

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

MARCUS VINÍCIUS SILVA WEIGEL GOMES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS BRUTO E  
FRAÇÕES DE PRODUTOS NATURAIS EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA**

MACEIÓ/AL  
2022

MARCUS VINÍCIUS SILVA WEIGEL GOMES

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DE EXTRATOS BRUTO E  
FRAÇÕES DE PRODUTOS NATURAIS EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA**

Trabalho de conclusão de curso apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para a obtenção do grau de bacharel em Odontologia.

Orientador: Professor Dr. Renato Santos Rodarte

MACEIÓ/AL  
2022

**Catálogo na Fonte Universidade  
Federal de Alagoas Biblioteca Central  
Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

G633a Gomes, Marcus Vinícius Silva Weigel.  
Avaliação do potencial antitumoral de extratos bruto  
e frações de produtos naturais em linhagens de câncer  
de mama / Marcus Vinícius Silva Weigel Gomes. – 2022.  
72 f. : il.

Orientador: Renato Santos Rodarte.  
Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso em  
Odontologia) – Universidade Federal de Alagoas.  
Faculdade de Odontologia. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 65-72.

1. Neoplasias da mama. 2. Antineoplásicos. 3.  
Citotoxicidade. 4. Produtos biológicos. 5. Ensaio

Dedico este trabalho as mulheres da minha vida,  
que me ensinam diariamente sobre dedicação,  
leitura, sonhos, paciência e amor: minha mãe  
**Rita** e minha avó **Eurides**. Que eu possa ser  
metade do indivíduo que vocês são para mim.  
Mãe, Que a chance de cura que apresento aqui  
possa se tornar realidade em ti.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos familiares que me deram suporte físico e mental para fechar esse ciclo. São eles: minha avó Eurides, minha mãe Rita de Cássia e meu paidrasto Paulo, minhas tias Rosa Maria e Carla Andreia e meu tio e padrinho Hoffman. Espero ter honrado o esforço depositado para que conseguisse um título que muitos em nossa família não puderam antes de mim;

Agradeço aos meus amigos de ensino médio, em especial o “piada”, por aguentarem os surtos e as ausências durante a fase mais pesada da graduação e da vida de pesquisador. Se os planos derem certos, agora chegar à parte em que ficamos ricos e tudo vale a pena (risos). Vocês são os irmãos que eu não tive. Amo vocês;

Agradeço também ao “sonhar” e aos demais colegas de trajetória na odontologia, especialmente as minhas “bucos” Yasmin e Elenisa. Ter uma base em casa é essencial, mas nós sabemos como foi olhar para o lado nos momentos críticos e ter alguém passando pela mesma situação, mas ainda com uma palavra ou gesto de força para oferecer;

Aos professores, técnicos e demais funcionários da FOUFAL, minha gratidão pelo apoio durante os momentos em que dividimos os mesmos espaços. Que todo ensinamento passado possa ser praticado com excelência, compensando os anos de esforço e dedicação investidos em nós;

Agradeço ao meu orientador, o “pai” Renato Santos Rodarte, e a minha “irmã (e agora mãe) mais velha”, Tayhana Priscilla Medeiros Souza. Vocês acolheram um Marcus moleque, com muitas ideias e pouco conhecimento da realidade da pesquisa nesse país. A paciência e o zelo de vocês me transformaram num homem, em alguém que consegue organizar as ideias, executá-las e chamar a atenção para a problemática real abordada. O caminho da pesquisa talvez tenha sido o que mais exigiu fisicamente de mim. Imagino quão penoso também foi para vocês. Dito isso, essa trajetória resultou nas minhas primeiras viagens enquanto pesquisador, em congressos, momentos de comilanças, fofocas, alguns surtos e amnésias, correções de relatórios,

premiações e, claro, o tão sonhado prêmio de EXCELÊNCIA ACADÊMICA. Se há algo de que eu possa me orgulhar, estufando o peito para me gabar mesmo, é do fato de vocês terem me incentivado a me tornar a melhor versão de mim. Peço desculpas pelo trabalho que dei no processo, mas o escolheria novamente todas as vezes que me fosse oferecido;

Tanto tempo no ICBS não poderia ter sido passado sem a colaboração, apoio e troca de ideias com demais pesquisadores. Aos Orientados, alunos de graduação e pós-graduação e técnicos dos laboratórios, em especial do LBCM, LBC, LAFI e LAPEVI, meu agradecimento. Um abraço especial para a equipe “Lapevista”: Ana Rachel, Grazi, Júlia e Elane. Estas sim compartilharam de água destilada a análises de experimentos aos finais de semana;

Ao professor Dr. Ênio Bassi, meu respeito e agradecimento por, além de fazer parte do meu ciclo de graduação, dividindo os conhecimentos e espaços para pesquisa, aceitou encerrar este ciclo compondo a banca do TCC;

Por fim, em tempos de pós-pandemia, de eleição de um desgoverno fascista e mentiroso, rogo que meus compatriotas olhem para esta época com um olhar crítico do que nunca mais gostaremos de presenciar em nosso país: orçamento público sequestrado, mais de 600 mil mortes que poderiam ser evitadas, desmatamento recorde, violência contra população pobre, preta, periférica e LGBTQIA+. Um teto de gastos apenas para saúde e educação pública não é teto, é falta de investimento em quem mais precisa;

Se esse caminho de provações no cenário político me ensinou algo, foi a lutar pelos direitos da maioria (sucateados por uma minoria dita conservadora e neoliberal) e valorizar os que nos iluminam, incentivam e somam a nossa luta. Os dois últimos parágrafos são especialmente focados em pessoas assim;

Agradeço de forma separada a três pessoas que somaram muito para meu crescimento pessoal e profissional: minha dupla de graduação Fernanda Lima, minha dupla de laboratório Islane Caroline e minha dupla de LIACCCO Vanessa Pontes.

Desde a primeira semana do curso cruzamos nossos caminhos, e rogo para que este elo se estreite nas caminhadas restantes de nossas vidas.

Agradeço ao carnaval de Olinda, a rua treze (tinha que ser de esquerda) por me apresentar um rapaz Paraibano que escolhi dividir a vida comigo. Ao meu namorado, José Alves Júnior (Jalves), agradeço por ser a luz que indica o caminho e se soma à minha, em especial quando ela fraqueja. A vida é muito mais bela por eu ter você nela.

“Os lugares mais quentes no inferno são reservados àqueles que escolheram a neutralidade em tempo de crise”

*Henry Powell Spring*

“Se a classe operária tudo produz, a ela tudo pertence”

*Karl Marx*

## RESUMO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o câncer é a 2ª maior causa de morte no mundo, ficando atrás apenas de doenças cardiovasculares. O maior desafio na terapia contra o câncer é a resistência à quimioterápicos e recorrência da doença pós-quimioterapia, devido ao surgimento de células-tronco tumorais. Nesse contexto, a busca por compostos ativos derivados de produtos naturais vem aumentando, visto que muitos isolados já deram origem a vários medicamentos utilizados na medicina alopática, como Vinblastina, Vincristina e Paclitaxel. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial antitumoral de um extrato da planta *Arrabidaea chica* e quatro da macroalga *Hypnea musciformis* nas linhagens tumorais de mama *Ehrlich ascitic câncer* (EAC) e 4T1. Após realizar triagem dos extratos pelo ensaio de viabilidade celular por MTT, os extratos que mostraram maiores inibições da viabilidade celular permitiram o cálculo de concentrações inibitórias (IC<sub>50</sub>). A partir destes valores, os ensaios *Tripán blue*, micronúcleo e espécies reativas de oxigênio (EROs) foram realizados, a fim de aprofundar o estudo nas linhagens tumorais. O extrato bruto de *Arrabidaea chica* (EBAc) apresentou efeito na viabilidade da linhagem EAC após 24 horas, enquanto o extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (EBDHm) apresentou após 48 horas de tratamento para a linhagem 4T1. A fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm) apresentou atividade antitumoral para ambas as linhagens testadas (EAC e 4T1), permitindo cálculo de concentrações inibitórias em 48 horas para EAC e 24 e 48 horas para 4T1. Não foi observada indução de morte das linhagens utilizadas no ensaio *Tripán blue*, após tratamento com as concentrações inibitórias (IC<sub>50</sub>) calculadas, além da ausência da formação de micronúcleos celulares. Para FCHm na linhagem EAC, sugere-se uma diminuição no metabolismo celular, com a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: câncer de mama, atividade antitumoral, citotoxicidade, produtos naturais e ensaio MTT.

## ABSTRACT

According to the World Health Organization, cancer is the 2nd leading cause of death in the world, behind only to cardiovascular disease. The biggest challenge in cancer therapy is resistance to chemotherapy and post-chemotherapy disease recurrence due to the emergence of tumor stem cells. In this context, the search for active compounds derived from natural products has been increasing, since many isolates have already given rise to several drugs used in allopathic medicine, such as Vinblastine, Vincristine and Paclitaxel. The aim of this research was to assess the antitumor potential of one extract from the plant *Arrabidaea chica* and four from the macroalgae *Hypnea musciformis* in breast tumor cell lines Ehrlich ascitic cancer (EAC) and 4T1. After screening the extracts using the MTT cell viability assay, the extracts that showed greater inhibition of cell viability allowed the calculation of inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ). Based on these values, the Tripan blue, micronucleus and reactive oxygen species (ROS) assays were carried out in order to deepen the study of tumor cell lines. The crude extract of *Arrabidaea chica* (EBAc) showed an effect on the viability of the EAC strain after 24 hours, while the crude dichloromethane extract of *Hypnea musciformis* (EBDHm) showed after 48 hours of treatment for the 4T1 strain. The chloroform fraction of the crude dichloromethane extract of *Hypnea musciformis* (FCHm) showed antitumor activity for both strains tested (EAC and 4T1), allowing calculation of inhibitory concentrations at 48 hours for EAC and 24 and 48 hours for 4T1. No induction of death was observed in the strains used in the Tripan blue assay, after treatment with the calculated inhibitory concentrations ( $IC_{50}$ ), in addition to the absence of cell micronucleus formation. For FCHm in the EAC strain, a decrease in cellular metabolism is suggested, with a decrease in the production of reactive oxygen species.

Keywords: breast cancer, antitumor activity, cytotoxicity, natural products and MTT assay.

## SUMÁRIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2. <b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
2.1 Câncer.....	14
2.1.1 Epidemiologia.....	14
2.1.2 Conceitos e características gerais.....	15
2.2 Tratamento e mecanismos de resistência tumoral.....	18
2.3 Produtos naturais como perspectiva de futuros fármacos.....	20
2.3.1 <i>Arrabidaea chica</i> .....	22
2.3.2 <i>Hypnea musciformis</i> .....	23
3. <b>OBJETIVOS</b> .....	25
4. <b>MATERIAIS E MÉTODO</b> .....	26
4.1 Extratos e produtos químicos.....	26
4.2 Animais experimentais.....	26
4.3 Linhagens celulares e cultivo.....	26
4.3.1 Células EAC e 4T1.....	26
4.3.2 Cultivo.....	29
4.4 Ensaio de viabilidade celular MTT.....	30
4.5 Ensaio de viabilidade celular <i>Tripán blue</i> .....	31
4.6 Ensaio de micronúcleo.....	32
4.7 Ensaio de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	32
4.8 Análise estatística.....	33
5. <b>RESULTADOS</b> .....	33
5.1 Resultado do ensaio da viabilidade das células EAC <i>in vitro</i> pelo ensaio MTT.....	36
5.2 Resultado da padronização do controle positivo em EAC <i>in vitro</i> , pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas.....	37
5.3 Resultado do efeito do extrato bruto aquoso de <i>Arrabidaea chica</i> (EBAc) em EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas.....	40
5.4 Resultado do efeito do extrato bruto diclorometano de <i>Hypnea musciformis</i> (EBDHm) em EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas.....	43

5.5	Resultado do efeito do extrato bruto etanólico de <i>Hypnea musciformis</i> (EBEHm) em EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas.....	43
5.6	Resultado do efeito da fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de <i>Hypnea musciformis</i> (FCHm) em EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas.....	45
5.7	Resultado do efeito da fração hexano do extrato bruto diclorometano de <i>Hypnea musciformis</i> (FHHm) em EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas.....	49
5.8	Resultado do efeito das IC <sub>50</sub> de <i>Arrabidaea chica</i> e <i>Hypnea musciformis</i> em EAC no ensaio <i>Tripan blue</i> .....	51
5.9	Resultado dos efeitos das IC <sub>50</sub> de <i>Arrabidaea chica</i> e <i>Hypnea musciformis</i> em EAC no ensaio micronúcleo.....	52
5.10	Resultado dos efeitos das IC <sub>50</sub> de <i>Arrabidaea chica</i> e <i>Hypnea musciformis</i> em EAC no ensaio de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	55
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	57
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	64
8	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	64
9	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	65



## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é a 2ª doença que mais mata no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (OMS, 2018). O número de casos de câncer tem aumentado de maneira considerável em todo o mundo, principalmente a partir do século passado, configurando-se, na atualidade, como um dos mais importantes problemas de saúde pública mundial (GUERRA et al., 2005).

Atrasos no diagnóstico e no início do tratamento do câncer de mama aumentam a ansiedade sentida pelas mulheres e podem impedir tratamentos curativos, reduzindo as taxas de sobrevivência (SOUZA et al., 2008). A história do câncer de mama indica que o curso clínico da doença e a sobrevida variam de paciente para paciente. Esta variação é determinada por uma série complexa de fatores, tais como a diferença na velocidade de duplicação tumoral, o potencial de metástase do tumor e outros mecanismos relacionados com a condição imunológica, hormonal e nutricional do paciente (SOUZA et al., 2008 e SARTORI & BASSO, 2019).

O tratamento do câncer de mama dependerá do estadiamento e do tipo de tumor. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (2020), pode-se incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia alvo. Em muitos casos, com a combinação destas terapias.

O maior desafio na terapia contra o câncer é a resistência à quimioterápicos e a recorrência da doença pós-quimioterapia, devido ao surgimento de células-tronco tumorais. Estas populações celulares apresentam mecanismos de resistência responsáveis pela queda na taxa de sucesso do tratamento (BARBATO et al., 2019).

O uso terapêutico de produtos naturais pertence a práticas médicas mais antigas. A OMS estima que quase 80% da população mundial utiliza plantas como drogas, especialmente nos países em desenvolvimento (WANG; CALWAY & YUAN, 2012). Devido à problemática acima abordada, a busca por compostos ativos derivados de produtos naturais vem aumentando, visto que muitos isolados já deram origem a vários medicamentos utilizados na medicina alopática, além de possuírem chances menores de causar efeitos colaterais (SULTANA et al., 2014).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer

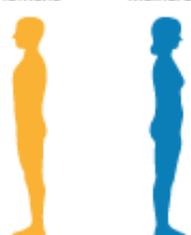
#### 2.1.1 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer é a segunda doença que mais mata no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. Foi responsável por 9,6 milhões de mortes em 2018, das quais 70% foram em países de média e baixa renda. O câncer de mama foi responsável por 2.09 milhões de casos em 2018, dividindo a 1ª colocação em incidência com o câncer de pulmão e ocupando a 5ª posição em mortalidade, com 627 mil vítimas.

Em 2017, apenas 26% dos países de baixa renda relataram ter serviços de patologia disponíveis no setor público. Mais de 90% dos países de alta renda relataram que os serviços de tratamento estão disponíveis, em comparação com menos de 30% dos países de baixa renda. Para agravar ainda mais esse quadro, o custo anual do combate à doença aumenta a cada ano. O custo anual total da doença em 2010 foi estimado em aproximadamente US\$ 1,16 trilhão (OMS, 2022).

A estimativa do INCA para o triênio de 2020-2022 indica que, no Brasil, ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma). O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama feminina ocupa a primeira posição, sendo mais frequente em todas as Regiões brasileiras (como demonstrado na figura 1), com um risco estimado de 81,06 por 100 mil na Região Sudeste; de 71,16 por 100 mil na Região Sul; de 45,24 por 100 mil na Região Centro-Oeste; de 44,29 por 100 mil na Região Nordeste; e de 21,34 por 100 mil na Região Norte.

**Figura 1: Tabela com a distribuição dos tipos de câncer mais incidentes no Brasil por sexo, em 2020, de acordo com o INCA.**

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Côlon e reto	20.520	9,1%			Côlon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.890	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2020.

Não existe somente um fator de risco para câncer de mama, no entanto a idade acima dos 50 anos é considerada o mais importante. Outros fatores que contribuem para o aumento do risco de desenvolver a doença são fatores genéticos (mutações dos genes BRCA1 e BRC2) e fatores hereditários (câncer de ovário na família), além da menopausa tardia (fatores da história reprodutiva e hormonal), obesidade, sedentarismo e exposições frequentes a radiações ionizantes (fatores ambientais e comportamentais) (BRAY et al. 2018; INCA, 2019).

