UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÓLEO DA SEMENTE DE *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze EM RELAÇÃO À CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULA DE EUCARIOTOS

CAMILA LEHNHARDT PIRES CUNHA

BOTUCATU – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO ÓLEO DA SEMENTE DE *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntz EM RELAÇÃO À CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA EM CÉLULA DE EUCARIOTOS

CAMILA LEHNHARDT PIRES CUNHA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração Biomoléculas: Estrutura e Função, Atividade Biológica de Produtos Naturais.

Prof. Dr. Edson Luis Maistro

BOTUCATU – SP

2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Cunha, Camila Lehnhardt Pires.
Avaliação da atividade do óleo da semente de Pentaclethra macroloba (Willd.) Kuntz em relação à citotoxicidade, genotoxicidade e expressão gênica em células de eucarioto / Camila Lehnhardt Pires Cunha. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Edson Luis Maistro
Capes: 20100000

1. Expressão gênica. 2. Óleos vegetais - Toxicologia. 3. Genotoxicidade. 4. Citotoxicidade.

Palavras-chave: Citotoxicidade; GPX1; Genotoxicidade; Óleo de Pracaxi; mTOR.

DEDICATÓRIA

Dedico, primeiramente a Deus sem o qual não teria conseguido ir tão longe.

Ao meu marido, Thiago, por ser um canal de encorajamento e fortalecimento em minha vida.

Aos meus familiares sempre presentes e participativos.

Aos meus pais por terem me trazido a vida.

AGRADECIMENTOS

À UNESP, ao corpo docente e aos funcionários desta instituição que me auxiliaram ao longo da trajetória da Pós-Graduação.

Aos órgãos de fomento a pesquisa, CAPES, CNPq e FAPESP pela concessão dos recursos necessários para o desenvolvimento deste estudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edson Luis Maistro pela oportunidade de concluir mais uma etapa em minha carreira e aperfeiçoamento profissional.

Aos meus colegas de laboratório por terem me instruído nas etapas iniciais, em especial à Thais Queiroz pelo auxílio no desenvolvimento das técnicas.

Ao Prof. Dr. Mário Sergio Mantovani, da Universidade Estadual de Londrina, por me receber em seu laboratório e concluir a análise de expressão gênica.

À Thalita Zanetti que acompanhou a elaboração da parte de expressão gênica, a análise dos dados e desenvolvimento da discussão.

Agradeço aos meus colegas de profissão, direção e coordenação do Colégio Compacto pela compreensão e auxílio nos momentos que precisei meu ausentar.

Meus alunos que sempre me encorajaram e cujo entusiasmo me animaram a continuar estudando.

I am convinced that neither death, nor life, nor angels, nor rulers, nor things present, nor things to come, nor powers, nor height, nor depth, nor anything else in all creation, will be able to separate us from the love of God (Rom.8: 38-39).

Cunha CLP. Avaliação da atividade do óleo da semente de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze em relação à citotoxicidade, genotoxicidade e expressão gênica em células de eucariotos [tese]. Botucatu: Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista; 2019.

RESUMO

Das sementes de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze, popularmente conhecida como Pracaxi, é possível a extração de um óleo que vem sendo utilizado no Brasil e em outros países para fins terapêuticos e cosméticos. Este vegetal é endêmico da região amazônica e frequentemente utilizado pela população ribeirinha como agente cicatrizante tópico, aplicado principalmente em parturientes e em picadas de serpentes, devido à sua ação antiofídica. Apesar do uso popular desse óleo, na literatura encontram-se poucos estudos avaliando seu potencial citotóxico e genotóxico. Frente a esta lacuna científica, o objetivo deste estudo foi investigar os efeitos deste óleo em células humanas HepG2/C3A *in vitro*, sob os aspectos de citotoxicidade, genotoxicidade, influência sobre o ciclo celular, apoptose e expressão de genes do metabolismo de xenobióticos e outras vias de sinalização celulares. Os testes do cometa e do micronúcleo foram utilizados na avaliação da genotoxicidade e mutagênese, citometria de fluxo na avaliação dos efeitos sobre o ciclo celular e apoptose, bem como a avaliação da expressão de alguns genes envolvidos nesses processos. Os resultados obtidos revelaram que o óleo não reduz a viabilidade celular nas concentrações de 31, 125 e 500 µg/mL. Nos ensaios do cometa e do micronúcleo, o óleo não apresentou efeitos genotóxico nas concentrações testadas. Além disso, a citometria de fluxo revelou que o óleo não induz apoptose nas células. A análise da expressão gênica revelou que, de todos os genes testados, os que sofreram estimulação foram os responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos (CYPs), proliferação celular (mTOR) e estresse oxidativo (GPX1). Pelos resultados apresentados, sugere-se que o óleo se ligue ao receptor de membrana RTK, ativando a cascata PI3/AKT/mTOR de crescimento e proliferação celular, permitindo a entrada do óleo. Após sua entrada, as CYP1A1, CYP3A4 e CYP 1A2 são ativadas para metabolizarem o óleo, cujos produtos podem ter gerado ROS e desencadeado a expressão de GPX1.

Palavras – chave: Óleo de Pracaxi, genotoxicidade, citotoxicidade, produtos naturais, expressão gênica de CYP, mTOR, GPX1.

Cunha CLP. Evaluation of *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze seed oil activity in relation to cytotoxicity, genotoxicity and gene expression in eukaryotic cells. [thesis]. São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Botucatu, 2019.

ABSTRACT

From the *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze seeds, popularly known as Pracaxi, it is possible to extract an oil that is being used in Brazil and in other countries for therapeutic and cosmetic purposes. This plant is endemic to the Amazon region and is frequently used by the riverine population as a topical healing agent, applied mainly to parturients and snake bites due to its antiofidic action. Despite the popular use of this oil, there are few studies in the literature evaluating its cytotoxic and genotoxic potential. The objective of this study was to investigate the effects of this oil on human HepG2 / C3A cells in vitro, under the aspects of cytotoxicity, genotoxicity, influence on the cell cycle, apoptosis and expression of xenobiotic and other metabolism genes cellular signaling pathways. The comet and micronucleus tests were used in the evaluation of genotoxicity and mutagenesis, flow cytometry in the evaluation of effects on the cell cycle and apoptosis, as well as the evaluation of the expression of some genes involved in these processes. The results showed that the oil did not reduce cell viability at concentrations of 31, 125 and 500 μg / mL. In the comet and micronucleus tests, the oil had no genotoxic effects at the concentrations tested. In addition, flow cytometry revealed that the oil does not induce apoptosis in cells. Analysis of gene expression revealed that of all genes tested, those that underwent stimulation were responsible for the metabolism of xenobiotics (CYPs), cell proliferation (mTOR) and oxidative stress (GPX1). From the results presented, it is suggested that the oil binds to the RTK membrane receptor, activating the PI3 / AKT / mTOR cascade of cell growth and proliferation, allowing the oil to enter. Upon entry, CYP1A1, CYP3A4 and CYP 1A2 are activated to metabolize the oil, whose products may have generated ROS and triggered the expression of GPX1

Key words: Pracaxi oil, genotoxicity, cytotoxicity, natural products, gene expression of CYP, mTOR, GPX1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Semente de *Penthacletra macroloba,* foto emitida em Comunicado Técnico 269 pela EMBRAPA (Cruz & Barros, 2015). Cada semente possui de 4 a 8 cm e cada vagem contém aproximadamente 5 sementes.....23

Figura 2 – Foto tirada pela autora do campo visual com invertoscópio no aumento de 10x. Imagem mostra a confluência de 80 a 100% da linhagem celular de HepG2/C3A utilizadas nos experimentos deste estudo.....27

Figura 3 - Transformação de Tetrazolium MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazolina) com coloração amarela para sais de Formazan com pigmentação violeta, evidenciando a metabolização do sal pelas células (BOPP; LETTIERI, 2008).....34

Figura 4 - Classificação dos níveis crescentes de danos no DNA observados no ensaio cometa utilizados como parâmetro na contagem de dano celular para HepG2/C3A onde o número 0 (zero) corresponde a nenhum dano detectado e 4 (quatro) onde há maior nível de dano (MELO, 2017).....37

Figura 5 - Alterações que podem ser observadas em células cultivadas no teste de MN com bloqueio de citocinese, após exposição a agentes citotóxicos/mutagênicos: MN – micronúcleo; PNP – ponte nucleoplasmática; BN – broto nuclear (FENECH, 2000).....40

Figura 6 – Curva A e B indicam, respectivamente, o resultado obtido por Espectometria de Massas (LC-MC) para o Ácido Oleanólico e a Hederagenina utilizadas como padrão. Curva C e D indicam o resultado obtido por Espectometria de Massas (LC-MC) do óleo de Pracaxi para m/z 455 e 471, Ácido Oleanólico e a Hederagenina, respectivamente.....51

Figura 7 – Porcentagem de células viáveis obtida pelo ensio de MTT no tempo de 24 horas de exposição ao óleo de Pracaxi. Para o controle negativo (C-) considera-se 100% de células viáveis e foi utilizado DMSO. Triton 1% é considerado controle positivo (C+). (*)Valores estatisticamente significativos quando comparados com o controle pelo teste de ANOVA e Dunnet, onde $p \leq 0,05$.....56

Figura 8 – Porcentagem de células viáveis obtida pelo ensio de MTT no tempo de 48 horas de exposição ao óleo de Pracaxi. Para o controle negativo (C-) considera-se 100% de células viáveis e foi utilizado DMSO. Triton 1% é considerado controle positivo (C+). (*)Valores estatisticamente significativos quando comparados com o controle pelo teste de ANOVA e Dunnet, onde $p \leq 0,05$.....57

Figura 9 - Porcentagem de células viáveis obtida pelo ensio de MTT no tempo de 72 horas de exposição ao óleo de Pracaxi. Para o controle negativo (C-) considera-se 100% de células viáveis e foi utilizado DMSO. Triton 1% é considerado controle positivo (C+). (*)Valores estatisticamente significativos quando comparados com o controle pelo teste de ANOVA e Dunnet, onde $p \leq 0,05$.....58

Figura 10 – Mudança morfológica na linha celular HepG2C3A após exposição com OP por 24 horas. Painel A: campo celular exposto ao Controle DMSO. Painel B: campo celular exposto à concentração de 31,25 µg/mL de óleo. Painel C: exposição ao óleo na concentração 125 µg/mL. Painel D: exposição ao óleo na concentração de 500 µg/mL. I – Espaço vazio. II – Ilhas de célula. Aumento do microscópio 40x.....60

Figura 11 – Fotografia da lâmina de MN evidenciando células binucleadas (A, B), Broto Nuclear (C), Ponte Nucleoplasmática (D) e Micronúcleo (E). Aumento de 400x em microscópio óptico.....64

Figura 12 – Perfil do Ciclo Celular mostrado em porcentual de população celular em fase G1, S e G2/M obtido por citometria de fluxo para linhagem celular HepG2/C3A em diferentes concentrações de tratamento com o óleo de Pracaxi. Controle positivo utilizado foi a Camptotecina 1 µM. (*) indica os valores significativos para o teste ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle com p≤0,05.....67

Figura 13 – Apoptose. Porcentual de população celular em fase G1, S e G2/M obtido por citometria de fluxo para linhagem celular HepG2/C3A em diferentes concentrações de tratamento com o óleo de Pracaxi. Controle positivo utilizado foi a Camptotecina 1 µM. (*) indica os valores significativos para o teste ANOVA, seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle com p≤0,05.....68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ensaio de Morte Celular por Apoptose em Citometria de Fluxo.....45

Tabela 2 – Nome, tempo de retenção e m/z dos padrões utilizados como controle negativo para corrida de UHPLC-MS, bem como a área de cada pico encontrado correspondente com a concentração.....52

Tabela 3 – Migração do DNA (Média ± DP) pelo Ensaio do Cometa para avaliar a genotoxicidade do óleo de Pracaxi, com 4 horas de exposição para linhagem de célula HepG2/C3A, em diferentes concentrações.....62

Tabela 4 – Frequência de Micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) na linhagem celular HepG2/C3A, exposta ao óleo de pracaxi (em triplicata para cada amostra).....65

Tabela 5. Expressão relativa dos genes utilizados nas reações de PCR-RT, suas respectivas seqüências e funções.....69

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AhR	Aril Hidrocarboneto
AKT	*Serine/threonine-protein kinase*
AMP	Adenosina Monofosfato
ANOVA	Análise da variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AO	Ácido Oleanólico
ATP	Adenosina Trifosfato
BAX	BCL2 *Associated X, Apoptosis Regulator*
BBC3	BCL2 *Binding Component 3*
BCl-2	*Apoptosis Regulator*
BECN1	*Beclin 1*
BIRC-5	*Baculoviral IAP Repeat Containing 5*
BN	Broto Nuclear
CASP 3	Cascapase 3
CASP 8	Caspase 8
CASP 9	Caspase 9
CBMN	*Cytokinesis-block micronucleus*
CtB	Citocalasina B
CDKN1A	*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
c-MYC	Proto-Oncogene C-Myc
CO_2	Dióxido de carbono
Ct	Cycle Threshold
CYP	Citocromo P 450
CYP1A1	Citocromo P 450 Família 1 Subfamília A Membro 1
CYP1A2	Citocromo P 450 Família 1 Subfamília A Membro 2
CYP3A4	Citocromo P 450 Família 3 Subfamília A Membro 4

DEPC	Dietil pirocarbonato
Depor	Proteína com domínio DEP que interage com mTOR
DMEM	*Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	*Ethylenediamine tetraacetic acid*
eIF4E	*Eukaryotic translation initiation factor 4E*
ESI	*Eletrospray*
FAB	Bombardeamento Rápido de Átomos
FDA	*Food and Drug Administration*
FSC	*Forward Light Scatter*
GADD45A	*Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha*
GAPDH	*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*
GβL	Proteína G, subunidade β
G0	*GAP 0*
G1	*GAP 1*
G2	*GAP 2*
GPX1	Glutationa peroxidade
GTP	*Guanosine triphosphate*
HD	Hederagenina
HeLa	Linha de célula de câncer cervical
HepG2	Hepatocarcinoma
Hep2/C3A	Hepatocarcinoma humano derivado de HepG2
H2AFX	*H2A Histone Family Member X*
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
IDN	Indice de Divisão Nuclear
LMP	Agarose de Baixo Ponto de Fusão
LoVo	Células cancerígenas coloretal humana
mLST8	Proteína Letal 8 com Sec13
MMS	Metilmetano Sulfonato
MN	Micronúcleo

MNCtB	Micronúcleo com bloqueio de citocinese
mTOR	*Mechanistic Target of Rapamycin*
MTT	3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazolina
mTORC2	mTOR Complex 2
$NaHCO_3$	Bicarbonato de sódio
OP	Óleo de Pracaxi
PARP-1	*Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDK2	Proteino quinase 2-dependente de fosfoinositideo
PIP2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3 quinase
pH	Potencial hidrogeniônico
PH	*Pleckistrin*
PNP	Ponte Nucleoplasmática
PRAS40	Substrato de AKT rico em prolina de 40kDa
PUMA	*P53 Upregulated Modulator of Apoptosis*
Rheb	*Ras homolog enriched in brain*
RICTOR	*Mammalian Target of Rapamycin*
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido Ribonucleico
RPM	Rotações por minuto
ROS	Espécies Reativas do Oxigênio
RT-PCR	*Transcription Polymerase Chain Reaction*
RTK	Receptor de Tirosino-Quinase
SCGE	*Single-Cell Gel Electrophoresis*
Ser 473	Serina na posição 473 na estrutura primária da proteína
SSC	*Side Light Scatter*
S	Fase de Síntese do DNA no Ciclo celular
S6K1	*p70 ribosomal S6 kinase 1*
Thr308	Triptofano na posição 308 da estrutura primária da proteína

Tr	Tempo de Retenção
TSC	*Tuberous Sclerosis Complex*
UHPLC-MS	*Ultra Performance Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometer*
7-AAD	*7-aminoactinomycin D*
4EBP1	*Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
µL	microlitro
mL	mililitro
µm	micrômetro
g/mL	grama por mililitro
µg/mL	micrograma por mililitro
mg/mL	miligrama por mililitro
°C	graus Celsius
≥	maior ou igual
v/v	volume por volume
nm	nanômetro
µM	micromolar
V	volts
M	molar
cm2	centímetro quadrado
<	menor
±	mais ou menos
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/g	miligrama por grama
g/kg	grama por quilograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....19
1.1. O USO DOS PRODUTOS NATURAIS.....20
1.2. O ÓLEO DE PRACAXI.....22
1.3. LINHAGEM E CULTIVO CELULAR.....25
2. OBJETIVOS.....29
2.1. OBJETIVOS GERAIS.....30
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....30
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....31
3.1. COLETA E EXTRAÇÃO.....32
3.2. DILUIÇÃO DO ÓLEO.....32
3.3. CULTIVO CELULAR.....33
3.4. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR – MTT.....34
3.5. TESTE DO COMETA – GENOTOXICIDADE 36
3.6. TESTE DO MICRONÚCLEO – MUTAGÊNESE 39
3.7. CITOMETRIA DE FLUXO.....42
3.7.1. Análise do Ciclo Celular.....43
3.7.2. Morte Celular por Apoptose.....44
3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....46
3.9. EXPRESSÃO GÊNICA.....46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....49
4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO.....50
4.2. VIABILIDADE CELULAR.....55
4.3. DANO NO DNA 61
4.3.1. Teste do Cometa.....61
4.3.2. Teste do Micronúcleo.....63
4.4. CITOMETRIA DE FLUXO.....66
4.4.1. Ciclo Celular.....66
4.4.2. Apoptose 68
4.5. EXPRESSÃO GÊNICA.....69

5. CONCLUSÃO.....74
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....76

1. INTRODUÇÃO

1.INTRODUÇÃO

1.1. O USO DOS PRODUTOS NATURAIS

O ser humano tem buscado recursos no ambiente, muito tempo antes da Medicina Moderna e da Ciência serem resposta às suas necessidades, desta forma, a cura para algumas enfermidades encontrava-se em chás, óleos, extratos e infusões. Estudos tem mostrado que mais de 80% da população de países em desenvolvimento dependem dos recursos disponíveis no ambiente no que diz respeito a atenção primária à saúde (HOSTETTMANN; MARSTON, 2002). Além disso, mais de 25% dos medicamentos prescritos mundialmente derivam direta ou indiretamente dos vegetais existentes nas circunvizinhanças. O conhecimento popular dos recursos ambientais e o uso tradicional da fauna e flora em torno das comunidades tradicionais têm chamado a atenção das indústrias farmacêuticas, cientistas, entre outras organizações para o desenvolvimento de fármacos (NEWMAN et al., 2000, 2003; BUTLER, 2004). Dessa forma, observa-se que com os avanços da Biologia Molecular, Bioquímica e Genética se volta mais uma vez para o que o ambiente têm disponível.

Com relação a flora nacional brasileira, as plantas medicinais são amplamente utilizadas tanto nas áreas rurais como urbanas (RATES, 2001). Em muitas regiões do Brasil, tanto a população menos favorecida de recursos econômicos que se encontra na zona rural ou pequenas cidades, até a das grandes cidades, faz utilização das plantas medicinais que são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. Por definição, plantas medicinais podem apresentar uma ou mais substâncias químicas com ação medicamentosa capazes de interagir com o organismo humano e de outros animais, restabelecendo sua saúde e equilíbrio. Entretanto, mesmo quando houver a comprovação científica dos seus benefícios, os vegetais considerados medicinais ou que apresentam propriedades biológicas com algum efeito significativo no indivíduo, devem ser utilizados de maneira cautelosa pela população uma vez que podem surgir efeitos adversos. Tais efeitos são decorrentes da toxicidade intrínseca ao composto químico; adulteração na formulação, substituição, contaminação ou mesmo erros cometidos no momento da identificação do material biológico, bem como a falta de fiscalização e

identificação desse material biológico vegetal comercializado (RATES, 2001; ZHOU et al., 2004).

