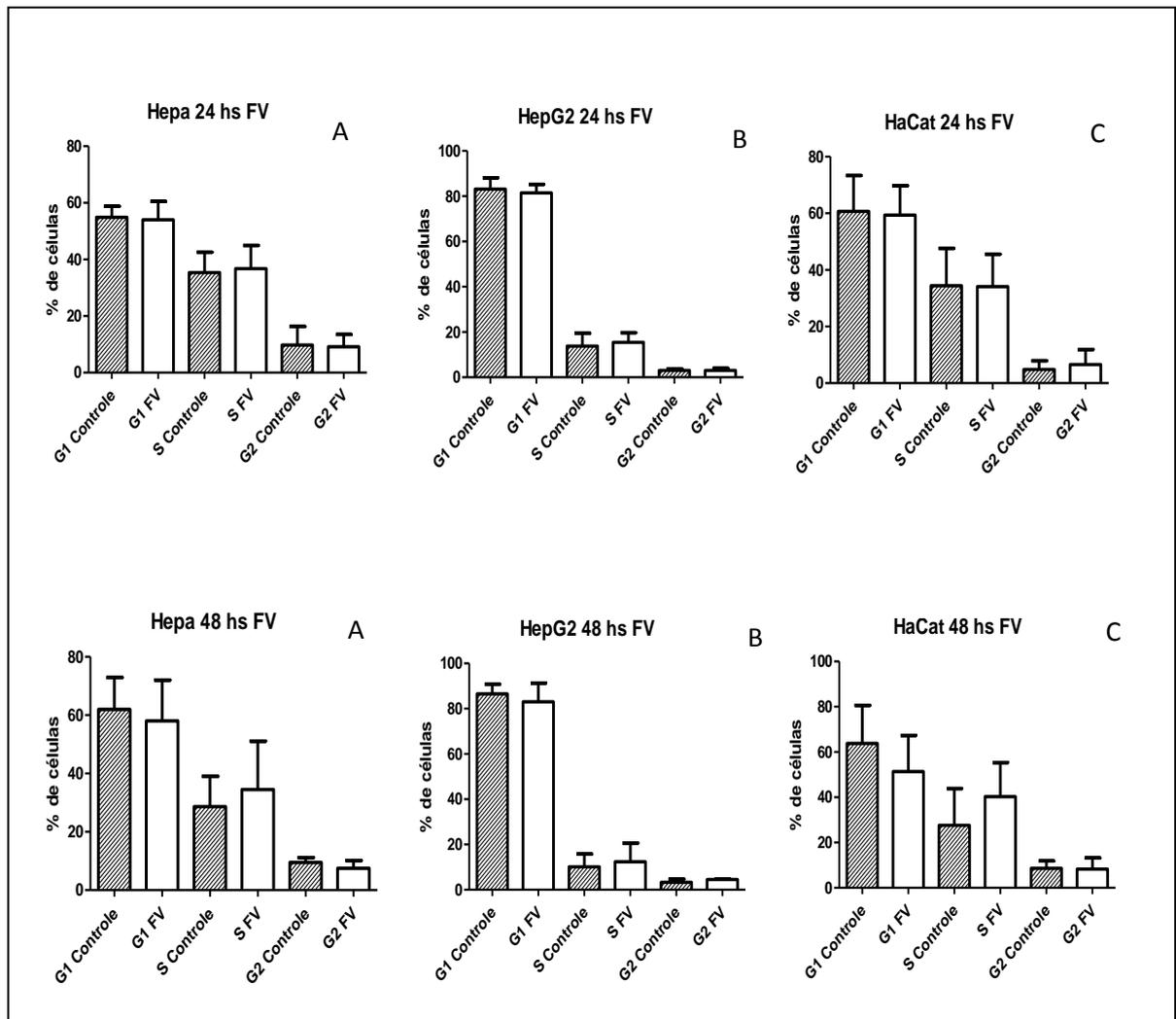
Podemos notar que houve uma tendência na indução da atividade de caspase 3 para ambos os extratos (Ej-fm1) e (Ej-fv1), no tempo de tratamento de 12 horas, embora não haja diferença estatisticamente significativa. Podemos observar também que essa tendência foi maior para o extrato Ej-fv1.

#### 5.4. Ensaio do Ciclo Celular

Os resultados do teste do ciclo celular em células Hepa-1c1c7- hepatocarcinoma murino, HepG2- linhagem humana de hepatocarcinoma e HaCat -queratinócito normal de pele, estão expressos nas figuras 23 e 24. Apenas o extrato bruto produzido pelo fungo endofítico isolados do fruto maduro (Ej-fm1), causou parada de ciclo na fase  $G_2/M$  na linhagem HaCat, apresentando uma redução de células em  $G_1$ .



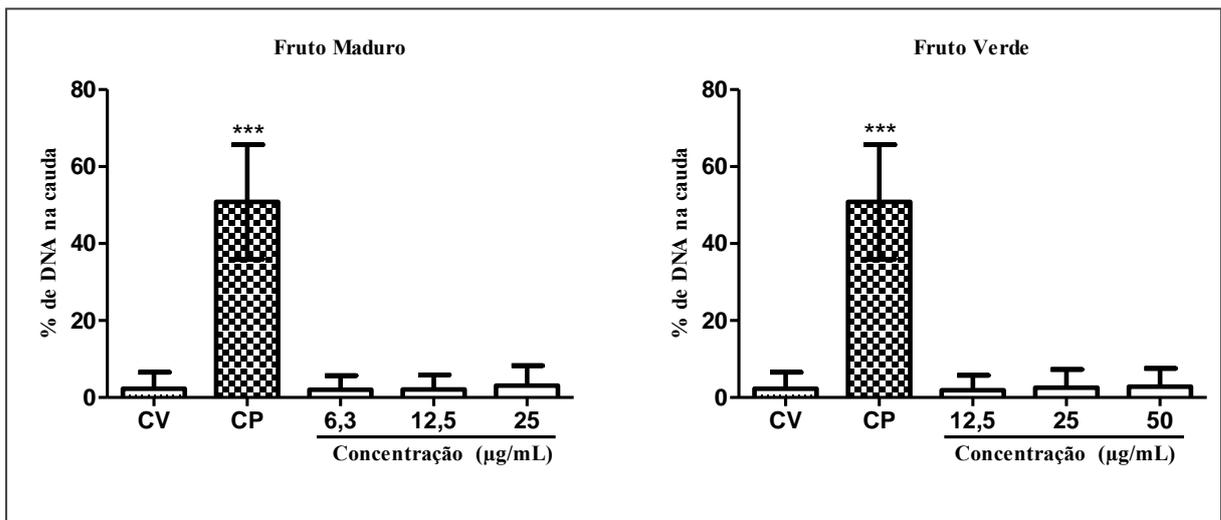
**Figura 23.** Ensaio do Ciclo Celular. Extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1) -FM na concentração de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , nas linhagens celulares de (A) Hepa-1c1c7- hep;atocarcinoma murino, (B) HepG2- linhagem humana de hepatocarcinoma e (C) HaCat - queratinócito normal de pele, tratadas por 12 horas.



**Figura 24.** Ensaio do Ciclo Celular. Extrato bruto do fungo endofítico isolado do fruto verde (Ej-fv1) - FV na concentrações de 50 µg/mL, nas linhagens celulares de (A) Hepa-1c1c7- hepatocarcinoma murino, (B) HepG2- linhagem humana de hepatocarcinoma e (C) HaCat - queratinócito normal de pele, tratadas por 12 horas.

### 5.5. Ensaio do Cometa

Para a avaliação da genotoxicidade dos extratos brutos produzidos por fungos endofíticos isolados do fruto maduro (Ej-fm1) e do fruto verde (Ej-fv1) de *E. jambolana*, foi realizado o ensaio do cometa, o qual consiste na mensuração de fragmentação do DNA na cauda distante do nucleóide. Foram utilizadas concentrações não citotóxicas determinadas previamente pelo método sulfarrodamina B. A linhagem Hepa 1c1c7 foi tratada por 6 horas utilizando as concentrações 25 µg/mL; 12,5 µg/mL e 6,3 µg/mL para o extrato (Ej-fm1) e 50 µg/mL; 25 µg/mL e 12 µg/mL para o extrato (Ej-fv1). No tratamento de ambos os extratos não houve efeito genotóxico significativo na linhagem Hepa 1c1c7 (Figura 25).

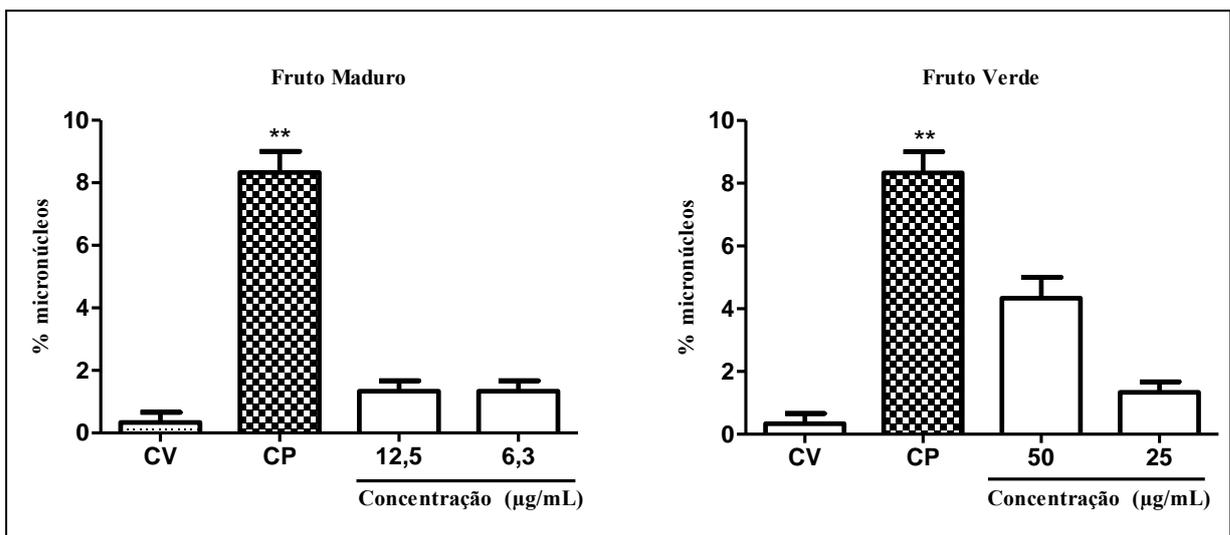


**Figura 25.** Genotoxicidade de extratos brutos produzidos pelo fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e do fruto verde (Ej-fv1) representada pela % de DNA na cauda em linhagem celular Hepa 1c1c7. Resultados são expressos como a média da % de DNA na cauda de 50 células por concentração e controles e analisados por *Kruskal-Wallis test* com pós-teste de Dunn's. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ). CV (controle de veículo – DMSO 1%), CP (controle positivo – 1mM de peróxido de hidrogênio por 10 minutos) \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 5.6. Ensaio do Micronúcleo

O teste é amplamente recomendado para avaliação do potencial mutagênico, é considerado um procedimento rápido, barato, que pode ser repetido várias vezes, para a prevenção e monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico.