Como estratégias de prevenção, a OMS recomenda evitar os fatores de riscos como: fumo, exposição a radiações, álcool. Além do controle de riscos ocupacionais, a organização reforça a vacinação contra vírus da hepatite B e HPV, além da realização de exames de rotina para detecção precoce, como a mamografia.

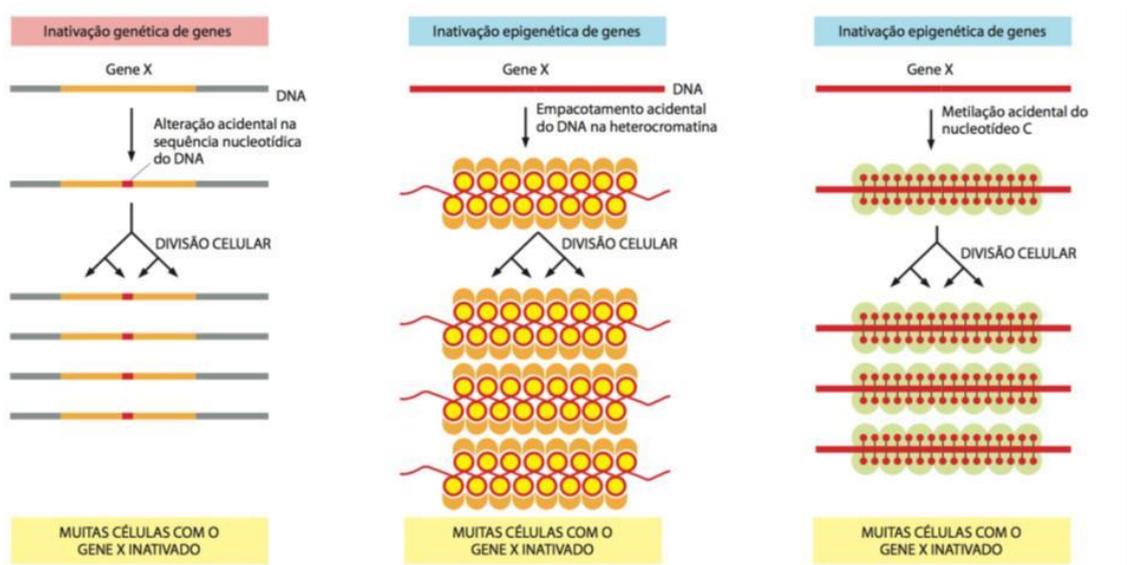
O INCA destaca que a prevenção do câncer de mama baseia-se no controle dos fatores de risco modificáveis e na promoção de fatores de proteção, como: praticar atividade física, manter o peso corporal adequado, adotar uma alimentação mais saudável e evitar ou reduzir o consumo de bebidas alcóolicas. Amamentar é uma prática protetora e deve ser incentivada e realizada pelo maior tempo possível.

### 2.1.2 Conceitos e características gerais

Para o INCA, o câncer é um nome que designa vários grupos de doenças, devido a peculiaridades de acordo com a célula lesada. De acordo com Robbins et al. (2016), o câncer é uma desordem genética causada por mutações do DNA que, em sua maior parte, são adquiridas espontaneamente ou induzidas por agressões do

ambiente. Além disso, os cânceres geralmente mostram alterações epigenéticas, como o aumento focal da metilação de DNA e alterações nas modificações da histona, as quais por sua vez se originam de mutações adquiridas em genes que regulam essas modificações, como esquematizado na figura 2. Essas alterações modificam a expressão ou função de genes-chave que regulam os processos celulares fundamentais, como crescimento, sobrevivência e senescência, e são passadas para as células-filhas na divisão celular.

**Figura 2: Comparação entre as alterações genéticas e epigenéticas nos tumores** - As alterações epigenéticas tem como base alterações que, apesar de serem passadas via célula-célula, podem ser revertidas por mudanças sítio-específicas na modificação de histonas, ou desmetilação sítio-específica do DNA.



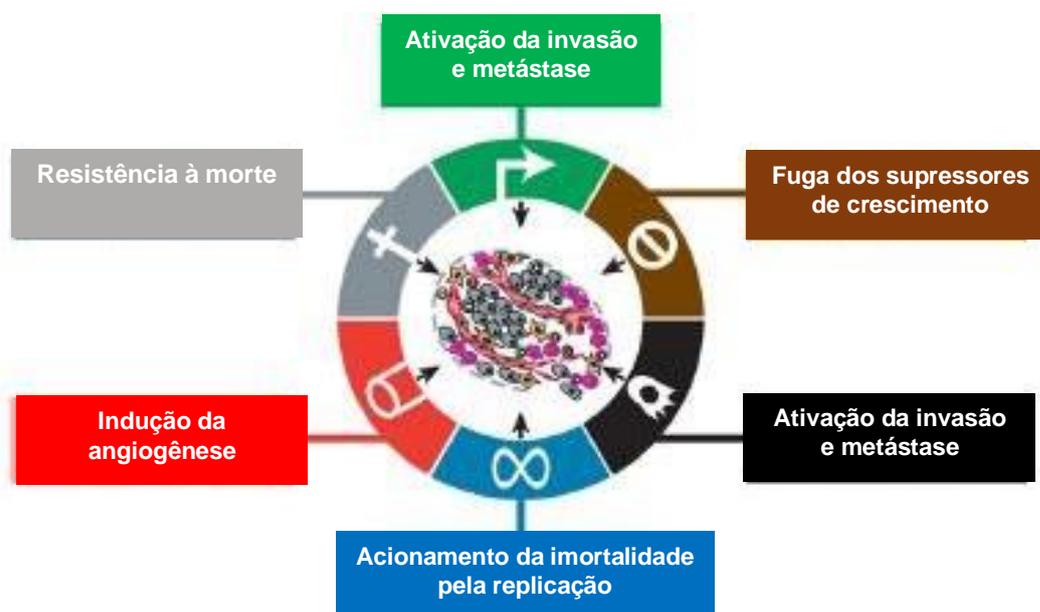
Fonte: Alberts et al., 2017.

Para Hanahan & Weinberg (2011), Robbins et al. (2016) e Alberts et al. (2017), esse conjunto de mutações dá origem a uma série de características principais (figura 3), como:

- 1) autossuficiência nos sinais de crescimento, com ausência de resposta aos sinais inibidores que controlam as proliferações celulares;
- 2) Adquirem maneiras para estabilizar seus telômeros ou produzem telomerase;
- 3) evasão da morte celular, permitindo que as células cancerosas sobrevivam sob condições que induzem apoptose em células normais;
- 4) potencial replicativo ilimitado;

- 5) desenvolvimento da angiogênese para sustentar o crescimento;
- 6) capacidade de invadir tecidos locais e disseminar-se para locais distantes;
- 7) reprogramação das vias metabólicas;
- 8) Evasão do sistema imune.

**Figura 3: As principais características do câncer** - A ilustração contempla as seis principais características comportamental no processo de carcinogênese, originalmente propostas na perspectiva dos anos 2000.



Fonte: Hanahan & Weinberg, 2011.

Os radicais livres também desempenham um papel importante na carcinogênese, sejam como iniciadores, sejam como promotores. O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua eliminação por mecanismos de proteção, conhecidos como antioxidantes (DURACKOVA, 2009). As EROs são produzidas pela atividade mitocondrial e atuam em ações como sinalização celular em resposta a estresse. Proteínas e lipídios também são alvos significativos para o ataque oxidativo, e a modificação dessas moléculas pode aumentar o risco de mutagênese (REUTER et al., 2011). Nas reações metabólicas endógenas, as células aeróbicas produzem EROs como o ânion superóxido ( $-O_2$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical hidroxila ( $-OH$ ), e peróxidos orgânicos (POYTON et al., 2009). Em casos de estresse prolongado, com alto acúmulo de EROs, alterações severas podem ocorrer na célula,

induzindo danos no DNA ou agravando mutações existentes (VISCANTI & GRIECO, 2009 e REUTER et al., 2011).

Dentre as alterações genéticas encontradas no câncer, algumas são consideradas críticas para o desenvolvimento do tumor, pois codificam componentes de vias bioquímicas que regulam o comportamento social das células, que também influenciam as células vizinhas (ALBERTS, et al., 2017). Uma lista de proteínas codificadas por proto-oncogenes e genes supressores de tumor inclui exemplos de praticamente todos os tipos de proteínas envolvidas em sinalização, como: proteínas-sinal secretadas, receptores transmembrana e proteínas reguladoras de genes. Os componentes das vias de sinalização que normalmente funcionam para inibir a proliferação celular frequentemente aparecem como supressores de tumor (HANAHAN & WEINBER, 2011; ROBBINS et al., 2016; ALBERTS, et al., 2017).

Dentre os fatores genéticos para o câncer de mama, o INCA destaca BRCA1 e BRCA2 como os mais frequentes. As situações que podem indicar predisposição hereditária ao câncer de mama, e que conferem risco elevado de desenvolvimento da doença, são: possuir vários casos de câncer de mama e/ou pelo menos um caso de câncer de ovário em parentes consanguíneos, sobretudo em idade jovem, ou câncer de mama em homem também em parente consanguíneo. O câncer de mama de caráter hereditário corresponde de 5% a 10% do total de casos (ADAMI et al., 2008; Breast Cancer Association Consortium, 2021 e INCA, 2022).

## 2.2 Tratamento e mecanismos de resistência tumoral

O INCA (2020) preconiza como tratamento, de maneira geral, a cirurgia, quimioterapia, radioterapia e/ou transplante de medula óssea. Em muitos casos, com combinação destas terapias. O tratamento do câncer de mama dependerá do estadiamento e tipo do tumor, podendo incluir cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e terapia alvo.

A perspectiva de tratamento, com maior grau de eficiência, continua sendo a quimioterapia. O principal entrave é que a maioria dos fármacos utilizados atingem também as células saudáveis, gerando imunotoxicidade que além de afetar o desenvolvimento do tumor, também pode complicar o quadro clínico do paciente (ZANDI, 2010).

Como efeitos colaterais, o paciente pode apresentar: queda de cabelo, prisão de ventre, diarreia, feridas na boca e surgimento de infecções oportunistas, náuseas, anemias, fraqueza, escurecimento da visão, dentre outros (INCA, 2022).

O maior desafio na terapia contra o câncer é a resistência à quimioterápicos e recorrência da doença pós-quimioterapia, devido ao surgimento de células-tronco tumorais (BARBATO et al., 2019). Estas populações celulares apresentam mecanismos de resistência responsáveis pela queda na taxa de sucesso do tratamento, como aumento na expressão de transportadores ABC para efluxo de drogas, resistência a apoptose, ativação da maquinaria de reparo do material genético e modulação do microambiente tumoral, ilustrados na figura 4 (BARBATO et al., 2019 e GARCIA-MAYEA, 2019).

Dentre os mecanismos de resistência, pode-se destacar a proteína de resistência ao câncer de mama (*breast cancer resistance protein* - BCRP/ABCG2), identificada pela primeira vez, em 1998, por Doyle e colaboradores na linhagem MCF-7. Expressando-se altamente em linhagens resistentes a tratamentos, BCRP é um transportador forte e com ampla especificidade de substrato, incluindo a maioria das drogas anticancerígenas, como metotrexato, doxorrubicina, bisantreno, irinotecano, etoposido, inibidor de tirosina quinase (imatinibe, flavopiridol), ambos com carga positiva, além de moléculas carregadas negativamente, bem como moléculas solúveis em água (SARASWATHY & GONG, 2013; KUMAR & JAIKAT, 2019).



câncer até 2010, 90 são derivados de fontes vegetais (QURISHI et al., 2010 e SINGH et al., 2018).

A revisão de Singh *et al.* (2018) exemplifica uma ampla gama de drogas anticancerígenas de origem vegetal derivadas de três tipos principais de metabólitos secundários: alcalóides, flavonóides e terpenóides que oferecem uma grande atividade e seletividade contra células tumorais, mas baixos efeitos colaterais e ainda um papel preventivo contra a doença, pois melhoram a imunidade. Essas classes apresentam como alvo as enzimas topoisomerasas, ciclooxigenases, lipoxigenase e aromatase em várias linhagens de câncer. Há relato de atividade antitumoral *in vitro* de produtos naturais em nosso laboratório, como *Bowdichia virgilioides*, *Padina gimnospora* e *Hypnea musciformis* (SOUZA, 2015; SILVA 2016 e WEIGEL-GOMES, 2019).

O ambiente marinho é abundante e diverso, sendo responsável por abrigar mais de 15000 componentes químicos identificados e caracterizados com potencial antitumoral (SHOEIB et al., 2004). Dentre o ecossistema marinho, as algas são consideradas como grande ambiente para desenvolvimento da indústria alimentícia, de cosméticos e de fármacos, pois possuem fibras, minerais, lipídios, proteínas, ômega-3, ácidos graxos, aminoácidos essenciais, vitaminas A, B e C e polissacarídeos como produtos de seu metabolismo. Há publicações científicas que descrevem atividades antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, anticoagulante e antitumoral para diversas linhagens de câncer (LYU et al., 2016; RUAN et al., 2018 e SOUZA et al., 2018).

As macroalgas podem ser classificadas de acordo com seu pigmento em rodófitas (vermelhas), feófitas (marrom) e clorófitas (verde). As algas marrons são as maiores, enquanto vermelhas são as menores. Os polissacarídeos são descritos como os principais grupos de metabólitos das macroalgas, sendo fonte de interesse por serem atribuídos a eles os efeitos biológicos relatados. Os principais polissacarídeos sulfatados encontrados nas algas são: carragenina (vermelha), fucoidano (marrom) e ulvana (verde) (CUNHA & GRENHA, 2016).

Essa diversidade quanto aos metabólitos pode ser atribuída pela localização das algas marinhas: predominantes nas zonas entre marés e são periodicamente submetidas à exposição direta à radiação solar, a elevadas temperaturas e a emersão devido as flutuações das marés. Similarmente, a precipitação anual das monções

também traz consigo mudanças na salinidade, na qualidade da água e na composição mineral. Essas mudanças são susceptíveis de influenciar o metabolismo e as funções metabólicas normais das algas, criando estresse oxidativo através do aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (MAHARANA et al., 2015). As algas entre marés desenvolveram mecanismos para prevenir danos fisiológicos letais, o que as permitem para sustentar as mudanças ambientais e manter sua integridade fisiológica (ARAVIND et al., 2005).

A revisão de Hanahan & Weinberg (2011) teve como objetivo listar o sucesso das drogas diante de pontos considerados chave para o crescimento do tumor. Dentre os quais: inibidores do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), inibidores de quinase dependentes de ciclina (Cdk), ativação imune do anti-CTLA4 mAB, inibidores de telomerase, drogas anti-inflamatórias seletivas, inibidores de sinalização do fator de crescimento endotelial de vasos (VEGF) e inibidores da enzima poli adenosina difosfato ribose polimerase (PARP).

Um agente terapêutico direcionado que inibe uma via chave em um tumor pode não desligar completamente uma capacidade característica, permitindo algumas células cancerosas sobreviver com função residual até elas, ou suas descendentes, eventualmente se adaptarem à pressão seletiva imposta pela terapia que está sendo aplicada. Tal adaptação, que pode ser realizada por mutação, por reprogramação epigenética, ou por remodelação do microambiente, pode restabelecer a capacidade funcional, permitindo o crescimento tumoral renovado e recidiva clínica (HANAHAN & WEINBERG, 2011).

### 2.3.1 *Arrabidaea chica*

*Arrabidaea chica* Verlot (imagem 1) é uma planta arbustiva da família Bignoniaceae, espécie nativa da região amazônica conhecida como crajiru, e difundida no sul do México ao Brasil central, especialmente na bacia amazônica. Atualmente ocorre nas regiões tropicais da América do Sul e da África (RIBEIRO et al. 2012 e ROCHA et al., 2019).

É amplamente utilizada na medicina popular para cicatrização de feridas, tratamento de inflamação e cólica intestinal. Há relato de atividade leishmanicida e antitumoral para diversas linhagens de leucemia (RIBEIRO et al., 2012; MICHEL et

al., 2013; CORTEZ DE SÁ et al., 2016). Vários flavonóides e antocianidinas foram isoladas de suas folhas, bem como as principais classes de metabólitos secundários: antocianinas, antraquinona, catequinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, esteróides, xantonas, taninos, flavonóis e flavanonas (ROCHA et al., 2019).

**Imagem 1: Aspectos das folhas e flores de *Arrabidaea chica* Verlot.**



Fonte: Site fitoterapia Brasil.

### 2.3.2 *Hypnea musciformis*

A macroalga rodófito *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux (imagem 2) é uma espécie cosmopolita, sendo a mais conhecida do gênero *Hypnea* e tem valor no nordeste do Brasil e no mundo por ser uma fonte natural de polissacarídeos sulfatados do tipo carrageninas (MAHARANA et al., 2015; CUNHA & GRENHA, 2016 e SOUZA et al., 2018). É considerada uma espécie potencialmente lucrativa devido ao alto rendimento específico de kappa-carragenina, rápida taxa de crescimento e tolerância a diferentes condições ambientais (COSENZA et al., 2014).