Alguns autores afirmam existir uma baixa incidência de relatos de efeitos adversos sobre o uso de plantas medicinais ou subprodutos de vegetais porque há pouca divulgação do produto, confusão na descrição dos sintomas, bem como a população em geral considerar a natureza benigna dos vegetais utilizados para determinados tratamentos (FUGH–BERMAM, 2000). A avaliação da genotoxicidade e citotoxicicidade dos agentes terapêuticos, naturais ou sintéticos, é recomendada por órgãos reguladores nacionais e internacionais, tais como a ANVISA. A agência norte-americana *Food and Drug Administration*, FDA, sugere uma bateria de testes *in vitro* e *in vivo* para a compreensão do potencial genotóxico dos compostos bioativos. Os testes de genotoxicidade são, portanto, de particular importância, pois são capazes de detectarem compostos que induzem danos genéticos diretamente ou indiretamente por diversos mecanismos.

O Artigo 16 da Lei nº 6.360 afirma que qualquer fármaco ou insumo farmacêutico de origem natural deve constar a análise e comprovação cientifica, assegurando seu uso e eficácia, além de possuir identificação, atividade deste produto, sua qualidade e pureza. Inúmeras plantas da biodiversidade brasileira já foram catalogadas e estudadas, entretanto, nos vastos Biomas nacionais existem espécies com extenso potencial para estudo, extração e comercialização de produtos que devem ser explorados. Com relação ao potencial biológico brasileiro, outros países tem conseguido usufruir dos recursos que ainda são desconhecidos para a os pesquisadores nacionais. Desta forma, é de crucial importância desvendar o potencial florístico nacional com perspectivas farmacológicas, buscando impulsionar de forma mais significativa o desenvolvimento tecnológico e econômico do país.

Os Artigos 20 e 21 da Lei nº 6.360 defendem o estudo das plantas e sua aplicação, para tal, é necessário ter sua composição conhecida, sua aplicação vantajosa e apresentar melhoramento na forma ou fórmula vigente no ponto de vista terapêutico. Ou seja, mesmo que tradicionalmente alguma planta seja utilizada para o tratamento de alguma moléstia e/ou enfermidade, se fazem necessários estudos mais profundos das substâncias e seu modo de ação em nível molecular, celular e tecidual.

O decreto número 2.960 da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos considerou que as ervas medicinais são estratégicas no reforço do emprego na agricultura familiar e geração de renda, no uso sustentável da biodiversidade brasileira, no avanço tecnológico e na melhoria dos cuidados à saúde para a população (BRASIL, 1972). Para o sucesso dessa inclusão, é essencial que os profissionais de saúde estejam cientes das atividades farmacológicas e toxicidade das plantas medicinais dos biomas brasileiros, bem como o uso de acordo com os costumes, tradições e status sócio-econômico da população (ARNOUS et al., 2005).

1.2. ÓLEO DE PRACAXI

Pentaclethra macroloba (Willd.) Kuntze é um vegetal da familia Mimosaceae, amplamente distribuída nas regiões equatoriais da Amazônia, Guianas e América Central, sendo uma leguminosa nodoza, de médio porte, atingindo de 8 a 14 metros (HARTSHORN, 1972). Seu nome popular é Pracaxi e é comumente encontrada em áreas inundáveis, podendo viver também em zonas de terra firme e, por tratar-se de uma leguminosa fixadora de nitrogênio, constitui uma espécie pioneira com grande potencial para regeneração florestal e recuperação de áreas degradadas (VIANA et al., 2004). Possui um fruto em forma de vagem com 20 a 25 cm de comprimento, encurvado e contém de 4 a 8 sementes como mostrado na Figura 1.



Figura 1 – Semente de *Penthacletra macroloba,* foto emitida em Comunicado Técnico 269 pela EMBRAPA (CRUZ; BARROS, 2015). Cada semente possui de 4 a 8 cm e cada vagem contem aproximadamente 5 sementes.

O uso tradicional do Pracaxi abrange a cicatrização de feridas e cortes, hidratação e renovação celular da pele, no tratamento da erisipela, estrias, manchas na pele, cura de úlceras (EMBRAPA, 2008) e na neutralização do veneno de serpente em picadas (SOFFREDINI et al., 2006). Esta planta tem sido comercializada e vendida sem que haja fiscalização e devida documentação de sua eficácia e segurança, tanto para a população brasileira, como para outros países que têm utilizado seus extratos e infusões na indústria cosmética (SOFFREDINI et al., 2006).

Alguns estudos têm sido feitos na tentativa de elucidação das propriedades biológicas de componentes presentes nas folhas, caules, raiz e sementes. O extrato aquoso das folhas apresentou propriedade de inibição da atividade hemorrágica induzida pelo veneno de *Bothrops atrax,* quando aplicado topicamente na picada (DA SILVA et al., 2005). Sugere-se que a interação do extrato aquoso com os íons metais divalentes contidos no veneno ou através da interação do extrato com as metaloproteases, neutralizam o efeito do veneno (DA SILVA et al., 2005). Estes mesmos autores afirmam que o extrato aquoso de *P.macroloba* foi capaz de inibir a ação nucleotídica e o dano no DNA causado pelo veneno, sugerindo uma ação protetora. Os componentes principais do extrato aquoso das folhas foram identificados como saponinas triterpenoides nomeadas como macrolobina A e

macrolibina B. segundo os autores, quando injetadas simultaneamente na picada apresentaram inibição parcial de 50% a 70% (DA SILVA et al., 2007).

A atividade larvicida de compostos isolados de extrato etanólico das sementes de Pracaxi foi testada e os autores observaram que a saponina triterpênica apresentou atividade larvicida quando a quantidade de açucares na molécula era menor (SANTIAGO et al., 2005). Outra informação importante que este trabalho fornece é a presença de maior atividade larvicida quando o grupo carboxila está presente. Taninos encontrados no extrato de casca de tronco foram avaliados com relação ao potencial antibacteriano (LEAL et al., 2011). Os autores documentaram a ação bacteriana de taninos extraídos da fase acetato de etila e mostraram que as subfrações não foram tóxicas em células eucariontes. Contudo, as elagitaninas presentes numa das subfrações apresentaram seletividade tóxica para células procarióticas. Além disso, observou-se que esses taninos apresentam efeito bactericida contra bactérias multirresistentes de importância clínica para infecções hospitalares (LEAL et al., 2011). Guimarães e seus colaboradores (2016) testaram o óleo de Pracaxi e de Copaíba em cepas de *Staphylococcus aureus*, responsável por causar infecções hospitalares, e verificaram que em baixas concentrações (0,3125 mg/ml) o óleo não apresentou efeito antibacteriano significativo, mas que possivelmente em concentrações maiores, o efeito inibidor do crescimento bacteriano do óleo poderia ser observado.

Tradicionalmente, o óleo de Pracaxi (OP) também é utilizado para o tratamento de feridas e sua cicatrização. Banov e seus colaboradores (2014) testaram a eficiência do óleo adicionado a pomadas no tratamento de cicatrizes e feridas causadas por queimaduras, traumas e lesões pós-cirúrgicas (BANOV et al., 2014). Dos pacientes testados, todos asseguraram uma significativa melhora no alívio da dor na ferida, e também no tamanho, aspecto e cor tanto da ferida quanto da cicatriz. Os autores discutem que o OP contém altas concentrações de ácidos graxos tais como Ácido Oléico, Linoleíco e Beênico que são essenciais para a formação e manutenção das membranas celulares e também aumentam a permeabilidade das camadas exteriores da pele. Esse aumento da permeabilidade das camadas exteriores da pele permitem o rápido envio dos bioprodutos farmacologicamente ativos tanto em adultos como em crianças, por isso, o uso do OP pode ser associado à outros componentes que desempenham outras funções (BANOV et al., 2014).

O OP também foi decisivo na cicatrização e fechamento completo de ulceração diabética (SIMMONS et al., 2015). Segundo os autores, o tratamento de úlcera diabética é uma complicada tarefa, pois a tendência é o desenvolvimento de outras injúrias, e, com isso, as propriedades medicinais tópicas do óleo teriam sido decisivas para o fechamento completo da ulceração em dois meses de tratamento (SIMMONS et al., 2015).

Com o objetivo de se estudar problemas dermatológicos de pigmentação, Teixeira e colaboradores (2012) testaram diferentes óleos extraídos de Açaí, Pracaxi, Castanha do Brasil, Patauá e Tucumã e encontraram que os óleos da semente de Açaí e do Pracaxi contém significativa ação inibitória da atividade da tirosinase, enzima responsável por dar a coloração da pele nos melanócitos, uma vez que, esses óleos vegetais são ricos em componentes hidrofóbicos, competindo com enzimas por sítios ativos nas células. Segundo o estudo, os óleos extraídos dessas plantas estão sendo amplamente estudados por farmacologistas, físicos, químicos e biólogos moleculares devido sua aplicação em diversas áreas, tais como: perfumaria, industria alimentícia, farmacologia, aplicação em cosméticos e assim por diante, uma vez que a alta complexidade química destes óleos pode substituir as substâncias sintéticas atuais (TEIXEIRA et al., 2012). Apesar do amplo potencial do uso do óleo de sementes e de outras partes do Pracaxi para a população mundial, até o momento, estudos dos efeitos genotóxicos e citotóxicos do mesmo não foram realizados, bem como, os mecanismos de ação do óleo, extrato e/ou seus constituintes químicos ainda não foram elucidados e são necessários para a utilização segura deste produto natural.

1.3. LINHAGEM E CULTIVO CELULAR

O cultivo celular teve início com uma metodologia para estudo do comportamento de células animais em ambiente controlado, isto é, fora do organismo vivo do animal. Os primeiros experimentos consistiam de fragmentos de tecido animal embebidos em fluidos animais para a manutenção das propriedades das células extraídas. Após os experimentos com anfíbios e aves, cultivou-se células de tecido tumoral humano na qual foi estabelecido a linhagem celular conhecida atualmente como HeLa, dando origem a linhagem de células continuas (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Apesar das dificuldades e controvérsias a respeito do uso de linhagens celulares, as vantagens dos seus estudos e uso são significativamente expressivas como modelo experimental devido ao controle do ambiente, homogeneidade da amostra, economia e por se tratar de um modelo alternativo para substituição de animais em pesquisa experimental (ALVES; GUIMARÃES, 2010). O ambiente controlado onde as células passam pelo processo de cultivo requer recipiente adequado contendo um substrato ou meio capazes de fornecer os nutrientes essenciais ao seu crescimento e multiplicação, tais como: aminoácidos, carboidratos, vitaminas, minerais; além de fatores de crescimento, hormônios e gases (O_2 e CO_2), controle do pH, da pressão osmótica e da temperatura. Também é imprescindível fornecer os nutrientes e condições fisiológicas estabelecidas *in vivo* (GIBCO, 2015).

A cultura celular pode ser dividida em três tipo: primária, secundária e transformada. Em uma cultura primária, as células são originadas de órgãos ou tecidos fragmentados por maceração mecânica e possuem tempo de vida curto, suportando até 10 subcultivos ou passagens, mas mantêm suas características originais. As células primárias que apresentam maior capacidade de proliferação, adaptação ao cultivo celular e não perderam as características do tecido de origem são as secundárias e continuam sua proliferação por até 80 a 100 passagens. As células transformadas são aquelas cujas características genéticas foram modificadas, deixam de ser semelhantes às células de origem e sua proliferação é exacerbada, ou seja, são capazes de se proliferar indefinidamente em cultura. Sua proliferação está ligada com o processo de transformação do material genético uma vez que permite mutações em genes responsáveis pelo controle de ciclo celular, os proto-oncogenes e genes supressores de tumor. Um reflexo dessa mutação é a ativação da telomerase que repõe o telômero perdido a cada divisão celular e, conseqüentemente a célula se divide indefinidamente (ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Um dos exemplos de células transformadas é o hepatocarcinoma conhecido como HepG2 amplamente utilizadas no estudo de citotoxicidade de diversos compostos (AHAMED et al., 2013; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003). Recentemente, uma linhagem celular derivada de hepatoma tem sido utilizada devido a sua maior sensibilidade e resposta a contaminantes químicos e drogas conhecida como HepG2/C3A (BAUDOIN et al., 2011). Células de fígado são utilizadas na análise de toxicidade e genotoxidade uma vez

que o fígado está envolvido em diversos processos metabólicos essenciais, principalmente na metabolização de moléculas (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003). Este órgão também está envolvido na detoxificação de drogas e outros compostos, sendo úteis em estudos de genotoxicidade e mutagenicidade, uma vez que o fígado é o principal sítio de metabolização de xenobióticos e a maioria dos compostos genotóxicos são mutágenos indiretos: precisam ser metabolizados para desempenhar efeito tóxico (VALENTIN-SEVERIN et al., 2003; MENDES, 2008).

A linhagem celular conhecida como HepG2/C3A, como mostrada na Figura 2, mantem conservada a atividade enzimática da fase I, como citocromo p450 CYP1A1, CYP1A2 CYPP2B e CYPP2E1. Além disso, a conservação também se estende para as enzimas da fase II glutationa-S-transferase, sulfotransferase, N-Acetiltransferases e glucoranosiltransferases. Seja na fase I, seja na II, tais enzimas estão relacionadas ao metabolismo de pré-carcinógenos (LAMY et al., 2004).

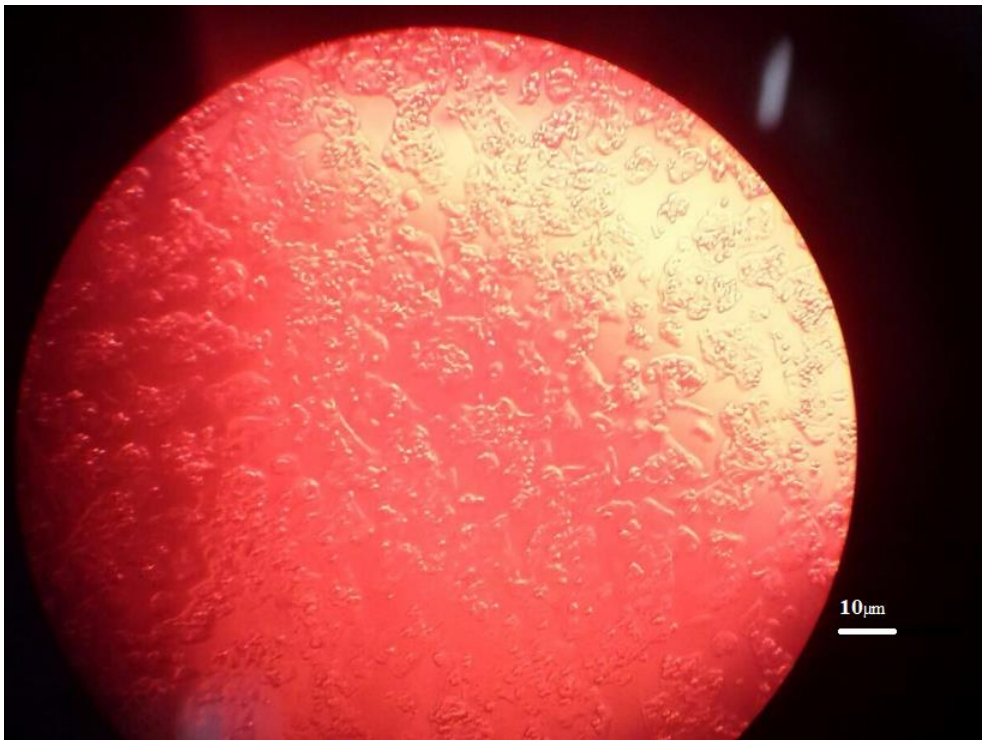


Figura 2 – Foto tirada pela autora do campo visual com invertoscópio no aumento de 10x. Imagem mostra a confluência de 80 a 100% da linhagem celular de HepG2/C3A utilizadas nos experimentos deste estudo.

O número de substâncias estranhas ao ser humano vem crescendo cada vez mais a medida que a sociedade se desenvolve e, por isso, é imprescindível identificar os agentes potencialmente prejudiciais e estabelecer normas para o seu uso (REIFFERSCHEID; HEIL, 1996). Avaliar a genotoxicidade dos compostos é importante uma vez que estudos recentes mostraram que inúmeras substâncias às quais o ser humano está constantemente exposto são capazes de induzir danos no DNA. Evidências crescentes sugerem que o dano no DNA, expresso principalmente como mutações, está envolvido na indução de muitos tipos de câncer (BARTSCH; TOMATIS, 1983; SARASIN, 2003). Além de seu papel na carcinogênese, as mutações possuem um papel crítico no processo de envelhecimento e no desenvolvimento de doenças auto-imune e crônico-degenerativas (FENECH, 2000; DE FLORA; FERGUNSON, 2005).

O DNA sofre alterações em sua seqüência, tais como, substituição, adição ou deleção das bases nitrogenadas, sendo o início do processo mutacional. As alterações no código genético podem ocorrer durante a duplicação do DNA na divisão celular (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). O processo de formação de uma mutação e suas conseqüências é chamado Mutagênese. As mutações podem ser de dois tipos: I) espontâneas, quando ocorrem naturalmente, sem participação de um agente mutagênico, surgindo em todas as células; ou II) induzidas, quando há a participação de um agente mutagênico que pode ser de caráter físico, químico ou biológico (MALACINSKI, 2011).

A exposição do homem a agentes mutagênicos tem aumentado consideravelmente desde a revolução industrial, principalmente devido ao aumento de poluentes lançados no meio ambiente e pela modificação dos hábitos alimentares, entre outros aspectos (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). A interação desses agentes aliada à suscetibilidade genética de cada indivíduo apresenta-se como um fator importante na indução de mutações no DNA. Neste quadro, conhecer os processos mutacionais e os fatores que os induzem, possibilita administrar e contribuir para a diminuição dos riscos dos efeitos indesejados decorrentes das mutações: malformações congênitas, envelhecimento celular e orgânico, câncer, bem como doenças crônico-degenerativas (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

2. OBJETIVOS

2.OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

Devido ao uso tradicional, recente comércio e exportação e à promissora aplicação terapêutica medicinal, este estudo teve como objetivo geral assegurar o uso do óleo das sementes de pracaxi através dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade em células HepG2/C3A. Pretende-se também, analisar seus possíveis efeitos sobre o ciclo celular, causar apoptose ou necrose e expressão de genes de diferentes vias de sinalização que possivelmente podem ser estimuladas pelo mesmo.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico do OP através do ensaio de citotoxicidade MTT, em células HepG2/C3A;
- Avaliar o efeito genotóxico do OP através do ensaio do cometa em células HepG2/C3A;
- Avaliar o efeito mutagênico do OP através do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese em células HepG2/C3A;
- Avaliar os possíveis efeitos do OP sobre o ciclo celular e apoptose em células HepG2/C3A;
- Analisar possíveis efeitos do OP na expressão de genes de diferentes vias de sinalização celular em células HepG2/C3A.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. COLETA E EXTRAÇÃO

As sementes da espécie de Pracaxi foram coletadas na localidade de Fazendinha no município de Macapá, estado do Amapá durante o período de seca e identificadas pelo Prof. Dr. Fábio Ferreira Perazzo. As exsicatas das plantas representando estas coletas encontram-se arquivadas no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará, sob os números EAC-2594. Da coleta, 500g de semente foram levadas ao laboratório e submetidas à prensa para a extração do óleo, sendo posteriormente descartadas uma vez que somente o óleo seria utilizado. O óleo foi filtrado a vácuo para retirada de resíduos e impurezas, obtendo-se um rendimento de 34,8%, isto é, 348g desse produto que foi avaliado por cromatografia em camada delgada. O processo não contou com a adição de solventes ou de reagentes que poderiam interferir durante os estudos *in vitro.*

No isolamento dos componentes do OP foram empregadas diferentes técnicas clássicas em conjunto tais como cromatografia gravitacional em gel de sílica, cromatografia por exclusão molecular usando Sephadex LH-20, bem como, técnica de alta precisão e reprodutibilidade como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência- CLAE. Na elucidação estrutural utilizou-se técnicas espectroscópicas de RMN 1H e 13C uni- e bidimensionais (1H, 1H-COSY, gs-HMQC, gs-HMBC, ROESY, NOESY e TOCSY) bem como, espectrometria de massa por ionização química por Eletrospray (ESI) e por Bombardeamento Rápido de Átomos (FAB), fundamentais na análise da sequência de ligação dos açúcares nas unidades osídicas (VIANA et al., 2004), todas as técnicas realizadas sob responsabilidade do Prof. Fabio.