A análise dos resultados do ensaio do micronúcleo na linhagem Hepa 1c1c7, demonstra que não houve diferença significativa entre as concentrações testadas e o controle de veículo. Esses resultados demonstram que os extratos brutos produzidos por fungos endofíticos isolados do fruto maduro (Ej-fm1) e do fruto verde (Ej-fv1) de *E. jambolana* não induziram mutagenicidade nas condições testadas (Figura 26).



**Figura 26.** Mutagenicidade de extratos brutos produzidos pelo fungo endofítico isolado do fruto maduro (Ej-fm1) e fruto verde (Ej-fv1) representada pela frequência de micronúcleos na linhagem celular Hepa 1c1c7. Resultados são expressos em 1000 células por concentração e controles e analisados por *Kruskal-Wallis test* com pós-teste de Dunn's. Os dados referem-se às médias de três experimentos independentes e desvio padrão ( $M \pm SD$ ). CV (controle de veículo – DMSO 1%), CP (controle positivo – 0,8 µM de Etoposídeo) \*\*  $p < 0,01$ .

## 6. Discussão

O carcinoma hepatocelular (CHC) é um grande problema de saúde pública, apresentando distribuição desigual ao redor do mundo com fatores de riscos bem definidos que variam de acordo com a região. Dados da Organização Mundial da Saúde (2015) indicam o câncer de fígado como segunda causa de óbito por câncer no mundo, com forte prevalência no Oriente, em áreas do continente africano e do pacífico oeste. Porém, o quadro epidemiológico da doença têm se apresentado de incidência crescente em todo mundo, com maior parte dos casos em países em desenvolvimento. Nessas áreas a etiologia do CHC está associada com a infecção pelo vírus da hepatite B (HVB). No Japão, Estados Unidos, América Latina e Europa, a maior causa está relacionada com a prevalência da infecção pelo vírus da hepatite C. No Brasil, apesar da incidência ser crescente dados referentes ao CHC ainda continuam escassos, o que dificulta o planejamento e adoção de medidas que possam contribuir para prevenção, diagnóstico e tratamento da neoplasia. (FERENCE et al., 2010; GOMES 2013; MICHITAKA et al, 2010; QUETGLAS et al., 2014). Estudos de Gonçalves e colaboradores (1997) ao verificar a prevalência da doença em alguns estados brasileiros mostraram que o CHC no Brasil tem características epidemiológicas intermediárias entre as observadas nas áreas de baixa e de alta incidência do tumor. Por essas razões, faz-se necessário a busca por tratamentos, justificada pelo quantidade de pessoas que já estão acometidas pelo CHC.

Produtos naturais têm desempenhado um importante papel na descoberta de drogas para o câncer, fornecendo um grande número de agentes clinicamente úteis. Trabalhos demonstram que muitos desses produtos naturais bioativos, apresentam bons resultados em suas atividades biológicas, com capacidade de inibição celular em linhagens tumorais, demonstrando significativos benefícios terapêuticos em modelos experimentais (NEWMAN e CRAGG, 2012). Esses produtos naturais têm apresentado diversas atividades biológicas, as quais contribuem para o desenvolvimento de aproximadamente de 75% das drogas (LEE,1999; NEWMAN e CRAGG, 2007). Principalmente extratos ou substâncias isoladas de plantas têm sido frequentemente avaliados quanto ao seu potencial anticarcinogênico (DUARTE, 2010).

Dentre as classes de organismos investigados como fonte de produtos naturais, os microorganismos endófitos desempenham um importante papel, representando uma importante fonte, com mais de 20000 substâncias já descritas, sendo que destas 51%

apresentam estruturas inéditas e 80% atividade biológica. Essas importantes características são explicadas pela teoria ecológica, que relaciona a resposta de produção metabólica com o nicho ecológico no qual o microrganismo está inserido, bem como suas interações bióticas e abióticas (CHAPLA; BIASETTO; ARAUJO, 2013).

Os fungos endofíticos e seus derivados representam uma importante classe desses bioativos naturais que se apresentam como fonte promissora de novos terapêuticos (CHAPLA, BIASETTO, ARAUJO, 2013; EVIDENTE et al., 2014). Atualmente, mais de 140 metabólitos fúngicos demonstraram atividade confirmada nos bioensaios com células tumorais (WANG et al., 2011). Desta forma, o presente estudo avaliou efeitos antitumorais de extratos brutos produzidos por fungos endofíticos isolados de *E. jambolana*. Ambas espécies fúngicas responsáveis pela produção dos extratos avaliados foram descritas recentemente, de acordo com o banco de dados de espécies fúngicas (MycoBank), tanto o *P. stromaticum*, quanto o *Neofusicoccum* sp foram descritos em 2006. Por essa razão são poucos os estudos encontrados na literatura referentes aos fungos *P. stromaticum* e *Neofusicoccum* sp.

*Pseudofusicoccum stromaticum*, foi encontrado em ramos e caules de Eucalipto e Acácia na Venezuela. O fungo também já foi reportado associado à manga no Brasil (MOHALI et al., 2006; MARQUES et al., 2012). A fim de resolver a taxonomia da família Batryosporiaceae foi realizado um estudo baseado em dados de sequência de DNA e morfologia, que enquadrou vários gêneros incluindo *Neofusicoccum* e *Pseudofusicoccum* (CROUS et al. 2006). Desde então foram poucos estudos com o fungo *P. stromaticum* e o fungo do gênero *Neofusicoccum*.

Determinar a viabilidade celular é o primeiro passo fundamental durante o desenvolvimento das manipulações experimentais, assegurando dessa forma a capacidade de encontrar populações celulares capazes de responder às substâncias a serem avaliadas. Através do teste de viabilidade, fica garantido que as concentrações dos compostos testados são adequadas e não causam citotoxicidade prejudiciais as culturas celulares. Neste trabalho, o modelo de estudo para o carcinoma hepatocelular foram as linhagens celulares Hepatocarcinoma murinho (Hepa1c1c7), Hepatocarcinoma humano (HepG2) e queratinócito de pele normal (HaCat) para avaliação da citotoxicidade dos extratos.

Para a linhagem Hepa1c1c7 foi verificada atividade citotóxica concentração-resposta do extrato produzido pelo fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm1) com inibição celular de 63, 4% e 38,4% para as concentrações 100µg/mL e 50µg/mL. O extrato bruto produzido pelo fungo *Neofusicoccum* sp (Ej-fv1) foi capaz de diminuir a viabilidade celular em 68% na maior concentração, não apresentando morte celular nas demais concentrações testadas. Esses

resultados corroboram com o trabalho de conclusão de curso de Franciele Baveloni, que apesar de ter utilizado outro método para avaliar citotoxicidade ao utilizar o modelo celular hepa1c1c7 também identificou o mesmo perfil de morte concentração-resposta para o extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm1), bem como também verificou a capacidade do extrato produzido pelo fungo *Neofusicoccum* sp (Ej-fv1) em induzir morte celular significativa apenas na concentração de 100µg/mL.

A linhagem celular HepG2 apresentou-se mais resistente, pois os extratos foram inativos nas concentrações testadas. Podemos observar que não houve citotoxicidade para o fruto maduro em todas as concentrações testadas. Já para o fruto verde, houve citotoxicidade apenas na maior concentração (100 µg/mL), com 38,4% de morte celular. Esse, resultado provavelmente se deu devido a sua capacidade de metabolização, pois esse tipo celular possui um papel fundamental na metabolização e detoxicação de xenobióticos. Por isso, os produtos metabólicos podem perder sua atividade citotóxica quando testados em linhagens metabolizadoras (TSUBOY et al., 2007).

Para a linhagem celular HaCat, apenas a maior concentração do extrato bruto produzido pelo fungo do fruto verde Ej-fv1 de *E. jambolana* apresentou atividade citotóxica significativa, com uma morte celular em média de 43,5% na maior concentração testada, 100 µg/mL). Dessa forma pode-se considerar que o extrato bruto produzido pelo fungo *Neofusicoccum* sp (Ej-fv1) não ocasionou uma morte celular seletiva (somente nas células neoplásicas). Esses resultados indicam que a aplicabilidade desse extrato é ainda questionável do ponto de vista tóxico às células normais. Atualmente, a busca por novas drogas com maior potência quimioterápica e que desenvolvam menos efeitos tóxicos é constante. Diante dos resultados obtidos, extrato produzido pelo fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm) foi mais ativo frente as células de Hepatocarcinoma murino, apresentando seletividade celular apenas para linhagem tumoral. Essa característica torna o extrato produzido pelo fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm) um melhor candidato quimioterápico, pois supostamente proporcionaria menos efeitos secundários e melhor eficiência terapêutica (DEMAIN e VAISHNAV, 2011). Nesse sentido ainda é importante salientar, que o extrato bruto é uma amostra que contém um “pool” de substâncias, que quando isoladas podem demonstrar uma atividade biológica mais específica, por essas razões é interessante que estudos posteriores realizem o fracionamento químico do extrato bruto para isolamento das substâncias bioativas, as quais provavelmente seriam utilizadas em menores concentrações em comparação com as concentrações utilizadas no presente trabalho.

Outros testes já realizados também com o extrato produzido pelo fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm1) também evidenciaram resultados significativos frente às linhagens tumorais: HCT-8 (côlon - humano), SF-295 (glioblastoma - humano) e OVCAR (carcinoma de ovário), porém não identificou inibição do crescimento celular *in vitro* ao testar o extrato bruto produzido pelo fungo *Neofusicoccum* sp (Ej-fv1). Devido a bioatividade observada no extrato bruto produzido pelo fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm1), outros ensaios também foram realizados e também evidenciaram resultados satisfatórios após avaliação de outras atividades metabólicas com o mesmo extrato bruto. O extrato do fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm1) também foi capaz de inibir a ação da enzima acetilcolinesterase e a ação do fungo fitopatogênico *Cladosporium sphaerospermum*. Esses resultados confirmam o potencial biológico do extrato produzido pelo fungo endofítico *P. stromaticum* (CHAPLA, 2014).

Souwalak e colaboradores (2007), demonstraram que os extratos brutos provenientes do metabolismo secundário de fungos endofíticos isolado da planta *Garcinia* sp também apresentam atividades biológicas como antifúngica, antibacteriana, antivirais e antitumorais.