Os polissacarídeos sulfatados são unidades repetidas de dissacarídeos e são encontrados na matriz extracelular das algas. Os encontrados em algas vermelhas são conhecidos como galactanas, onde variações estruturais definiram a nomenclatura carragena ou agaran (SOUZA et al., 2018).

Souza et al. (2018) também relatou potencial antioxidante, antimicrobiano e antiproliferativo do polissacarídeo sulfatado isolado de *Hypnea musciformis*. O composto mostrou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* e atividade antiproliferativa contra neuroblastoma e câncer de mama.

Também foi testado em linhagem celular de fibroblasto, onde não mostrou toxicidade. Apesar da predominância de kappa-carragenanas em sua composição, *H. musciformis* mostra também uma grande quantidade de compostos fenólicos, o que pode justificar sua atividade antioxidante e, conseqüentemente, sua atividade protetora e potencial antitumoral (CAO, SOFIC & PRIOR, 1997).

A revisão de Cunha e Grenha (2016) destaca que, dentre as atividades biológicas atribuídas as carrageninas, também há relatos de atividade antiviral contra o HPV, o HIV, o vírus da influenza H1N1, o da dengue, o da hepatite A, herpes, além de apresentar atividade anticoagulante e redução dos níveis de colesterol séricos.

**Imagem 2: Aspectos gerais da macroalga *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamouroux.**



Fonte: Site Algaebase.

### 3. OBJETIVOS

**Objetivo geral:** avaliar o potencial antitumoral de extratos brutos e frações de plantas macroalgas em linhagens tumorais EAC e 4T1.

**Objetivos específicos:**

1. Avaliar a viabilidade das células EAC *in vitro*;
2. Padronizar a concentração de quimioterápico como controle positivo em células EAC pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas;
3. Avaliar a atividade antitumoral do extrato bruto aquoso de *Arrabidaea chica* em células EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas;
4. Avaliar a atividade antitumoral dos extratos brutos diclorometano e etanólico, bem como das frações clorofórmica e hexano de *Hypnea musciformis* em células EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas;
5. Avaliar a viabilidade pelo ensaio *Tripán blue* com as IC<sub>50</sub> obtidas dos extratos de *A. chica* e *H. musciformis*, em EAC e 4T1;
6. Avaliar a genotoxicidade com as IC<sub>50</sub> obtidas dos extratos de *A. chica* e *H. musciformis*, em EAC e 4T1;
7. Avaliar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) com as IC<sub>50</sub> obtidas dos extratos de *A. chica* e *H. musciformis*, em EAC e 4T1.

## 4. MATERIAIS E MÉTODO

### 4.1 Extratos e produtos químicos

As amostras da macroalga *Hypnea musciformis* foram preparadas e gentilmente cedidas pela Prof.<sup>a</sup> Élica Guedes (GUEDES et al., 2013) do Laboratório de Ficologia do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS-UFAL). Foram utilizados o extrato bruto diclorometano (EBDHm), o extrato bruto etanólico (EBEHm), fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano (FCHm) e fração hexano do extrato bruto diclorometano (FHHm). A amostra da planta *Arrabidaea chica* foi preparada semelhante aos extratos brutos em Guedes et al. (2013), e cedida pelo professor Rafael Brito, do setor de Fisiologia da Universidade Federal Fluminense (UFF). Foi utilizado o extrato bruto aquoso da planta (EBAc). Os demais produtos químicos foram adquiridos na Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO).

### 4.2 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) fêmeas, entre 8 e 12 semanas de idade, pesando entre 28 e 32 gramas, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (Biocen-UFAL) e mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Celular (LBC/SEVERINÃO). Os animais foram mantidos em gaiolas (produzida em polipropileno) nas medidas (LxCxA) de 45 x 60 x 25 cm, em grupos de 6 animais por caixa, temperatura de  $21 \pm 1$  °C, ciclo claro-escuro de 12-12 horas e com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal da UFAL (CEUA nº 01/2017).

### 4.3 Linhagens celulares e cultivo

#### 4.3.1 Células EAC e 4T1

Para realização dos ensaios antitumorais foram escolhidas o *Ehrlich Ascites Carcinoma* (EAC), conhecido como tumor de *Ehrlich*, e a linhagem comercial 4T1, ambas de origem murina.

As células EAC mimetizam um comportamento de tumor de mama humano metastático e foram descritas inicialmente por Paul Ehrlich, em 1896, como um adenocarcinoma mamário espontâneo de camundongo fêmea. Ehrlich e Apolant (1905) usaram-no como tumor por transplante de tecidos tumorais por via subcutânea de animal para animal. Os tumores experimentais têm grande importância para servirem como modelos vivos de experimentação, sendo EAC considerado um dos mais comuns (OZASLAN et al., 2011).

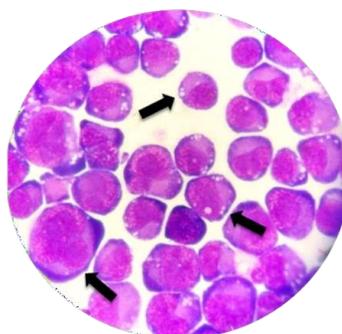
Em 1932, Loewenthal e Jahn (1932) obtiveram a forma líquida no peritônio do camundongo, nomeando-a “carcinoma de ascite de *Ehrlich*” devido ao líquido ascítico (imagem 3), juntamente com as células do carcinoma. Para ensaios *in vitro* a viabilidade em cultura dessas células chega a 7 dias apenas, pois não apresentam capacidade proliferativa, o que justifica um protocolo de manutenção de EAC que depende de organismo vivo. Estas células tumorais são arredondadas, citoplasma escasso com presença de vacúolos, núcleo denso e pleomorfismo celular característico, apresentando diâmetro cerca de 2 a 3 vezes maior que aos das hemácias, como exemplificado na imagem 4 (DAGLI, GUERRA & SALDIVA, 1992; CHAKRABORTY et al., 2007 e SOUZA, 2020).

**Imagem 3: Foto do líquido peritoneal de camundongos contendo o tumor ascítico de *Ehrlich*.**



Fonte: Souza, 2020.

**Imagem 4: Foto das células EAC coradas com kit panóptico** - As setas pretas destacam a presença de vacúolos. Aumento 1000x.

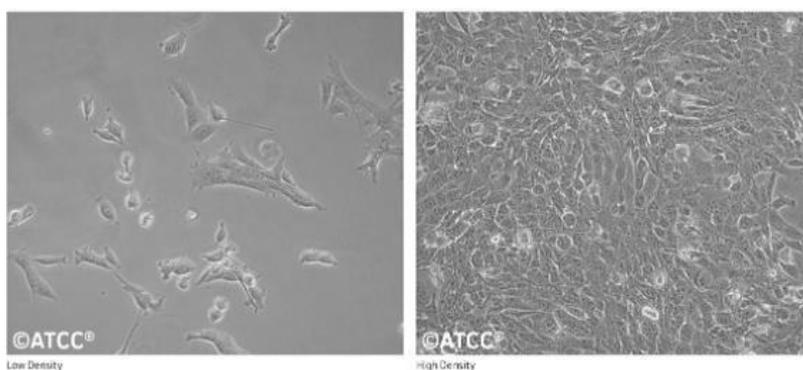


Fonte: O autor, 2020.

A linhagem celular 4T1 (imagem 5) consiste num carcinoma mamário com potencial metastático para pulmão e fígado, isolado de camundongos fêmeas BALB- C (ASLAKSON & MILLER, 1992). Essa linhagem celular se apresenta como alternativa mais adequada para ensaios experimentais para avaliar a atividade antitumoral de extratos, frações ou substâncias puras que se mostraram promissoras ao longo de anos de estudos.

Além disso, essa linhagem também é capaz de induzir tumor de mama em modelo *in vivo*, com o desenvolvimento de metástase de forma espontânea, a partir do tumor primário, bem como a disseminação progressiva para os nódulos linfáticos de drenagem e outros órgãos semelhante à um câncer mamário humano (ASLAKSON & MILLER, 1992; PULASKI & OSTRAND-ROSENBERG, 2000).

**Imagem 5: Foto mostrando morfologia da célula 4T1 aderida** - aumento não informado pelo ATCC. Lado esquerdo indica densidade baixa da população celular, enquanto o direito indica densidade alta.



Fonte: ATCC.

#### 4.3.2 Cultivo

EAC foi cultivado em camundongos. As células do tumor foram obtidas para os ensaios através de punção do líquido peritoneal. O tumor e o modelo de crescimento foram gentilmente cedidos pela professora Dr.<sup>a</sup> Ivone Antônia de Souza do Laboratório de Farmacologia e Cancerologia Experimental do Departamento de Antibióticos do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

A linhagem celular comercial de mama murino 4T1 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). A linhagem é mantida em nosso laboratório de acordo com as normas de procedimento do BCRJ e da ATCC.

O meio de cultura utilizado foi o RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% de L-glutamina (2mM). O descongelamento das células foi feito à 37°C, seguido de centrifugação por 5 minutos à 1500 rpm. O crescimento foi realizado utilizando garrafas 25cm<sup>2</sup>, incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> com atmosfera úmida de 5% à 37°C. Os ensaios foram realizados em placas de 24 ou 96 poços sob estas condições.

#### 4.4 Ensaio de viabilidade celular MTT

O MTT é um teste colorimétrico que detecta células vivas baseando-se na atividade mitocondrial pela redução do MTT [brometo de 3-(4,5- dimetiliazol-2- il)-2,5- difeniltetrazolio], através da clivagem do sal de tetrazólio em cristais de formazana, pela enzima succinato desidrogenase (DENIZOT, 1986).

Foram plaqueadas  $5 \times 10^4$  células/poço de EAC em placas de 96 poços de fundo "U". Após o período de incubação de 1 hora das células EAC, houve a adição de 100µL de meio RPMI 10% SBF (cinética celular) ou meio com diferentes concentrações do controle positivo (cisplatina) e extratos (*Arrabidaea chica* e *Hypnea musciformis*). Após 24 ou 48 horas de tratamento em EAC, houve adição de 20µL de MTT (5mg/mL) em cada poço e as placas foram colocadas novamente em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C por 3 horas. Em seguida, a placa foi centrifugada por 14min à 1.400 rpm, o sobrenadante foi retirado e adicionados 150µL de DMSO 1% por poço para a diluição dos cristais de MTT formados dentro das mitocôndrias. Passados 15 minutos, as placas foram lidas no espectrofotômetro com comprimento de onda de 530nm. Os

controles utilizados no ensaio foram: a) meio de cultura sem células e sem extrato - BRANCO; b) controle proliferativo/negativo (células em meio de cultura sem extrato - CELLS); c) controle do veículo de diluição (células com dimetilsulfóxido – DMSO 1%) e d) controle positivo (células com o quimioterápico cisplatina à 5µg/mL - CIS).

Para a linhagem celular 4T1, foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços de fundo chato. após incubação de 16 horas, os demais passos se deram da mesma forma. A diferença consistiu na mudança do controle positivo para o quimioterápico doxorrubicina à 1µg/mL (DOXO). O cálculo da viabilidade celular foi feito da seguinte forma:

$$\% \text{ inibição} = \text{MÉDIA} \left[ \frac{(\text{absorbância tratado} / \text{absorbância do branco}) \times 100}{\text{absorbância não tratado/negativo}} \right]$$

Este resultado possibilitou o cálculo da IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% da proliferação celular) tanto em 24 como em 48 horas.

#### 4.5 Ensaio de viabilidade celular *Tripán blue*

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão com corante azul de Tripán, conhecido como *Tripán blue*. (CODER, D.M., 2005). Este teste é baseado no conceito de que as células viáveis não permitem a internalização do corante, enquanto que as células com membrana rompida (mortas) são permeáveis, adquirindo a cor azul como sinal de morte.

A quantidade celular utilizada por placa neste ensaio foi mantida para as células presentes no estudo. Após 24 ou 48 horas da adição dos extratos, ou apenas de meio de cultura para cinética celular, a placa foi centrifugada por 14 minutos à 1.400 rpm, retirado 150µL do sobrenadante e realizada a contagem de 10µL de células retiradas de cada poço homogeneizado com 90µL de Azul de Tripán na câmara de Neubauer. O número de células por mL de uma amostra contada na câmara de Neubauer foi obtido pela equação:

$$\frac{Q1 + Q2 + Q3 + Q4}{4} \times 10^4 \times \text{fator de diluição} = n^\circ \text{ de células/ mL}$$

onde, Q = quadrante

Os controles utilizados no ensaio foram: a) meio de cultura sem células e sem extrato - BRANCO; b) controle proliferativo/negativo (células em meio de cultura sem extrato - CELLS); c) controle do veículo de diluição (células com dimetilsulfóxido – DMSO 1%) e d) controle positivo (células com o quimioterápico cisplatina à 5µg/mL - CIS).

#### 4.6 Ensaio de micronúcleo

O protocolo utilizado (FENECH 2000 e 2002) foi realizado apenas com as IC<sub>50</sub>. Os micronúcleos são fragmentos de DNA que são separados do núcleo principal da célula. A formação de micronúcleo na célula é um processo considerado uma aberração cromossômica, pois ocorrem quebras na fita dupla do DNA, sem que haja reparo.

A quantidade celular utilizada para este ensaio foi mantida para as células presentes neste estudo. Após 24 ou 48 horas de tratamento, 30µL da amostra foram utilizados para preparar as lâminas. O volume de 200µL foi completado com 1700µL de PBS (1X). As células foram centrifugadas a 350 rpm durante 5 minutos, fixadas com metanol e, por fim, coradas com o kit panóptico rápido para avaliação das lâminas em microscópio óptico, com aumento final de 1000X, para análise de 1000 células por amostra.

As células foram agrupadas de acordo com o aspecto nuclear em saudáveis, com micronúcleo ou apoptóticas. Os controles utilizados no ensaio foram: a) meio de cultura sem células e sem extrato - BRANCO; b) controle proliferativo/negativo (células em meio de cultura sem extrato - CELLS); c) controle do veículo de diluição (células com dimetilsulfóxido – DMSO 1%) e d) controle positivo (células com o quimioterápico cisplatina à 5µg/mL - CIS).

#### 4.7 Ensaio de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para a medição de EROs intracelular foi utilizado o método do 2',7'-diacetato diclorofluoresceína (H2DCFH-DA), com base com o protocolo da Invitrogen/Molecular Probes. Ao permear na célula, mediante a presença de EROs, o H2DCFH-DA é oxidado à sua forma fluorescente DCF (2',7'-diclorofluoresceína). Para o ensaio de EROs foram utilizadas  $2 \times 10^5$  células/poço de EAC em placas de 24 poços. Os poços foram transferidos para tubos de citometria e marcados com o H2DCFH-DA  $10 \mu\text{M}/\text{mL}$ , por 30 minutos, protegido da luz, seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente foi adicionado PBS (1X) para leitura em citometria de fluxo.

#### 4.8 Análise estatística

Para realizar as análises estatísticas dos resultados, utilizou-se o software GraphPad Prism 8 ®.

**Ensaio MTT, *Tripán blue* e EROs:** utilizou-se a análise de variância One-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas de Tukey com nível de significância selecionado para  $p < 0.05$ . As  $\text{IC}_{50}$  obtidas foram calculadas através de regressão não-linear.

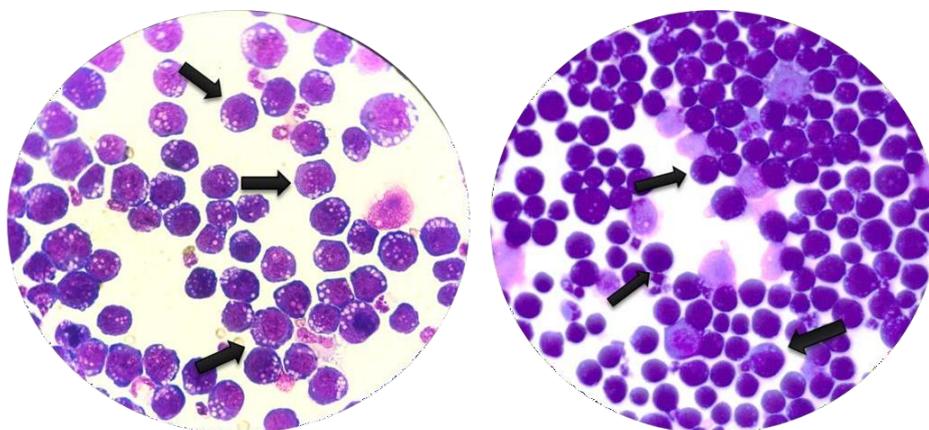
**Ensaio *Tripán blue*:** utilizou-se a análise de variância Two-way ANOVA, seguido do pós-teste de comparações múltiplas Bonferroni com nível de significância também selecionado para  $p < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

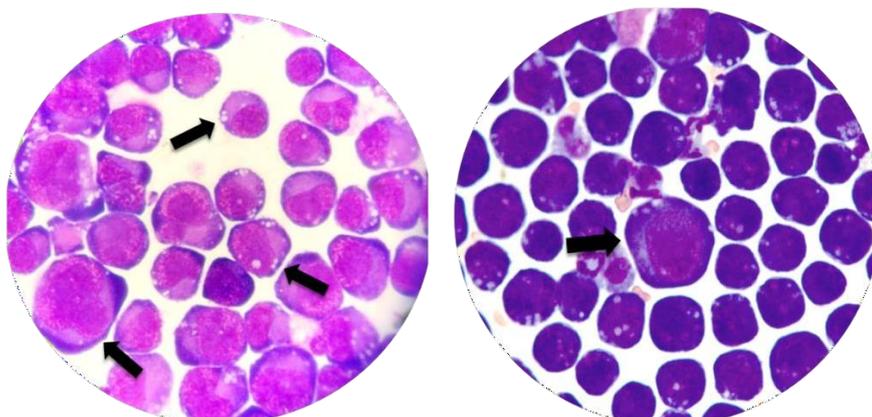
### 5.1 Resultado da viabilidade celular das células EAC *in vitro* pelo ensaio MTT

Para tornar possível realização dos ensaios com estas células, primeiro houve a padronização do modelo de indução tumoral de *Ehrlich* na UFAL. Esta padronização foi realizada como parte da tese de doutorado de Souza (2022). Camundongos muito jovens ou com um nível elevado de estresse pode levar ao retardo do desenvolvimento do tumor de *Ehrlich* na sua forma ascítica. Para permitir melhor reprodutibilidade dos experimentos, em todos os ensaios foram utilizados camundongos com 8-12 semanas de idade.