3.2. DILUIÇÃO DO ÓLEO

Nas dependências do Laboratório de Genética Toxicológica, 500 mg do óleo foi pesado em balança analítica de precisão (Sartorius ED224S), alocado em tubo cônico (Tubo Falcon com volume de 2,5 mL) e diluído em 1 mL de DMSO (Dimetilsulfóxido – Panreac Reag.Ph.Eur., PA-ACS, M=78,13) dentro do fluxo laminar previamente limpo e esterilizado. A mistura foi submetida ao vórtex para homogeneização e aquecida em 37 ºC

em banho-maria por 5 (cinco) minutos. De volta ao fluxo laminar, a mistura foi filtrada em filtro de nitrato de celulose com poro de 0,2 µm e 47 mm (Sartorius Stedium Biotech GmbH 37070, Germany) e alocada em novo tubo cônico (Tubo Falcon 2,5 mL) estéril. Após a filtragem, 500 µL da concentração de 500 mg/mL foi aliquotada em um novo tubo e, a este tubo, mais 500 µL de DMSO foi adicionado, obtendo-se, desta forma, a concentração de 250 mg/mL. Assim procedeu-se em mais alíquotas obtendo-se no final deste processo as seguintes concentrações para análise de viabilidade celular, citotoxidade e genotoxidade: 500 mg/mL, 250 mg/mL, 125 mg/mL, 62,5 mg/mL, 31,25 mg/mL. Para a expressão gênica, a concentração escolhida foi de 500 mg/mL, como descrito a seguir. Após o preparo, todos os tubos foram alocados na temperatura de 4 ºC e estocados para estudo. Para todos os experimentos foi calculada a concentração final nos poços das garrafas e placas de cultivos, sendo que os resultados foram apresentados de acordo com a concentração final expressa em microgramas (µg).

3.3. CULTIVO CELULAR

As células de hepatocarcinoma humano HepG2/C3A foram cedidas pelo Prof. Dr. Mario Sergio Mantovani, Departamento de Biologia Geral, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina (tendo sido obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, UFRJ) e conservadas estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Genética Toxicológica, localizado no CEPEN, UNESP, Campus II de Marília, SP. Durante o desenvolvimento do estudo, as células foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco Meio Mínimo Essencial, Gibco®), suplementado com piruvato e *L*-glutamina, acrescido de 2,2 mg/mL de bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$) e 1% de piruvato de sódio (Gibco®), suplementado com 15-20% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de antibiótico/antimicótico (Gibco®). Os cultivos eram realizados em estufa umidificada, com 5% de CO_2, a 37 °C.

3.4. TESTE DE VIABILIDADE CELULAR - MTT

Nos experimentos conduzidos com compostos de interesse torna-se imprescindível a análise da viabilidade das células expostas ao composto alvo do estudo, a fim de se quantificar o prejuízo da linhagem celular estudada. Um dos ensaios mais utilizados para citotoxicidade em cultura celular é o MTT que se baseia na medida do dano induzido pelo composto através da atividade da desidrogenase mitocondrial (BOPP; LETTIERI, 2008).

A viabilidade mitocondrial e, consequentemente a viabilidade celular é quantificada pela redução do sal Tetrazolium MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazolina) com pigmentação amarela para Formazan (1-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-3,5-difenilformazan) com pigmentação violeta, podendo ser analisado em espectrofotômetro, ou seja, quanto maior o valor da absorbância maior será o número de células vivas (BOPP; LETTIERI, 2008). A atividade mitocondrial é fator chave para a redução do MTT por causa da ação da desidrogenase mitocondrial (MOSMANN, 1983). Através destes ensaios, é possível selecionar as concentrações utilizáveis ao longo do experimento que podem trazer resultados mais satisfatórios.

A Figura 3 mostra a estrutura química de ambos os sais, o MTT na sua forma antes de entrar nas células e ser metabolizado pela desidrogenase mitocondrial. Após esse processo reducional, o sal formado é o Formazam que adquire aspecto violeta dependendo do metabolismo celular.

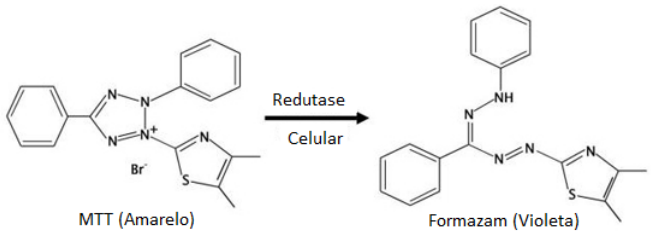


Figura 3 - Transformação de Tetrazolium MTT (3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difenil-brometo de tetrazolina) com coloração amarela para sais de Formazan com pigmentação violeta, evidenciando a metabolização do sal pelas células (BOPP; LETTIERI, 2008).

As células de HepG2/C3A foram semeadas em placas de cultura de 96 poços contendo 250 µL de meio DMEM completo por 24 h, em uma concentração de 1 x 10^5. Dado o tempo de sedimentação, o meio foi descartado e as células foram submetidas aos

tratamentos, em triplicata: 20 µL de Triton 1% como Controle+ (C+); 20 µL de DMS como Controle- (C-) e 20 µL das demais concentrações do óleo 500 µg/mL; 250 µg/mL; 125 µg/mL; 62,5 µg/mL; 31,25 µg/mL, sendo que a cada poço foi adicionado novo meio suplementado até completar o volume máximo de 250 µL. Também foi preparado uma triplicata de poços contendo meio DMEM sem soro que foi considerado como branco. Para verificação da ação do óleo, foram montados três testes para diferentes tempos de leitura absorbância, isto é, a o primeiro teste teve leitura em 24 h, o segundo teste em 48 h e o terceiro teste em 72 h.

Após o preparo com as concentrações do óleo e o controle, esperou-se 24 h para remoção/p dos tratamentos e adicionado 150 µL de MTT em cada poço. Para a ação do MTT (invitrogen™, Lot: 1178042) nas células contidas nos poços, aguardou-se 4 h para a leitura. O MTT foi diluído em PBS (5mg/mL), sendo esta a solução estoque, filtrada e esterilizada em filtro membrana 0,22 µm (Millex®, Merck). Para a solução de uso, a proporção desejada é de 1:9 (v:v) com relação a solução de estoque e meio DMEM não suplementado. Ao término das 4 horas, o MTT foi retirado dos poços, e foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich) para a solubilização dos cristais de formazan, agitando a placa durante 5 minutos. Em seguida, deu-se prosseguimento à leitura em espectrofotômetro de microplacas (Epoch-BioTek), em comprimento de onda de 550 nm. Após 48h e 72h a contar do preparo dos tratamentos, o procedimento acima explicado foi repetido. Durante o experimento conduzido para viabilidade celular, fotografias das seguintes concentrações foram tiradas: controle, 31,25 µg/mL, 125µg/mL e 500 µg/mL no tempo de 24 horas no EVOS Microscope FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com aumento de 200x.

3.5. TESTE DO COMETA - GENOTOXIDADE

O ensaio do cometa (Single-Cell Gel Electrophoresis– SCGE) permite detectar danos no DNA devido a sua notável fragmentação em relação ao núcleo principal. O uso desta técnica investiga genotoxicidade em cultivo celular, possíveis agentes mutagênicos e aspectos fundamentais de danos no DNA e seus mecanismos de reparo (COLLINS, 2004). Quanto maior o comprimento da cauda formada, maior será a fragmentação do DNA e, por isso, maior o dano genético. Trata-se de um teste relativamente barato, simples, flexível, de resultados imediatos, no qual um pequeno número de células por amostra e pequenas quantidades da substância teste são suficientes para conduzir o experimento (COLLINS et al., 1996; TICE et al., 2000; WITTE et al., 2007). Também pode ser conduzido em qualquer tecido cujas células possam ser isoladas (GICHNER; PLEWA, 1998).

As lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção, uma vez que lesões genômicas só resultam em mutações – irreversíveis – após serem processadas (AHUJA; SARAN, 2001; GONTIJO; TICE, 2003). Nestas condições, a técnica permite detectar o mais amplo espectro de dano ao DNA - quebras de fita simples e dupla, danos em sítios álcali-lábeis e ainda, sob certas condições *crosslinks* DNA-DNA, DNA-proteína, que (na ausência de outras lesões) aparecem como uma diminuição da migração do DNA quando comparado aos controles (HARTMANN et al., 2003). Em outras palavras, ao ser submetido a corrente elétrica da eletroforese, os fragmentos de DNA migram mais livremente no gel da eletroforese, formando um rastro sujeito ao núcleo central como mostrado na Figura 4.

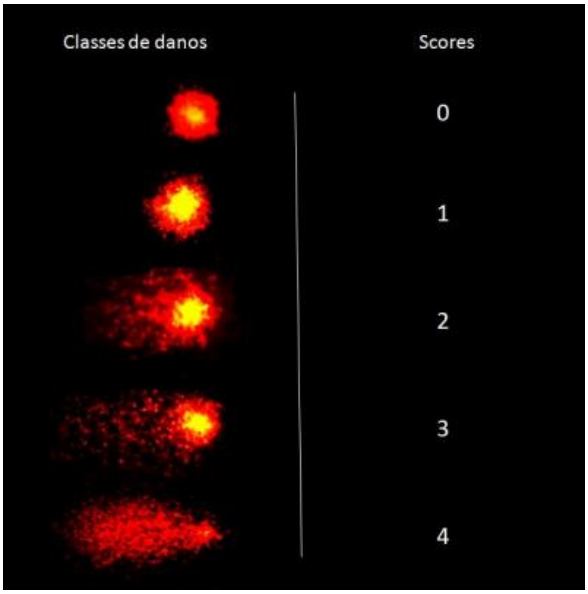


Figura 4 - Classificação dos níveis crescentes de danos no DNA observados no ensaio cometa utilizados como parâmetro na contagem de dano celular para HepG2/C3A onde o número 0 (zero) corresponde a nenhum dano detectado e 4 (quatro) onde há maior nível de dano KIRSCH.

A técnica consiste em cobrir a superfície da lâmina com células tratadas com o composto alvo de estudo, seus respectivos controles e concentrações; as células devem estar suspensas em gel agarose. Após o preparo das lâminas, estas são alocadas em uma solução de lise formada por alta concentração de sais e detergentes para a remoção das membranas nucleares e celulares e o conteúdo citoplasmático, levando a expansão do DNA no gel de agarose. A solução tampão promove o rompimento das estruturas secundárias e terciárias do núcleo celular e desenovela as cadeias de DNA (FARBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; TICE, 2000; AHUJA; SARAN, 2001).

Com a exposição e desenovelamento do DNA, a corrida eletroforética se inicia e, caso o DNA esteja rompido em fragmentos gerados pelo potencial agente mutagênico, tais fragmentos migram no sentido da corrente se afastando do núcleo principal, gerando uma figura semelhante a um cometa. O resultado é interpretado dividindo-o em duas partes: "cabeça" e "cauda". Com isso, células sem cauda possuem nenhum ou pouco dano no DNA; enquanto células com mais danos apresentam cauda (GONTIJO; TICE, 2003; VILLELA et al., 2003; MALUF; ERDTMANN, 2003).

Os experimentos para o teste do cometa foram realizados em triplicata para cada tratamento para as células de linhagem HepG2/C3A, com modificações (SINGH et al., 1988; KLAUDE et al., 1996). As lâminas foram previamente preparadas com uma fina camada de agarose ultrapura 1,5% (Invitrogen®), para a aderência celular. Após secagem overnight, foram estocadas em geladeira até o momento do uso. As células submetidas ao cultivo foram desprendidas da garrafa de cultivo com tripsina, contadas a uma concentração de 1 x 10^5 e transferidas para placa de 24 poços contendo meio DMEM completo, durante 24 horas para aderência celular. Completadas às 24 h de cultivo celular, foram feitos os tratamentos com o OP nas concentrações de 31,25 µg/mL, 125 µg/mL, e 500 µg/mL, determinadas nos testes de citotoxicidade. O controle positivo, MMS, foi empregado na concentração de 45 µM. Para o controle negativo, foram pipetados 20 µL da solução de DMSO puro e estéril.

Finalizadas as 4 h de tratamento, as células foram desprendidas dos poços da placa de cultivo com Tripsina EDTA 0,5% (Sigma-Aldrich). Para tanto, o meio de cultura contido nos poços foi descartado e as células foram lavadas com PBS, duas vezes, descartando-o, ao final. Em seguida, 200 µL de tripsina foram adicionados aos poços, e a placa foi incubada por 5 minutos em estufa. Após, com as células despregadas, a tripsina foi neutralizada com 1,5 mL de meio DMEM com soro. A suspensão celular de cada poço foi, então, transferida para tubos de centrífuga, que foram centrifugados a 1500 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante de todos os tubos foi descartado, restando aproximadamente 100 uL para ressuspensão dos pellets.

Cerca de 100 µL de suspensão celular de cada tubo foi misturado a 100 µL de agarose LMP 5% (Invitrogen®) – previamente preparada –, a 37 ºC, e mesmo volume foi depositado sobre a lâmina pré-coberta com agarose ultrapura 1,5%, sendo, em seguida, coberta com lamínula. As lâminas foram levadas para refrigeração a 4 ºC, por 20 minutos para endurecimento da agarose. Finalizado esse tempo, as lamínulas foram retiradas cuidadosamente, e acondicionadas em cuba contendo solução de lise, em refrigerador (4 °C), durante 1 hora, protegidas da luz para evitar danos adicionais ao DNA. No escuro, as lâminas foram transferidas cuidadosamente para a cuba horizontal de eletroforese e o tampão de eletroforese foi adicionado lentamente até cobri-las. Antes de iniciar a corrida eletroforética, o DNA passa pela desnaturação em tampão alcalino (pH>13) por 20

minutos. Finalizada a desnaturação, a corrida de eletroforese foi realizada durante 20 minutos, em baixa voltagem (25V) e 300 mA, e com a cuba mergulhada em recipiente com gelo (4 ºC).

Concluída a corrida de eletroforese, as lâminas foram retiradas cuidadosamente e encaminhadas para a neutralização com 5 mL de solução de Tris 0,4 M, por 5 minutos, duas vezes. As lâminas foram deixadas secando durante 15 minutos em temperatura ambiente para serem fixadas em etanol absoluto por 10 minutos. Ao término do procedimento, as lâminas foram estocadas em geladeira para análise.

Para análise foram adicionados à lâmina 100 µL de solução de brometo de etídio 200 µg/mL a 1%, e a mesma foi coberta com lamínula. O brometo de etídio é um agente intercalante, capaz de se associar ao DNA. Para visualização dos danos no DNA, as lâminas foram observadas imediatamente após coloração, em aumento de 400x, usando microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm, em sala escura. Foram analisadas 150 células de cada tratamento/repetição, para cada tipo celular, de acordo com a intensidade da cauda, classificando-as em: 0 - sem dano; 1 - dano pequeno, cauda menor que o diâmetro da cabeça; 2 - dano médio, cauda 1 ou 2 vezes maior que o diâmetro da cabeça; e 3 - dano máximo, cauda maior que 2 vezes o diâmetro da cabeça. Foi determinado o escore, isto é, o somatório da multiplicação do número de células identificadas em cada classe pelo valor da classe, sendo que esse resultado varia de 0 (sem dano) a 4 (dano severo). Não foram consideradas células apoptóticas e necróticas.

3.6. TESTE DO MICRONUCLEO – MUTAGÊNESE

O MN é uma pequena massa nuclear contendo DNA envolvido por membrana localizado no citoplasma celular, por isso, não apresenta conexão com o núcleo principal. Sua formação ocorre durante a telófase, tanto na mitose quanto na meiose, uma vez que esta fase tem como característica a reconstituição do envoltório nuclear ao redor dos cromossomos das células-filhas e, consequentemente, esta pequena fração do DNA fragmentado também é envolvida por membrana, como mostrado na Figura 5 (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003).

Durante a mitose, os MN são resultantes da quebra cromossômica (clastogênese) ou disfunção do aparelho mitótico (aneugênese), podendo ser formados por cromossomos inteiros que se perderam do núcleo principal ou fragmentos de cromossomos acêntricos originados da quebra da cromatina (FENECH, 2000; FENECH, 2006; MAISTRO, 2014). Outras possibilidades abrangem a disfunções no fuso mitótico, defeito ou falta do centrômero (o que impede a ligação com as fibras de fuso) e quaisquer mecanismos falhos que permitam a distribuição incorreta dos cromossomos após a anáfase. Somente após um ciclo de divisão celular, os danos causados pela exposição a agentes mutagênicos são expressos na forma de MN, podendo haver mais de um MN por célula.

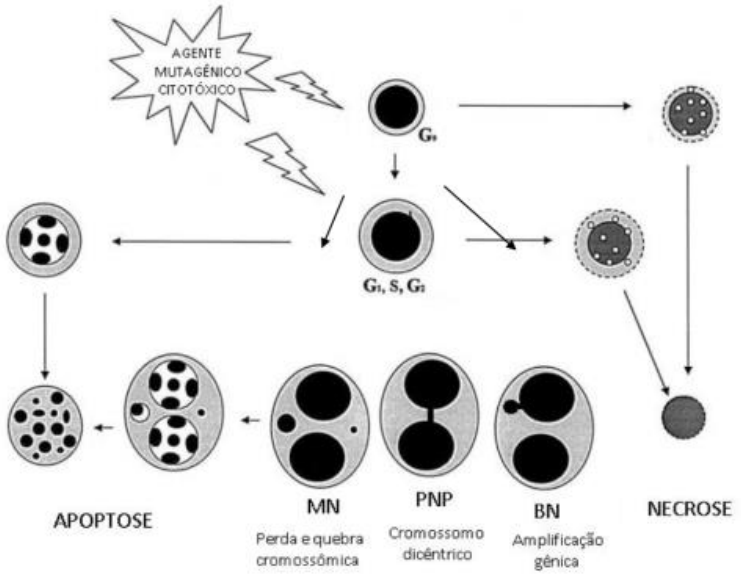


Figura 5 - Alterações que podem ser observadas em células cultivadas no teste de MN com bloqueio de citocinese, após exposição a agentes citotóxicos/mutagênicos: MN – micronúcleo; PNP – ponte nucleoplasmática; BN – broto nuclear (FENECH, 2000).

O ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNCtB), desenvolvido por Fenech e Morley (1985), tornou-se um dos testes citogenéticos padrão para a análise da freqüência de micronúcleos em células humanas (FENECH, 2006). Como as células se dividem em taxas diferentes, para possibilitar a diferenciação daquelas que passaram por um ciclo de divisão celular (ou seja, ficaram binucleadas) das que não passaram, se faz necessária a adição de uma substância conhecida como Citocalasina B (CtB). Este composto é um inibidor da polimerização da proteína actina importante para a formação do anel de microfilamentos responsável por contrair o citoplasma e dividir a célula em duas

células-filhas. Portanto, com o bloqueio da citocinese, ocorre o acúmulo de células binucleadas, facilitando essa diferenciação e análise. A partir disso, o teste do micronúcleo ficou conhecido como CBMN (*cytokinesis-block micronucleus*) – teste do micronúcleo com bloqueio da citocinese (FENECH, 2000; PALAZZO; MALUF, 2011).

Além da formação dos MN, é possível a ocorrência de PNP – pontes nucleoplasmáticas - que são ligações contínuas entre os núcleos da célula binucleada sendo o DNA (resultante na ponte) coberto por uma membrana nuclear. Podem ser marcadas juntamente com a contagem de MNs, por fornecerem uma medida adicional e complementar de um rearranjo cromossômico (FENECH, 2000; SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; PALAZZO; MALUF, 2011). Outra alteração possível de ocorrer é o broto ou "bud" nuclear. Trata-se de uma estrutura semelhante ao micronúcleo, mas que permanece ligado ao núcleo principal por uma conexão nucleoplasmática fina ou espessa. Acredita-se que essa estrutura seja DNA amplificado (eliminado do núcleo por um processo ativo), e que corresponda a uma resposta à resistência celular a drogas ou à progressão tumoral (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003; PALAZZO; MALUF, 2011).