Diante desses resultados positivos com relação a atividade biológica dos endófitos, faz-se necessário a busca de métodos para mimetizar o ambiente natural dos endófitos ou alterar a produção metabólica com vistas aumentar a expressão gênica das vias biossintéticas. Esse método resulta na observação de que pequenas alterações nas condições de cultivo que podem mudar o perfil metabólico de muitos micro-organismos. Estudos têm relatado a importância de modificadores epigenéticos aplicados no cultivo de microrganismos, a fim de proporcionar alterações na produção metabólica e promover o crescimento de espécies fúngicas em grande escala. (PARANAGAMA; WIJERATNE; GUNATILAKA, 2007). Pesquisas apontam diferenças significativas na produção metabólica de fungo endofítico cultivado com modificador epigenético. Estudos realizados por Vanessa Chapla (2014) avaliou a produção metabólica do fungo endofítico *Lecythophora* sp. utilizando um modificador epigenético. Quando o fungo foi cultivado na presença de um modificador epigenético, foi constatado um aumento significativo do rendimento do extrato bruto. O cultivo sem modificador epigenético forneceu 20,6 mg e com o modificador foi de 189,0 mg, um aumento de 9,2 vezes. A alta massa obtida provavelmente está associada com a alta produção metabólica.

Além de verificar esses eventos, quando pensamos especificamente na possibilidade de aplicação clínica de compostos antitumorais, devemos também identificar o seu potencial de propiciar à morte das células malignas, caracterizando o tipo de morte que a substância

culminou. Na literatura ainda não há nenhum relato que caracterize o tipo de morte induzida pelos extratos testados nesse trabalho. Por essas razões, o presente estudo contribui para descrever mais uma característica desses extratos salientando suas promissoras atividades biológicas. Com relação ao tipo de morte celular na linhagem Hepa 1c1c7 pelo método Hoechst/ Iodeto de Propídeo, para o extrato do fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm1), não houve indução significativa de apoptose em relação ao controle veículo (DMSO 1%) para as duas menores concentrações 25 µg/mL e 50 µg/mL. Embora a diferença estatística não seja significativa para apoptose nas duas menores concentrações testadas houve morte celular por apoptose de 18,6% e 44,2% respectivamente para as concentrações 25 µg/mL e 50 µg/mL. Na maior concentração testada (100 µg/mL), foi observado diferença estatística para presença de apoptose tardia ( $p < 0,01$ ), bem como para necrose ( $p < 0,001$ ).

Essa característica de apoptose tardia significativa apenas na maior concentração também foi verificada no trabalho de Duarte e colaboradores (2010), que também ao avaliar um composto de fonte natural, frente uma linhagem tumoral, encontraram diferença estatística para presença de apoptose tardia ( $p < 0,01$ ), também apenas na maior concentração testada.

Já o extrato bruto proveniente do fungo *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1) isolado do fruto verde de *E. jambolana*, promoveu indução significativa de apoptose precoce e necrose ( $p < 0,001$ ), apenas na maior concentração testada (100 µg/mL). Assim como observado no ensaio de citotoxicidade, em que apenas a maior concentração do extrato (Ej-fv1) foi capaz de induzir morte celular na linhagem hepa 1c1c7. Ao avaliar o tipo de morte celular do extrato do fungo *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1) ainda podemos notar um aumento concentração-resposta para apoptose, representando 11,5%, 17,7% e 45,6%, respectivamente, para as concentrações de 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL. Nesse caso, pôde-se notar valores menos representativos com relação a morte por necrose, sendo 3,3%, 5,8% e 25, 2% para as concentrações 25 µg/mL, 50 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. O restante representa uma porcentagem de células vivas e apoptose tardia.

Esse perfil característico de morte mista dos dois extratos testados para o modelo de carcinoma hepatocelular pode ser importante, pois na maior parte dos tumores a apoptose encontra-se deficiente, com isso a necrose passa ser responsável por desempenhar um papel fundamental no reconhecimento e regressão do tumor por estimulação da resposta imune inata (GUERREIRO et al., 2008). Dessa forma, uma morte celular ideal para um quadro de neoplasia seria uma morte capaz de recrutar células do sistema imune, ou seja, uma morte celular imunogênica, que é uma modalidade de morte celular capaz de estimular uma resposta imune contra os antígenos de células mortas, em especial quando eles derivam de células

tumorais (GREEN et al., 2009). Este modelo de morte celular contribui significativamente para o tratamento quimioterápico, pois com base em evidência clínica, estudos indicam que respostas imunes específicas para o tumor pode determinar a eficácia das terapias anticâncer por meio da resposta citotóxica de fármacos convencionais (ZITVOGEL; KEPP; KROEMER, 2011). Mais especificamente a morte celular imunogênica proporciona mudanças na composição da superfície da célula, bem como a liberação de mediadores solúveis. Tais sinais, ativam uma série de receptores, expressos por células dendríticas, que estimulam a apresentação de antígenos tumorais para células T. Por isso, a morte celular imunogênica constitui uma via importante para ativação do sistema imunológico contra o câncer, determinando assim a longo prazo um possível viés para o sucesso da terapia anti-câncer (KROEMER et al., 2013).

Na avaliação de apoptose induzida pelos extratos brutos provenientes dos fungos endofíticos *P. stromaticum* (Ej-fm1) e *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1) na linhagem celular Hepa 1c1c7 pelo método caspase 3, não foi verificada atividade de caspase 3 em nenhuma das concentrações testadas, bem como para os dois tempos de exposição avaliados. No tempo de tratamento de 8 horas apesar do extrato (Ej-fv1) não apresentar diferença significativa, houve uma pequena tendência para indução de caspase 3. Para o tempo de exposição de 12 horas, ambos extratos apresentaram uma tendência de indução da atividade de caspase 3, porém não apresentou diferença estatisticamente significativa. Podendo também observar que essa tendência foi maior para o extrato (Ej-fv1). Esses resultados podem sugerir uma via de morte celular possivelmente independente de caspase. Embora os eventos da apoptose como permeabilidade da membrana mitocondrial, externalização da fosfatidilserina, proteólise, encolhimento celular e degradação do DNA, muitas vezes são atribuídos apenas por atividade de caspase (TAIT e GREEN, 2008), existem também evidências de que o processo de apoptose também possa ocorrer na ausência de atividade de caspase, sugerindo que existe um mecanismo alternativo regulador de apoptose (LEIST e JAATTELA, 2001). Esse mecanismo complementar possui suas vias de sinalização mediadas por outras proteases, que não caspases. Proteases como catepsinas, calpaínas e granzimas também são capazes de induzir apoptose (JOHNSON, 2000). Estudos demonstraram que a inibição de caspase foi incapaz de bloquear o processo de apoptose em células expostas por uma variedade de estímulos citotóxicos assim como já é comprovado *in vivo* que a apoptose pode ocorrer na ausência de caspase (LOCKSHIN e ZAKERI, 2004; XIANG; CHAO; KORSMEYER, 1996). A evolução desses mecanismos complementares comprovou que além da mitocôndria, que também contribui para morte celular independente de caspase, outras organelas também estão

intimamente associadas a outros mecanismos efetores de apoptose, como o retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e lisossomos, que podem gerar sinalização independente de caspases, participando de forma efetora na via apoptótica (HAIL et al., 2006; PRADELLI; BÉNÉTEAU; RICCI, 2010).

Estudos já relataram que a inibição de caspases não impedem a morte celular. Embora, presente características apoptóticas, as caspases podem não ser exclusivas e cruciais nesse processo. Algumas vias independente de caspase já foram descritas na literatura, as quais estão relacionadas com a liberação de AIF da mitocôndria (BROWN et al., 2006); ativação de serino proteases como AP24 que, quando inibidas, provocam uma proteção contra a morte mais eficiente que a conseguida com um inibidor de caspases (TORRIGLIA *et al.*, 2000); ativação de endonuclease G, uma nucleasse capaz de clivar a cromatina em fragmentos internucleossomais (LI et al., 2001); ativação da rota colpaína/catepsina que, uma vez ativada por excesso de cálcio, promove a ruptura do lisossomo e o extravasamento do seu conteúdo, responsável pela digestão dos constituintes. Nesse momento, o cálcio acaba também ativando uma série de outras proteínas responsáveis pelas características ditas “apoptóticas” nas células (YAMASHIMA, 2000).

Com relação a regulação do ciclo celular induzida pelos extratos brutos (Ej-fm1) e (Ej-fv1) nas linhagens celulares Hepa1c1c7, HepG2 e HaCat, houve parada do ciclo celular na fase G2/M com redução em G1 ao avaliar o extrato do fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm1) para HaCat. Já para as linhagens tumorais não houve nenhuma interferência na progressão do ciclo celular, isso indica que as células tumorais deixaram de corrigir algum dano nessa fase. E podendo ainda sugerir que na linhagem normal foi detectado algum tipo de dano que pode estar relacionado com a perda de fibras do fuso ou com dificuldade de segregação dos cromossomos, pois uma parada em G2 evita que a célula segregue cromossomos defeituosos. Um dos pontos que podem ocorrer durante a mitose é a parada da progressão da mitose se o fuso mitótico não estiver corretamente formado, ou se a ligação e orientação de todos os cromossomos ao fuso não estiverem totalmente firmes. Esse checkpoint tem a função de assegurar uma replicação precisa do DNA, bem como proporcionar uma segregação precisa do DNA (PERDIGÃO e TAVARES, 2001).

Embora, a HaCat seja normal, ela foi transformada para adquirir crescimento contínuo em cultura, ou seja, ela foi mutada para se tornar uma linhagem celular imortalizada. Características que podem ter sido alteradas na linhagem normal, podem ter sido sensíveis o suficiente para proporcionar parada do ciclo induzida pelo tratamento. A regulação do ciclo celular pode ser altamente sensível, pois a presença de uma única quebra em uma molécula do

DNA ou um único cromossomo que não foi associado ao fuso mitótico corretamente pode ser suficiente para causar uma parada na progressão do ciclo celular. Quando células normais são sujeitas a alterações que podem ter danificado o DNA a progressão ao longo do ciclo celular para enquanto o dano é reparado (PERDIGÃO e TAVARES, 2001).

Há proteínas que estão envolvidas no controle do ciclo celular, caso ocorrer algum dano celular, proteínas supressoras de tumores, como a p53, por exemplo, executam papéis fundamentais no controle do ciclo celular. Essa regulação é necessária na decisão final da via seguida pela célula, que pode culminar na progressão ou parada do ciclo celular ou na indução ou não da célula para entrar em apoptose. Estudos realizados com células tumorais têm mostrado que genes supressores de tumor, como o p53, e alguns oncogenes estão envolvidos no processo que iniciam a apoptose em detrimento de um atraso no ciclo celular (checkpoint) para o reparo de dados no DNA. Outros genes como o Bax, Bad, Bcl-X, Mcl1, Al, p21 e GADD45, também estão envolvidos. O gene p53 quando expresso em grande quantidade causa atraso do ciclo celular em G1. Durante o atraso em G1, a célula ativa o sistema de reparo do dano ao DNA e caso não haja reparo correto, a célula entra em apoptose (OLIVE e DURAND, 1997; POUGET e MATHER, 2001).