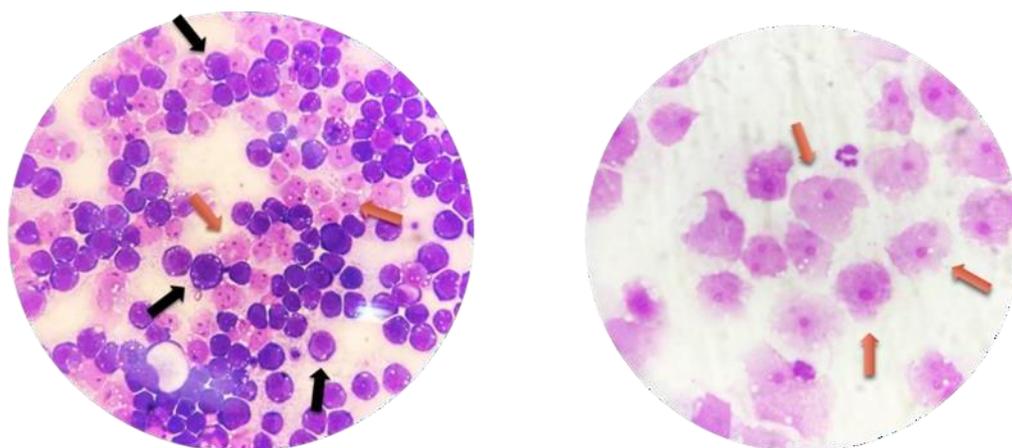
Após a padronização do processo de indução tumoral, as demais etapas consistiram no estudo do comportamento das células *in vitro*. Para tanto, após a punção do líquido ascítico, 30 $\mu$ L de EAC foram misturadas com 170 $\mu$ L de PBS 1x para preparação de lâminas na citocentrífuga (figura 5).



A e B) Lâmina de células EAC (setas pretas) em aumento de 400x. Coloração com kit panótico rápido.



C e D) Lâmina de células EAC (setas pretas) em aumento de 1000x. Coloração com kit panótico rápido.

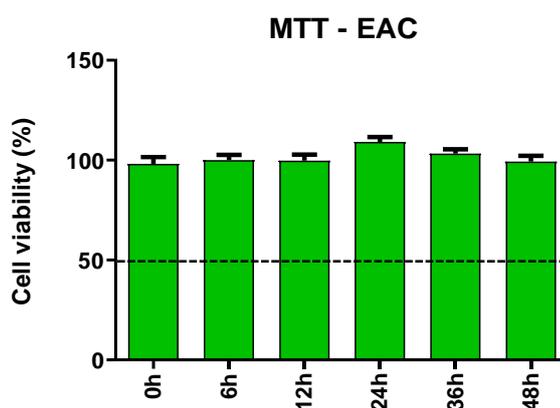


E) Lâmina de EAC com células vivas (setas pretas) e mortas (setas laranjas) em aumento de 400x. F) Lâmina de EAC com controle cisplatina à 5µg/mL (setas laranjas) em aumento de 1000x. Coloração com kit panótico rápido.

**Figura 5: A) a F) Células do tumor ascítico de Ehrlich em vários aumentos.** As setas pretas indicam morfologia normal (células vivas) de EAC, enquanto as setas laranjas indicam alterações na morfologia (células mortas). Coloração com kit panótico rápido (Panótico rápido Laborclin).

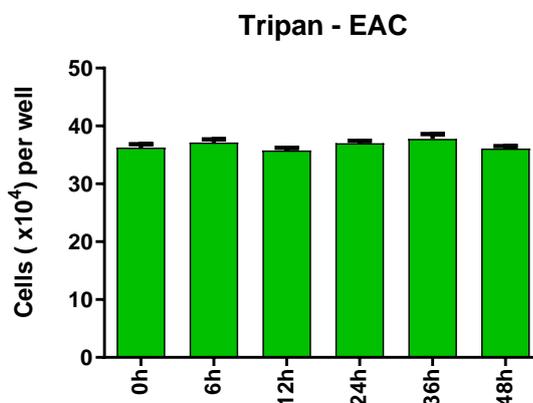
A obtenção das lâminas pela citocentrifugação permitiram observar a morfologia de EAC, confirmando com o que existe descrito no ítem 4.3.1 da metodologia.

As figuras 6 e 7 mostram os resultados da viabilidade celular de EAC, pelo ensaio MTT e Tripán blue, em diferentes tempos:



**Figura 6. Gráfico de cinética celular por MTT (0-48h) de células EAC (tumor ascítico de Ehrlich).** Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o software GraphPad Prism 8. One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey

para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.



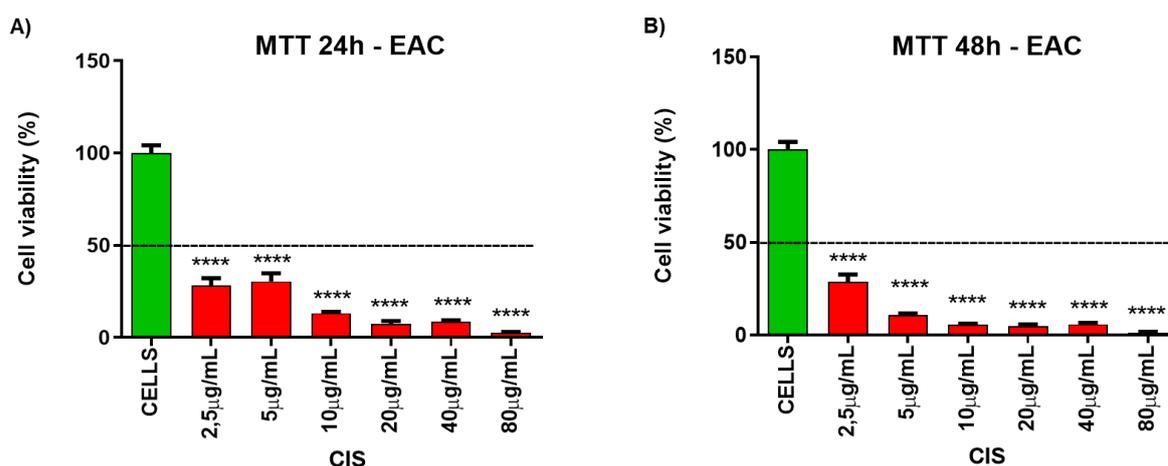
**Figura 7. Gráfico de cinética celular por Tripan (0-48h) de células EAC (tumor ascítico de Ehrlich).** Dados representados pela média  $\pm$  erro padrão da média utilizando o software GraphPad Prism 8. One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao tempo 0h.

Os ensaios MTT e *Tripan blue* foram utilizados para avaliar a viabilidade celular, bem como estabelecer a cinética destas células nos tempos 0, 6, 12, 24, 36 e 48 horas. De acordo com a figura 6, apesar de um leve aumento na barra indicativa de 24h, não houve aumento estatisticamente significativo da proliferação celular entre os tempos. Esse resultado se confirma pelo ensaio *Tripan blue* (figura 7). Nele, a contagem de células viáveis se manteve durante todos os tempos avaliados. Todos os tempos tiveram como controle de morte o detergente *Tween* a 3%, que matou as células em todos os tempos, tanto no ensaio de MTT quanto no de *Tripan Blue*.

## 5.2 Resultado da padronização do controle positivo em EAC *in vitro*, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas

Uma vez conhecendo o comportamento celular *in vitro* de EAC, podemos realizar experimentos com aplicabilidade terapêutica (busca por quimioterápicos), que é o objetivo do nosso grupo de pesquisa. Ao provar que as células são resistentes em cultura por pelo menos 48 horas, precisamos estabelecer um quimioterápico que funcionasse para EAC e que pudesse ser o comparativo para os compostos testados como possíveis antitumorais. Com o auxílio da literatura, elegemos o quimioterápico cisplatina.

Os gráficos da figura 8 mostram os resultados do MTT em 24 e 48 horas do quimioterápico cisplatina em EAC:



**Figura 8. Gráfico de viabilidade celular (MTT) do quimioterápico cisplatina (CIS) nas concentrações de 2,5 à 80µg/mL em células EAC (tumor ascítico de Ehrlich) após: A) 24 horas de tratamento e B) 48 horas de tratamento.** CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média  $\pm$  erro padrão da média utilizando o software GraphPad Prism 8. One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.

Como observado na figura 8, todas as concentrações do quimioterápico reduziram a viabilidade celular de forma concentração-dependente, especialmente em 48 horas. As menores concentrações testadas reduziram cerca de 70% da população de EAC em 24 horas (2,5µg/mL =  $28.16 \pm 4.00$  e 5µg/mL =  $30.39 \pm 4.39$  EAC viáveis).

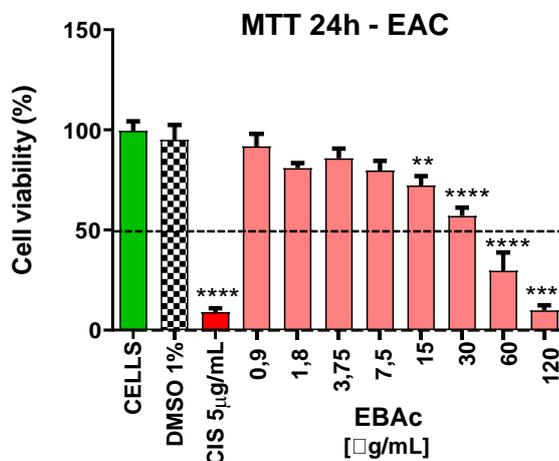
Em 48 horas, a concentração de 5µg/mL reduziu a viabilidade celular superiormente ao mínimo desejado de 80% ( $10.82 \pm 0.81$  células viáveis), enquanto que a concentração de 2,5µg/mL manteve a redução da viabilidade em 70% ( $28.66 \pm 3.97$  células viáveis).

A concentração de 5µg/mL foi adotada como controle positivo. Além de seguir os critérios de redução de viabilidade, o fato dessa concentração reduzir significativamente em 48 horas poderá permitir melhor comparação com futuros compostos testados, visto que, em nosso laboratório, os extratos de *H. musciformis* testados já reduziram a viabilidade tumoral de outras células (leucemia linfóide aguda, CCRF-CEM) desta mesma forma em 48 horas. (WEIGEL-GOMES, 2019). Há também a facilidade de utilizar uma única concentração em ambos os tempos (24 e 48 horas). As demais concentrações, apesar de reduzirem mais a viabilidade celular, exigem mais gasto de medicamento para reprodução do ensaio, e por isso foram descartadas.

### 5.3 Resultado do efeito do extrato bruto aquoso de *Arrabidaea chica* (EBAc) em EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas

A padronização possibilitou o cálculo da IC<sub>50</sub> (concentração que inibe 50% da proliferação celular) para o extrato bruto aquoso de *Arrabidaea chica* (EBAc) e para a fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm) na linhagem de EAC.

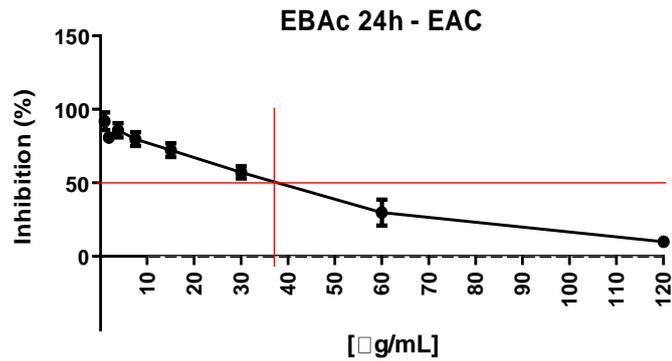
Os dados da figura 9 apresentam o resultado do MTT de EBAC em EAC, após 24 horas:



**Figura 9. Gráfico de viabilidade celular (MTT) do extrato bruto de *Arrabidaea chica* (EBAC) nas concentrações de 0,9 à 120µg/mL em células EAC (tumor ascítico de Ehrlich) após 24 horas de tratamento.** DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. CIS: cisplatina, controle positivo à 5µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média  $\pm$  erro padrão da média utilizando o software GraphPad Prism 8. One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.

De acordo com a figura 9, EBAC reduziu a viabilidade celular de forma concentração-dependente a partir de 3,75µg/mL. A partir de 15µg/mL o extrato teve redução significativa na viabilidade de EAC, onde as maiores concentrações reduziram mais que 50% das células tumorais. Em 60µg/mL houve uma redução com cerca de 70% (29.70  $\pm$  8.92 células viáveis). Em 120µg/mL a redução foi ainda maior, em torno de 90% (9.95  $\pm$  2.45 células viáveis), tendo praticamente o mesmo desempenho do controle positivo CIS. O quimioterápico CIS reduziu a viabilidade celular também em cerca de 90% (9.04  $\pm$  1.85 células viáveis). O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade de EAC em relação ao controle CELLS.

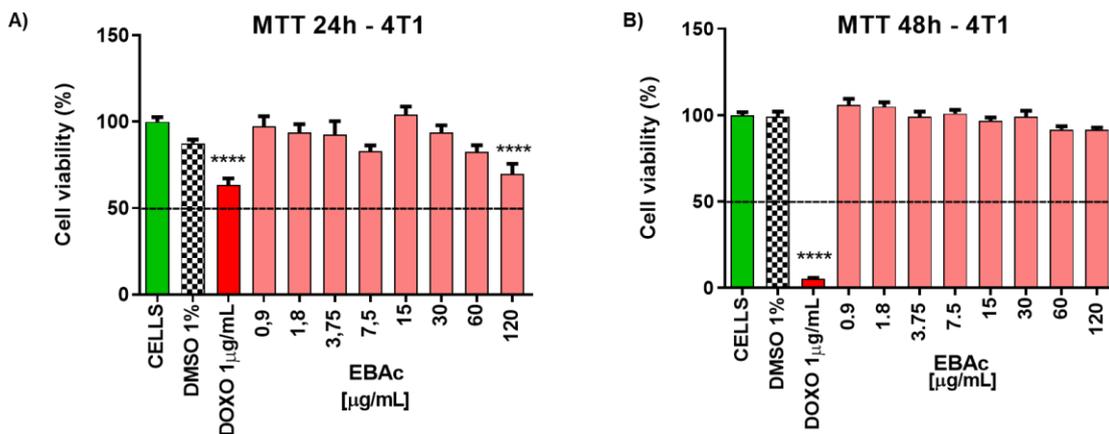
O sucesso de EBAC na redução em mais de 50% da população tumoral permitiu o cálculo de uma concentração inibitória para 50% das células (IC<sub>50</sub>). A IC foi calculada através de regressão não-linear, obtendo IC<sub>50</sub>  $\cong$  40µg/mL (figura 10).



**Figura 10.** Gráfico representando a  $IC_{50} \cong 40 \mu\text{g/mL}$  do extrato bruto de *Arrabidaea chica* (EBAc) após 24 horas de tratamento em células EAC (tumor ascítico de Ehrlich) obtido a partir do ensaio MTT. A  $IC_{50}$  foi calculada por regressão não linear utilizando o software *GraphPad Prism 8*.

Como a redução tumoral de EBAc foi alta nas maiores concentrações, mostrando um resultado promissor em 24 horas, optamos por não realizar o ensaio em 48 horas para este extrato em EAC.