A formação de MN em um organismo pode ocorrer devido ao efeito de agentes mutagênicos ou mesmo de forma espontânea por algum erro no metabolismo celular, podendo ser facilmente eliminado pelo próprio organismo. Já os agentes mutagênicos podem aumentar de maneira significativa a taxa de mutações, assim como a formação de MN e isso pode ser prejudicial para o organismo, tendo em vista os perigos que a perda de um cromossomo ou fragmento cromossômico pode representar, como mostrado na Figura 5 (SILVA et al., 2003).

A metodologia utilizada nesta etapa foi o Teste do Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese descrita por Fenech (2000), sendo que os experimentos foram realizados em triplicata com a linhagem celular HepG2/C3A para cada tratamento. Os frascos de cultura de 25 cm² (TPP®) foram preparados com 5 mL de meio DMEM completo e um volume correspondente a 2×10^5 de células. Os frascos foram incubados por 76 horas. Os tratamentos foram realizados 24 horas após a incubação, com as seguintes concentrações do óleo de pracaxi: 31,125 µg/mL, 125 µg/mL e 500 µg/mL . Como controle positivo foi utilizado o Benzo(a)pireno (MMS; 2 µM); como controle negativo foram utilizados 50 µL de DMSO estéril.

Após 24 horas de tratamentos, o meio de cultivo de todos os frascos foi desprezado, e todas as células foram lavadas com 5 mL de PBS, seguido de seu descarte. Um novo meio de cultura completo foi adicionado a cada frasco juntamente com a citocalasina-B (6 μg/mL), e seguimos com a incubação por mais 28 horas. Finalizadas as 76 horas, o meio de cultura de cada frasco foi colocado em respectivos tubos de centrífuga identificados, e os frascos foram lavados duas vezes com 5 mL de PBS, sendo que a primeira lavagem foi destinada aos respectivos tubos. Um mililitro de tripsina foi adicionado em cada frasco e deixado por 5 minutos a 37 ºC para desprendimento das células. Finalizado esse tempo, o meio reservado nos tubos de centrífuga foi utilizado em seus respectivos frascos para neutralização da tripsina. E, ao final, a suspensão celular foi transferida novamente para cada tubo de centrífuga.

As culturas foram centrifugadas a 1000 rpm durante 10 minutos e os pellets suspensos em solução hipotônica de citrato de sódio a 4 ˚C, durante 5 minutos. Novamente, as células foram centrifugadas por 5 minutos, e fixadas em mistura de metanol:ácido acético (3:1) gelada. Gotas de formaldeído (4%) foram adicionadas nesta fixação para preservação do citoplasma. O processo de fixação foi realizado mais duas vezes. Ao final, o pellet foi homogeneizado e as lâminas preparadas por gotejamento.

Para a análise da frequência de micronúcleos, brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas, as lâminas foram coradas com Giemsa a 10%. As análises foram realizadas em microscópio de luz com aumento de 400x, contando um total de 1000 células por tratamento/repetição, anotando a presença de micronúcleo, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares. Não foram consideradas células apoptóticas e necróticas. Como uma medida de citotoxicidade, foi calculado o Índice de Divisão Nuclear (IDN), seguindo a fórmula: IDN = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)/N], em que M1-M4 indicam o número de células de 1 a 4 núcleos avaliados em 500 células (N) – para cada tratamento/repetição.

3.7. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo foi desenvolvida como uma técnica alternativa para estudo de eventos celulares, uma vez que muitas das técnicas existentes envolviam uso de moléculas radioativas ou tóxicas, que não somente inviabilizavam a célula, como também dependiam

de mão de obra especializada e equipamentos próprios, o que muitas vezes dificultava o estudo. Com a citometria de fluxo, respostas imunes e outros processos metabólicos das células foram possíveis de serem realizados e aplicados à clínica, uma vez que a principal característica deste instrumento é a manutenção das condições vitais da célula uma vez que ela continua viável após o tratamento, permitindo investigações a respeito do comportamento biológico da população celular e análise do seu metabolismo (MACEY et al., 1994).

Em seu estudo com células mononucleares humanas, Junior e colaboradores (2006) avaliaram a atividade imunomodulatória da fitohemaglutinina dos alcaloides vimblastina e vindolina e dos extratos de *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert, *Bauhinia microstachya (*Raddi) Machr. e *Himatanthus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson (camomila, escada-de-macaco e agoniada, respectivamente), sugerindo que a citometria de fluxo pode ser usada como uma alternativa metodológica quando se deseja investigar a ação de substâncias puras ou de extratos de plantas.

No citômetro, as células são individualmente conduzidas em canal de corrente fluida que, ao interceptarem o feixe de luz, causam sua dispersão em várias direções, dependendo do tamanho, da estrutura interna, das características topográficas e de densidade de cada célula, as quais estão diretamente correlacionadas com a morfologia celular (MACEY, 1994). Desta forma, o feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionado com o tamanho celular (Forward Light Scatter - FSC), enquanto aqueles que captam o desvio ortogonal aos eixos do fluído celular e do laser (Side Light Scatter - SSC) estão relacionados com a complexidade celular interna, em particular sua granularidade (MACEY, 1994, ROBISON, 1993).

3.7.1. Análise de Ciclo Celular

O ciclo celular é um processo natural que ocorre nas células com o objetivo de manutenção da quantidade de células, renovação e/ou regeneração das células nos tecidos/órgãos. Uma série de etapas caracteriza o ciclo celular, ou seja, a célula inicia o processo de divisão celular (mitose) ativando o ciclo celular que divide-se em duas fases

distintas com caraterísticas, funções e tempos característicos. O período onde uma célula se divide em duas é chamado mitose e a fase entre uma mitose e outra é chamada interfase. A interfase é dividida em três fases: G1, S e G2. G1 é um período onde a célula aumenta seu volume e ocorre a síntese proteica; S é a fase de replicação do DNA e G2 se caracteriza por iniciar a mitose. Todo esse processo é coordenado por uma rede bioquímica complexa que sinaliza o andamento e a passagem de uma fase para outra. As vias podem responder a fatores extracelulares que através de uma cascata de sinalização fornecem estímulos para que a célula saia de G1 (muitas vezes referido como G0), e entre em S modulada por fatores intracelulares (EKHOLM et al., 2001).

Um total de 2.67×10^5 células foram semeadas em placas de 6 poços. Após 24 horas de tratamento, as células foram coletadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos e ressuspendidas em 100 µL de PBS. Após, foram adicinados 5 µL of Rnase (2 µg/mL; Thermo Fisher, cat. 12091-021) e as células foram incubadas a 37 ºC por 30 minutos. Em seqüência, para a lise do DNA completar, foi utilizado 100 µl de solução de HFS (50 µg/L propidium idado, 0.1% citrato de sodio, 0.1% Triton X-100) e o produto resultante foi incubado no gelo e protegido da luz por 30 minutos. A fluorescência do propídio iodado foi estimada com o Analisador Celular Muse® (Merck Millipore) utilizando 10.000 células/tratamento. O conteúdo do DNA foi analisado e as porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo celular foram estimadas de acordo com a intensidade da fluorescência. A análise foi realizada em três réplicas experimentais.

3.7.2. Morte Celular por Apoptose

Apoptose, também conhecida como morte celular programada, tem como característica alterações na fisiologia e metabolismo celular desde fragmentação do material genético com conseqüências marcantes no volume celular, até mesmo destruição do citoesqueleto e desfragmentação da carioteca. Ao final do processo apoptótico, a célula apresenta propriedades distintas das células normais e essa mudança faz com que ela seja fagocitada por macrófagos ou células vizinhas. Esse evento pode ser decorrente de

processos naturais nas quais a célula deve entrar em apoptose por algum erro ou dano no DNA ou por regulação na quantidade de células (ALBERTS; JOHNSON, 2008).

As vias de sinalização celular para a morte celular programada podem ser a via extrínseca ou intrínseca, mas ambas podem ser decorrentes da ação de agentes mutagênicos. A via extrínseca ou citoplasmática é desencadeada por receptores localizados na membrana plasmática capazes de desencadear a cascata das caspases; a via intrínseca tem como principal mediador as mitocôndrias, pois ao sofrerem algum tipo de estresse (hipóxia, falta de nutrientes, danos no DNA e ausência de fatores de crescimento) liberam moléculas efetoras da morte celular (GRIVICICH et al., 2007). Alguns genes como CASP-3 e BCl-2 podem se tornar ativos nesses processos e desencadear a produção de proteínas que atuarão como mediadoras e sinalizadoras nesse processo (MATIKAINEN et al., 2001; CHIPUK et al., 2010).

Um total de 2.67×10^5 células/poço foram semeadas em placa de 6 poços e após 48 horas de tratamento as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Após a ressuspensão com 100 µL de PBS, a lise celular foi realizada seguindo as recomendações do fabricante Guava Nexin Reagent (Merck Millipore, cat. 4500-0405). As células foram consideradas viáveis quando não lisadas com Annexin V-PE e 7-AAD. As células lisadas com Annexin V-PE mas não com 7-AAD foram consideradas em estágios iniciais de apoptose, mas as células não lisadas com Annexin V-PE mas com 7-AAD foram consideradas no estágio pós-apoptótico. Já as células lisadas com ambos estão no processo de necrose, como mostrado na Tabela 1. Para a análise, o analizador de célula Muse® (Merck Millipore) foi utilizado e todos os tratamentos foram conduzidos em triplicatas.

Tabela 1. Ensaio de Morte Celular por Apoptose em Citometria de Fluxo.

	Apoptose inicial	Pós-Apoptose	Necrose
Anexina V-PE	X		
7-AAD		X	
Anexina + 7-AAD			X

Células lisadas apenas com Anexina V-PE são consideradas em estágios iniciais de Apoptose, com 7-AAD consideradas em estágios pós-apoptóticos e células lisadas com ambos os reagentes se encontram em estágio de necrose.

3.8. ANÁLISE ESTATISTICA

A análise da variância (ANOVA) foi usada como teste estatístico na comparação dos resultados obtidos no controle com as diferentes concentrações testadas, seguido do teste de Dunnet ($p \leq 0.05$). utilizou-se o teste de Tukey para comparar cada grupo entre si. O programa de análise estatística utilizado foi o *GraphPad Prism 5*. Para a análise de expressão gênica foi utilizada a expressão relativa explicada na sessão "expressão gênica" abaixo.

3.9. EXPRESSÃO GÊNICA

A técnica do Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) em tempo real permite o monitoramento dos produtos assim que são gerados (VALESKET, 2005) e é comumente utilizada para detectar expressão gênica através da criação do DNA complementar transcrito a partir do RNA, com o auxílio da transcriptase reversa. Esta técnica permite também a quantificação do RNA com uma quantidade pequena de amostras, até mesmo de uma única célula (DHARMARAJ, 2015). Ensaios baseados em RT-PCR são métodos mais comuns para caracterização e confirmação de padrões de expressão gênica e para comparar níveis gênicos em diferentes populações celulares (MOCELLIN et al., 2003). Informações a respeito do mecanismo de ação de novas drogas poderão ser investigadas através dessa metodologia.

Para avaliação de expressão gênica foi utilizado a técnica RT-qPCR. Um total de 7.2×10^5 células foram semeadas em cada poço da placa de 6 poços. Após 12 horas, o meio foi removido e RNA total foi extraído utilizando o Mini Kit de RNeasy® (catalogo n°74106; Qiagen) seguindo as especificações do fornecedor. A integridade do RNA foi confirmada utilizando eletroforese em gel de agarose a 0.8%, sendo que a concentração e pureza do RNA foi verificada utilizando como base as taxas de absorbâncias A260/A280 fornecidas no espectrofotômetro (BioDrop μLite; BioDrop). A sintese do cDNA foi realizada no Termociclador T100TM Thermal Cycler (BIO-RAD). A mistura continha

1000 ng de RNA total diluido em 12.4 µL de água de tratamento DEPC, 1 µL de oligo dT (20 pm/mL, Invitrogen, catalogo n°18418012) e 2 µL de dNTPs (2.5 mM, Invitrogen, catalogo n°. 10297018). Essa mistura foi mantida a 60 °C por 15 minutos. A mistura foi alocada no gelo e a ela foi adicionado 4 µL de Tampão FSB5x (Invitrogen, catalogo nº Y02321). Após 2 minutos a temperatura ambiente, 0,1 µL de Inibidor de Ribonuclease Recombinante RNaseOUT (Invitrogen, catalogo nº 10777019) e 0,5 µL de enzima transcriptase reversa (M-MLV - Invitrogen, catálogo nº 28025-013) por amostra foi adicionada nas quais cada uma foi mantida a 37 °C/50s, 70 °C/15s e 10 °C na última etapa. A reação em tempo real foi realizada usando o LightCycler®Nano System (Roche). Foi utilizado 11 µL de volume final do Platinum™ SYBR™Green qPCR SuperMix-UDG (Invitrogen, Cat. nº11733038) com primers de oligonucleotídeos (5 pmol em cada) e cDNA padão (250 ng). Os ciclos foram feitos de acordo com as seguintes condições: 95 °C por 5 minutos e 40 ciclos de 95 °C/20 s, 60 °C/30 s, 72 °C/20 s. A análise da curva de crescimento foi feita no final de cada reação de 50 °C a 90 °C, a cada 0.5 °C/20 s. O gene de referencia utilizado foi o GAPDH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*). As reações foram utilizadas em triplicatas para o Controle e a concentração de 500 µmg do OP. Os genes utilizados para as reações foram **ciclo celular**: CDKN1A (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1ª*); c-MYC (*Proto-Oncogene C-Myc*); mTOR (*Mechanistic Target of Rapamycin*); **danos ao DNA**: GADD45A (*Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha*) e H2AFX (*H2A Histone Family Member X*); **apoptose**: BCL-2 (*Apoptosis Regulator*); BBC3 (*BCL2 Binding Component 3*); BIRC5 (*Baculoviral IAP Repeat Containing 5*), CASP3 (*Caspase 3*), CASP8 (*Caspase 8*), CASP9 (*Caspase 9*), PARP1 (*Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1*), PUMA (P*53 Upregulated Modulator of Apoptosis*); **estresse oxidativo:** GPX1 (*Glutathione Peroxidase 1*); **autofagia**: BECN1 (*Beclin 1*); **metabolismo:** CYP1A1 (*Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 1*), CYP1A2 (*Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 2*), CYP3A4 (*Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4*).

Os dados obtidos pelo PCR-RT foram analisados considerando os níveis de expressão relativa onde valores iguais ou inferiores a 0,5 indicam inibição da atividade de determinado gene e valores superiores a 2 são considerados como aumento da expressão de determinado gene. Para isso, os resultados foram expressos pelo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ com base no Ct

(Cycle Threshold) dos genes testados e do gene constitutivo (GAPDH) para controle (DMSO) e 500 ug/mL do óleo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, desta forma uma média dos valores de Ct foi obtida para todos os genes testados com 500 ug/mL do óleo e controle, bem como valores de Ct de GAPDH tratado com o óleo e controle.

Para se obter os valores do ΔCt, segue a seguinte fórmula:

$\Delta Ct\ (_{500ug}) = Ct(_{gene\ testado}) - Ct(_{GAPDH})$

$\Delta Ct\ (_{Controle}) = Ct(_{gene\ testado}) - Ct(_{GAPDH})$

$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct(_{500ug}) - \Delta Ct\ (_{Controle})$

Fator de Expressão = $2^{-\Delta\Delta Ct}$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO

O óleo extraído das sementes de P. *macroloba* mostrou um rendimento de 42% para o processo de extração descrito anteriormente na sessão Materiais e Métodos. Os resultados obtidos na caracterização do óleo foram cedidos pelo Prof. Dr. Fabio Ferreira Perazzo para a elaboração dessa tese. Em temperatura ambiente, seu aspecto é sólido e branco, sem odor característico. A Figura 6 mostra os resultados obtidos pelo espectrofotômetro de massas, na qual o primeiro (A) e o segundo gráfico (B) representam os marcadores utilizados na identificação das partes componentes do óleo, Ácido Oleanólico (AO) e Hederagenina (HD), respectivamente. Para o AO padrão, o valor obtido de m/z foi 455, com tempo de retenção (Tr) de 6,9 minutos e área da amostra com 2.901,945. Para a HD foi m/z de 471, com Tr de 5,57 minutos e área de amostra com 5.140,617.

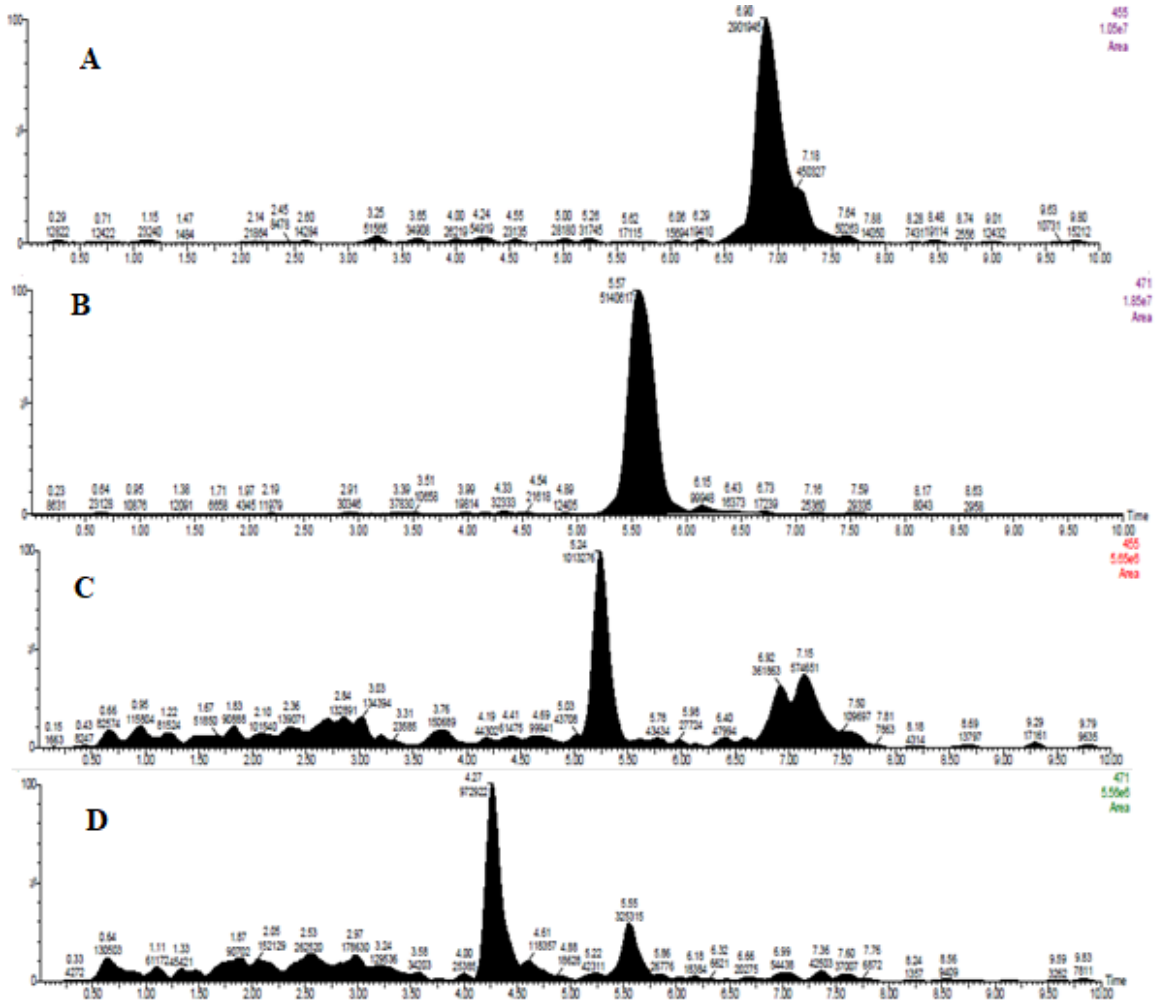


Figura 6 – Curva A e B indicam, respectivamente, o resultado obtido por Espectometria de Massas (LC-MC) para o Ácido Oleanólico e a Hederagenina utilizadas como padrão. Curva C e D indicam o resultado obtido por Espectometria de Massas (LC-MC) do óleo de Pracaxi para m/z 455 e 471, Ácido Oleanólico e a Hederagenina, respectivamente.