Para a avaliação dos níveis de dano no DNA, existem algumas técnicas disponíveis, como, por exemplo, ensaio do cometa, que nos permite avaliar o índice de danos no DNA. É um teste capaz de detectar danos mais recentes e passíveis de serem reparados (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005; MOLLER, 2005). Demonstra-se ser uma técnica simples, rápida e não requer altos investimentos com equipamentos analíticos. As imagens dos cometas podem ser analisadas, por meio comprimento de migração e da proporção relativa de DNA na cauda. O dano ao DNA, no ensaio do cometa pode ser induzido por drogas, radiações e substâncias inorgânicas (COSTA et al., 2001). Danos causados ao DNA por mutagênicos ambientais podem ser nocivos para vários organismos, inclusive para os seres humanos. O acúmulo de mutações está relacionado com o desenvolvimento de praticamente todos dos tumores malignos e doenças degenerativas, também ocorrendo aumentando as chances com a idade e com algumas anomalias genéticas (CUZZOCREA et al., 2001; MIGLIORE et al., 2002). A fim de prevenir o risco genotóxico, é pertinente tanto identificar os agentes mutagênicos e diminuir a exposição a eles (JEONG et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2006;). Assim, ao avaliarmos substâncias, cujo mecanismo de ação ainda é desconhecido, faz-se necessário avaliar o potencial genotóxico buscando melhor caracterizar tais mecanismos.

Dessa maneira faz-se necessária a utilização do teste do cometa para avaliar a atividade genotóxica dos extratos brutos provenientes dos fungos endofíticos *P. stromaticum*

(Ej-fm1) e *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1). Já que os extratos brutos possui um “pool” de compostos ainda desconhecidos, é de extrema importância verificar se há alguma substância que pode provocar algum dano genotóxico, pois estudos já relataram que diferentes metabólitos secundários, tais como flavonóides e alcalóides, podem ser potencialmente genotóxicos (SCHMITTA et al., 2003).

Nossos resultados não identificaram danos no DNA causados pelo tratamento com os dois extratos para a linhagem Hepa 1c1c7, diferente dos resultados de Baveloni (2013), que identificou o extrato bruto proveniente do fungo endofítico *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1) como agente genotóxico para a linhagem Hepa 1c1c7.

Outro teste relevante é o teste do micronúcleo, que em combinação com o ensaio do cometa é indicado para determinar os efeitos que as drogas podem causar ao DNA. Principalmente por serem testes possuem como característica a capacidade de avaliar danos de DNA em estágios específicos do ciclo celular (CAVALCANTI et al., 2006; RIVA et al., 2007). Devido à sua simplicidade, confiabilidade e sensibilidade, o teste do micronúcleo tem sido de grande importância para a avaliação de mutagenicidade de substâncias, entre elas, produtos naturais, os quais podem exercer atividades clastogênicas (capacidade ou predisposição à quebra cromossômica), aneugênicas (capacidade ou predisposição de alterar o fuso mitótico resultando na perda de cromossomo), ou ambas (TOROUS, et al., 1998). Por essas razões, os extratos também foram submetidos ao teste do micronúcleo e pudemos observar que nenhum dos extratos exibiram atividade mutagênica, pois não houve aumento significativo na frequência de micronúcleo na linhagem hepa1c1c7 em relação a frequência de micronúcleos do controle veículo. Esses achados sugerem que os extratos não possuem capacidade de induzir qualquer dano de DNA na linhagem celular Hepa 1c1c7. Nossos resultados demonstram a extrema importância do estudo das comunidades endofíticas ainda não investigadas, a fim de ampliar as possibilidades para descoberta de novos microorganismos de interesse biotecnológico. E ainda, reforçar o potencial terapêutico que a grande diversidade de microorganismos encontrados em regiões tropicais, como o Brasil podem oferecer.

Apesar das caracterizações realizadas no presente trabalho, ainda são necessários estudos adicionais para indicar os extratos ou seus compostos isolados como fontes terapêuticas, propondo estudos a fim de complementar e certificar tais resultados utilizando um modelo *in vivo*.



## 7. Conclusão

Através da análise dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

O extrato bruto do fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm1), apresentou efeito citotóxico concentração-resposta para linhagem Hepa1c1c7. Já o extrato bruto proveniente do fungo *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1) induziu inibição celular significativa apenas para a maior concentração para as linhagens Hepa1c1c7, HepG2 e HaCat.

A apoptose induzida pelos extratos (Ej-fm1) e (Ej-fv1) pelo método Hoechst/IP, apresentou morte celular por apoptose (precoce e tardia), bem como por necrose. Para tal resultado podemos sugerir que os extratos induziram um perfil de morte mista, indicando uma resposta de morte celular imunogênica. Podendo ainda sugerir que haja um mecanismo de morte independente de caspase 3.

Houve parada do ciclo celular na fase G2/M com redução em G1 ao avaliar o extrato do fungo endofítico *P. stromaticum* (Ej-fm1) apenas para HaCat. O extrato bruto proveniente do fungo *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1) não induziu parada de ciclo celular para nenhuma linhagem celular.

Ao avaliar a genotoxicidade (teste do cometa) e mutagenicidade (teste do micronúcleo), os extratos brutos produzidos pelos fungos endofíticos *P. stromaticum* (Ej-fm1) e *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1), não ocasionaram danos genotóxicos, e não induziram mutagenicidade para linhagem Hepa 1c1c7.

## 8. Referências Bibliográficas

- BALIGA, M. S.; BHAT, H.; BALIGA, B.R. V.; WILSON, R.; PALATY, P. L. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. **Food Research International**, v. 44, p. 1776–1789, 2011.
- BARBARA, L.; BENZI, G.; GAIANI, S.; FUSCONI, F.; ZIRONI, G.; SIRINGO, S.; RIGAMONTIA, A.; BARBARA, C.; GRIGIONI, W.; MAZZIOTTI, A. Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a multivariate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. **Hepatology**, v.16, n. 1, p. 132-137, 1996.
- BAVELONI, F. G. **Avaliação da atividade citotóxica e genotóxica de extratos brutos de metabólitos secundários de fungos endofíticos isolados da Eugenia jambolana em células de hepatocarcinoma murino (Hepa-1c1c7)**. 2013. 50f. Monografia (Trabalho de Conclusão de curso) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- BOQUEST, A. C.; DAY, B. N.; PRATHER, R. S. Flow Cytometric Cell Cycle Analysis of Cultures Porcine Fetal Fibroblast Cells. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 1013-1109, 1999.
- BOUJRAD, H.; GUBKINA O.; ROBERT N.; KRANTIC S.; SUSIN S. A. AIF-Mediated Programmed Necrosis: A Highly Regulated Way to Die. **Cell Cycle**, v. 6, p. 2612-2619, 2007.
- BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. **Biochemistry (Moscow)**, v. 70, p. 231-239, 2005.
- BRENDLER-SCWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-254, 2005.
- BROWN, D.; YU, B. D.; LOZA, N.; BÉNIT, P.; MENESES, J.; FIRPO, M.; RUSTIN, P.; PENNINGER, J. M.; MARTIN, G. R. Loss of Aif function causes cell death in the mouse

embryo, but the temporal progression of patterning is normal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United of America**, v. 103, n. 26, p. 9918-9923, 2006.

BRUIX, J.; SHERMAN, M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. **Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 1020-2, 2011.

CACCIOLA, I.; POLLICINO, T.; SQUADRITO, G.; CERENZINA, G.; ORLANDO, M. E.; RAIMONDO, G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. **New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 1, p. 22-6, 1999.

CAVALCANTI, B.C.; COSTA-LOTUFO, L.V.; MORAES, M.O.; BURBANO, R.R.; SILVEIRA, E.R.; CUNHA, K.M.; RAO, V.S; MOURA, D.J.; ROSA, R.M.; HENRIQUES, J.A; PESSOA, C. Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in Copaiba oil. **Food and Chemical Toxicology.**, v. 44, p. 388-392, 2006.

CHAPLA, V. M. Bioprospecção dos fungos endofíticos associados à espécie vegetal *Eugenia jambolana* e utilização de modificador epigenético no cultivo do fungo *Lecythophora* sp. 2014. 251f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Araraquara, 2014.

CHAPLA, V. M.; BIASETTO, C. R.; ARAUJO, A. R. Fungos Endofíticos: Uma fonte inexplorada e sustentável de novos bioativos produtos naturais. **Revista Virtual de Química.** v. 5, n. 3, p. 421-437, 2013.

SCHMITTA, E. M. M.; JONASA, R.; DEKANTA, W.; STOPPER, H. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.542, p.43-48, 2003.

CIANCIO, G.; POLLACK, A.; TAUPIER, M.A.; BLOCK, N.L.; IRVIN, G.L. Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry.** v. 36, n. 9, p.1147-52, 1988.

COLLINS, I.; GARRETT, M. D. Targeting the cell division cycle in cancer: CDK and cell cycle checkpoint kinase inhibitors. **Current opinion in pharmacology**, v. 5, n. 4, p. 366-373, 2005.

COSTA, R. M. A.; LIMA, W. C.; VOGEL, C. I. G.; BERRA C. M.; LUCHE, D. D.; MEDINA-SILVA, R.; GALHARDO, R. S.; MENCK, C. F. M.; OLIVEIRA, V. R. DNA repair-related genes in sugarcane expressed sequence tags (ESTs). **Genetics and Molecular Biology**, v.24, p.131-140, 2001.

CUZZOCREA, S.; RILEY, P.D.; CAPUTI, P.A.; SALVEMINI, D. Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, in Xammation, and ischemia/reperfusion injury. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 135–159, 2001.

CROUS, P. W.; SLIPPERS, B.; WINGFIELD, M. J.; RHEEDER, J.; MARASAS, W. F. O.; PHILIPS, A. J. L.; ALVES, A.; BURGESS, T.; BARBER, P.; GROENEWALD, J. Z. Phylogenetic lineages in the Bothyosphaeriaceae. **Studies em Mycology**, v. 55, p. 235-253, 2006.

DAMETTO, A. C. Bioprospecção em *Eugenia jambolana* (Myrtaceae). 131f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

DAVILA, J. C.; RODRIGUEZ, R. J.; MELCHERT, R. B.; ACOSTA, D. J. Predictive value of in vitro model in toxicology. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 38, p. 63-96, 1998.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microbial Biotechnology**, v. 4, n. 6, p. 687-699, 2011.

DREYFUSS, M. M., AND I. H. CHAPELA. Potential of fungi in the discovery of novel, low-molecular weight pharmaceuticals. **Biotechnology**, v. 26, p. 49-80, 1994.

DUARTE, R. A.; MELLO, R. M.; ARAKI, C.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; REGASINI, L. O.; SILVA, T. G. A.; MORAIS, C. C. M.; XIMENES, V. C.; SOARES, C. P.

Alkaloides extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. **Tumor Biology**, v. 31, p. 513-522, 2010.

EL-SAYED, W. M.; ABOUL-FADL, T.; ROBERTS, J. C.; LAMB, J. G.; FRANKLIN, M. R. Murine Hepatoma (Hepalcl7) cells: a responsive in vitro system for chemoprotective enzyme induction by organoselenium compounds. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 1, p. 157-164, 2007.