Os resultados do extrato EBAc sobre a viabilidade celular de 4T1 são apresentados na figura 11, em 24 e 48 horas:



**Figura 11.** Gráfico de viabilidade celular (MTT) do extrato bruto de *Arrabidaea chica* (EBAc) nas concentrações de 0,9 à 120 µg/mL em células 4T1 (tumor de mama murino) após: A) 24 horas de tratamento e B) 48 horas de tratamento. DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. DOXO: doxorubicina, controle positivo à 1 µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados

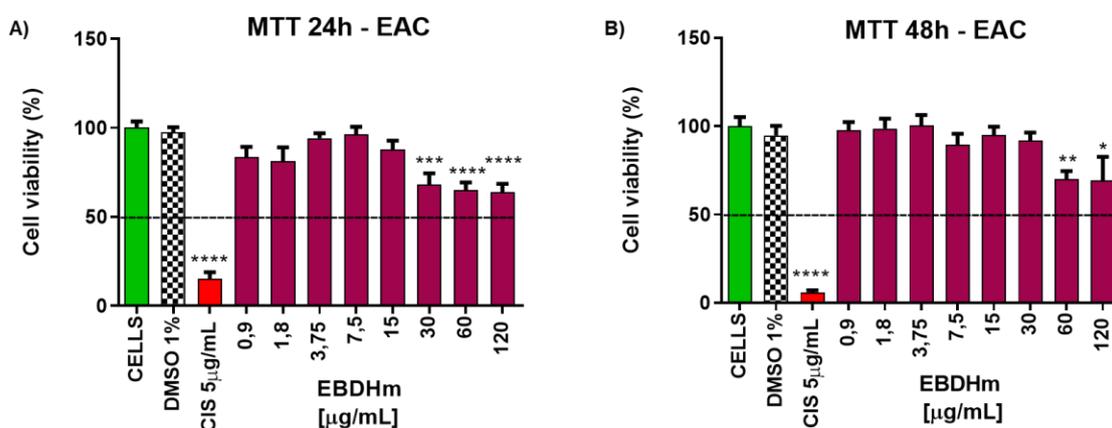
representados pela média  $\pm$  erro padrão da média utilizando o software GraphPad Prism 8. One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.

De acordo com a figura 11, o extrato apresentou um efeito inibitório em 24h na apenas maior concentração testada (120  $\mu\text{g/mL}$ ;  $69.6 \pm 6$  células viáveis) em relação ao controle CELLS, o que inviabilizou o cálculo de uma  $\text{IC}_{50}$  para este grupo. O quimioterápico DOXO reduziu a viabilidade celular em 30% ( $63.6 \pm 3.5$  células viáveis) em 24 horas. O grupo DMSO, não mostrou efeito sobre a viabilidade de 4T1 em relação ao controle CELLS.

Em 48 horas, diferente do observado em grupos que começaram a ter inibição no primeiro tempo testado, não houve redução estatisticamente significativa em nenhuma das concentrações. O quimioterápico DOXO reduziu a viabilidade celular em mais de 90% ( $5.3 \pm 0.5$  células viáveis). O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade de 4T1 em relação ao controle CELLS.

#### 5.4 Resultado do efeito do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (EBDHm) em EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas

Os resultados do extrato EBDHm sobre a viabilidade celular de EAC são apresentados na figura 12, em 24 e 48 horas:



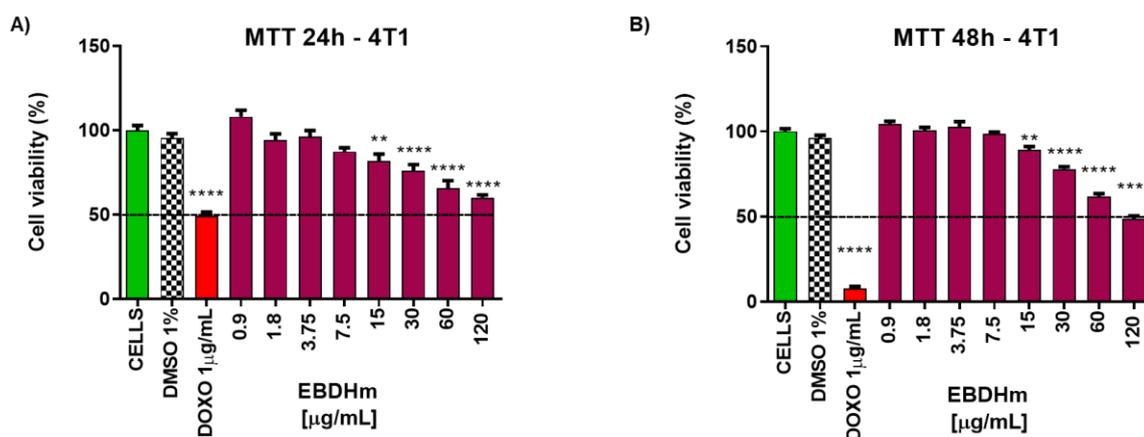
**Figura 12. Gráfico de viabilidade celular (MTT) do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (EBDHm) nas concentrações de 0,9 à 120  $\mu\text{g/mL}$  em**

**células EAC (tumor ascítico de Ehrlich) após: A) 24 horas de tratamento e B) 48 horas de tratamento.** DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. CIS: cisplatina, controle positivo à 5µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o software GraphPad Prism 8. One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas, onde \*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001 em relação ao controle celular.

Na figura 12 em “A”, EBDHm reduziu a viabilidade celular de forma significativa de 30 a 120µg/mL em 24 horas. No entanto, nem as maiores concentrações reduziram a população de EAC em 50%: 60µg/mL= 64.93 ± 4.36 células viáveis e 120µg/mL= 63.85 ± 4.70 células viáveis. O quimioterápico CIS reduziu a viabilidade celular em cerca de 80% (15.32 ± 3.64 células viáveis). O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade de EAC em relação ao controle CELLS.

Buscando uma redução de 50% da população tumoral, EBDHm foi testado nas mesmas concentrações, porém no tempo de 48 horas. Na figura 12, em “B”, observou-se novamente que as concentrações maiores, apesar de serem estatisticamente significantes, não reduziram a população celular para um mínimo de 50%: 60µg/mL= 70.04 ± 4.57 células viáveis e 120µg/mL= 69.40 ± 13.34 células viáveis. O quimioterápico CIS reduziu a viabilidade celular acima de 90% (5.80 ± 1.42 células viáveis). O grupo DMSO novamente não mostrou efeito em relação ao controle CELLS.

Os resultados do extrato EBDHm sobre a viabilidade celular de 4T1 são apresentados na figura 13, em 24 e 48 horas:

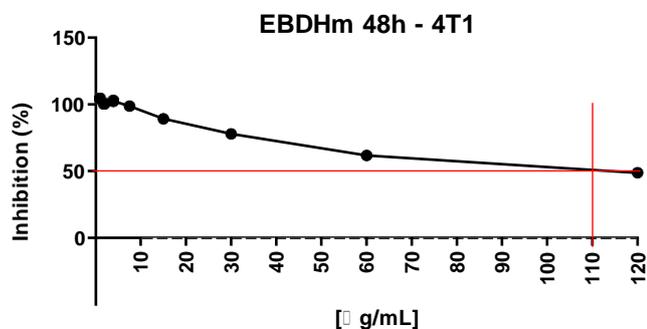


**Figura 13. Gráfico de viabilidade celular (MTT) do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (EBDHm) nas concentrações de 0,9 à 120µg/mL em células 4T1 (tumor de mama murino) após: A) 24 horas de tratamento e B) 48 horas de tratamento.** DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. DOXO: doxorubicina, controle positivo à 1µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o software GraphPad Prism 8. One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.

De acordo com a figura 13, o extrato apresentou um efeito concentração-dependente de inibição celular nos dois tempos testados. Em 24h, a inibição teve início a partir da concentração de 3,75 µg/mL, com melhor desempenho na concentração de 120 µg/mL (60 ± 1.6 células viáveis). Apesar de não ser possível o cálculo da IC<sub>50</sub> em 24 horas, esse efeito foi potencializado em 48h. O quimioterápico DOXO reduziu a viabilidade celular em 50% (49 ± 2.4 células viáveis). O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade celular.

Em 48h, o efeito inibitório tem início na concentração de 7,5 µg/mL e atinge um efeito citotóxico para mais de 50% da população celular na maior concentração testada (120 µg/mL; 48.7 ± 1.6 células viáveis). O quimioterápico DOXO manteve uma redução da viabilidade celular maior que 90% (7.7 ± 1.2 células viáveis). O grupo

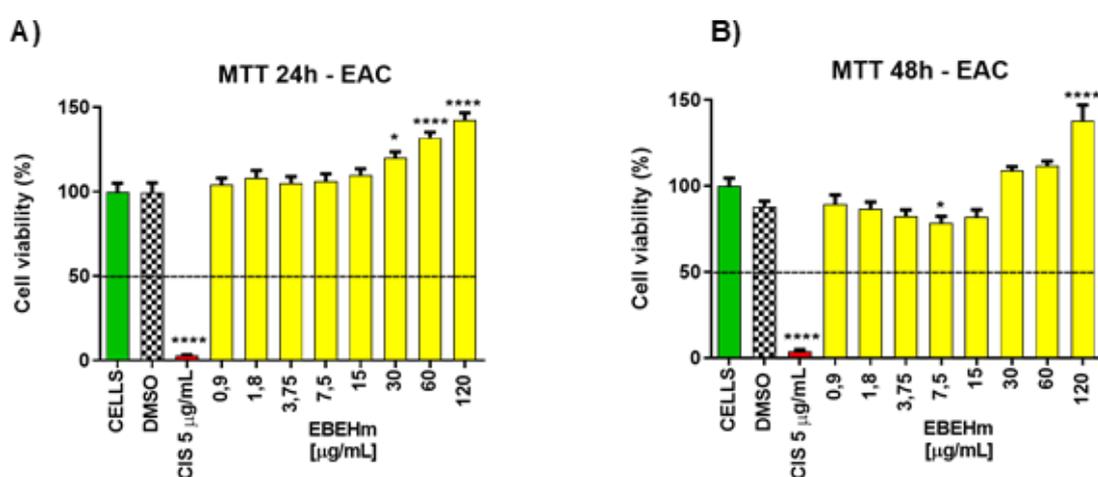
DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade celular. Estes resultados possibilitaram o cálculo de uma  $IC_{50} \cong 110\mu\text{g/mL}$ , através de regressão não linear (figura 14).



**Figura 14.** Gráfico representando a  $IC_{50} \cong 110\mu\text{g/mL}$  do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (EBDHm) após 48 horas de tratamento em células 4T1 (tumor de mama murino) obtido a partir do ensaio MTT. A  $IC_{50}$  foi calculada por regressão não linear utilizando o software GraphPad Prism 8.

### 5.5 Resultado do efeito do extrato bruto etanólico de *Hypnea musciformis* (EBEHm) em EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas

Os resultados do extrato EBEHm sobre a viabilidade celular de EAC são apresentados na figura 15, em 24 e 48 horas:

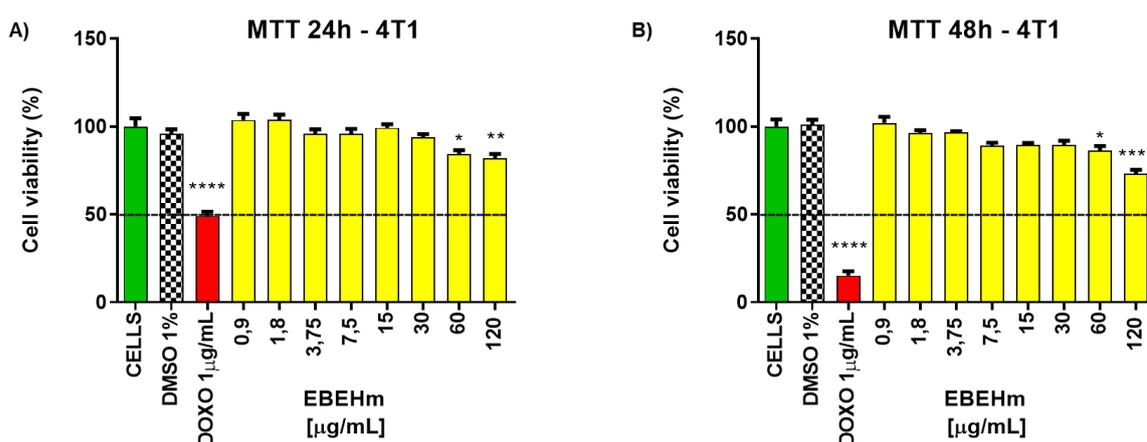


**Figura 15.** Gráfico de viabilidade celular (MTT) do extrato bruto etanólico de *Hypnea musciformis* (EBEHm) nas concentrações de 0,9 à 120µg/mL em células

**EAC (tumor ascítico de Ehrlich) após: A) 24 horas de tratamento e B) 48 horas de tratamento.** DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. CIS: cisplatina, controle positivo à 5µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o software GraphPad Prism 8. One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas, onde \*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001 em relação ao controle celular.

De acordo com a figura 15 em “A”, EBEHm não foi capaz de reduzir a viabilidade celular em 24 horas, apresentando um efeito proliferativo nas concentrações de 30µg/mL (120 ± 3.57 células viáveis), 60µg/mL (132 ± 3.24 células viáveis) e 120µg/mL (142 ± 4.48 células viáveis). O quimioterápico CIS reduziu a viabilidade celular acima de 95% (2.89 ± 0.59 células viáveis) em 24 horas. Em “B”, apenas a concentração de 7,5µg/mL (80.68 ± 4.82 células viáveis) reduziu a viabilidade celular de forma estatisticamente significativa. No entanto, a inibição apresentada não foi capaz de reduzir a viabilidade em 50%. O quimioterápico CIS reduziu a viabilidade celular (3.12 ± 0.43 células viáveis) em 48 horas. O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade de EAC em relação ao controle CELLS.

Os resultados do extrato EBEHm sobre a viabilidade celular de 4T1 são apresentados na figura 16, em 24 e 48 horas:



**Figura 16. Gráfico de viabilidade celular (MTT) do extrato bruto etanólico de *Hypnea musciformis* (EBEHm) nas concentrações de 0,9 à 120µg/mL em células 4T1 (tumor de mama murino) após: A) 24 horas de tratamento e B) 48 horas de tratamento.** DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. DOXO:

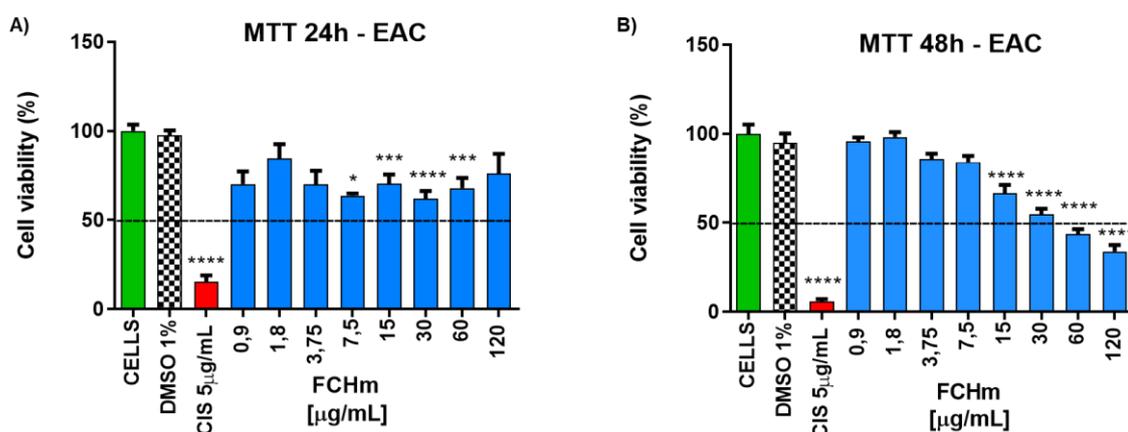
doxorubicina, controle positivo à 1µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o *software GraphPad Prism 8*. *One-way ANOVA* seguido do pós-teste *Tukey* para comparações múltiplas, onde \*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001 em relação ao controle celular.

De acordo com a figura 16, o extrato apresentou um pequeno efeito inibitório apenas na maior concentração testada, tanto em 24h (120µg/mL; 82.1 ± 2.3 células viáveis), como em 48h (120µg/mL; 73.1 ± 2.3 células viáveis), o que inviabilizou o cálculo de uma IC<sub>50</sub> para este grupo. O quimioterápico DOXO reduziu a viabilidade celular em 50% (49 ± 2.4 células viáveis) em 24 horas. O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade de 4T1 em relação ao controle CELLS.

O quimioterápico DOXO reduziu a viabilidade celular em mais de 80% (15.2 ± 2.5 células viáveis) em 48 horas. O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade de 4T1 em relação ao controle CELLS.