Na figura 6, os gráficos C e D indicam os espectros obtidos com o OP. Como o AO padrão foi detectado em m/z 455, a leitura do gráfico (C) foi realizada no mesmo espectro e, com isso, observa-se três picos principais: o primeiro com Tr de 5,24 minutos e área de amostra de 1.013,276; o segundo pico com 6,92 minutos e área de amostra 361,863; e o terceiro com 7,15 minutos e área de amostra com 574,651. O primeiro pico pode indicar a presença de ácidos graxos de cadeia longa porque seu Tr antecede as demais frações da amostra. Outros trabalhos também encontraram ácidos graxos de cadeia longa mono ou poliinsaturado em análise do óleo de Pracaxi (PEREIRA LIMA, et al 2019; PEREIRA et

al., 2017). Com relação ao segundo pico (Tr = 6,92) e ao terceiro pico (Tr = 7,15), seu tempo de retenção corresponde ao do AO padrão o que indica a presença deste na constituição do OP.

No gráfico (D) obtido na leitura m/z 471 mostra dois espectros: o primeiro apresenta Tr de 4,27 minutos com área de amostra de 972,922 enquanto que o segundo pico tem Tr de 5,55 minutos e área de amostra de 325,315. O primeiro pico parece indicar a presença de ácidos graxos de cadeia longa assim como indicado no gráfico (C) e o segundo pico provavelmente corresponda à HD pois seu tempo de retenção é similar à HD padrão. A fim de facilitar o entendimento, uma tabela foi elaborada relacionando área de amostra, concentração e porcentagem das amostras e seus respectivos padrões (Tabela 2).

Tabela 2 – Nome, tempo de retenção e m/z dos padrões utilizados como controle negativo para corrida de UHPLC-MS, bem como a área de cada pico encontrado correspondente com a concentração.

Nome	Tr (min)	Ion m/z	Área da Amostra	Concentração ng/mL	Concentração %
AO padrão	6,90	455	2.901,945		
AO amostra	6,92	455	361,863	278	0.0000278
HD padrão	5,57	471	5.140,617		
HD amostra	5.55	471	325.315	124	0.0000124

Para LC-MC a análise revelou a presença de dois triterpenos principais identificados como Ácido Oleanólico e Hederagenina, além de uma fração significativa de ácido graxo. O AO é um ácido triterpeno amplamente encontrado em vegetais distribuídos em todos os continentes, ganhando atenção por sua interessante ação terapêutica fungicida (TANG et al., 2000), além de combater o vírus HIV (MA et al., 2000) e por ter efeito diurético (ALVAREZ, et al., 2002). Estudos também mostraram que o AO tem efeito quimioprotetor no fígado atuando contra injurias causadas por compostos químicos, uma vez que inibe a expressão das isoformas do Citocromo P 450 (CYPs) responsáveis pelo metabolismo de xenobióticos (JEONG, 1999). Com isso, compostos quimioprotetores podem inibir a expressão das CYPS e, desta forma, impedir o desenvolvimento de carcinomas. Outros autores discutem que o efeito inibidor do AO ocorre porque as reações catalíticas das CYP1A2 e CYP3A4 sofrem inibição e sugerem o uso de fitoterápicos contendo esse

triterpeno junto com medicações para o tratamento anticâncer uma vez que ele pode prevenir a inflamação, a formação de um carcinoma e proteger a integridade do fígado (KIM et al., 2004).

Desde a década de 70, na Europa, extratos das cascas do caule de *Pygeum africanum* eram prescritos para o tratamento de hiperplasia prostática em estágio inicial por conter inúmeros compostos incluindo ácidos graxos e triterpenoides como o AO (BRACKMAN et al., 2010; LEVIN et al., 2000). Além disso, ele é considerado um agente anticarcinogênico promissor para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas (SALVADOR, 2010). Estudos em células nervosas têm sido conduzidos, principalmente para o tratamento e a cura do Mal de Alzheimer e Parkinson, para a elucidação da ação quimioprotetora do AO com o objetivo de proteger a integridade das células nervosas (BRAHMACHARI, 2017).

A análise do óleo também mostrou a presença da Hederagenina, um triterpeno pentaciclico derivado do AO, encontrada e extraído de folhas, frutos e raízes (LIU et al., 2014; REZGUI et al., 2016). Estudos tem sido conduzidos para a elucidação de seu potencial farmacológico e os resultados apontam para propriedades antitumorais, antibióticas e antinflamatória, bem como ação protetora de órgãos como o figado (BARTHOMEUF et al., 2002; WANG et al., 2009; LIU et al., 2014).

HD extraída de folhas de *Hedera helix L.* foi testada em células cancerígenas coloretal humana (LoVo) e mostrou ser indutora de apoptose pela via mitocondrial (LIU et al., 2014), inibindo a proliferação celular. Segundo os autores, a HD pode ter causado mudanças no núcleo celular característico de apoptose, alem de ter aumentado de maneira expressiva a geração de ROS, ter induzido a expressão de vias relacionadas à apoptose celular como BAX e por ter inibido BCL-2, BCL-xL e BIRC-5. Os resultados indicam uma disrupção na membrana mitocondrial o que contribui para a apoptose, reforçando que a HD é candidata para a terapia contra o câncer (LIU et al., 2014). Em nosso estudo, os experimentos conduzidos com PCR em Tempo Real para CASP 9, CASP 3, CASP 8 não foram significativamente expressos nas células HEP2/C3A tratadas com o óleo, apesar da presença de HD no óleo testado. Tais resultados serão apresentados e discutidos na Sessão "EXPRESSÃO GÊNICA", logo mais adiante na discussão deste trabalho. Alem disso, nós testamos PARP-1, relacionado ao reparo de dano no material genético, BIRC-5, inibidor de apoptose e BCL-2 gene pro-apoptotico, porem não se obteve expressão de nenhuma dessas

vias. No entanto, nós observamos um aumento significativo na expressão de GPX1, expresso quando há aumento de ROS no citoplasma celular, de mameira semelhante à Liu e colegas (2014).

Rodríguez-Hernández e colegas (2015) analisaram o efeito de ésteres e aminas derivadas de HD e identificaram efeitos antitumorais em seis linhagens celulares de câncer, dentre elas melanoma (518A2), câncer ovariano (A2780). Seus resultados apontaram para altos níveis de atividade citotóxica quando as linhagens celulares foram tratadas com os derivados de HD, mas o composto original não apresentou citotoxicidade. O mesmo grupo testou o potencial leishmanicida de derivados da HD isolada de frutos de *Sapindus saponaria* sobre a taxa de crescimento em *Leishmania infantum* (RODRÌGUEZ-HERNÀNDEZ et al., 2017). Entre as descobertas deste estudo, apenas três derivados foram eficientes na destruição de formas amastigotas intracelulares de *L infartum.* No entanto, todos os compostos derivados mostraram baixa toxicidade em linhagem celular de HepG2 devido à interação com sitio ativo da enzima CYP5. Como será mostrado adiante na sessão "VIABILIDADE CELULAR", o OP não se mostrou citotoxico para nenhuma das concentrações testadas, o que corrobora quando os autores apontam para baixa toxicidade de HD em linhagem celular de HepG2. Outro resultado do nosso trabalho que será mostrado adiante é a ativação da família CYP também observadas por esses autores (RODRÌGUEZ-HERNÀNDEZ et al., 2017).

Existem outros compostos relatados na literatura presentes no OP ou em partes aéreas de *P.macroloba.* Pereira Lima e colegas (2018) consideram que o OP é uma fonte natural Ácido Beenico, um ácido graxo de cadeia longa, excelente na utilização de preparações pouco calóricas, além de conter ácidos graxos mono e poliinsaturados. Pode conter também Ácido Oléico e Ácido Lignocérico (PEREIRA LIMA et al., 2018). Para *P.macroloba* já foram encontrados duas saponinas obtidas de extratos de folhas, macrolobina A e macrolobina B. Santiago e colaboradores (2005) descrevem a ação larvicida de saponinas triterpênicas obtidas de galhos e sementes para a mesma espécie. Em nosso estudo não foi encontrado macrolobina A e B, talvez porque utilizou-se apenas sementes para extração do óleo.

4.2. VIABILIDADE CELULAR

O experimento conduzido para a detecção da viabilidade celular requer a incubação do reagente com a população de células viáveis e, espera-se que as células convertam o reagente em um produto colorido, detectável por um leitor de placa e então a geração desse sinal será proporcional ao número de células viáveis, uma vez que células mortas não possuem a habilidade de converter o reagente no produto. O MTT é o reagente metabolizado pelas células viáveis que formam o formazan com a coloração violeta lida pelo espectrofotômetro (RISS et al., 2016). Em nosso estudo, a solução contendo MTT foi aplicada após 24, 48 e 72 horas nos tratamentos expostos ao OP. Os dados de leitura do espectrofotômetro foram convertidos em porcentagem de células viáveis, descontando-se o "Branco" e considerando o "Controle negativo (C-)" como 100% de viabilidade celular.

O teste de viabilidade celular conduzido por 24 horas (Figura 7) mostrou redução na quantidade de células viáveis apenas para o Triton 1% utilizado neste experimento como "Controle positivo (C+)". As células tratadas com esta substância não sobreviveram devido à conhecida ação detergente do Triton 1% que destrói a membrana plasmática celular. Em decorrência desta destruição, a geração de sinal emitido pelo leitor de placa (espectrofotômetro) foi baixa o que significa baixa viabilidade das células uma vez que estando destruídas ou mortas o produto resultante da metabolização do MTT não é formado (RISS et al., 2016).

No mesmo experimento, os valores obtidos nas concentrações de 500 µg/mL, 250 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL são equivalentes ao (C-), isto é, não foram estatisticamente significativos quando comparadas com o C-. Porém, os valores detectados na leitura do espectrofotômetro para a concentração de 125 µg/mL se mostraram maiores em relação ao C-, indicando que a referida concentração aumentou a quantidade de células viáveis de forma expressiva.

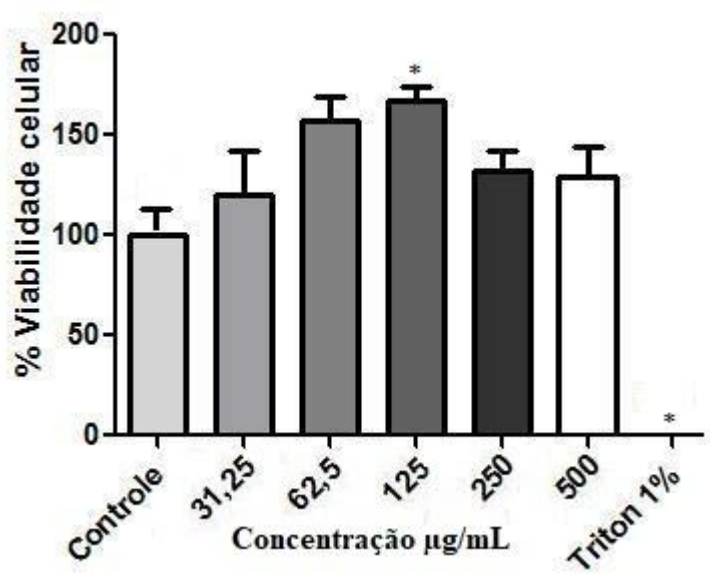


Figura 7 – Porcentagem de células viáveis obtida pelo ensio de MTT no tempo de 24 horas de exposição ao óleo de Pracaxi. Para o controle negativo (C-) considera-se 100% de células viáveis e foi utilizado DMSO. Triton 1% é considerado controle positivo (C+). (*)Valores estatisticamente significativos quando comparados com o controle pelo teste de ANOVA e Dunnet, onde $p \leq 0,05$.

A Figura 8 mostra o ensaio de MTT para 48 horas de tratamento com o óleo. Os valores de porcentagens obtidos nos diferentes tratamentos nao foram estatisticamente significativos quando comparados ao grupo C-, apenas para o C+.

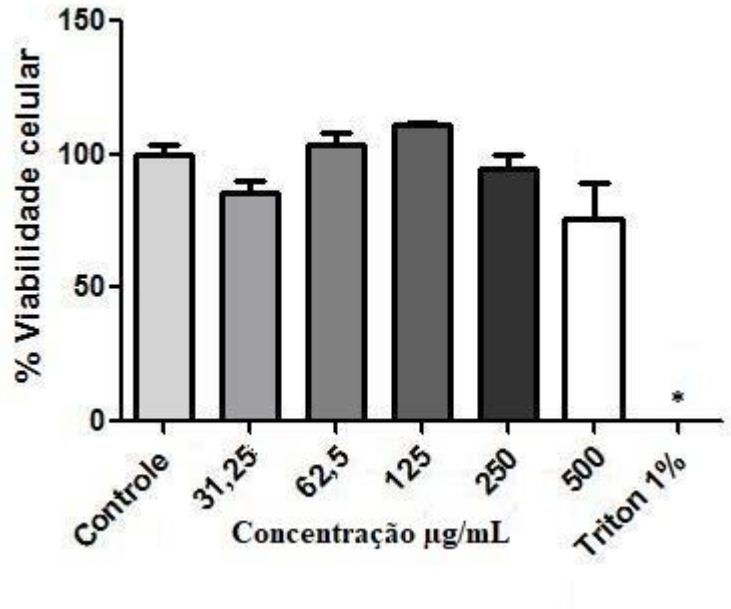


Figura 8 – Porcentagem de células viáveis obtida pelo ensio de MTT no tempo de 48 horas de exposição ao óleo de Pracaxi. Para o controle negativo (C-) considera-se 100% de células viáveis e foi utilizado DMSO. Triton 1% é considerado controle positivo (C+). (*)Valores estatisticamente significativos quando comparados com o controle pelo teste de ANOVA e Dunnet, onde $p \leq 0,05$.

Com relação ao tratamento de 72 horas de exposição do óleo, os resultados dos tratamentos estão mostrados na Figura 9.

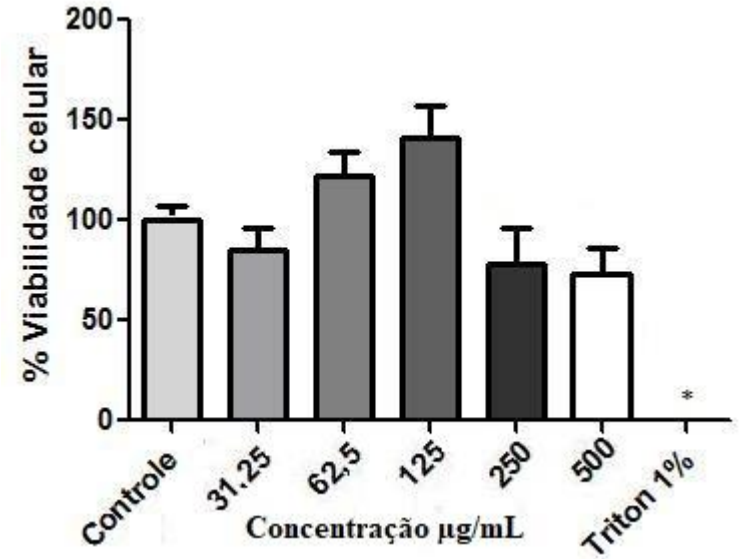


Figura 9 - Porcentagem de células viáveis obtida pelo ensio de MTT no tempo de 72 horas de exposição ao óleo de Pracaxi. Para o controle negativo (C-) considera-se 100% de células viáveis e foi utilizado DMSO. Triton 1% é considerado controle positivo (C+). (*)Valores estatisticamente significativos quando comparados com o controle pelo teste de ANOVA e Dunnet, onde $p \leq 0,05$.

Quando comparados com os resultados obtidos no grupo controle, os resultados dos diferentes tratamentos não foram estatisticamente significativos, apenas o C+ mostrou baixa viabilidade celular. No entanto, os valores obtidos nas diferentes concetrações testadas foram comparadas entre si e os valores foram estatisticamente significativos para 500 µg/mL, 250 µg/mL e 125 µg/mL, uma vez que se observa uma tendência de diminuição de viabilidade celular nas concentrações 500 µg/mL e 250 µg/mL, comparadas com 125 µg/mL. Os resultados apontam que a concentra de 125 µg/mL é viável independente do tempo administrado e causa proliferação das células viáveis. Também foi feita uma análise comparativa entre as concentrações e seus respectivos tempos, ou seja, comparou-se a concentração 500 µg/mL no tempo 24, 48 e 72 horas, e procedeu-se desta forma para todos os tratamentos. Nenhum dos tratamentos acarretou diferença estatisticamente significativa para os diferentes tempos, o que mostra que o uso prolongado do óleo pode não causar diminuição da viabilidade celular.

Guimarães e colegas (2016) testaram o efeito bacteriostático de diferentes óleos de plantas tropicais amazônica, dentre eles, o OP não inibiu o crescimento de *Staphylococcus*

aureus, mostrando que o OP não é eficiente na citotoxicidade de células procariontes, causadores de infecções hospitalares. Em nosso estudo, não foi observada ação citotóxica do OP em células eucarióticas de HepG2/C3A.

Liu e colaboradores (2019) demonstraram que ácidos graxos monoinsaturados de óleos vegetais podem neutralizar os efeitos citotóxicos dos ácidos graxos saturados de origem animal, causadores de obesidade. Investigaram o efeito protetor do Ácido Oléico (de origem vegetal) contra o Ácido Palmítico, cuja ação citotóxica atinge as células β do pâncreas, prejudicando a viabilidade celular e a produção de insulina como consequência. Em seus ensaios, a viabilidade celular foi testada adicionando-se o Ácido Oléico após ou concomitante a aplicação do Ácido Palmítico nas células in vitro. Os resultados indicam que o Ácido Oléico atua impedindo a morte celular, podendo causar a diminuição dos efeitos citotóxicos, porque ameniza os efeitos causados pelo ácido palmítico, diminuindo o estresse dos retículos endoplasmáticos (LIU et al., 2019). Em nosso estudo, os resultados para o teste de viabilidade celular indicam que o OP não apresenta efeito citotóxico na linha celular testada, podendo ter como uma das explicações a presença de ácidos graxos.

Com a finalidade de se observar o desenvolvimento do teste de viabilidade celular, as células HepG2/C3A foram fotografadas após 24 horas de exposição às diferentes concentrações de OP, como mostrado na Figura 10.