EL-SERAG H, B; RADOLPH, K. L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. **Gastroenterology**, v. 132, n.7, p. 2557-2576, 2007.

EL-SERAG H, B. Hepatocellular carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 365, p. 1118-1127, 2011.

EVIDENTE, A.; KORNIENKO, A.; CIMMINO, A.; ANDOLFI, A.; LEFRANCE, F.; MATHIEU, V.; KISS, R. Fungal metabolites with anticâncer activity. **Natural Product Reports**, v. 31, p. 617-627, 2014.

FERENCI, P.; FRIED, M.; LABRECQUE, D.; BRUIX, J.; SHERMAN, M.; OMATA, M.; HEATHCOTE, J.; PIRATSIVUTH, T.; KEW, M.; OTEGBAYO, J. A.; ZHENG, S. S.; SARIN, S.; HAMID, S.; MODAWI, S. B.; FLEIG, W.; FEDAIL, S.; THOMSON, A.; KHAN, A.; MALFERTHEINER, P.; LAU, G.; CARILLO, F. J.; KRABSHUIS, J.; LE MAR, A. World Gastroenterology Organisation Guideline. Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. **Journal Gastrointestinal and Liver Disease**. v. 19, n. 3, p. 311-7, 2010.

FERLAY, J , SHIN, H. R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D. M. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International journal of cancer**, v. 127, p. 2893–2917, 2010.

GARRETT, M. D. Cell cycle control and câncer. **Current Science**. v. 81, n. 5, p. 515-522, 2001.

GENERAL ELETRIC HEALTHCARE. Micronuclei formation analysis module for IN cell analyser 2000. **GE Healthcare**, v.28, p. 14-60, 2009

GOMES, M. A.; PRIOLLI, D. G.; TRALHÃO, J. G.; BOTELHO, M. F. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 514-524, 2013.

GOMES, R.P. **Fruticultura brasileira**. 9. ed.São Paulo: Nobel, 1983. 269 p.

GREEN, D. R.; FERGUSON, T.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Immunogenic and tolerogenic cell death. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 353-363, 2009.

GREEN, D.; KROEMER, G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria. **Trends in Cell Biology**, v. 8, p. 267–271, 1998.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GONÇALVES, C. S.; PEREIRA, F. E. L.; GAYOTTO, L. C. C. Hepatocellular carcinoma in Brazil: reporto f a national survey (Florianópolis, SC, 1995). **Revista do Instituto de Medina Tropical de São Paulo**, v. 39, n. 3, p. 165-70, 1997.

GUICCIARDI, M. E.; GORES, G. J. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. **Gut**, v. 54, n. 7, p. 1024-33, 2005.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive natural products from endophytes: a review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 136-142, 2008.

HEDDLE, J. A.; CIMINO, M. C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHELBY, M.D.; VANPARYS, P.; MACGREGOR, J. T. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present and future. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277-91, 1991.

HAIL, N. JR.; CARTER, B. Z.; KONOPLEVA, M.; ANDREEFF, M. Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys. **Apoptosis**, v. 11, n. 6, p. 889-904, 2006.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Rules for making human tumor cells. **The New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 20, p. 1593-1603, 2002.

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 9, n. 6, p. 691-704, 2004.

HARTWELL, L. E.; WEINERT, T. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.

HASHIMOTO, N.; TSUNEDOMI, R.; YOSHIMURA, K.; WATANABE Y.; HAZAMA, S.; OKA, M. Cancer stem-like sphere cells induced from de-differentiated hepatocellular carcinoma-derived cell lines possess the resistance to anti-cancer drugs. **BMC Cancer**, v. 14, 2014.

HASHIMOTO, Y.; SHIMADA, Y.; ITAMI, A.; ITO, T.; KAWAMURA, J.; KAWABE, A.; KAGANOI, J.; MAEDA, M.; WATANABE, G.; IMAMURA, M. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, v.39, p. 2239-2246, 2003.

INCA, INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Tipos de câncer. Rio de Janeiro. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/figado>. Acesso em: 16/01/2015.

JALGAONWALA, R. E.; MOHITE, B. V.; MAHAJAN, R. T. A review: Natural products from plant associated endophytic fungi. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 1, n. 2, p. 21-32, 2001.

JEONG, T.J.; MOON, J. H.; PARK, K.H.; SHIN, S.CH. Isolation and characterization of a new compound from *Prunus mume* fruit that inhibits cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2123–2128, 2006.

JOHNSON, D.E. Noncaspase proteases in apoptosis. **Leukemia**, v. 14, p. 1695–1703, 2000.

KERR, J. F.R.; GOBE, G. C.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Anatomical methods in cell death. **Methods in Cell Biology**, v. 46, p. 1–27, 1995.

KIECHLER, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta; international journal of clinical chemistry**, v. 326, p. 27–45, 2003.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.; KUIJTEN, G.A.; KEEHNEN, R.M.; PALS, S.T.; VAN OERS, M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**. v. 84, p. 1415-1420, 1994.

KOROSTOFF, J.; WANG, J.F.; KIEBA, I.; MILLER, M.; SHENKER, B.J.; LALLY, E. T. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leucotoxin induces apoptosis in HL-60 cells. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4474-4483, 1998.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; KEPP, O.; ZITVOGEL, L. Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 51-72, 2013.

LEE, KUO-HSIUNG. Novel Antitumor Agents From Higher Plants. **Medicinal research review.**, v. 19, n. 6,5, p. 69–596, 1999.

LEIST M, JAATTELA M. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 589-598, 2001.

LI, L. Y.; LUO, X.; WANG, X. Endonucleases G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, v. 412, p. 95-99, 2001.

LI, N.; RUAN, F. L.; WEN, Z. S.; LI, J. H.; CHEN, R. D.; LIU, X.; XIE, D.; LI, M. Y.; WANG, C. M.; WU, J.; DAI, J. G. Diversity and in vitro antitumor activity of endophytic fungi from mangrove plants *Xylocarpus*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v. 38, n. 14, p. 2282-6, 2013.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI Z. Caspase-independent cell death? **Oncogene**, v. 23, p. 2766–2773, 2004.

MICHITAKA K, NISHIGUCHI S, AOYAGI Y, HIASA Y, TOKUMOTO Y, ONJI M. The Japan Etiology of Liver Cirrhosis Study Group. Etiology of liver cirrhosis in Japan: a nationwide survey. **Journal Gastroenterology**, v. 45, p. 86-94, 2010.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative disease. **Mutation Research**, v. 512, p. 135-153, 2002.

MOLLER, P. Genotoxicity of environmental agents assessed by the alkaline comet assay. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96 Suppl 1, p. 1-42, 2005.

MORAIS, J. F.; YOSHIMOTO, M.; RHODEN, S. A.; PAMPHILE, J. A. Bioprospecção de microrganismos produtores de compostos bioativos com atividade antitumoral. **UNINGÁ Review**, v. 17, n. 1, p. 27-34, 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as source of new drugs over the 25 years. **Journal of Natural Products Reports**, v. 17, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311 -335, 2012.

NIGG, E. A. Mitotic Kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nature reviews. Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 1, p. 21-32, 2001.

NOGUEIRA, M. E.; PASSONI, M. H.; BISO, F. I. LONGO, M. C.; CARDOSO, C. R.; SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. **Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA**, v. 20, n. 3, p. 361-366, 2006.

PARANAGAMA, P. A.; WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L. Uncovering biosynthetic potential of plant-associated fungi: effect of culture conditions on metabolite production by *Paraphaeosphaeria quadrisepata* and *Chaetomium chiversii*. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 12, p. 1939-1945, 2007.

PARKIN, D. M. Global cancer statistics in the year 2000. **The Lancet Oncology**, v. 2, n. 9, p. 533-43, 2001.

PERDIGÃO, J.; TAVARES, A. Ciclo Celular e Novas Terapias contra o Cancro (o ano do Nobel). *Boletim de Biotecnologia*, p. 7-12, 2001.

PIMENTA, J. R.; MASSABKI, P. S. Carcinoma hepatocellular: um panorama clinic. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, v. 8, p. 59-67, 2010.

PRADELLI, A. L.; BÉNÉTEAU, M.; RICCI, J-E. Mitochondrial control of caspase-dependent and independent cell death. **Celular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 1589-1597, 2010

QUETGLAS, I. M.; MOEINI, A.; PINYOL, R.; LLOVET, J. M. Integrantion of genomic information in the clinical management of HCC. **Best Pratical & Research Clinical Gastroenterology**, v. 28, p. 831-842, 2014.

RELLO, S.; STOCKERT, J. C.; MORENO, V.; GÁMEZ, A.; PACHECO, M.; JUARRANZ, A.; CAÑETE, M.; VILLANUEVA, A. Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. **Apoptosis**, v. 10, n. 1, p. 201-8, 2005.

RIVA, C.; BINELLI, A.; COGNI, D.; PROVINI, A. Evaluation of DNA damage induced by decabromodiphenyl ether (BDE-209) in hemocytes of *Dreissena polymorpha* using the comet and micronucleus assays. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 48, n. 9, p. 735-43, 2007.

RÖCKEN, C.; CARL-MCGRATH, S. Pathology and pathogenesis of hepatocellular carcinoma. **Digestive Diseases**, v. 19, n. 4, p. 269-78, 2001.

SANTOS, C. E. R. Tumores Primários de Fígado, In: CASTRO, L. S.; CORRÊA, J. H. S. Tratamento Cirúrgico do Câncer Gastrintestinal. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. p. 417-429.

SCHWARTZ, GARY K.; SHAH, M. A. Targeting the Cell Cycle: A New Approach to Cancer Therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9408-9421, 2005.

SCOLASTICI, C.; ALVES DE LIMA, R. O.; BARBISAN, L. F.; FERREIRA, A. L. A.; RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D. M. F. Antigenotoxicity and antimutagenicity of lycopene in HepG2 cell line evaluated by the comet assay and micronucleus test. **Toxicology in vitro**, v. 22, p. 510-514, 2008.

SCHMITTA, E. M. M.; JONASA, R.; DEKANTA, W.; STOPPER, H. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. **Mutation Research Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.542, p.43-48, 2003.

SHIMIZU, N.; ITOH, N.; UTIYAMA, H.; WAHL, G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. **The Journal of Cell Biology**, v. 140, n. 6, p. 1307-1320, 1998.

SHIMIZU, N.; SHIMURA, T.; TANAKA, T. Selective elimination of double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. **Mutation Research**, v. 448, p. 81-90, 2000.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; SCHUDIERO, D.; MONKS, A. McMARHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOVD, MR. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-12, 1990.

SPRINGER, J. E.; AZBILL, R. D.; CARLSON, S. L. A rapid and sensitive assay for measuring mitochondrial metabolic activity in isolated neural tissue. **Brain Research Protocols** n. 2, p. 259-263, 1998.

TAIT, S. W.; GREEN, D. R. Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6452-61, 2008.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000.