#### 5.6 Resultado do efeito da fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm) em EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas

Os resultados do extrato FCHm sobre a viabilidade celular de EAC são apresentados na figura 17, em 24 e 48 horas:



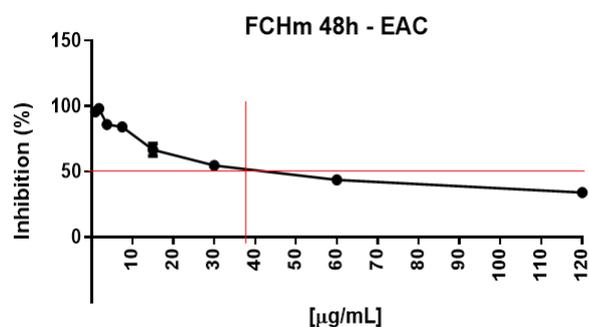
**Figura 17. Gráfico de viabilidade celular (MTT) da fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm) nas concentrações de 0,9**

**à 120µg/mL em células EAC (tumor ascítico de Ehrlich) após: A) 24 horas de tratamento e B) 48 horas de tratamento.** DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. CIS: cisplatina, controle positivo à 5µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o software GraphPad Prism 8. One-way ANOVA seguido do pós-teste Tukey para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.

De acordo com a figura 17 em “A”, FCHm reduziu a viabilidade celular de forma significativa entre 7,5 e 60µg/mL em 24 horas. Não foi possível estabelecer uma inibição de forma concentração-dependente. As concentrações que mostraram maior inibição da viabilidade de EAC foram: 30µg/mL ( $62.07 \pm 4.19$  células viáveis) e 7,5µg/mL ( $63.71 \pm 1.23$  células viáveis), ambas com cerca de 40% de inibição, impossibilitando o cálculo da  $IC_{50}$ . O quimioterápico CIS reduziu a viabilidade celular em cerca de 80% ( $15.32 \pm 3.64$  células viáveis). O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade de EAC em relação ao controle CELLS.

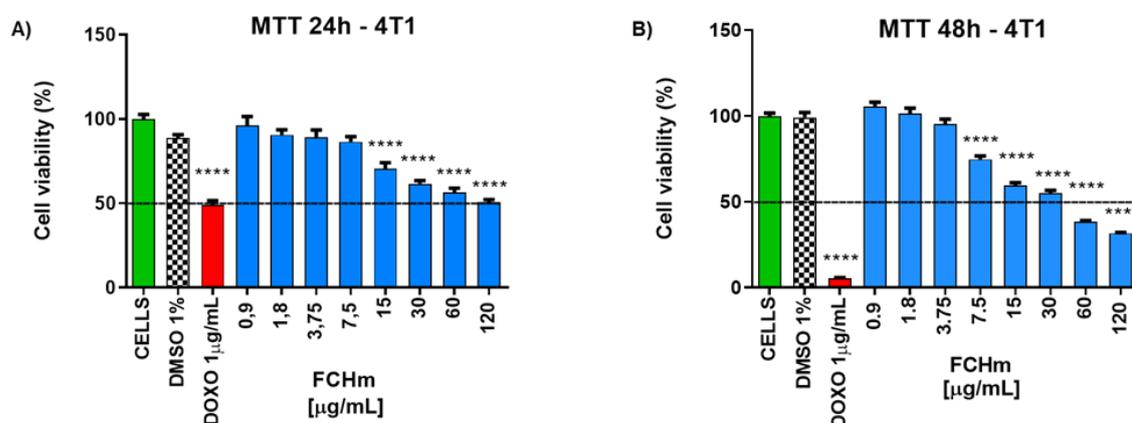
Buscando uma redução de 50% da população tumoral, FCHm também foi testado nas mesmas concentrações, porém no tempo de 48 horas. Na figura 17 em “B”, observou-se um perfil de inibição concentração-dependente a partir de 15µg/mL, semelhante a EBAC, em 24h, para EAC. Houve redução de quase 60% da população celular em 60µg/mL ( $43.55 \pm 2.84$  células viáveis). A concentração de 120µg/mL inibiu pouco menos de 70% de EAC ( $33.94 \pm 3.63$  células viáveis). O quimioterápico CIS reduziu a viabilidade celular acima de 90% ( $5.80 \pm 1.42$  células viáveis). O grupo DMSO não mostrando efeito sobre a viabilidade de EAC, em relação ao controle CELLS.

Assim como EBAC, FCHm permitiu o cálculo da concentração inibitória para 50% das células, obtendo um valor aproximado também de 40µg/mL (figura 18), visto que o perfil de queda no intervalo das concentrações foi semelhante em ambos.



**Figura 18.** Gráfico representando a  $IC_{50} \approx 40 \mu\text{g/mL}$  da fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm) após 48 horas de tratamento em células EAC (tumor ascítico de Ehrlich) obtido a partir do ensaio MTT. A  $IC_{50}$  foi calculada por regressão não linear utilizando o software *GraphPad Prism 8*.

Os resultados do extrato FCHm sobre a viabilidade celular de 4T1 são apresentados na figura 19, em 24 e 48 horas:

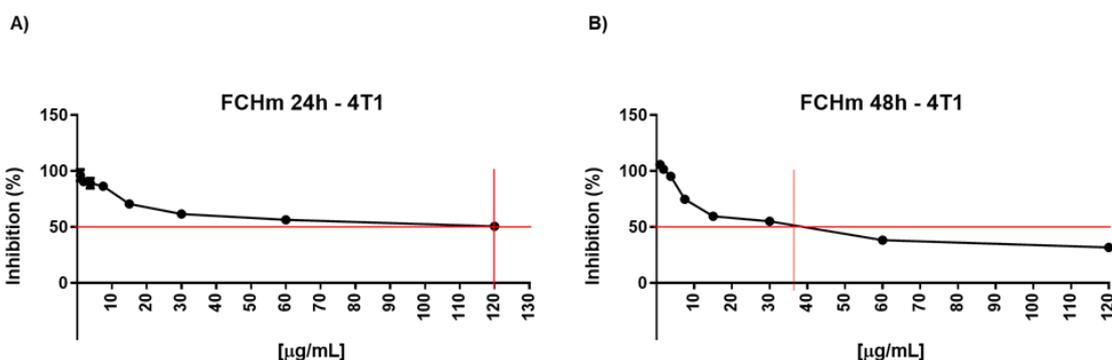


**Figura 19.** Gráfico de viabilidade celular (MTT) da fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm) nas concentrações de 0,9 à 120 µg/mL em células 4T1 (tumor de mama murino) após: **A) 24 horas de tratamento e B) 48 horas de tratamento.** DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. DOXO: doxorubicina, controle positivo à 1 µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média  $\pm$  erro padrão da média utilizando o software *GraphPad Prism 8*. *One-way ANOVA* seguido do pós-teste *Tukey*

para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.

De acordo com a figura 19, o extrato apresentou um efeito concentração-dependente de inibição celular nos dois tempos testados, a partir da concentração de 3,75  $\mu\text{g/mL}$ . Em 24h, o maior efeito foi observado em 120  $\mu\text{g/mL}$  ( $50.5 \pm 1.6$  células viáveis), com redução de 50% da população tumoral. Esse efeito é potencializado em 48h, semelhante ao comportamento de EBDHm para 4T1. O quimioterápico DOXO reduziu a viabilidade celular em 50% ( $49 \pm 2.4$  células viáveis). O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade celular.

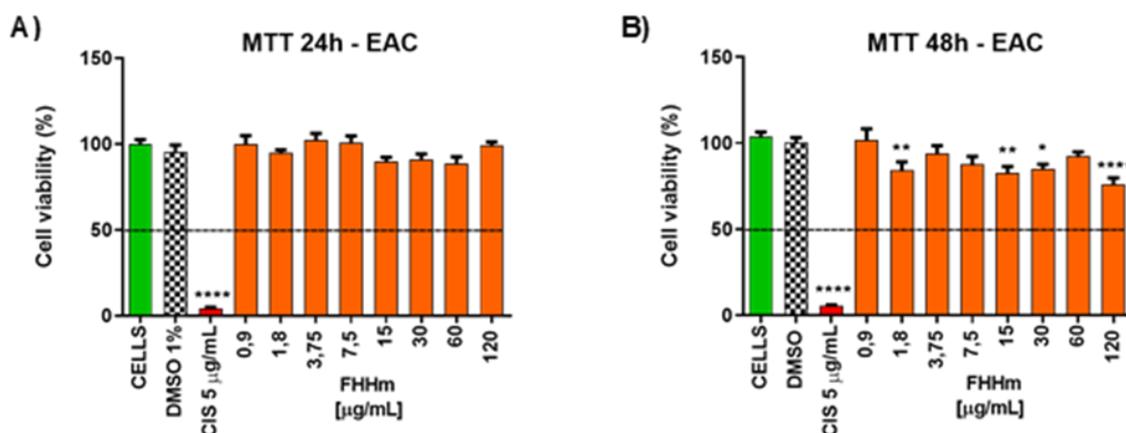
Em 48h, FCHm também atinge um efeito citotóxico para mais de 50% da população celular em 60  $\mu\text{g/mL}$  ( $38.3 \pm 0.7$  células viáveis), com melhor desempenho na maior concentração (120  $\mu\text{g/mL}$ ;  $31.7 \pm 0.5$  células viáveis). O quimioterápico DOXO manteve uma redução da viabilidade celular maior que 90% ( $5.3 \pm 0.5$  células viáveis). O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade celular. Estes resultados possibilitaram o cálculo da  $IC_{50}$  tanto em 24h ( $\cong 120\mu\text{g/mL}$ ) como em 48h ( $\cong 37\mu\text{g/mL}$ ), através de regressão não linear (figura 20).



**Figura 20.** Gráfico representando as  $IC_{50}$  da fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm): A)  $IC_{50} \cong 120\mu\text{g/mL}$  após 24 horas de tratamento e B)  $IC_{50} \cong 37\mu\text{g/mL}$  após 48 horas de tratamento em células 4T1 (tumor de mama murino) obtido a partir do ensaio MTT. A  $IC_{50}$  foi calculada por regressão não linear utilizando o software *GraphPad Prism 8*.

## 5.7 Resultado do efeito da fração hexano do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FHHm) em EAC e 4T1, pelo ensaio MTT, em 24 e 48 horas

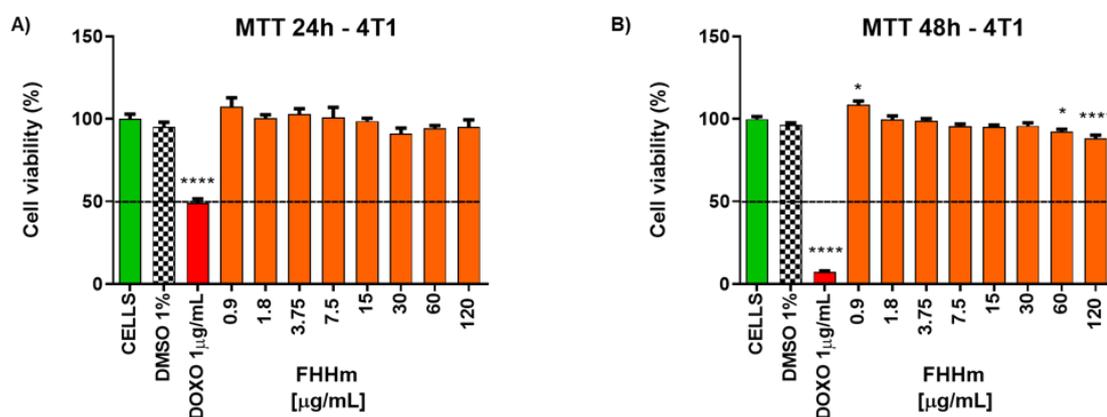
Os resultados do extrato FHHm sobre a viabilidade celular de EAC são apresentados na figura 21, em 24 e 48 horas:



**Figura 21. Gráfico de viabilidade celular (MTT) da fração hexano do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FHHm) nas concentrações de 0,9 à 120µg/mL em células EAC (tumor ascítico de Ehrlich) após: A) 24 horas de tratamento e B) 48 horas de tratamento.** DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. CIS: cisplatina, controle positivo à 5µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o software *GraphPad Prism 8*. *One-way ANOVA* seguido do pós-teste *Tukey* para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.

De acordo com figura 21 em “A”, FHHm não foi capaz de reduzir a viabilidade celular de forma significativa em 24 horas. O quimioterápico CIS reduziu a viabilidade celular ( $4.15 \pm 0.75$  células viáveis) em 24 horas. Em “B”, observamos uma redução da viabilidade de forma estatisticamente significativa em 4 concentrações: 1,8, 15, 30 e 120µg/mL, onde a última apresentou redução de 30% ( $76.22 \pm 3.61$  células viáveis), mas nenhuma foi capaz de reduzir acima de 50%. O quimioterápico CIS reduziu a viabilidade celular ( $5.41 \pm 0.62$  células viáveis) em 48 horas. O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade de EAC em relação ao controle CELLS.

Os resultados do extrato FHHm sobre a viabilidade celular de 4T1 são apresentados na figura 22, em 24 e 48 horas:

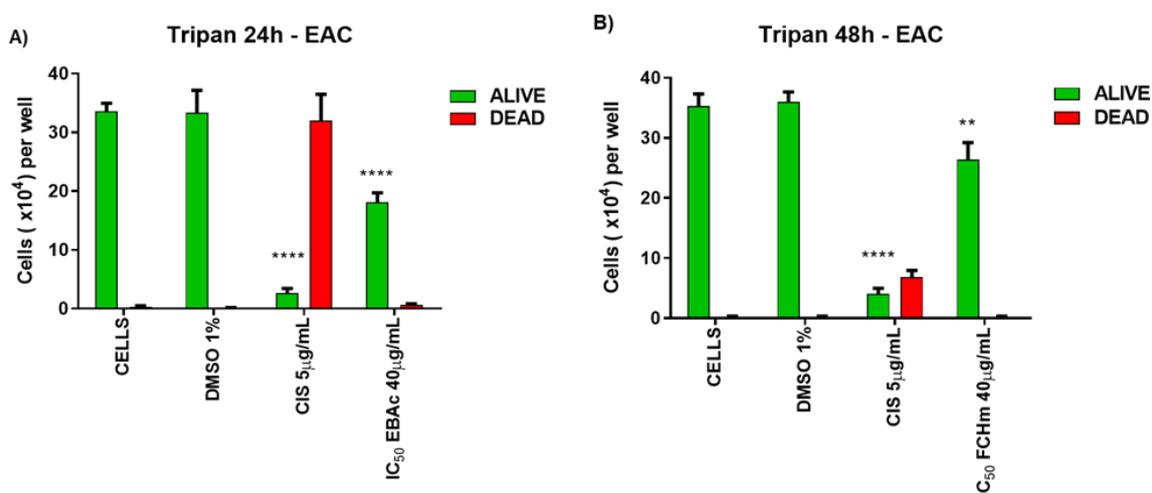


**Figura 22. Gráfico de viabilidade celular (MTT) da fração hexano do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FHHm) nas concentrações de 0,9 à 120µg/mL em células 4T1 (tumor de mama murino) após: A) 24 horas de tratamento e B) 48 horas de tratamento.** DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. DOXO: doxorubicina, controle positivo à 1µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o software *GraphPad Prism 8*. *One-way ANOVA* seguido do pós-teste *Tukey* para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.

De acordo com a figura 22, o extrato apresentou um efeito inibitório apenas na maior concentração testada, sendo estatisticamente significativa apenas em 48h (120µg/mL;  $88.3 \pm 1.8$  células viáveis), o que inviabilizou o cálculo de uma  $IC_{50}$  para este grupo. O quimioterápico DOXO reduziu a viabilidade celular em 50% ( $49 \pm 2.4$  células viáveis) em 24 horas. O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade de 4T1 em relação ao controle CELLS. O quimioterápico DOXO reduziu a viabilidade celular em mais de 90% ( $7.4 \pm 0.5$  células viáveis) em 48 horas. O grupo DMSO não mostrou efeito sobre a viabilidade de 4T1 em relação ao controle CELLS.

## 5.8 Resultado do efeito das IC<sub>50</sub> de *Arrabidaea chica* e *Hypnea musciformis* em EAC no ensaio *Tripan blue*

Os gráficos na figura 23 mostram o resultado das IC<sub>50</sub> de EBAC e FCHm em EAC, em 24 e 48 horas, respectivamente:



**Figura 23.** Gráfico de viabilidade celular (Tripan) das IC<sub>50</sub> após: A) 24 horas de tratamento com o extrato bruto de *Arrabidaea chica* (EBAC) à 40µg/mL e B) 48 horas de tratamento com a fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm) à 40µg/mL em células EAC (tumor ascítico de *Ehrlich*). DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. CIS: cisplatina, controle positivo à 5µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o *software GraphPad Prism 8*. *Two-way ANOVA* seguido do pós-teste *Bonferroni* para comparações múltiplas, onde \*p<0,05, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001 e \*\*\*\* p<0,0001 em relação ao controle CELLS (ALIVE).