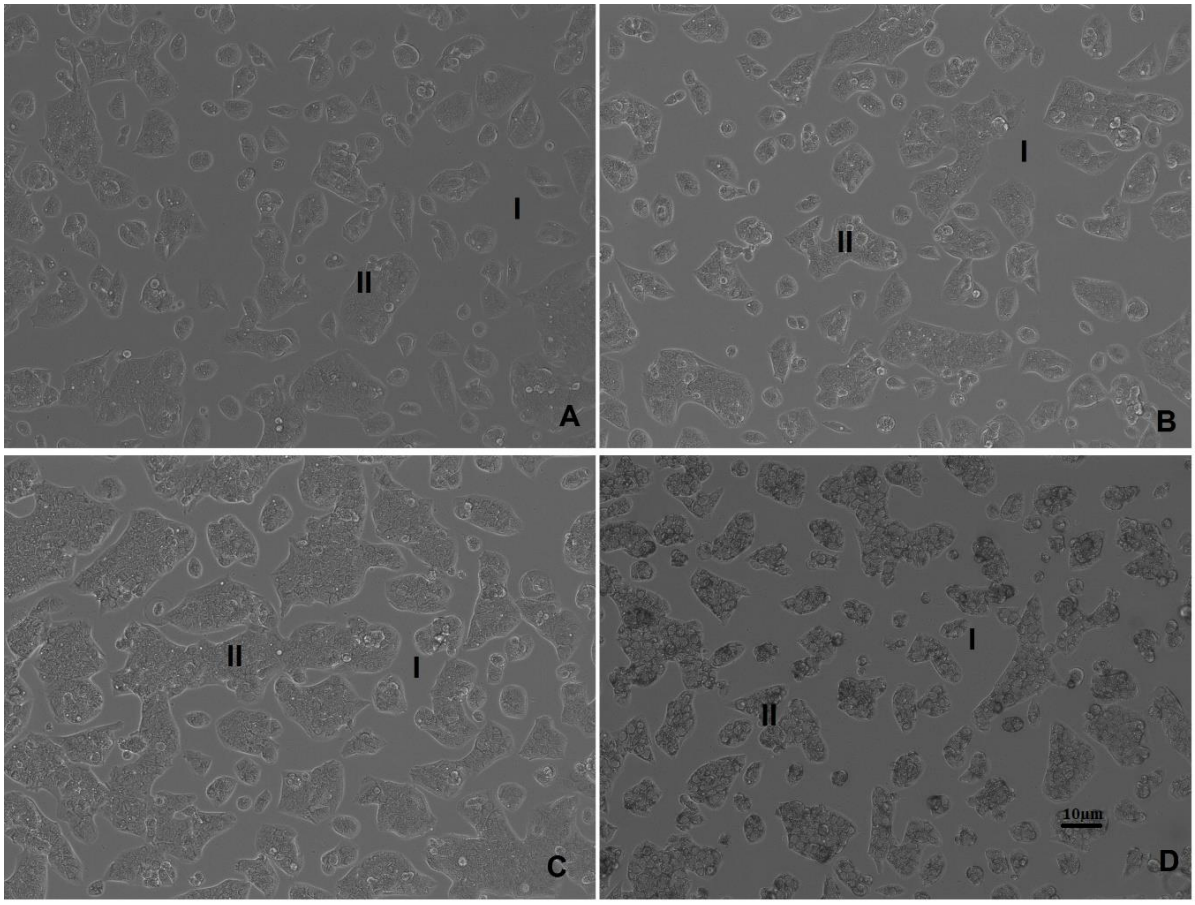


Figura 10 – Mudança morfológica na linha celular HepG2C3A após exposição com OP por 24 horas. Painel A: campo celular exposto ao Controle DMSO. Painel B: campo celular exposto à concentração de 31,25 µg/mL de óleo. Painel C: exposição ao óleo na concentração 125 µg/mL. Painel D: exposição ao óleo na concentração de 500 µg/mL. I – Espaço vazio. II – Ilhas de célula. Aumento do microscópio 40x.

O Painel A mostra as células tratadas com o controle, o Painel B mostra as células tratadas na concentração 31,25 µg/mL, no Painel C as células foram tratadas com 125 µg/mL de OP e o Painel D mostra as células tratadas com 500 µg/mL. Os números romanos representam espaços abertos onde as células não estão aderidas (I) e pontos de aderência celular (II) nos quatro painéis fotografados.

As imagens dos painéis de células apontam para uma mudança na morfologia celular. Visivelmente não se observa diferença na distribuição e quantidade de célula para o controle e a concentração 31,25 µg/mL, tampouco na aderência celular e os espaços abertos onde as células não se aderiram, mostrando homogeneidade na confluência das células. Porém, ao se observar a distribuição das células na concentração 125 µg/mL, localizadas no

Painel C ocorre um significativo aumento na quantidade de células nos pontos de aderência e nítida diminuição nos espaços vazios sem células, o que parece ser uma discreta proliferação celular. Já a relação entre o controle e a concentração de 500 µg/mL observa-se um aumento dos espaços sem aderência celular e uma visível mudança na morfologia das células tratadas. Segundo Riss e seus colaboradores (2016), uma mudança na morfologia das células em meio de culturas tratados com substâncias pode indicar alteração no funcionamento normal da célula. Além disso, a metabolização de compostos xenobióticos pode alterar a morfologia celular de forma conspícua (WENUM et al., 2016; HAN et al., 2015).

O efeito dos ácidos graxos insaturados, tais como, Ácido Oleico e AO na permeabilidade da membrana é maior do que ácidos graxos saturados, como ácido palmítico, por exemplo. Experimentos conduzidos com células vivas têm sugerido que ácidos graxos e lisolipidios em concentrações abaixo daquelas consideradas citotóxicas têm melhorado a captura de substâncias anticancerígenas do meio extracelular para o intracelular e isso pode melhorar ação efetiva de compostos no combate ao câncer (AROURI; MOURITSEN, 2013). Devido a sua natureza anfipática e por formar micelos quando estão em solução, os ácidos graxos são incorporados rapidamente pelos lipídios presentes na membrana celular, causando uma curvatura na bicamada, isso pode causar instabilidade na membrana plasmática e aumenta a permeabilidade (AROURI et al., 2016).

4.3. DANO NO DNA

4.3.1. Teste do cometa

O teste do cometa detecta danos no DNA reparáveis pelo metabolismo celular. Na Tabela 3 estão os resultados da contagem celular no teste do cometa para linhagem de HepG2/C3A, nas seguintes concentrações do óleo 31 µg/mL, 125 µg/mL, 500 µg/mL e os C-C+, obedecendo a escala de dano evidenciado pelo rastro de DNA fragmentado (cometa). Na coluna após os tratamentos, é mostrada a somatória da quantidade total de células com danos em suas respectivas classes. As classes do cometa são representadas de 0

a 3, e se observa que, para o grupo C-, foram contadas 129 células com nenhum dano (dano O) e para os demais tratamentos (31 μg/mL, 125 μg/mL e 500 μg/mL) as células contadas foram 135, 142 e 135 células, respectivamente. De acordo com os resultados obtidos, não houve resultados significativos, apenas no C+, com apenas seis células com dano 0 (zero).

Para o dano 1, o tratamento com MMS, utilizado como grupo C+, foi o mais significativo pois contou-se 127 células enquanto que para os demais tratamentos com o óleo as células contadas foram 21, 15, 7,5 e 13,5 para controle negativo, 31μg/mL, 125μg/mL e 500 μg/mL, respectivamente. O único tratamento que apresentou dano 2 foi C+. Os valores obtidos foram significativos apenas para o C+, fato explicado pela sua conhecida ação mutagênica. Na última coluna da tabela, os dados de Score revelam a somatória do número de células contadas no seu devido dano e multiplicada pelo número da classe, como explicado na sessão dos Métodos. O Score significativo foi o observado no MMS quando comparado com o grupo controle. Os tratametos não mostraram genotoxidade significativa em nenhuma das concentrações utilizadas.

Tabela 3 – Migração do DNA (Média ± DP) pelo Ensaio do Cometa para avaliar a genotoxicidade do óleo de Pracaxi, com 4 horas de exposição para linhagem de célula HepG2/C3A, em diferentes concentrações.

Tratamento	**Total[1]**	***Classe do Cometa***				**Scores**
		0	**1**	**2**	**3**	
Controle	18.67±19.66	129.00 ± 18.26	21.0 ± 17.96	0.00 ±0.00	0.00 ± 0.00	21.70±17.96
OP [31μg/mL]	15.00±9.12	135.00 ± 9.12	15.0 ±9.12	0.00 ±0.00	0.00 ±0.00	15.00±9.12
OP [125μg/mL]	7.50 ±4.50	142.50 ± 4.50	7.5±4.50	0.00 ±0.00	0.00 ± 0.00	7.50±4.50
OP [500 μg/mL]	14.10 ±8.26	135.90 ± 8.26	13.50 ±7.50	0.6 ± 0.57	0.00 ± 0.00	14.70±9.04
MMS [45 μM]	141.50 ±0.8*	6,49 ± 0.40*	127.9 ±7.55*	9.99 ±3.78*	6.49 ±0.86*	167.40±7.39*

DP = Desvio Padrão. Controle positivo = MMS (Metil MetanoSulfonado). Controle negativo = DMSO. OP = Óleo de Pracaxi. Para o teste estatístico foi utilizado a Análise de Variância um Fator (ANOVA), seguido do teste de Dunnett: estatisticamente relevantes com relação ao controle negativo *($P \leq 0.05$). [1]Número total de células danificadas (class 1 + 2 + 3).

O teste do cometa é formado por células semelhantes a um cometa com região da cabeça e calda. A cabeça do cometa é formada por uma região nuclear onde o DNA está

íntegro e a região da calda contem fragmentos de DNA derivados da quebra das cadeias moleculares que migraram durante a eletroforese (HARTMANN et al 2003).

4.3.2. Teste do micronúcleo

O teste do cometa identifica lesões genômicas possíveis de serem corrigidas pelo próprio metabolismo celular, por exemplo, a molécula teste pode causar quebras em uma das fitas de DNA ou em ambas em sítios álcali-lábeis, mas o sistema de reparo da célula pode corrigir e eliminar esses danos. Já o teste do micronúcleo é um ensaio de genotoxicidade que detecta a formação de micronúcleos formados na célula em divisão. Esses micronúcleos são formados devido às quebras do cromossomo ou mesmo distanciamento/perda de cromossomo inteiro, o que acarreta na formação de pequenas porções de material genético não incluso no núcleo principal porque não migraram para os polos celulares durante a anáfase da divisão celular. Durante a telófase, onde o envoltório nuclear é refeito, essa porção de material genético é encapsulada formando pequenos núcleos individuais, ou seja, micronúcleos. Como houve um desprendimento de uma porção significativa de material genético não há a possibilidade de reparo. Tal processo pode ser ocasionado por agentes externos como os agentes mutagênicos.

Neste estudo foi realizado o teste de micronúcleo com o objetivo de se observar se as células tratadas com o OP contêm micronúcleos ou não. A Figura 11 mostra as principais alterações nucleares que podem ser detectadas pelo teste do micronúcleo. O campo A é uma imagem tirada da lâmina no aumento 400x pelo microscópio ótico; o campo B é a imagem de uma célula binucleada utilizada na contagem para análise micronúcleo (MN); campo C é uma imagem de broto nuclear (BN); campo D mostra uma célula binucleada com ponte nucleoplasmática (PNP); campo E é o exemplo de célula binucleada com MN utilizada na contagem.

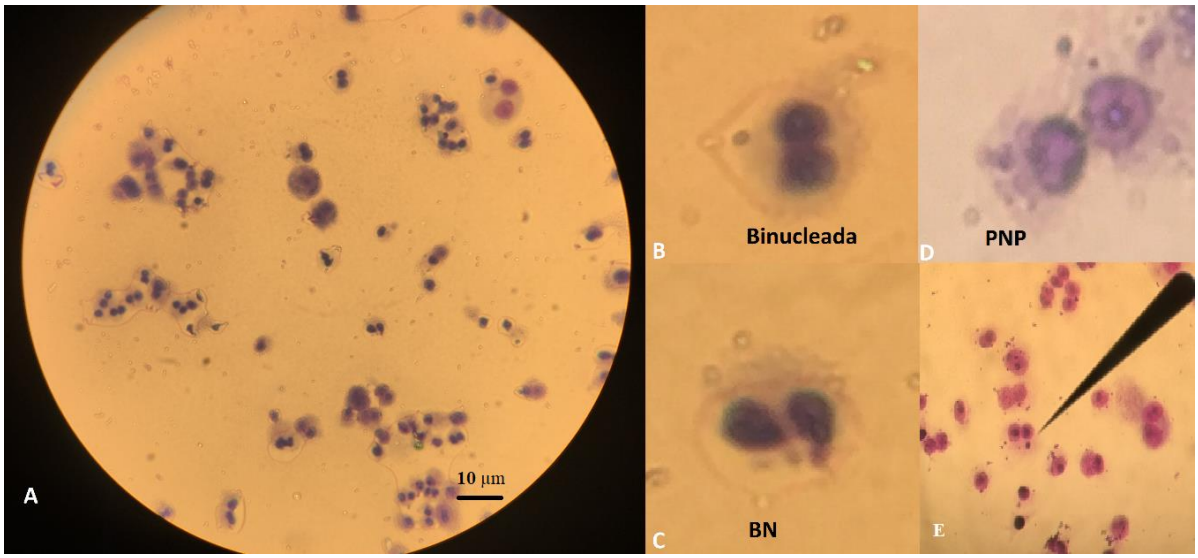


Figura 11 – Fotografia da lâmina de MN evidenciando células binucleadas (A, B), Broto Nuclear (C), Ponte Nucleoplasmática (D) e Micronúcleo (E). Aumento de 400x em microscópio óptico.

A Tabela 4 traz os resultados obtidos através do teste de micronúcleo onde mostra a frequência dos micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) na linhagem celular HepG2/C3A após os tratamentos com as diferentes concentrações do óleo de Pracaxi. As concentrações testadas foram 31 µg/mL, 125 µg/mL e 500 µg/mL. O controle positivo utilizado foi o benzo(a)pireno na concentração de 2µg/mL. Para o controle negativo, utilizou-se o DMSO escolhido para a dissolução do óleo. Para o cálculo do IDN foram contadas 500 células em cada réplica, totalizando 1500 células dentre estas o valor de mono, bi, tri e tetranucleadas de acordo com a seguinte fórmula:

$$IDN= [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]/500$$

Foi calculado IDN para cada réplica e feita a análise estatística de cada grupo comparando-se os valores entre si e com o grupo controle negativo. Os resultados obtidos mostram que os tratamentos com 31 µg/mL, 125 µg/mL e 500 µg/mL não foram estatisticamente significativos em relação ao controle. Para IDN, a presença do óleo afetou de forma significativa, levando a uma queda neste índice. Observa-se também a existência de uma quantidade maior de células mononucleadas do que binucleadas quando as células estão submetidas ao óleo. Além disso, com os tratamentos nas diferentes concentrações do óleo não tiveram células tri e

tetranucleadas. Ao se comparar as diferentes concentrações os valores estatísticos não são significativos, mostrando que não houve diferença na concentração do óleo utilizada. A frequência aumentada de células mononucleadas pode ser explicada por uma possível ação no ciclo celular, tal como um atraso no ciclo. A citometria de fluxo mostrou redução da quantidade de células em G2/M e aumento na quantidade de células em G1.

Tabela 4 – Frequência de Micronúcleos (MN), pontes nucleoplasmáticas (PNP), brotos nucleares (BN) e índice de divisão nuclear (IDN) na linhagem celular HepG2/C3A, exposta ao óleo de pracaxi (em triplicata para cada amostra).

Substância teste	Exposição(24h) Concentração (µg/mL)	Células binucleadas com MN (3000células) No.	%	PNP No.	BN No.	IDN (1500células) (Mean ± DP)
Controle negativo DMSO	0	8	0.26	23	12	1.75 ± 0.05
Controle positivo Benzo(a)pireno	2*	42*	1.4	46*	33*	1.64 ± 0.14
Óleo de Pracaxi	31	20	0.66	44	17	*1.38 ± 0.09
	125	16	0,53	34	19	*1.48 ± 0.06
	500	22	0,73	31	18	*1.40 ±0.08

Concentração = µg/mL. DP = Desvio Padrão. Controle Negativo: Meio de cultura DMEM. Teste estatístico utilizado foi ANOVA – Análise de Variancia um Fator, seguido pelo teste de Dunnett: diferenças estatísticas com relação ao controle negativo * ($p \leq 0,05$).

Com relação à incidência de Ponte Nucleoplasmática (PNP), Broto Nuclear (BN) e Micronúcleo (MN), para cada réplica foram contadas 1000 células binucleadas, totalizando 3000 células para cada grupo tratado, uma vez que o teste foi feito em triplicata. Destas, o controle positivo contem maior quantidade de pontes, brotos e micronúcleos, como mostrado na Tabela 4. O C+ apresenta 42 células e esse resultado é estatisticamente significativo com relação ao C- (total de 8 células binucleadas com micronúcleo).

Ao se comparar os grupos tratados com o óleo, apenas a concentração de 125ug/ml se destaca com relação as demais, com 16 células binucleadas com micronúcleo, valor menor que o controle. Quando se compara os valores de PNP e BN de todos os tratamentos, não há significância. A frequência de micronúcleo encontrada no controle negativo pode estar associada à mutações espontâneas, uma vez que, segundo Fenech (2000) não há trabalhos que mostrem

alguma interferência da citocalasina B na formação do micronúcleo. A citocalasina B é uma molécula cujas propriedades bloqueiam a citocinese durante a divisão celular e promove o acúmulo de células binucleadas. Apesar da frequência de micronúcleo encontrada nos tratamentos com o óleo é possível que ele não fragmente o DNA (como mostrado nos resultados para o teste do cometa onde os valores dos tratamentos são semelhantes ao controle negativo).

Lamy e colegas (2004) discutem que alguns compostos genotóxicos podem ser clastogênicos e aneugênicos ao mesmo tempo, mas também podem ter efeitos separadamente. Agentes clastogênicos causam quebras no material cromossômico e o MN se forma devido ao DNA fragmentado que se desprende o núcleo principal, já os agentes aneugênicos causam perda no cromossomo inteiro porque prejudicam a ligação do cromossomo com as fibras de fuso. Em seu estudo, o composto 3-Nitrobenzantrona (3-NBA) ocasionou a formação de micronúcleos com forte fragmentação do DNA mostrada pelo teste do cometa o que se leva a crer que o composto tem provável efeito clastogênico. No caso do OP não se observa formação de rastro de DNA no teste do cometa evidenciado pelo rastro formado após o núcleo principal. Isso pode indicar que a formação do micronúcleo seja de origem normal da célula, mas outros resultados que reforçam essa hipótese serão discutidos na sessão de citometria de fluxo e expressão gênica.

4.4. CITOMETRIA DE FLUXO

4.4.1. Ciclo celular

Para melhor compreender o potencial efeito citotóxico e proliferativo do OP, as percentagens de células em cada fase do ciclo celular foram determinadas por citometria de fluxo. A figura 12 relaciona as fases do ciclo celular G1, S, G2/M nos diferentes tratamentos para as células HepG2/C3A cuja a alteração na quantidade de célula em cada fase do ciclo está sendo representada em porcentagem. A análise do ciclo celular demonstrou que o tratamento com o OP manteve padrões de distribuição semelhantes aos do controle, além de se observar uma diminuição significativa na população de células em

G2/M nas concentrações de 31µg/mL e 500 µg/mL. Com isso, mostramos que o OP não foi capaz de alterar a quantidade de celulas nas diferentes fases do ciclo celular.

Os resultados obtidos para as células tratadas com o óleo foram semelhantes ao controle, o que indica que o ciclo celular não foi alterado significativamente. Provavelmente a pequena diminuição de G2/M foi devido a um aumento nas porcentagens das outras fases, principalmente na fase G1, onde se observa uma tendência de aumento, mas que não foi significativo de acordo com a análise estatística. Para o tempo de 24 horas o óleo não mostrou efeito no ciclo celular.