TIMBOLA, A. K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE, F. D.; M. G. PIZZOLATTI, A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 174-176, 2002.

THORBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: Enemies within. **Science**, v. 281. p. 1312-1316, 1998.

TOROUS, D.K.; DERTINGER, S.D.; HALL, N.E.; TOMETSKO, C.R. An automated method for discriminating Aneugen vs. Clastogen- induced micronuclei. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.31, p.340-344, 1998.

TORRIGLIA, A.; PERANI, P.; BROSSAS, J. Y.; ALTAIRAC, S.; ZEGGAI, S.; MARTIN, E.; TRETON, J.; COURTIS, Y.; COUNIS, M. F. a caspase independent cell clearance program. The LEI/L-DNase II pathway. **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 926, p. 192-203, 2000.

TSUBOY, M. S.; ANGELI, J. P. F.; MANTOVANI, M. S.; KNASMÜLLER, S.; UMBUZEIRO, G. A.; RIBEIRO, L. R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p.1650-1655, 2007.

VASI, S.; AUSTIN A. Potencial antioxidante de *Eugenia jambolana* Lam. Sementes. **Jornal de Ciências Biológicas**, v. 9, p. 894-898, 2009.

VOIGT, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 39-48, 2005.

WATERHOUSE D. W.; DRAGOWSKA W. H.; GELMON K. A.; MAYER L .D.; BALLY M. B. Pharmacodynamic behavior of liposomal antisense oligonucleotides targeting Her-

2/neu and vascular endothelial growth factor in an ascetic MDA435/LCC6 human breast cancer model. **Cancer Biology & Therapy**, v. 3, p. 197-204, 2004.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Globocan, 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx#>. Acesso em: 16 jan. 2015.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Cancer, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>. Acesso em: 16 jan. 2015.

XIANG, J.; CHAO, D. T.; KORSMEYER, S. J.; BAX-induced cell death may not require interleukin 1  $\beta$ -converting enzyme-like proteases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 14559–14563, 1996.

YAMASHIMA, T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. **Progress in Neurobiology**, v. 62, p. 273-295, 2000.

ZITVOGEL, L.; KEEP, O.; KROEMER, G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 8, n. 3, p. 151-60, 2011.

ZHANG, Y.; ONG, C. N.; SHEN, H. M. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Cancer Letters**, v. 211, n. 2, p.175-188, 2004.

ZHOU B-B. S.; ELLEDGE, S. The DNA damage response putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, n. 6811, p. 433-9, 2000.

# ***CAPÍTULO 2***

**Anticancer activities of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* treated in hepacellular carcinoma cell lines**

Patrícia da Silva Lopes<sup>1</sup>, Juliana Maria Sorbo<sup>1</sup>, Thaís Fernanda Moreira<sup>1</sup>, Amanda Martins Baviera<sup>1</sup>, Ana Emília Brumatti Galiardi<sup>1</sup>, Rodolfo Bortolozo Serafim<sup>2</sup>, Valéria Valente<sup>1</sup>, Vanessa Mara Chapla<sup>3</sup>, Angela Regina Araújo<sup>3</sup>, Cleverton Roberto Andrade<sup>1</sup>, Christiane Pienna Soares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Department of Clinical Analyses University of São Paulo State – UNESP- Araraquara, SP – Brazil

<sup>2</sup>University of São Paulo – USP -Ribeirão Preto Medical School- Department of Cell and Molecular Biology

<sup>3</sup>Institute of Chemistry of Araraquara, University of São Paulo State – UNESP

*Correspondence to:* Professor Christiane Pienna Soares, Department of Clinical Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo State - UNESP, Rua Expedicionários do Brasil, 1621, Zip code 14801-902 Araraquara, Sao Paulo, Brazil e-mail:soarescp@hotmail.com

LOPES et al: Anticancer activities from endophytic fungi in hepatoma cells.

**ABSTRACT**

Hepatocellular carcinoma is more frequent primary liver cancer, and third most common cause of cancer mortality. Promising sources of cancer treatment modalities involve natural products with biological activities, such as the endophytic fungi. This study aimed to investigate the anticancer potential of crude extracts produced from endophytic fungus *in vitro*. The cytotoxicity of crude extracts from *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) and *Neofusicoccum* (Ej-fv1) from fruits of *Eugenia jambolana* on Hepal1c7, HepG2 and HaCat cells was evaluated using sulphorhodamine B assay. Apoptosis was determined by Hoechst staining and Caspase 3 assay. The cell cycle were analyzed by flow cytometry and the genotoxicity and mutagenicity were realized using comet and micronucleus assays, respectively. The extract (Ej-fm1), has most selectivity against Hepal1c7, showed concentration-response cell death. The extract (Ej-fv1) was cytotoxic just in concentration bigger tested, as well as, HepG2 and HaCat. There are induction of apoptosis and necrosis in both extracts and suggested independent caspase cell death. No identified cell cycle arrest, neither mutagenicity and

genotoxicity for murine hepatoma cell. The *in vitro* outcomes suggest a potential activity of extracts from endophytic fungi in model of murine hepatoma cell line.

Key words: Hepatocellular carcinoma, cytotoxicity activity, cell lines, endophytic fungi, *Eugenia jambola*.

## Introduction

Among primary hepatic tumors, the hepatocellular carcinoma is the most frequent cancer in the liver, representing 90% of the patients and the second occurrence of cancer in the world. Hepatocellular carcinoma are diagnosed about 50.000 cases by year with more incident in countries which hepatitis B is more endemic (1-3). The risk factors to hepatocellular carcinoma are involved with chronic hepatitis occurred by type of virus B, C and D virus B, C e D, alcohol, hereditary liver diseases hepatic metabolic diseases, autoimmune hepatitis, hepatite autoimmune, obesity, hepatic steatosis non-alcoholic hepatitis, being the hepatic cirrhosis the most important cause. In fact, the hepatocellular cirrhosis and hepatocellular carcinoma are close associated in 80% of Asiatic countries as well as in 50% of europeans countries (1,4-6). Thus, new substances have been studied to produce new drugs derivated from products isolated from plants. Among pathogenic microorganism endophytic fungi has been demonstrate activity as antibiotic, antitumor immunosuppressive and reduce blood cholesterol (7). Thus endophytic fungis represent a excellent source of natural products in the produce secondary metabolic. Recent studies have shown that endophytic fungis have biological activity (8-9). Therefore, considering high mortality index of liver câncer in the world, the present study purpose a hepatocellular murine model *in vitro*, because rodent are easier to work when we compare with *in vivo* model. Murine model could do a previous selection to identify bioactive natural products (10). Thus, the aim of the present study was to investigate the potential antitumoral of endophyte fungi isolated of fruits from *Eugenia jambolana* in cell culture of hepatoma.

## Materials and methods

### *Isolation and Identification of the Endophytic Fungi*

The Endophytic fungi were isolates from healthy fruits of *Eugenia jambolana*. The fruits were first washed with water and soap and then immersed in 70% aqueous ethanol (EtOH), in 1% aqueous sodium hypochlorite solution and immersed in sterile water two times. Sterilized fruit were cut in three pieces and deposited onto a Petri dish containing PDA

(potato dextrose agar) and gentamicin sulfate (100 µg/ml). Single fungal strains were obtained following serial transfers on PDA plates and deposited at the NuBBE fungi collection (stored in sterile water at 25°C). The endophytic fungi isolated from fruits were each inoculated into two Erlenmeyer flasks (500 ml), each containing Czapek medium (200 ml). After cooling, the medium was inoculated with the endophytes and incubated at 25 °C during 28 days. The flask-accumulated mycelial biomass was separated from the aqueous medium by filtration, and the filtrate was subjected to liquid-liquid partition with ethyl acetate (EtOAc; 3×300 ml). The EtOAc fraction was evaporated in vacuum, resulting in the crude EtOAc extract. The fungi were identified by molecular taxonomy by GENOTYPING BIOTECNOLOGIA - PROSPECTA in Botucatu-SP. They were identified as *Pseudofusicoccum stromaticum* and *Neofusicoccum* sp.

#### *Cell culture*

The cell lines used in this study were Hepa 1c1c17 (Murine hepatoma; ATCC n.CRL-2026), were kindly provided by Prof. John M. Pezzuto do College of Pharmacy, University of Hawai'i at Hilo, these cell line were cultivated in  $\alpha$ MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). We also used the Hep G2 (Human hepatocarcinoma cell line; ATCC n. HB-8065) and HaCaT (spontaneously immortalized human keratinocytes) that were grow in a 1:1 mixture of Dulbecco's Modifield Eagle's Medium DMEM, Sigma Co., St. Louis, USA) and Ham's Nutrient Mixture F10 (Sigma Co., St. Louis, USA). All cell lines supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Cutlab, Campinas, Brazil), 1X antibiotic/antimycotic solution (100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 0.25 µg/ml amphotericin B Sigma Co., St. Louis, USA) and 0.1mg/ml kanamycin (Sigma Co., St. Louis, USA), whit is referred to as complete médium hereafter. Cells were kept in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, 95% relative humidity and a constant temperature of 37 °C.

#### *Cytotoxicity*

Cells were seeded at  $8 \times 10^4$  cells/mL in 96-well plate. After 24 h the medium was removed, and cells were simultaneously treated with the crude extracts tested (100µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 6,3 µg/ml e 3,1 µg/ml). The cytotoxicity assay was determined and performed using the method (11). The cells were fixed with trichloroacetic acid (50%) and stained sulphorhodamine B (SRB) for 20 min. Unbound dye was removed by washing with 1% acetic acid, and protein-bound dye was extracted with 10 mM Tris base (pH10)

solution for determination of optical density in absorbance in measured at 570 nm (BioTek Powerwave X, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA).

#### *Hoechst 33342 stain assay*

The Hoechst assay was performed by following the protocol as previously describe (12). Cells were seeded in 96-well plates at  $2 \times 10^5$  cells / ml and incubated for 24 h. Concentrations used in treatment were 100 mg / ml, 50 mg / ml, 25 mg / ml, which were the concentrations that showed cell death. Curcumin (25  $\mu$ M) doxorubicin (50 mg/ml) were used as positive controls. The time of treatment used in this test was 12 hours. The plate was centrifuged at 2.500 rpm for 5 minutes at 4 °C to pellet the cells floating. Then the medium was removed and added 100  $\mu$ L of cold 1X PBS to each well and centrifuged again. In the darkness was added in to each well 100  $\mu$ L of the dye solution prepared in the following proportions HO: 0.15%, PI: 0.25%, DAF: 0.35%. The plate was incubated for 10 minutes and after were captured 12 fields per well in 20x objective by Incell Analyzer 2200/2000 (GE Healthcare Life Sciences, USA). The percentage of viable, apoptotic, and necrotic cells were represented out of a total of 500 cells counted in each independent assay. The cells were identified as viable (spherical blue nucleus stained by HO, green cytoplasm stained by DAF), apoptotic (small nucleus), green cytoplasm) or necrotic (red enlarged nucleus with spherical vesicles stained by PI). The cells too were classified as apoptotic early (blue nucleus with apoptotic bodies) or late (nucleus stained red with apoptotic bodies) as proposed previously (13-15).