De acordo com a figura 23 em “A”, EBAC teve uma redução significativa da população celular viável ( $18.1 \times 10^4$ ) com relação ao controle CELLS ( $33.5 \times 10^4$ ), ambos representados pelas barras em verde (ALIVE). Com relação a população de células mortas, nenhum destes grupos exibiu quantidade significativa para comparação. O controle positivo CIS foi o que apresentou maior redução das células viáveis ( $2.6 \times 10^4$ ) em comparação ao controle CELLS. Além, foi o único que exibiu células mortas,

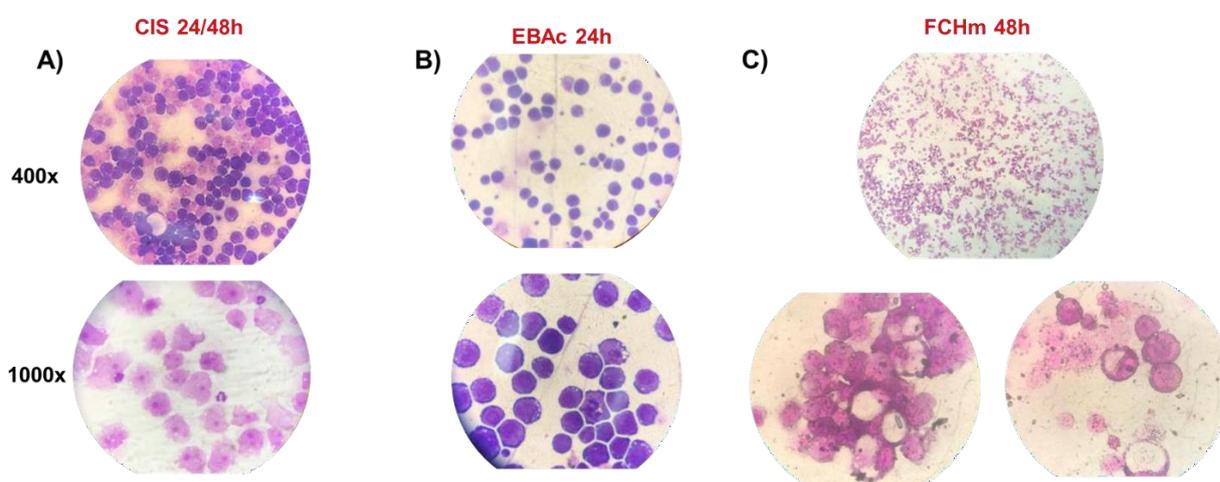
inclusive em quantidade quase superior ( $32 \times 10^4$ ) ao número de células viváveis do grupo CELLS. O grupo DMSO ( $33.3 \times 10^4$ ) não mostrou efeito sobre a viabilidade de EAC em relação ao controle CELLS ( $33.5 \times 10^4$ ).

Já em “B”, FCHm também teve uma redução em 48h, de forma menos expressiva, da população celular viável ( $26.3 \times 10^4$ ) com relação ao controle CELLS ( $35.2 \times 10^4$ ), ambos representados pelas barras em verde (ALIVE). Com relação a população de células mortas, assim, como ocorrido em “A”, nenhum destes grupos exibiu quantidade significativa para comparação. O controle positivo CIS repetiu o desempenho com maior redução das células viáveis ( $4 \times 10^4$ ) em comparação ao controle CELLS. Também foi o único dentre os grupos a exibir células mortas ( $6.8 \times 10^4$ ). O grupo DMSO ( $36 \times 10^4$ ) não mostrou efeito sobre a viabilidade de EAC em relação ao controle CELLS ( $35.2 \times 10^4$ ).

O resultado do Tripán nos levou a investigar a hipótese de os extratos agirem através da diminuição da quantidade de células por provocar danos irreversíveis ao material genético ou ao metabolismo celular, induzindo indiretamente uma morte por apoptose. Para isto, realizamos os ensaios de micronúcleo e de espécies reativas de oxigênio (EROs).

### 5.9 Resultado do efeito da $IC_{50}$ de *Arrabidaea chica* e *Hypnea musciformis* em EAC no ensaio micronúcleo

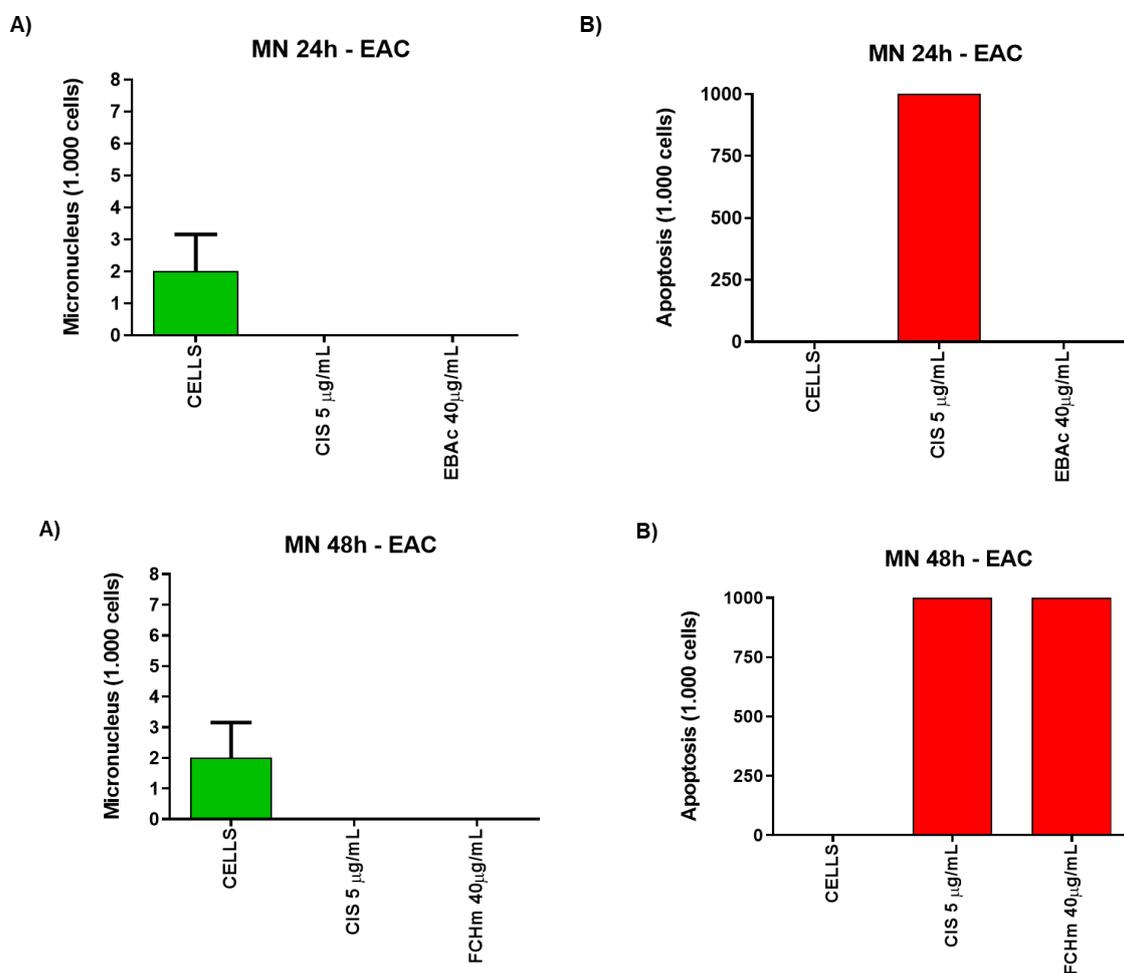
A figura 24 mostra o efeito das  $IC_{50}$  de EBAC e FCHm em EAC, em 24 e 48 horas, respectivamente, em lâminas para contagem no ensaio micronúcleo:



**Figura 24: Células do tumor ascítico de Ehrlich no aumento de 400x (em cima) e 1000x (embaixo).** Em **A) CIS:** cisplatina, controle positivo à 5µg/mL após 24 horas de tratamento. Em **B) EBAC:** extrato bruto de *Arrabidaea chica* à 40µg/mL após 24 horas de tratamento. Em **C) FCHm:** fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm) à 40µg/mL após 48 horas de tratamento. Coloração com kit panóptico rápido.

Como observado na figura 24, o extrato EBAC, em 24h, não mostrou indicativos de alteração na morfologia celular semelhante a um estado de morte, nem gerou a formação de micronúcleos no citoplasma. Já para FCHm, em 48h, todas as lâminas preparadas apresentavam as células em estágios semelhantes ao controle CIS (apoptose). Como já relatado no tópico “revisão de literatura”, o efeito de indução de apoptose em EAC pela cisplatina já foi relatado.

Os gráficos da figura 25 apresentam o resultado das IC<sub>50</sub> de EBAc e FCHm em EAC, em 24 e 48 horas, respectivamente:



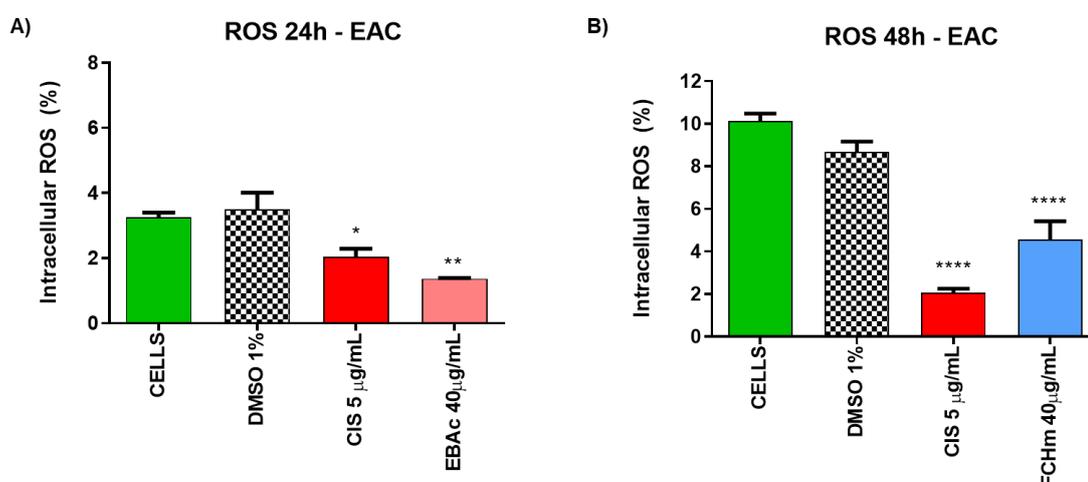
**Figura 25.** Gráfico indicando presença de micronúcleo (em A) e apoptose (em B) em lâminas coradas com kit panóptico. As células EAC (tumor ascítico de Ehrlich) foram tratadas após 24 horas com o extrato bruto de *Arrabidaea chica* (EBAc) à 40µg/mL (superior) e após 48 horas com a fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (inferior). CIS: cisplatina, controle positivo à 5µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o *software GraphPad Prism 8*. *One-way ANOVA* seguido do pós-teste *Tukey* para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.

A figura 25 reitera o que já foi relatado de acordo com a análise das lâminas: não houve formação de micronúcleo para EBAc em EAC, em 24h, enquanto que o

controle CIS, em ambos os tempos, e FCHm, em 48h, induzem estado de apoptose na célula tumoral.

#### 5.10 Resultado dos efeitos das IC<sub>50</sub> de *Arrabidaea chica* e *Hypnea musciformis* em EAC no ensaio de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os gráficos da figura 26 mostram o resultado das IC<sub>50</sub> de EBAC e FCHm em EAC, em 24 e 48 horas, respectivamente:



**Figura 26.** Gráfico da produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) intracelular após: A) 24 horas com o extrato bruto de *Arrabidaea chica* (EBAC) à 40µg/mL e B) 48 horas de tratamento com a fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm) à 40µg/mL em células EAC (tumor ascítico de Ehrlich). DMSO: dimetilsulfóxido, controle do veículo de diluição à 1%. CIS: cisplatina, controle positivo à 5µg/mL. CELLS: controle celular sem tratamento. Dados representados pela média ± erro padrão da média utilizando o software *GraphPad Prism 8*. *One-way ANOVA* seguido do pós-teste *Tukey* para comparações múltiplas, onde \* $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  e \*\*\*\*  $p < 0,0001$  em relação ao controle celular.

De acordo com a figura 26, em A, comparando com o grupo CELLS (3.2%), a porcentagem de produção de radicais livres do grupo CIS (2%) e EBAC (1.3%) foram inferiores, sendo a última menor até que o controle positivo. Em B, comparando com o grupo CELLS (10%), a porcentagem de produção de radicais livres dos grupos CIS

(2%) e FCHm (4.5%) também foram inferiores, com o extrato apresentando redução semelhante ao controle positivo. O controle DMSO não foi significativo em relação ao controle CELLS em ambos os tempos.

Se confirmado, esta diminuição do metabolismo contribuiria para a hipótese de os extratos causarem uma diminuição do metabolismo ou possível parada no ciclo celular, diminuindo a proliferação de células tumorais. Para isso, torna-se imprescindível a realização do ensaio de ciclo celular para investigar a ação dos extratos.

## 6. DISCUSSÃO

A busca por compostos de origem natural com atividade antitumoral faz parte do carro-chefe de nosso laboratório. Desta vez, optamos pela padronização de um modelo de indução tumoral *in vivo* para permitir novos ensaios. Os tumores *in vivo* são utilizados como modelos de experimentação, simulando a fisiologia de um fármaco administrado em humanos. (OZASLAN et al., 2011). Apesar do tumor ascítico de Ehrlich ser considerado comum, fez-se necessária à padronização deste modelo de indução tumoral na UFAL.

Foi exatamente através dos trabalhos de SOUZA (2020) que permitiu observar que as células predominantes no líquido peritoneal são compostas majoritariamente por células tumorais, seguido de neutrófilos e mononucleares. Essa composição da ascite tornou possível a tentativa de cultivo destas células em estufa de CO<sub>2</sub>, pois poderia ser um estágio de triagem antes dos gastos de animais e compostos para modelos *in vivo*.

Com os resultados da padronização da viabilidade de EAC em cultura e de concentrações de quimioterápico estabelecidas, pudemos dar continuidade nos ensaios em EAC, desta vez com foco na triagem de extratos de produtos naturais (plantas e macroalgas) que já mostraram efetividade em linhagens tumorais. Como ambas as linhagens celulares (EAC e 4T1) sobrevivem em cultura por tempo superior a 48 horas, elegemos 8 concentrações destes extratos para avaliar nos tempos de 24 e 48 horas.

Até a presente data, nosso grupo conhece apenas dois trabalhos que tenham realizado ensaios com EAC de forma *in vitro*: o estudo de Ghose (2022) e Kabir (2013). No entanto, a forma de cultura para realização dos ensaios *in vitro* não foram esclarecidas. Apesar do meio e suplementação (RPMI 10% SBF + L-glutamina) ser o mesmo, os autores não descrevem se há cultivo na estufa antes do plaqueamento. Há uma divergência quanto a quantidade de células plaqueadas ( $5 \times 10^5$  cels/poço) e tempo de incubação na estufa (24 horas para iniciar o tratamento).

Para verificar a morfologia celular e as condições destas células fora do organismo vivo, o início deste trabalho consistiu no preparo de lâminas com amostras do infiltrado peritoneal e da realização de ensaios de viabilidade celular com MTT e Tripán blue.

O MTT é um sal metabolizado no interior da mitocôndria pela enzima succinato desidrogenase, a quantidade de cristais de formazana formados correspondem a atividade celular, indicando células viáveis (DENIZOT, 1986). O ensaio de viabilidade Tripán blue se baseia na internalização deste corante apenas em células com membrana rompida, sendo este um sinal de morte (Coder, 2001). As barras elevadas nos gráficos mostram que as células, mesmo fora do corpo do animal, estavam viáveis até 48 horas após o plaqueamento, conforme confirmado pelos ensaios MTT (figura 6) e Tripán blue (figura 7). Em seguida ao tempo de cultivo estabelecido, realizamos plaqueamentos diversos para conseguir uma confluência equilibrada em placas de 96 poços de fundo “U”, já que as células não são aderentes (dados não mostrados). Optamos pela quantidade de  $5 \times 10^4$  células por poço, por se tratarem de células maiores que outras em suspensão utilizadas por nosso grupo (como leucemias).

O passo seguinte consistiu na padronização de um controle positivo para ser utilizado nos ensaios terapêuticos. Aprovada pela FDA em 1978, inicialmente para uso em cânceres de testículos e bexiga, a cis-diamminedichloroplatinum (II), CDDP ou cisplatina é utilizado para diversos cânceres, como de cabeça e pescoço, pulmão, mama, ovários, testículos, carcinomas, dentre outros (GALLUZZI et al. 2012 e DASARI & TCHOUNWOU, 2014), podendo ser utilizada sozinha ou em conjunto com outros quimioterápicos.

Além do uso clínico para cânceres de mama, seu uso também já foi relatado na literatura induzindo morte por apoptose em células EAC (GHOSH & MAITY, 2006 e DASARI & TCHOUNWOU, 2014), o que a tornou uma candidata para a padronização de uma concentração que servisse como controle positivo em futuros ensaios. De acordo com a figura 8, adotamos a concentração de 5µg/mL como concentração para os ensaios, tanto em 24 como em 48 horas.