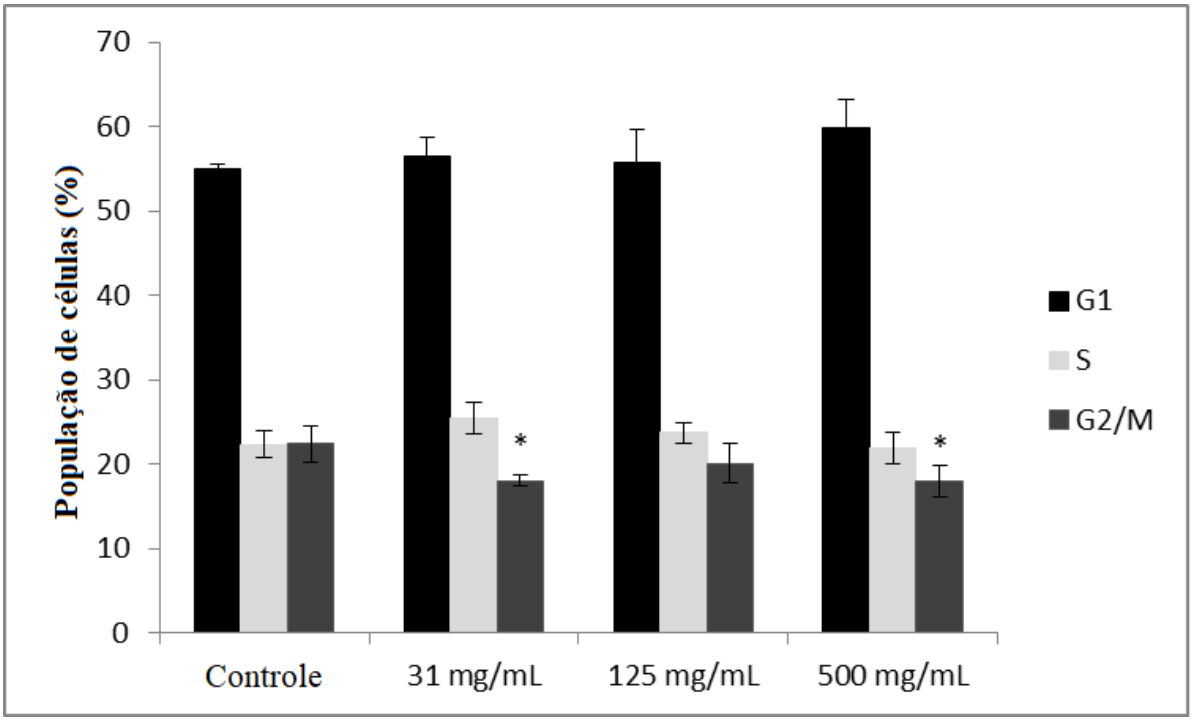


Figura 12 – Perfil do Ciclo Celular mostrado em porcentual de população celular em fase G1, S e G2/M obtido por citometria de fluxo para linhagem celular HepG2/C3A em diferentes concentrações de tratamento com o óleo de Pracaxi. Controle positivo utilizado foi a Camptotecina 1 µM. (*) indica os valores significativos para o teste ANOVA seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle com $p \leq 0,05$.

4.4.2. Apoptose

A figura 13 mostra o percentual de população celular em apoptose inicial, em apoptose final e em necrose, nas concentrações de de 31µg/ml, 125µg/ml e 500µg/ml do OP. Além de observamos uma diminuição de células com características necróticas na concentração de 31µg/ml, o pracaxi não foi capaz de induzir morte celular por apoptose ou necrose onde todos os tratamentos apresentaram porcentagem celulares similares ao controle. Os dados de expressão gênica também corroboram esta afirmativa uma vez que os genes relacionados à apoptose não foram expressos. Com os dados obtidos pela citometria de fluxo, pode-se observar que o óleo de pracaxi não influencia no ciclo celular e nem induz morte celular.

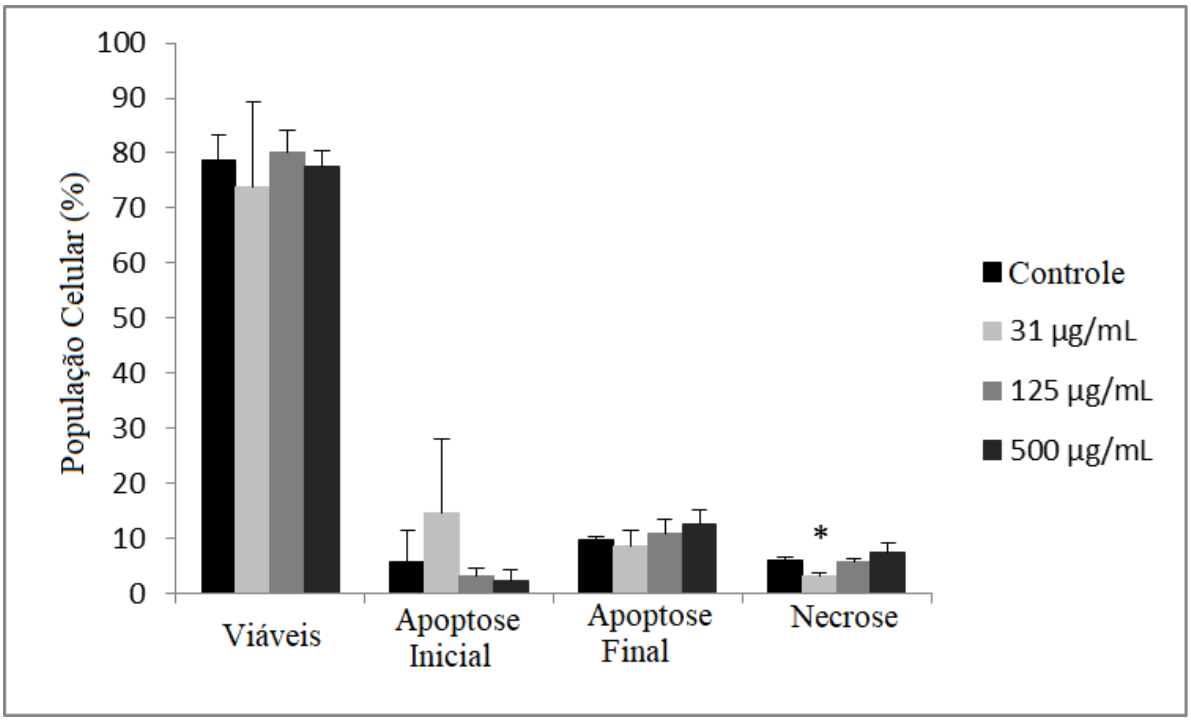


Figura 13 – Apoptose. Porcentual de população celular em fase G1, S e G2/M obtido por citometria de fluxo para linhagem celular HepG2/C3A em diferentes concentrações de tratamento com o óleo de Pracaxi. Controle positivo utilizado foi a Camptotecina 1 µM. (*) indica os valores significativos para o teste ANOVA, seguido do teste de Dunnet para comparação com o controle com $p \leq 0,05$.

4.5. EXPRESSÃO GÊNICA

De modo a facilitar a compressão dos genes utilizados e suas respectivas funções, todos os resultados foram organizados em um tabela como mostrado na Tabela 5, bem como a direção e seqüência dos genes e o fator de expressão obtido por cada um deles.

Tabela 5. Expressão relativa dos genes utilizados nas reações de PCR-RT, suas respectivas seqüências e funções.

Primers	Direção/Sequência	Fator de Expressão	Função
CASP9	F - CTC TAC TTT CCC AGG TTT R - TTT CAC CGA AAC AGC ATT	0,993	Apoptose
CASP3	F - AACTGGACAGTAACATGGAG R - TTGCTGGCAAAGTAGAAAAG	0,835	Apoptose
CASP8	F – CTACAGGGTCATGCTCTATC R - ATTTGGAGATTTCCTCTTGC	1,304	Apoptose
H2AFX	F - AAT CCA AGC ACC TAG ATA CC R - CAG AAT TCC AGT TCA GAA GC	0,797	Dano/Reparo
PUMA	F - GC**GGATCC**ATGAAAT TTGGCATGGGG R - C*CG***CTCGAG**CTACATGGTGC AGAGAA	1,42	Apoptose
GADD45	F - TCA GCG CAC GAT CAC TGT C R - CCA GCA GGC ACA ACA CCA C	1,209	Dano/Reparo
CDKN1A	F – CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC R - CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG	1,125	Ciclo celular
mTOR	F – GGAGGAGAAATTTGATCAGG R - GGGCAACAAATTAAGGATTG	12,614 *	Proliferação celular
MYC	F - TGA GGA GGA ACA AGA AGA TG R - ATC CAG ACT CTG ACC TTT TG	1,209	Ciclo celular
GPX1	F – CTCCCCTTACAGTGCTTGTTCG R - CGATGTCAATGGTCTGGAAG	2,1 *	Estresse oxidativo
BECN1	F – CAGTATCAGAGAGAATACAGTG R – TGGAAGGTTGCATTAAAGAC	1,155	Autofagia
BBC3	F - GTA AGA TAC TGT ATA TGC GCT G R - TTT TCC ACT GTT CCA ATC TG	1,037	Apoptose
BIRC5	F – CATCTCTACATTCAAGAACTGG R - CCTTGAAGCAGAAGAAACAC	1,236	Inibidor de apoptose
BCL2	F – GAT TGT GGC CTT CTT TGA G R - GTT CCA CAA AGG CAT CC	0,797	Pró – Apoptótico
CYP3A4	F - AGT CTT TCC ATT CCT CAT CC R - TGC TTT TGT GTA TCT TCG AG	3,166 *	Metabolismo
CYP1A2	F – CAC TAT CAG GAC TTT GAC AAG R – AGG TTG ACA ATC TTC TCC TG	3,62 *	Metabolismo
CYP1A1	F – AAA GAA CCC GCA CCT GGC AC R – TGA AAT CAT CGC CCT GCC	2,981 *	Metabolismo
PARP – 1	F – ATGACATGCTTGAGCCA-GG R – GTGTCTCCTTCTTTGACACT	1,428	Dano/Reparo
BACT	F – CGGGAAATCGTGCGTGACAT R - AGGAAGGAAGGCTGGAAGAG	1,730	

Fator de expressão significativo para inibição indicado por valores abaixo de 0.5 e expressão acima de 2 (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

Para a expressão gênica relativa, as células foram tratadas com 500 µg/mL de óleo e apresentaram aumento significativo de expressão de mRNA dos genes relacionados à

proliferação celular (mTOR), estresse oxidativo (GPX1) e relacionados a metabolismo de xenobióticos (CYP3A4, CYP1A2, CYP1A1), como mostrado na Tabela 5.

O conhecimento sobre a importância da via de sinalização de mTOR tem aumentado significativamente ao longo dos anos pois, neoplasias vem sendo amplamente estudas e, como consequência, tem se procurado inibidores da via PI3K/AKT/mTOR por ser responsável pela sobrevivência e proliferação celular. mTOR é uma serino/treonina quinase com peso molecular de 289kDa que regula a síntese proteica para motilidade celular, crescimento e proliferação, sendo classificada como membro da família fosfatidil inositol 3-kinase baseada na homologia entre a terminação carboxi e PI3K. Tal via é desencadeadora de efeitos em cascata de sinalização de PI3K e AKT (KELLY et al., 2011). A via mTOR pode ser ativada na presença de fatores de crescimento no meio extracelular e também quando a célula detecta depleção de nutrientes no ambiente intracelular ou consumo de energia caso haja excesso de AMP em relação à quantidade de ATP. A via mTOR regula a transcrição de RNA e traduz proteínas necessárias para a progressão do ciclo celular, passando da fase G1 para S (KELLY et al., 2011).

Fatores de crescimento como ácidos graxos de cadeia longa podem interagir com RTK (Receptor de Tirosino-Quinase) localizados ao lado externo da membrana plasmática e promover a ativação de uma proteína conhecida como PI3K (fosfatidilinositol-3 quinase). PI3K gera PIP3 (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) localizada no lado interno da membrana a partir da conversão da PIP2. A produção e conversão de PIP2 em PIP3 recruta a proteína AKT, formando uma interação entre as duas moléculas. Tal interação entre AKT e PIP3 muda a estrutura molecular de AKT expondo os dois principais sítios ativos, Thr 308 e Ser 473. A fosforilação da Ser 473 é realizado pelo mTORC2 (RICTOR). Quando fosforilado, o AKT irá interagir com o complexo TSC1/TSC2, que estão diretamente envolvidos na regulação do mTOR. mTOR forma pelo menos dois complexos protéicos funcionais distintos: complexo 1 (mTORC1) também conhecido como mTORC1-Raptor e complexo 2 (mTORC2) comumente utilizado como mTORC2 – Rictor. A diferença de ambos está na sensibilidade à rapamicina e as proteínas que formam os complexos estruturais dos domínios. mTORC1 é inibido na presença de rapamicina e é formado por mTOR, mLST8 (proteína letal 8 com sec13), GβL (Proteina G, subunidade β), raptor, PRAS40 (substrato de AKT rico em prolina de 40kDa) e deptor (proteína com domínio DEP que interage com

mTOR). Para mTORC2, a rapamicina falha na inibição, o que o torna insensível a ela e age como uma PDK2 (proteino quinase 2-dependente de fosfoinositideo), fosforilando o AKT. O complexo molecular desta estrutura envolve as proteínas mTOR, Rictor e mLST8.

TSC2 é a forma fosforilada de TSC1 e, devido a sua atividade GTPase (GAP), o complexo TSC1/TSC2 converte a GTP-Rheb em GDP-Rheb, sua forma inativa, porém, a GTP-Rheb é necessária para o domínio mTORC1-Raptor funcione, desta forma, o AKT fosforilado inibe a fosforilação do complexo TSC1/TSC2. A ligação GTP-Rheb e mTORC1-Raptor provoca alterações conformacionais e, conseqüentemente sua ativação. A ativação deste complexo molecular mTORC1-Raptor regula a tradução de RNAs importantes para a progressão do ciclo celular através de dois substratos: S6K1(p70 ribosomal S6 kinase 1) e o fator eIF4E ligado à proteína 1 (4EBP1). A fosforilação de S6K1 mediada por mTORc1 ajuda a montagem do complexo de iniciação de tradução do fator eIF3 **e** a fosforilação de 4EBP1induz a liberação do eIF4E o que promove a tradução cap-dependente. De forma geral, a ativação de S6K recruta a subunidade de 40kDa do ribossomo, aumenta a tradução de RNAm que codificam proteínas ribossomais, fatores de elongamento e iniciação. Já a ativação de eIF4E inicia aumento na produção de RNAm para proliferação celular. Dados recentes sugerem que a fosforilação de 4EBP1 mediada por mTOR promove a progressão do ciclo celular e conseqüentemente a proliferação celular (EKIM, et al 2011).

Segundo o exposto acima, o OP poderia servir como um fator de crescimento, se ligando ao RTK e ativando essa cascata de eventos descritos através da via PI3K/AKT/mTOR, o que explica o leve aumento de expressão observada nos resultados obtidos da análise de expressão gênica das células tratadas. Da mesma forma, houve aumento de atividade para os genes CYPS conhecidos pelo metabolismo de substâncias. Os genes da família CYPS testados foram (CYP3A4, CYP1A2, CYP1A1). As enzimas que compõem a família do citocromo P 450 estão envolvidas no metabolismo de drogas, bem como na ativação e eliminação de moléculas aplicadas como medicamentos. As CYPs são classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos que formam sua estrutura molecular, isto é, CYP 1, 2 e 3 se encontram presentes no metabolismo fase I de compostos xenobióticos enquanto que os demais membros da CYP estão envolvidos no metabolismo endógeno e compostos como ácidos graxos, esteroides, glicosaminoglicanos, ácidos

biliares, entre outros. Os alelos CYP 1A2 e CYP3A4 são responsáveis pelo metabolismo oxidativo catalítico de aproximadamente 90% das drogas humanas e pela viabilidade dessas moléculas.

A determinação de substâncias mediadoras de CYPs, principalmente substratos e produtos gerados pelo metabolismo dessas reações tem sido importante na descoberta de novos medicamentos, bem como sua eficácia e a segurança do uso dessas novas moléculas terapêuticas. Desta forma, para o estudo do óleo de pracaxi, a determinação da inibição ou ativicação das CYPs pelo óleo testado se mostra essencial uma vez que pode ser um candidato ao desenvolvimento de medicamento para o tratamento de cicatrização e renovação celular (VEITH ET., 2009; SINGHT et al., 2011).

Os ensaios realizados com o óleo de pracaxi em HepG2/C3A mostraram o efeito indutor dos genes CYP3A4, CYP1A2, CYP1A1 na concentração de 500 µg/mL testada. Em humanos, a modulação das CYPs, principalmente 1A1 e 1A2 é mediada por um receptor intracelular denominado aril hidrocarboneto (AhR) que é ativado no citoplasma por um xenobiótico. Após essa ativação, ele é translocado para o núcleo ligando-se aos fatores de transcrição que ativam a transcrição dos genes CYP 1A1. Grande parte das moléculas que se ligam ao receptor AhR são moléculas hidrofóbicas como óleo ou hidrocarbonetos aromáticos e outros halogenados (NGUYEN; BRADFIELD, 2008). A Tabela 5 mostra os resultados para expressão relativa das células HepG2/C3A tratadas com óleo no período de 24 horas de exposição. A isoforma CYP3A4 também sofreu um leve aumento de expressão.

Outro gene estimulado pelo óleo de pracaxi foi o GPX1, Glutationa Peroxidase 1 pertencente a uma superfamília de selenoproteina, com centro catalítico formado por selenocisteina. GPX1 é encontrado no citosol e nas mitocôndrias onde desempenha função catalítica redutora de H_2O_2 principalmente, mas também pode agir em outros hidroperoxidos orgânicos transformando em água devido à presença da glutationa (MAIORINO et al., 2013). A respiração mitocondrial normal pode formar entre outras moléculas o superóxido O^- porém, estudos têm mostrado que as isoformas de CYPs, responsáveis pela metabolização de moléculas, podem contribuir para o aumento da quantidade dos superóxidos. Tanto no meio intracelular quanto no extracelular, eles são convertidos em peróxido de hidrogênio, substrato para a ação da GPX1 (LUBOS et al.,

2011). É possível que a metabolização do óleo pelas isoformas da CYP, ocasione o aumento das ROS e desencadeie a ação da GPX1, mas, aparentemente, esse estresse oxidativo gerado pelo metabolismo do óleo não seja suficiente para causar morte celular uma vez que os genes analisados para morte celular não foram ativados, em especial os apoptóticos (consultar Tabela 5 onde está a relação dos genes estudados).

Com relação aos demais genes utilizados, não foi observado efeito significativo de inibição ou expressão nos genes relacionados à apoptose: Casp 9, Casp 3, Casp 8, PUMA, BBC-3, BLC-2; de dano e reparo: PARP – 1, GADD45, H2AFX; ativadores de ciclo celular: MYC, CDKN1A; autofágico BECN1e inibidor apoptótico: BIRC5. Os demais genes testados para as outras vias de expressão não foram afetados pela presença do óleo nas células.

A Citometria de Fluxo mostrou que o ciclo celular não foi afetado e os genes MYC e CDKN1A não tiveram expressão, vias responsáveis pela ativação do cicloe. Não se observou geração de células apoptóticas pela técnica da citometria de fluxo, o que confirma os resultados obtidos do PCR-TR onde os genes Casp 9, Casp 3, Casp 8, PUMA, BBC-3, BLC-2 não se expressaram, além do gene de inibição de apoptose BIRC5 que também não expressou. Os genes PARP – 1, GADD45 e H2AFX relacionados à dano no material genéticos também não mostrou expressão ou inibição quando as células foram tratadas com o óleo.

É possível que o óleo entre na célula através dos receptores de membrana da via mTOR e, ao atingir o citoplasma celular, as enzimas responsáveis por desencaderarem a cascata de ativação das CYPs o encontrem, iniciando o processo de metabolização. Os produtos formados no metabolismo do óleo desencadeiam a expressão de GPX1 e a célula se prepara para se proliferarem.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos, a caracterização do óleo de pracaxi extraído das sementes contem ácidos graxos, ácido oleanólico e hederagenina. O teste de MTT mostrou maior viabilidade celular nas células tratadas com óleo, o que indica que o óleo não é citotóxico. O uso prolongado do óleo não afetou a viabilidade celular uma vez que os testes conduzidos em tempos distintos não foram significativos. Micrografias de 24 horas após o tratamento do óleo, mostraram alteração na morfologia celular. Para o teste do cometa, os resultados obtidos no grupo controle e no tratamento são semelhantes, o que mostra que não é genotóxico.

No teste de micronúcleo, foram identificados valores semelhantes entre os tratamentos e grupo controle, desta forma, o óleo não pode ser considerado mutagênico. Ao se comparar os valores obtidos para PNP e BN de todos os tratamentos e controle, os resultados não são significativos. A análise do ciclo celular demonstrou que o tratamento com o óleo de pracaxi manteve padrões de distribuição semelhantes aos do controle, mas se observa uma diminuição significativa na população de células em G2/M e aumento de G1. Com relação aos dados obtidos de apoptose em citometria de fluxo, observa-se uma diminuição de células com características necróticas. Isso significa que o óleo não foi capaz de induzir morte celular por apoptose ou necrose onde todos os tratamentos apresentaram porcentagem celulares similares ao controle.