#### *Caspase 3 assay*

In caspase-3 protease activity assay, measured by cleavage of model fluorescent substrate Ac-DMQD-AMC, cells were plated at a concentration of  $2 \times 10^5$  cell/ml in 96 well black bottom plate and incubated for 24 hours at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Cells were treated with crude extract of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* ripe fruit (Ej-fm1) and unripe fruit (Ej-fv1), using concentrations ranging from 25 - 100  $\mu$ g/mL, for 8 and for 12 hours. After treatment period, the medium was removed and each well received 100  $\mu$ L of lysis buffer (50 mM Tris pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.5% Triton X-100; 2 mM EDTA; 5 mM DTT). The plate was incubated on ice for 20 minutes and 100  $\mu$ L of Ac-DMQD-AMC substrate (20  $\mu$ M) was added in each well. The fluorescence was read in an excitation 360/40 nm and emission 460/40 nm, at 37°C, during 30 min. The results were expressed in concentration of AMC released by cleavage, based on the standard curve (0,016 - 4  $\mu$ M). The

protocol was followed according to the manufacturer's protocol Kit Caspase 3 Assay kit, Fluorimetric (Sigma-Aldrich S 1402).

#### *Cell cycle assay*

To cell cycle assay,  $2 \times 10^4$  cells was transferred to 12 well plates. After treatment, cells were trypsinized, fixed in 1 ml of 70% ethanol in PBS 1X with 5 mM EDTA and incubated overnight. The next day, the cells were centrifuged at 1400 RPM and incubated in 200 ul of PBS 1X with 5 mM EDTA and 0.1 ug/ul RNase A for 30 minutes at 37°C. Thereupon, 200  $\mu$ L of propidium iodide (0.1  $\mu$ g/ml) was added and cells were analyzed by flow cytometry (FACSCanto) as previously described (16).

#### *Comet assay*

The comet assay was performed using the method (17). Cells were seeded in 96-well plates at  $2 \times 10^5$  cells/ml in 24-well plates. To evaluate the genotoxic activity, were used non-cytotoxic concentrations. As a positive control, we used the peroxide hidrogênio 1mM. After trypsinization of cells, they are resuspended with a low melting point agarose and deposited in clean optical microscope slides containing a thin layer of the normal melting point agarose. After the agarose gel has solidified, the slides are placed, generally for at least 1 hr, in a lysis solution consisting of high salts and detergents. The original lysing solution consisted of (2.5 mM NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris). After was subjected to an alkaline electrophoresis (pH 13) under the conditions of 25V, 280mA for 20 minutes in an electrophoresis solution consists of 1 mM EDTA and 300 mM sodium hydroxide, pH 13.0. The migrating DNA was quantitated by staining with ethidium bromide and by measuring the intensity of fluorescence observed under fluorescence microscope, where were captured images of 50 cells per slide ,totaling 150 cells per concentration.

#### *Micronuclei assay*

The micronucleus assay was performed by following the protocol Incell Analyzer 2200/2000. The murine hepatoma cells (hepa1c1c7) were plated at the concentration  $5 \times 10^4$  cells/ml in 96 well plates. To evaluate the mutagenicity, were used non-cytotoxic concentrations. As a positive control, we used the etoposide in concentrations of 0.8  $\mu$ M and vehicle control (1% dimethylsulphoxide). After treatment for 24 hours, blocking was done with cytokinesis 10 $\mu$ l/well of cytochalasin B in a concentration of 30 $\mu$ M in a period 36 hours.

After this period the plate was washed with PBS and the cells were fixed with absolute ethanol 100  $\mu$ L per well for 30 minutes at room temperature. After fixation of the cells was added FITC diluted in PBS at a concentration of 10 $\mu$ M for 30 minutes, then the wells are washed 3 times with PBS and added Hoechst 33342 at a concentration of 5 $\mu$ M during 15 minutes in order to mark the nucleus and the cytoplasm of the cell. The images were captured by Incell Analyzer 2200/2000 (GE Healthcare Life Sciences, USA). Were captured at a minimum concentration of 1000 cells per independent assay.

#### *Statistical analysis*

Data were expressed as the mean plus standard deviation (SD) and Statistical comparisons were carried out using ANOVA with Tukey's post hoc test in Cytotoxicity/Hoechst assay and Activity of Caspase 3. The comet assay and micronucleus were done by comparing the concentrations through the test nonparametric Kruskal Wallis with Dunn's post test. Statistical comparisons to cell cycle assay were carried out using ANOVA with the significance level adjusted using the repeated t-tests with Bonferroni correction. All the statistical analyses were performed using software Microsoft Excel®, version 2010 and the statistical program GraphPad Prism® Version 5.1 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Differences were considered to be significant when  $p < 0.05$ . The acceptable coefficient of variation was less than or equal to 25%. Each protocol was performed in triplicate to ensure reproducibility.

#### Results

The crude extract from endophyte fungi *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) present cytotoxicity activity concentration-response when treated murine hepatoma cell (Hepa1c1c7). The  $CI_{50}$  was found in the concentration 58 $\mu$ g/ml, demonstrating growth inhibition of 63,4% e 38,4% to concentration (100 $\mu$ g/ml e 50  $\mu$ g/ml), respectively. On the other side to HepG2 and HaCat cells no significant cellular death was found. The crude extract of from endophyte fungi *Neofusicoccum* sp (Ej-fv1) was cytotoxicity in hepa1c1c7 cell line only in high concentration (100  $\mu$ g/ml), demonstrating cell viability cellular of 32.14% and  $CI_{50}$  of 89  $\mu$ g/ml. The same pattern occurred in HepG2 and HaCat cell line whose the higher concentration inhibits 38,4% e 43,5%, respectively. In order to elucidate the type of cellular death the cell type Hepa1c1c7, apoptosis assays was performed. In the evaluation of Hoechst/ Propidium Iodide, the extract from endophytic fungi *Pseudofusicoccum stromaticum*, didn't presented difference statistic to apoptosis when compared with vehicle control (DMSO 1%) in lower concentrations (25  $\mu$ g/ml and 50  $\mu$ g/ml). Although no statistic

significance was found to lower concentrations tested to apoptosis we could observed apoptosis in 18.6% e 44.2% respectively in the concentrations 25 µg/ml and 50 µg/ml. In higher concentration (100 µg/ml), we could observe statistic difference to late apoptosis ( $p < 0.01$ ), as well as necrosis cell death ( $p < 0.001$ ). However, the extract from *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1), we could observe significant induction significant apoptosis cell death, demonstrating early apoptosis and necrosis ( $p < 0,001$ ), too only in the higher concentration (100 µg/ml). In the other hand to crude extract from endophyte fungi (Ej-fv1) we could observe a concentration-response to apoptosis of 11.5%, 17.7% e 45.6%, respectively to the concentration 25 µg/ml, 50 µg/ml e 100 µg/ml. In this case we could observed lower percentage of cellular death by necrosis (3.3%, 5.8% e 25. 2%) to the same concentrations presented above. Moreover, the remainder was living cells. The evaluation of apoptosis induced by endophytic fungi extracts from *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) and *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1) in murine hepatoma cell (Hepa 1c1c7), using the caspase 3 assay, we couldn't verify no caspase 3 activated in all concentration tested. In the time of 12 hours of treatment, the crude extracts (Ej-fv1) demonstrated a trend induction of caspase, however no significant statistic was found. To cell cycle assay when the cells were treated with crude extracts tested in cell lines Hepa1c1c7, HepG2 and HaCat, we could observe induced a cell cycle arrest in G2/M phase and reduction of G1 phase when the cells were treated with crude extract from *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) just in HaCat cell line. So, hepatocellular carcinoma cells (murine and human) there wasn't no interference in cell cycle. Thus, HepG2 e HaCat cells were also evaluated in this test on intend of relate the cause of cellular death detected just on high on cytotoxicity assay. In the present study no genotoxic effect was observed demonstrating that no DNA damage was found. In the micronuclei assay there wasn't found no effect mutagenic was found, indicating that the crude extracts from endophytic fungi evaluated in the present search didn't cause mutagenicity.

## Discussion

Hepatocellular Carcinoma (HCC) is a public health problem, with uneven distribution around the world. Data indicate that liver cancer is the second most common cause of death from cancer (18). The incidence of HCC are related with epidemiologic factors. The major risk factors for hepatocellular carcinoma is dependent of world region. In most high-risk is a chronic liver injury caused for cirrhosis stage, almost never occurs in the healthy liver in generally occurs when there are chronic infection with the hepatitis viroses, hepatitis B and C or in response of others mechanisms that induce hepatocarcinogenesis. Most cases of the disease occur in countries with the highest incidence rates in regions where the infection with

hepatitis B virus (HBV) infection is endemic (1-3). In Brazil, although the incidence is increasing data on the HCC are still scarce, which makes the planning and adopting measures that may contribute to prevention, diagnosis and treatment of cancer (19-22). For these reasons, it is necessary to search for treatments, justified by the number of people who are already possess Hepatocellular Carcinoma. Natural products have played an important role in drug discovery for cancer by providing a large number of clinically useful agents. Studies have shown that many of these bioactive natural products, had good results in their biological activities, with cellular inhibition capacity in tumor cell lines, demonstrating significant therapeutic benefit in experimental models (7). The present study assessed anti-tumor effects of crude extracts produced by endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana*. Both fungal species were recently described, according to the database of fungal species (MycoBank). *Pseudofusicoccum stromaticum*, as *Neofusicoccum* sp were reported in 2006. Therefore there are few studies in the literature relating to fungi *Pseudofusicoccum stromaticum* and *Neofusicoccum* sp. There was cytotoxic activity concentration-response from extract produced by the endophytic fungus *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) and significant cell inhibition produced by the fungus *Neofusicoccum* sp (Ej-fv1), only in the highest concentration, with no significant cell death in other concentrations tested. These results corroborate studies Bavelone (2013), who used another method to evaluate cytotoxicity also using the cellular model hepa1c1c7 identified the same profile concentration-response death for crude extract produced by the endophytic fungus *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1), as well as significant induction cell death produced by the fungus *Neofusicoccum* sp (Ej-fv1) only in high concentration. The cell line HepG2 introduced himself sensitive because the extracts were inactive at most concentrations tested. These results probably was due to his ability to metabolise because this cell type possess a key role in metabolism of detoxification of xenobiotics. Therefore, the metabolic products may lose their cytotoxic activity when tested at lines that are metabolizing (23). For cell line HaCat, only the highest concentration of crude extract produced by the fungi *Neofusicoccum* sp Ej-fv1 showed significant cytotoxic activity. Thus it can be considered that the crude extract produced by the fungus *Neofusicoccum* sp (Ej-fv1) did not cause a selective cell death (only in neoplastic cells). These results indicate that applicability of this extract is still questionable to normal cells. Currently, the search for new chemotherapeutic drugs to develop less toxic effects is constant. Based on this, the extract produced by the endophytic fungi *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fv1) was the most active substance for murine hepatoma cells presenting cell selectivity just to carcinoma cell. This feature makes the extract produced by the endophytic fungi

*Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) shows as best chemotherapeutic candidate than *Neofusicoccum* sp and supposedly will cause fewer side effects and better therapeutic efficiency (24). Other tests already with the extract produced from endophytic fungi *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) also achieved significant results across the tumor cell lines: HCT-8 (colon - human), SF-295 (glioblastoma - human ) and OVCAR (ovarian carcinoma), but did not identify *in vitro* inhibition of cell growth by testing the crude extract produced by the fungus *Neofusicoccum* sp (Ej-fv1) (Chapla, unpublished data). In the literature still there isn't no report that features the kind of death induced by the extracts tested in this work. For these reasons, this study contributes to describe feature of these statements stressing its promising biological activities. The extract produced by the endophytic fungus *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) showed statistical significance to the presence of late apoptosis ( $p < 0.01$ ) as well as necrosis ( $p < 0.001$ ). This profile of late apoptosis significant only at highest concentration was also observed other work (25) which also evaluated a compound of the natural source, in a tumor cell line, they also found statistical difference found for presence of late apoptosis ( $p < 0.01$ ). Already the crude extract from the fungi *Neofusicoccum* sp. (Ej-Fv1), caused a significant induction of early apoptosis and necrosis ( $p < 0.001$ ). As observed in the cytotoxicity assay, only the highest concentration of extract (Ej-fv1) was able to induce significant cell death in Hepa 1c1c7 cell line. This findings suggest that the extracts induced a profile mixed of cell death, indicating a ideal cell death for a situation of neoplasia helping to recruit immune cells, characterized as immunogenic cell death, that is a form of cell death capable of stimulating an immune response against antigens, especially when they are derived from tumor cells, this type of cell death constitutes a prominent pathway for the activation of the immune system against cancer, which in turn contributing to long-term success of anticancer therapies (26-27). For the test caspase 3 activity our results suggest a possible pathway of cell death independent of caspase. Although apoptosis events such as mitochondrial membrane permeability, externalization of phosphatidylserine, proteolysis, cell shrinkage and DNA degradation are often only given by caspase activity (28), there is also evidence that apoptosis process It can also occur in the absence of caspase activity, suggesting that an alternative mechanism regulating apoptosis (29). With respect to cell cycle regulation induced by crude extracts (Ejfm1) and (Ej-fv1), there cell cycle arrest at the G2/ M phase with a reduction in G1 when we tested the extract from *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) to HaCat cell line. for carcinoma cell lines hadn't interference in the cell cycle progression, it indicates that the tumor cells could have left to correct some damage in G2 phase. And it may also suggest that the normal cell was

detected some kind of damage that may be related to the loss of time or with limited segregation of chromosomes fibers, for a stop at G2 prevents the cell secretes defective chromosomes. This checkpoint has the function to ensure a precise replication of DNA, as well as providing accurate segregation of DNA (30). The accumulation of mutations associated with the development of almost all malignant tumors and degenerative diseases also increase the chances occurring with age and with certain genetic abnormalities (31,32). When we want evaluating substances, whose mechanism of action is unknown, it is necessary to evaluate the genotoxic potential to better characterize some mechanisms. In this way it is necessary to use the comet assay to assess the genotoxic activity of crude extracts from the endophytic fungi *Pseudofusicoccum stromaticum* (Ej-fm1) and *Neofusicoccum* sp. (Ej-fv1). It is important to take into consideration that crude extracts possess a "pool" of yet unknown compounds, therefore it is of utmost importance checking if there is any substance which may cause genotoxic damage. Some studies have reported that different secondary metabolites such as flavonoids and alkaloids can may be potentially genotoxic (33). Our results did not identify DNA damage caused by treatment with the two extracts in murine hepatoma cells. In assessing mutagenicity was observed that none of the extracts exhibit mutagenic activity as there was no significant increase in the frequency of micronuclei too on hepa1c1c7 cell line. The data obtained in this study showed that suggest that the extracts don't have any ability to induce DNA damage in the Hepa 1c1c7 cell line. Evidence has also been presented to suggest that the extreme importance of the study of endophytic communities not yet investigated in order to expand possibilities for discovering new microorganisms of biotechnological interest.

#### Acknowledgements

We thank Claudia Almeida, for her technical assistance with Incell Analyzer 2000 equipment. We also thanks to Professor Iguatemy Lourenço Brunetti who allowed us with caspase experiments.

## References

1. El-Serag HB: Hepatocellular carcinoma. *N Engl J M* 365: 1118-1127, 2014.
2. Bruix J.; Sherman M: Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53: 1020–1022, 2011.
3. Parkin, DM. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* 2: 533-43, 2001.
4. Barbara L, Benzi G, Gaiani S, Fusconi F, Zironi G, Siringo S, Rigamontia A, Barbara C, Grigioni W, Mazziotti A, et al: Natural history of small untreated hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a multivari-ate analysis of prognostic factors of tumor growth rate and patient survival. *Hepatology* 16: 132-137, 1996.
5. Cacciola I.; Pollicino T.; Squadrito G.; Cerenzina G.; Orlando ME.; Raimondo G: Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J M* 341: 22-6, 1999.
6. Pimenta JR, Massabki OS: Carcinoma hepatocellular: um panorama clinic. *Rev Soc Bra Clín Méd* 8: 59-67, 2010.
7. Newman DJ, Cragg GM: Natural Products as source of new drugs over the 25 years. *Nat. Prod. Rep.* 17: 461-477, 2007.
8. Chapla VM, Zeraik ML, Ximenes VF, Zanardi LM, Lopes MN, Cavalheiro AJ, Silva DHS, Young MCM, Fonseca LM, Bolzani VS, Araújo AR: Bioactive Secondary Metabolites from *Phomopsis* sp., na Endophytic Fungus from *Senna spectabilis*. *Molecules* 19: 6597-6608, 2014.
9. Li N, Ruan FL, Wen ZS, Li JH, Chen RD, Liu X, Xie D, Li MY.; Wang CM, WU J, DAI JG. Diversity and in vitro antitumor activity of endophytic fungi from mangrove plants *Xylocarpus*. *Zhongguo Zhong Zazhi* 38: 2282-6, 2013.
10. El-Sayed, WM, Aboul-Fadl T, Roberts JC, Lamb JG, Franklin MR: Murine Hepatoma (Hepalclc7) cells: a responsive in vitro system for chemoprotective enzyme induction by organoselenium compounds. *Toxicol In Vitro* 21: 157-164, 2007.

11. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Schudiero, D.; Monks, A. McMarhon J.; Vistica, D.; Warren JT, Bokesch H.; Kenney S, Bovd MR: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 82: 1107-12, 1990.
12. Wang S, Wang Lu, Zhi S, Zhong Z, Chen M, Wang Y: Evodiamine Synergizes with Doxorubicin in the Treatment of Chemoresistant Human Breast Cancer without Inhibiting P-Glycoprotein. *PLoS One* 9: e97512, 2014.
13. Elstein KH, Zucker RM: Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. *Exp Cell Res.* 211: 322–31, 1994.
14. Lopes FCM, Rocha A, Pirraco A, Regasini LO, Silva DHS, Bolzani VS, Azevedo I, Carlos IZ, Soares R: Anti-angiogenic effects of pterogynidine alkaloid isolated from *Alchornea glandulosa*. *BMC Complement Alter Med.* 9: 15-26, 2009.
15. Rello S.; Stockert JC.; Moreno V, Gámez A, Pacheco M, Juarranz A, Cañete M, Villanueva A: Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* 10: 201-8, 2005.
16. Valente V, Bortolozo RS, Oliveira LC, Adornil FS, Torrieri R, Tirapelli DPC, Espreafico EM, Oba-Shinjo SM, Marie SKN, Paçó-Larson ML, Carlotti CH Jr: Modulation of HJURP (Holiday Junction- Recognizing Protein) Levels Is Correlated with Glioblastoma Cells Survival. *PLoS One* 8: e62200, 2013.
17. Singh, NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider, EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell. *Exp Cell Res.* 175: 184-191, 1988.
18. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M: Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *The Lancet Oncology* 13: 607-615, 2012.
19. Quetglas IM, Moeini, A, Pinyol R, Llovet JM: Integrantion of genomic information in the clinical management of HCC. *Best pratice Res Clin Gastroenterol* 28: 1-842, 2014.
20. Ferenci P, Fried M, Labrecque D, Bruix J, Sherman, M, Omata M, Heathcote J, Piratsivuth T, Kew M, Otegbayo JA, et al: World Gastroenterology Organisation Guideline.

- Hepatocellular carcinoma (HCC): a global perspective. *J Gastrointest Liver Dis.* 19: 311-317, 2010.
21. Gomes, MA, Priolli, DG, Tralhão JG, Botelho MF: Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. *Rev Assoc Med Bras.* 59: 514-524, 2013.
  22. Michitaka K, Nishiguchi S, Aoyagi Y, Hiasa Y, Tokumoto Y, Onji M: Etiology of liver cirrhosis in Japan: a nationwide survey. *J Gastroenterol* 45: 86-94, 2010.
  - 23 Tsuboy MS, Angeli, JPF, Mantovani, MS, Knasmüller, S.; Umbuzeiro GA, Ribeiro LR: Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. *Toxicol In Vitro* 21: 1650-1655, 2007.
  24. Demain AL, Vaishnav P: Natural products for cancer chemotherapy. *Microb Biotechnol.* 4: 687-699, 2011.
  25. Duarte RA, Mello RM, Araki C, Bolzani VS, Silva DHS, Regasini LO, Silva TG A, Morais CCM, Ximenes VC, Soares CP: Alkaloides extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. *Tumor Biol* 31: 513-522, 2010.
  26. Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O, Zitvogel L: Immunogenic Cell Death in Cancer Therapy. *Annu Rev Immunol.* 31: 51-72, 2013.
  27. Green DR, Ferguson T, Zitvogel L, Kroemer G: Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat Rev Immunol.* 9: 353-363, 2009.
  28. Tait, SW, Green, DR: Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut. *Oncogene* 27: 6452-61, 2008.
  29. Leist M, Jaattela M: Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 589-598, 2001.
  30. Perdigão J, Tavares A: Ciclo Celular e Novas Terapias contra o Cancro (o ano do Nobel). *Boletim de Biotecnologia:* 7-12, 2001.
  31. Cuzzocrea S, Riley PD, Caputi PA, Salvemini D: Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, in Xammation, and ischemia/reperfusion injury. *Pharmacol Rev* 53: 135–159, 2001.

32. Migliore L, Coppedè F: Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative disease. *Mutat Res.* 512: 135-153, 2002.
33. Schmitta EMM, Jonasa R, Dekanta W, Stopper H: Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. *Mut Res Genetic Toxicol Environ Mutagen.* 542: 43-48, 2003.