Na expressão gênica relativa, após o tratamento com 500 µg/mL de óleo a linhagem celular apresentou aumento significativo de expressão de mRNA dos genes relacionados à proliferação celular (mTOR), estresse oxidativo (GPX1) e relacionados a metabolismo de xenobióticos (CYP3A4, CYP1A2, CYP1A1) e não expressou nem inibiu os genes relacionados à morte celular, pró-apoptótico, e de dano e reparo. Conclui-se, desta forma, o uso seguro do óleo das sementes de Pracaxi.

6. BIBLIOGRAFIA

6. BIBLIOGRAFIA

AHAMED, M., ALI, D., ALHADLAG, H.A., AKHTAR, M.J., Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2). **Chemosphere** v.93, p.2514–2522, 2013.

AHUJA, Y. R.; SARAN, R. Potential of Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Comet Assay) in Heavy Ion Radiation Biology. **Kamla-Raj**, v. 1, n. 2, 2001.

ALBERTS, B., JHONSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P., 2008. **Molecular Biology of the Cell**, 5 edition, Garl Sci.

ALVAREZ, M.E.; MARIA, A.O.; SAAD, J.R. Diuretic activity of Fabiana patagonica in rats. Phytotherapy Research 16, 71–73, 2002.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo Celular. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, I. AMENDOEIRA, R. (Org.). Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde. Rio de Janeiro: EPSJV/IOC, 2010.

ARNOUS, A.H., SANTOS, A.S., BEINNER, R.P.C. Plantas Medicinais de Uso Caseiro – Conhecimento Popular e Interesse por Cultivo Comunitário. Revista Espaço para a Saúde, v.6, p.1-6, 2005.

AROURI, A.; LAURITSEN, K.E.; NIELSEN, H.L.; MOURITSEN, O.G. Effect of fatty acids on the permeability barrier of model and biological membranes. **Chemistry and physics of Lipids**, v.200, p.139-146, 2016.

AROURI, A.; MOURITSEN, O.G. Membrane-perturbing effect of fatty acids and lysolipids. **Prog. Lipid Res.** v.52, p.130-140, 2013.

BANOV, D.; BANOV, F.; BASSANI, A. case series: the effectiveness of fatty acids from pracaxi oil in a tropical silicone base for scar and wound therapy. Dermatol Ther, v.4, p.259-269, 2014.

BARTHOMEU, F.; DEBITON, E.; MSHVILDADZE, V.; KEMERTELIDZE, E. G. B. In vitro activity of hederacolchisid A1 compared with other saponins from Hedera colchica against proliferation of human carcinoma and melanoma cells. **Planta Med.** v.68, p.672–675, 2002.

BAUDOIN, R.; GRISCOM, L.; PROT, J.M.; LEGALLAIS, C.; LECLERC, E. Behavior of HepG2/C3A cell cultures in a microfluidic bioreactor. Biochemical Engineering Journal, v.53, p.172-181, 2011.

BRAHMACHARI, G. Neuroprotective natural products: clinical aspects and mode of action. Weinheim, German: Wiley VCH, 2017.

BRASIL. Lei nº 6.360, 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. TÍTULO III - Do Registro de Drogas, Medicamentos e Insumos Farmacêuticos. Artigo 16. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6360.htm. Acesso em 20 jul, 2015.

BRASIL. Lei nº 6.360, 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. TÍTULO III - Do Registro de Drogas, Medicamentos e Insumos Farmacêuticos. Artigo 20. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6360.htm. Acesso em 20 jul, 2015.

BRASIL. Lei nº 6.360, 23 de setembro de 1976. Dispõe sobre a Vigilância Sanitária a que ficam sujeitos os Medicamentos, as Drogas, os Insumos Farmacêuticos e Correlatos, Cosméticos, Saneantes e Outros Produtos, e dá outras Providências. TÍTULO III - Do Registro de Drogas, Medicamentos e Insumos Farmacêuticos. Artigo 21. http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L6360.htm. Acesso em 20 jul, 2015.

MAIORINO, M.; BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Glutathione peroxidases. **Biochimica et Biophysica Acta,** v.1830, p. 3289–3303, 2013.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. Journal of Natural Products, v. 67, p. 2141– 2153, 2004.

CHIPUK, J.E.; MOLDOVEANU, T.; LLAMBI, F.; PARSONS, M.J.; GREEN, D.R. The BCL-2 Family Reunion. Molecular Cell, v. 37, n. 12, p. 299-310, 2010.

COLLINS, A.R.; DOBSON, V.L.; DUSINKÁ, M.; KENNEDY, G.; STETINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research,** v. 375, p. 183-193, 1996.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. Molecular Biotechnology, v. 26, p. 249-261, 2004.

CRUZ, E.D.; BARROS, H.S.D. Germinação de sementes de espécies amazônicas: pracaxi [(*Pentaclethra macroloba*) (Willd.) Kuntze].

DA SILVA, J.O.; COPPEDE, J.S.; FERNANDES, V.C.; SANT'ANA, C.D.; TICLI, F.K.; MAZZI, M.V.; GIGLIO, J.R.; PEREIRA, P.S.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. Antihemorrhagic, antinucleolytic and other antiophidian properties of the aqueous extract from *Pentaclethra macroloba*. Journal of Ethnopharmacology, v. 100, p. 145–152, 2005.

DA SILVA, J.O.; FERNANDES, R.S.; TICLI, F.K.; OLIVEIRA, C.Z.; MAZZI, M.V.; FRANCO, J.J.; GIULIATTI, S. PEREIRA, P.S. SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V.

Triterpenoid saponins, new metalloprotease snake venom inhibitors isolated from *Pentaclethra macroloba*. Toxicon, v. 50, p. 283-291, 2007.

DE FLORA, S.; FERGUNSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research,** v. 591, p. 8-15, 2005.

DHARMARAJ, S, 2015. The Basics: RT-PCR. Disponível em: https://www.lifetechnologies.com/br/en/home/references/ambion-tech-support/rtpcr-analysis/general-articles/rt--pcr-the-basics.html. Acesso em: 19 jul 2015.

EMBRAPA/CPAFAP, 2008. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Universitários estudam mudas de pracaxi no viveiro da Embrapa. Disponível em: < http://www.cpafap.embrapa.br/embrapa/?p=625>. Acesso em 25 jun. 2012.

EKHOL, S.V.; ZICKERT, P.; REED, S.L.; ZETTERBERG, A. Accumulation of cyclin E is not a prerequisite for passage through the restriction point. Mol Cell Biol 21: 3256-3265, 2001.

EKIM, B.; MAGNUSON, B.; ACOSTA-JAQUEZ, H. A.; KELLER, J. A.; FEENER, E. P.; FINGAR, D. C. mTOR Kinase Domain Phosphorylation Promotes mTORC1 Signaling, Cell Growth, and Cell Cycle Progression. Mol. Cel. Biology, v. 31, n.14, p. 2787–2801, 2011.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The Comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 339, 1995.

FENECH M, MORLEY AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research**, v. 147, n.1-2, p. 29–36, 1985.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research,** v. 600, p. 58-66, 2006.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. Mutation Research, v. 455, p. 81-95, 2000.

FUGH-BERMAN, A. Herb-drug interactions. **Lancet,** v. 355, p. 134-138, 2000.

GIBCO.**Cell Culture Basics**.Life technologies, 2015.

GONTIJO, A. M. de M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003.

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

GUIMARÃES, A.L.; CUNHA, E.A.; MATIAS, F.O.; GARCIA, P.G.; DANOPOULOS, P.; SWIKIDISA, R.; PINHEIRO, V.S.; NOGUEIRA, R.J. Antimicrobial Activity of Copaiba (Copaifera officinalis) and Pracaxi (*Pentaclethra macroloba*) oils against *Staphylococcus aureus*: Importance in Compounding for wound care.**Int J Pharm Compd**.v.20, n.1, p.58-62, 2016.

GICHNER, T.; PLEWA, M. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants. Mutation Research, v. 401, p. 143-52, 1998.

HAAN, J.B.; CRACK, P.J.; FLENTJAR, N.; IANNELLO, R.C.; HERTZOG, P.J.; KOLA, J. An imbalance in antioxidant defense affects cellular function: the pathophysiological consequences of a reduction in antioxidant defense in the glutathione peroxidase-1 (Gpx1) knockout mouse. **Redox Report**, v.8, n.2, p.69-79, 2003.

HAN, S.; GUO, J.; LIU, Y.; ZHANG, Z.; HE, Q.; LI, P.; ZHANG, M.; SUN, H.; LIL, R.; LI, Y.; ZENG, W.; LIU, J.; LIAN, L.; GAO, Y. SHEN, L.; Knock out CD44 in reprogrammed liver cancer cell C3A increases CSCs stemness and promotes differentiation. **Oncotarget**, v.6, n.42, 2015.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.A.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. Mutagenesis, v. 18, p. 45-51, 2003.

HARTSHORN, G. S. 1972. The ecological life history and population dynamics *of Pentaclethra macroloba*, a tropical wet forest dominant and *Stryphnodendron excelsum*, an occasional associate. Ph. D. Diss., University of Washington, Seattle, WA.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. Twenty years of research into medicinal plants: results and perspectives. Phytochemistry Reviews, v. 1, p. 275-285, 2002.

JEONG, H.G., 1999. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid: hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. Toxicology Letters 105, 215–222.

JUNIOR, J.C. M.; FLORÃO, A.; MATTANA, F. V.R.; ROCHA, F. H.; SANTOS, C.A.M.; WEFFORT-SANTOS, A. M. A citometria de fluxo como instrumento de avaliação da atividade imunomodulatorioa de extratos e substancias isoladas de plantas medicinais. Brazilian Journal of Pharmacognosy v.16, p.645-655. 2006.

KELLY, K.R.; ROWE, J.H., PADMANABHAN, S.; NAWROCKI, S.T., CAREW, J.S. Mammalian target of rapamycin as a target in hematological malignancies. **Target Oncol**, v.6, n.1, p.53-61, 2011.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J. & AHNSTROM, G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. Mutation Research, v.363, p.89-96, 1996.

KIM, K.A.; LEE, J. S.; PARK, H.; KIM, J.; KIM, C.; SHIM, I.; KIM, N.; HAN, S.; LIM, S. Inhibition of cytochrome P450 activities by oleanolic acid and ursolic acid in human liver microsomes. Life Sciences, v.74, p. 2769–2779, 2004.

LAMY, E.; KASSIE, F.; GMINSKI, R.; SCHMEISER, H.H.; MERSCH-SUNDERMANN, V. 3-Nitrobenzanthrone (3-NBA) induced micronucleus formation and DNA damage in human hepatoma (HepG2) cells. **Toxicology Letters**, v.146, p.103-109, 2004.

LEAL, I.C.R.; JÚNIOR, I.I.; PEREIRA, E.M.; LAPORT, M.S.; KUSTER, R.M.; dos SANTOS, K.R.N. *Pentaclethra macroloba* tannins fractions active against methicillin-resistant staphylococcal and Gram-negative strains showing selective toxicity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 21, p. 991-999, 2011.

LEVIN, R.M.; DAS, A.K. A scientific basis for the therapeutic effects of *Pygeum africanum* and *Serenoa repens*. Urol Res, v.28, n.3, p.201-9, 2000.

LIU, B.; ZHOU, J.; LI, Y.; ZOU, X.; WU, J.; GU, J.; YUAN, J.; ZH
AO, B.; FENG, L.; JIA, X.; WANG, R. Hederagenin from the leaves of ivy (*Hedera helix L.*) induces apoptosis in human LoVo colon cells through the mitochondrial pathway. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.14, p.412, 2014.

LIU, X.X.; YANG, Y.T.; WANG, X.; WANG, K.Y.; LIU, J.Q.; LEI, L.; LUO, X.M.; ZHAI, R.; FU, F.H.; WANG, H.B. Design synthesis and biological evaluation of novel α-hederagenin derivatives with anticancer activity. **Eur. J. Med. Chem.** v.141, p.427–439, 2019.

LUBOS, E.; LOSCALZO, J.; HANDY, D.E. Glutathione preoxidase-1 in health and desease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. **Antioxidants & Redox signaling**, v. 15, n. 7, p.1957-1997, 2011.

MA, C.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M.; KAKUDA, H.; QIAO, J.; YU, H. Inhibitory effects on HIV-1 protease of constituents from the wood of Xanthoceras sorbifolia. Journal of Natural Products 63, 238–242, 2000.

MACEY, M.G. 1994. **Flow cytometry - clinical applications**. Oxford: Blackwell Scientifi c Publications.

MALACINSKI, G. M. **Fundamentos de Biologia Molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B. Biomonitorização do Dano Genético em Humanos. In: SILVA, J. da; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

MAISTRO, E.L.; MARQUES, E. S.; TSUBOY, M.S.F. Cytotoxic and genotoxic assessment of Euterpe oleracea fruit oil and Pentaclethra macroloba oil in human peripheral lymphocytes. Abstracts/Toxicology Letters, v.221S, p.59–256, 2013.

MATIKAINEN, T.; PEREZ, G.I.; ZHENG, T.S.; KLUZAK, T.R.; RUEDA, B.R.; FLAVELL, R.A.; TILLY, J.L. **Caspase-3 Gene Knockout Defines Cell Lineage Specificity for Programmed Cell Death Signaling in the Ovary.** Endocrinology, v. 142, n. 6, p. 2468-2480, 2001.

MENDES, J. **Modulação do efeito mutagênico por fitoestrógenos *in vitro* e *in vivo***. Dissertação de Mestrado. Londrina: UEL, 2008.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. Journal oflmmunological Methods, v.65, p.55-63, 1983.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. Natural Product Reports, v. 17, p. 215– 234, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981–2002. Journal of Natural Products, v. 66, p. 1022–1037, 2003.

NGUYEN, L.P.; BRADFIELD, C.A. The Search for Endogenous Activators of the Aryl Hydrocarbon Receptor. **Chem Res Toxicol**, v.21, n.1, p.102-116, 2008.

PEREIRA, E.; FERREIRA, M. C.; SAMPAIO, K. A. GRIMALDIB, R.; MEIRELLESA, A. J. A.; MAXIMO, G. J. Physical properties of Amazonian fats and oils and their blends. Food Chemistry, V.278, P.208–215, 2019.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon,** v. 39, p. 603-613, 2001.

REIFFERSCHEID, G.; HEIL, J. Validation of SOS/*umu* test using results of 486 chemicals and comparison with the Ames test and carcinogenicity data. **Mutation Research**, v. 369, p. 129-145, 1996.

REZGUI, A.; MITAINE-OFFER, A.; MIYAMOTO, T.; TANAKA, C.; DELEMASURE, S.; DUTARTRE, P.; LACAILLE-DUBOIS, M.; Oleanolic acid and hederagenin glycosides from *Weigela stelzneri*. **Phytochemistry**, v.123, p.40–47, 2016.

RIBEIRO, L. R; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003.

RISS, T.L.; MORAVEC, R.A.; NILES, A.L.; Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G.S.; COUSSENS, N.P.; BRIMACOMBE, K. **Assay Guidance Manual**. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

ROBINSON, J.P. 1993. **Handbook of fl ow cytometry methods.** New York: Willey-Liss, Inc.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, D.; DEMUNER, A.J.; BARBOSA, L.C.A.; CSUK, R.; HELLER, L. Hederagenin as a triterpene template for the development of new antitumor compounds. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.105, p.57-62, 2015.

RODRIGUEZ-HERNANDEZ, D.; BARBOSA, L.C.A.; DEMUNER, A.J.; NAIN-PEREZ, A.; FERREIRA, S.R.; FUJIWARA, R.T.; ALMEIDA, R.M.; HELLER, L.; CSUK, R. Leishmanicidal and cytotoxic activity of hederagenin-bistriazolyl Derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.140, p.624-635, 2017.

SALVADOR, J.A.R. Pentacyclic triterpenes as promising agents in cancer. New York : Nova Science, 2010.

SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L. R; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003.

SANTIAGO, G.M.P.; VIANA, F.A.; PESSOA, O.D.L.; SANTOS, R.P.; POULIQUEN, Y.B.M.; ARRIAGA, A.M.C.; ANDRADE-NETO, M.; BRAZ-FILHO, R. Avaliação da atividade larvicida de saponinas triterpenicas isoladas de *Pentaclethra macroloba* (Willd.) Kuntze (Fabaceae) e *Cordia piauhiensis* Frensen (Boraginaceae) sobre *Aedes aegypti*. **Rev. Bras.de Farmacognosia,** v.15, n.3, p.187-190. 2005.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagens and carcinogens. **Mutation Research,** v. 544, p. 99-106, 2003.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SIMMONS, C.V.; BANOV, F.; BANOV, D. Use of a topical anhydrous silicone base containing fatty acids from pracaxi oil in a patient with a diabetic ulcer. **Medicinal Case Reports**, v.3, p.1-4, 2015.

SINGH, D.; KASHYAP, A.;.PANDEY, R.V.; SAINI, K.S. Novel advances in cytochrome P450 research. **Drug Discov Today**, v.16, n.17-18, p.793-9, 2011.

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 cells. **Experimental Cell Research,** v.175, p.184-191, 1988.

SUFFREDINI, I.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. Cytotoxic molecules from natural sources: tapping the Brazilian biodiversity. A**nti-Cancer Agent in Medicinal Chemistry,** v.6, p.367-375, 2006.

TANG, H.Q.; HU, J.; YANG, L.; TAN, R.X. Terpenoids and flavonoids from Artemisia species. Planta Medica 66, 391–393, 2000.

TEIXEIRA, R.S..; ROCHA, P.R.; POLONINI, H.C.; BRANDÃO, M.A.F.; CHAVES, M.G.A.M.; RAPOSO, N.R.B. Mushroom tyrosinase inhibitory activity and major fatty acid constituents of Amazonian native flora oils. Braz. J. Pharm. Sci., v.48, n.3, 2012.

TICE, R. R. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, 2000.

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: Guideline for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis,** v. 35, p. 206-221, 2000.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR**. Adv. Physiol Educ**,v.29, n.3,p.151-159, 2005.

VALENTIN-SEVERIN, I. et al. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **MutationResearch**, v. 536, 2003.

VEITH, H. Comprehensive characterization of cytochrome P450 isozyme selectivity across chemical libraries. **Nat. Biotechnol.** v.27, p.1050–1055, 2009.

VIANA, F.A.; BRAZ-FILHO, R.; POULIQUEN, Y.B.M.; NETO, M.A.; SANTIAGO, G.M.P.; RODRIGUES-FILHO, E. Triterpenoids saponins from stem bark of *Pentaclethra macroloba.* **Journal of the Brazilian Chemical Society,** v. 15, p. 595-602. 2004.

VILLELA, V. I. et al.Bioensaios para Monitoramento de Genotoxicidade Ambiental.In: SILVA, J. da; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. (org.). **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

WENUM, M.V.; ADAM, A.A.A.; HAKVOORT, T.B.M.; HENDRIKS, E.; SHEVCHENKO, V.; GULIK, T.M.V.; CHAMULEAU, R.A.F.M.; HOEKSTRAL, R. Selecting Cells for Bioartificial Liver Devices and the Importance of a 3D Culture Environment: A Functional Comparison between the HepaRG and C3A Cell Lines. **Int J Biol Sci**, v.12, n.8, p.964-978, 2016.

WITTE, I.; PLAPPERT, U.; WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the best science for human evaluation Part III: The Comet Assay as an alternative to in vitro clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicological Sciences,** v. 97, p. 21-26, 2007.

WANG, J.; ZHAO, X.Z.; QI, Q.; TAO, L.; ZHAO, Q.; MU, R.; GU, H.Y.; WANG, M.; FENG, X.; GUO, Q.L.; Macranthoside B, a hederagenin saponin extracted from *Lonicera*

macranthoides and its anti-tumor activities in vitro and in vivo. **Food Chem. Toxicol.** v.47, p.1716–1721, 2009.

ZHOU, S.; KOH, H.; GAO, Y.; GONG, Z.; LEE, E.J.D. Herbal bioactivation: The good, the bad and the ugly. **Life Sciences,** v. 74, p. 935-968, 2004.