Dando continuidade ao projeto, iniciamos a busca por atividade antitumoral de compostos presentes em nosso laboratório com o extrato bruto aquoso de *Arrabidaea chica* (EBAc) nas linhagens de mama EAC e 4T1.

EBAc reduziu a viabilidade celular de EAC em 24h pelo ensaio MTT de forma concentração-dependente, a partir de 3,75µg/mL (figura 9). Fato que tornou possível o cálculo de uma  $IC_{50} \cong 40 \mu\text{g/mL}$  (figura 10). O desempenho foi semelhante ao controle positivo CIS. Para a linhagem tumoral 4T1, no entanto, não houve redução estatisticamente significativa em nenhum dos tempos testados.

Os resultados de Rocha et al. (2019) e Michel et al. (2013 e 2015) corroboram com a atividade antitumoral relatada para *A. chica*, apesar da dificuldade de comparar efeito de extratos diretamente, pois seus compostos dependerão da forma de obtenção do extrato (GUEDES et al., 2013).

Rocha et al. (2019) mostraram o potencial antioxidante e antitumoral de extratos etanólico de *A. chica in vivo* em tumor de mama induzido por DMBA. Não foi observada toxicidade sistêmica do extrato. Ribeiro et al. (2012) também avaliou o extrato etanólico de *A. chica in vivo* em tumor sólido de EAC. Foi observado que a administração oral por 10 dias inibiu o tumor sólido e não mostrou toxicidade nos ensaios bioquímicos e hematológicos.

MICHEL et al. (2013) também relatou atividade antitumoral do extrato etanólico de *A. chica*. Os resultados *in vitro* mostraram atividade contra 2 linhagens de leucemia. No ensaio *in vivo* não houve relato de toxicidade hepática ou renal pela administração oral do extrato nos camundongos.

Já em 2015, Michel et al. (2015) avaliou atividade anti-inflamatória *in vivo* e antitumoral *in vitro* do extrato aquoso e etanólico de *A. chica*. Enquanto ambos extratos tiveram a primeira atividade confirmada, para a segunda, apenas o extrato etanólico e sua fração se mostraram uma alternativa, inibindo atividade tumoral em 48 horas em células de leucemia (HL-60, célula mielóide e JURKAT, célula linfóide T), mas sem atividade contra o câncer de mama humano (MCF-7).

Os achados quanto a ausência de citotoxicidade fora das linhagens tumorais se mostra promissor quanto a continuidade dos ensaios com este extrato.

Em seguida realizamos os ensaios de viabilidade com extratos brutos e frações de *Hypnea musciformis*, tanto em EAC como em 4T1. Dos quatro extratos, apenas o extrato bruto diclorometano (EBDHm) e a fração clorofórmica deste extrato (FCHm) mostraram efeito antitumoral e, portanto, serão discutidas abaixo.

EBDHm não reduziu a viabilidade celular de EAC da forma desejada no MTT, tornando inviável a obtenção de  $IC_{50}$  em nenhum dos tempos testados (figura 12). Já para a linhagem 4T1, este extrato mostrou um efeito concentração-dependente também a partir de 3,75µg/mL (figura 13), tanto em 24 como em 48 horas no MTT. EBDHm foi capaz de inibir mais de 50% das células tumorais em 48 horas, o que tornou possível o cálculo de uma  $IC_{50} \cong 110\mu\text{g/mL}$  (figura 14).

Para finalizar a etapa de triagem, FCHm foi testado em 24 e 48 horas, tanto em EAC quanto em 4T1. Para a primeira linhagem celular, houve redução da viabilidade celular de forma concentração-dependente, mais uma vez a partir de a partir de 3,75µg/mL, em 48 horas (figura 17). Com inibição acima de 50% da população celular, foi possível o cálculo de uma  $IC_{50} \cong 40\mu\text{g/mL}$  (figura 18), assim como em EBAC 24 horas para EAC.

Na linhagem 4T1, FCHm repetiu o excelente desempenho, atuando de forma concentração-dependente desde o menor valor (0,9µg/mL) tanto em 24 como em 48 horas (figura 19). Houve redução de mais de 50% da população celular nos dois tempos, tornando possível os cálculos de  $IC_{50} \cong 120\mu\text{g/mL}$  em 24 horas e  $IC_{50} \cong 37\mu\text{g/mL}$  em 48 horas (figura 20).

Os achados acima corroboram com a atividade antitumoral relatada para *H. musciformis*. Taskin *et al.* (2010) demonstraram que os extratos diclorometano, clorofórmio e etanólico de *H. musciformis*, na concentração de 100µg/mL, apresentaram promissora atividade *in vitro* em linhagens tumorais de mama e de próstata. Guedes *et al* (2013) realizou uma triagem do potencial antiproliferativo de várias espécies de macroalgas das três classes, relatando atividade antitumoral de Hypnea em carcinoma pulmonar humano, adenocarcinoma de laringe humano e leucemia promielocítica crônica.

Em estudos anteriores, nosso grupo relatou atividade biológica do extrato bruto etanólico de *H. musciformis* contra o zika vírus (WEIGEL-GOMES, 2018), tanto no pré como no pós-tratamento em células VERO-E6. Shi *et al.* (2017) relata atividade das carragenanas tanto na ligação com o receptor de proteína viral, impedindo a ligação do vírus com o receptor celular, quanto na internalização do vírus e na sua replicação.

Nosso grupo de pesquisa também relatou atividade antitumoral contra linhagem de leucemia linfoblástica aguda CCRF-CEM, obtendo uma  $IC_{50} \cong 64\mu\text{g/mL}$  para o extrato bruto diclorometano e  $IC_{50} \cong 65\mu\text{g/mL}$  para a fração clorofórmica deste extrato. Também realizamos ensaios para avaliar o potencial citotóxico desses extratos em linhagem de sangue periférico humano (PBMC), obtendo  $CC_{50} \cong 100\mu\text{g/mL}$  e  $CC_{50} \cong 230\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. (WEIGEL-GOMES, 2019). Estes resultados reforçam que o potencial antitumoral da alga é superior a toxicidade apresentada, devido a diferença de valores entre as concentrações terapêutica e tóxica.

Após a realização da triagem em ambas linhagens de mama, optamos pela continuidade dos ensaios com as IC<sub>50</sub> obtidas em EAC, pois havia disponibilidade de animais para a indução tumoral e retirada das células. Além, os ensaios foram realizados no período da pandemia de COVID-19, que resultou em isolamento social de alunos e funcionários da UFAL, bem como diminuição de recursos para pesquisa e manejo dos animais do biotério central da universidade. Os ensaios com a linhagem comercial poderiam ser realizados em paralelo ou após os ensaios com o tumor de *Ehrlich*. Para dar continuidade aos ensaios com a linhagem EAC foi realizado o ensaio *Tripán blue* com as IC<sub>50</sub> obtidas em EBAC (24 horas) e FCHm (48 horas).

O resultado de EBAC mostrou uma diminuição da quantidade de células tumorais, mas com ausência de células mortas. Este resultado se repetiu em 48 horas para FCHm (figura 23). O diferencial do tempo de ação entre os dois ensaios foi observado no controle CIS. Enquanto que em 24 horas houve pouca quantidade de células vivas ( $2.6 \times 10^4$ ) e muitas células mortas ( $32 \times 10^4$ ), em 48 horas houve redução dos 2 tipos celulares ( $4 \times 10^4$  vivas e  $6.8 \times 10^4$  mortas). Fato justificado pelo maior tempo de degradação celular pela ação da cisplatina, como já descrito no início desta discussão.

Os resultados do ensaio *Tripán blue* em EAC corroboram com o observado no ensaio MTT, onde ambos os extratos mostraram atividade na viabilidade celular. Como não houve demonstração de morte pelo *Tripán*, decidimos avaliar a hipótese de os extratos estarem induzindo algum dano ao material genético ou ao metabolismo celular, o que induziria a uma morte indireta por apoptose. Demos continuidade com os estudos das concentrações inibitórias em EAC, desta vez realizando o ensaio de micronúcleo.

A figura 24 apresentou, em diferentes aumentos, como a morfologia de EAC se alterou na presença do quimioterápico CIS, entrando num estado de apoptose. Este comportamento também foi observado para o grupo tratado com FCHm, em 48 horas. Não houve presença de células vivas para este grupo. Já em EBAC, a morfologia celular não se alterou, pois se apresentou semelhante ao controle CELLS. Não houve presença de células mortas nem de micronúcleos no citoplasma das células deste grupo. Os dados são confirmados após o gráfico da contagem das lâminas deste ensaio (figura 25).

O resultado do *Tripán* e do micronúcleo para EBAC corroboraram com nossa hipótese inicial de indução de morte de forma indireta, mais tardia. No entanto, o resultado extremamente alto de apoptose presente nas células tratadas com FCHm diverge do observado pelo ensaio *Tripán blue* para este extrato. Uma nova repetição deve ser realizada para este grupo, a fim de confirmar este resultado.

Por fim, buscando avaliar o efeito no metabolismo das células tumorais, houve adição dos extratos para posterior ensaio de espécies reativas de oxigênio (EROs). Seu papel na formação tumoral já foi descrito na seção “revisão de literatura”.

De acordo com a figura 26, houve redução da produção de EROs intracelular no grupo EBAC em relação ao controle CELLS, inclusive com redução superior ao controle positivo CIS. A redução também foi observada para FCHm em relação ao controle CELLS.

Tanto a diminuição quanto um aumento da produção de radicais livres podem estar relacionados com a indução de morte celular. O aumento pela concentração de radicais superior ao mecanismo de reparo, que se acumulam, gerando dano ao material genético, e a diminuição, pois indica que há uma redução da atividade metabólica das células. (Reuter et al., 2010)

Este efeito de produtos naturais agindo no controle do ciclo celular é conhecido, como relatado na seção “revisão de literatura”, o que reitera nossa hipótese da realização do ensaio de ciclo celular com estas IC<sub>50</sub>.

O ensaio de apoptose com anexina V também seria útil, pois se trata de um ensaio específico que comprova a morte celular, seja por apoptose ou necrose. Outra forma válida de ensaio seria a prospecção dos extratos, a fim de confirmar sua composição e realizar os ensaios com as substâncias isoladamente. Dessa forma, os efeitos citotóxicos tanto para linhagens saudáveis quanto para linhagens tumorais seriam bem relatados.

Como a forma de produção dos extratos varia de acordo com o método químico, estudos antitumorais que sejam semelhantes tanto no delineamento quanto na composição dos extratos não são tão simples de serem achados. O estudo de Ghose et al. (2022) também utiliza *H. musciformis*, juntamente com nanopartículas de prata em linhagens de tumor de mama. Essa combinação foi capaz de induzir a inibição do crescimento tumoral por indução de morte celular por apoptose em células do tumor ascítico de Ehrlich (EAC), com IC<sub>50</sub>  $\cong$  40,45µg/mL, e câncer de mama humano (MCF-

7), com  $IC_{50} \cong 36,95\mu\text{g/mL}$  *in vitro*, após 48h de tratamento. O estudo também realizou ensaios *in vivo* em camundongos portadores do tumor EAC, calculando a dose de 3mg/kg/dia durante 5 dias para inibição de 51% do tumor. Estes resultados corroboram com a redução da viabilidade celular para linhagem EAC encontrada em nosso estudo. No entanto, diferem quanto ao possível mecanismo de ação, visto que não foi realizado nenhum ensaio específico para avaliar morte celular, diferente de Ghose. Verificou-se também que estas  $IC_{50}$  aumentaram a produção de radicais livres, também pelo ensaio DCFH-DA, enquanto a fração deste estudo (FCHm) diminui a produção de radicais em EAC.

Além de *Hypnea*, outras algas vermelhas possuem relato de atividade contra tumores, como a *Palmaria palmata* para câncer de cérvix, *Gracilaria fisheri* para colangiocarcinoma, *Laurencia papillosa* para câncer de mama humano (MCF-7) (YUAN, Y. V. & WALSH, N. A. 2006; SAE-LAO et al., 2017 e GHANNAM et al., 2018) e *Porphyra dentata* em câncer de mama 4T1 (KAZBOWSKA, K. et al., 2013).

O estudo de Ruan et al. (2018) com algas vermelhas cita 43 compostos isolado que apresentaram atividade antitumoral, como a subexpressão de Topo I e VEGF em diversas linhagens tumorais de mama, incluindo o já citado adenocarcinoma mamário (MCF-7). Estes resultados podem ser indicativos do mecanismo de ação dos extratos de *H musciformis*, o que sugere fortemente a confirmação da composição dos extratos aqui testados para elucidar seus mecanismos de ação nas linhagens celulares.

## 7. CONCLUSÕES

O extrato bruto de *Arrabidaea chica* (EBAc) apresentou efeito na viabilidade da linhagem EAC após 24 horas, enquanto o extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (EBDHm) apresentou após 48 horas de tratamento para a linhagem 4T1. A fração clorofórmica do extrato bruto diclorometano de *Hypnea musciformis* (FCHm) apresentou atividade antitumoral para ambas as linhagens testadas (EAC e 4T1), permitindo cálculo de concentrações inibitórias em 48 horas para EAC e 24 e 48 horas para 4T1. Não foi observada indução de morte das linhagens utilizadas no ensaio *Tripán blue*, após tratamento com as concentrações inibitórias (IC<sub>50</sub>) calculadas, além da ausência da formação de micronúcleos celulares. Para FCHm na linhagem EAC, sugere-se uma diminuição no metabolismo celular, com a diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio.

## 8. PERSPECTIVAS

1. Realizar o ensaio de ciclo celular e anexina V com as IC<sub>50</sub> encontradas de EBAc e FCHm em EAC, a fim de elucidar o mecanismo dos extratos;
2. Realizar prospecção fitoquímica para confirmar as substâncias presentes e confirmar seus efeitos citotóxicos para linhagens tumorais e saudáveis;
3. Avançar com ensaios com as IC<sub>50</sub> encontradas de EBDHm e FCHm na linhagem tumoral 4T1.

## 9. REFERÊNCIAS

1. ADAMI, H.; HUNTER, D.; TRICHOPOULOS, D. (ed.). **Textbook of cancer epidemiology**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2008.
2. ALBERTS, B. et al. *Biologia molecular da célula*. 6ed. Editora **Artmed**, 2017.
3. ALVES, M.G.C.F. et al. Antioxidant, cytotoxic and hemolytic effects of sulfated galactans from edible red alga *Hypnea musciformis*. **J Appl Phycol** 24:1217-1227, 2012.
4. ARAVIND, P., Narasimha, M. & Prasad, V. Modulation of cadmiuminduced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate glutathione cycle and glutathione metabolism. **Plant Physiol Biochem** 43:107-16, 2005.
5. ASLAKSON, C J & Miller, F R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. **Cancer Res** 15; 52 (6):1399-405, 1992.
6. BARBATO, L. et al. Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. **CELLS**. 8, 926, 2019.
7. BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, Hoboken,v. 68, n. 6, p. 394-424, Nov. 2018
8. BREAST CANCER ASSOCIATION CONSORTIUM et al. Breast Cancer Risk Genes - Association Analysis in More than 113,000 Women. **The New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 5, p. 428-39, 2021.

9. CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and pro-oxidant behavior of lavanoids: Structure-activity relationship. **Free. Radic. Biol. Med.**22: 749-760, 1997.
10. CHAKRABORTY, T. et al. Acanthus ilicifolius plant extract prevents DNA alterations in a transplantable Ehrlich ascites carcinoma-bearing murine model. **World J. Gastroenterol.**, v. 13, p. 6538-6548, 2007.
11. CODER, D. M. Assessment of Cell Viability. **Current Protocols in Cytometry**, 2001.
12. CORTEZ DE SÁ, J. et al. Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of *Arrabidaea chica* Verlot. **BMC Complementary and Alternative Medicine**,16:1, 1-11, 2016.
13. COSENZA, V. A. et al. Chemical and rheological characterization of the carrageenans from *Hypnea musciformis* (Wulfen) Lamoroux. **Carbohydrate Polymers**, 102, 780-89, 2014.
14. CUNHA, L. & GRENHA, A. Sulfated Seaweed Polysaccharides as Multifunctional Materials in Drug Delivery Applications. **Marine Drugs**,14, 42, 2016.
15. DAGLI, Z. et al. Inhibition of ascitic ehrlich tumr cell growth by intraperitoneal injection of *pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) butanolic residue. **Brazilian Archives of Biology and Technology na International Journal**, v. 53, n. 3, p. 609-613, 2010.
16. DASARI, S. & BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **Eur J Pharmacol**, 2014.
17. DENIZOT, F. & LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J IMMUNOL METHODS**, 89: 271, 1986.

18. DURACKOVA, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiol Res.** 2009.
19. EHRLICH, P. & APOLANT, H. Beobachtungen uber maligne mausetumoren. **Berliner Klinischer Ocheschrift**, v. 28, p. 871-874, 1906.
20. FENECH, M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology* 181-182: 411 (2002).
21. FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research* vol. 455, p. 81–95, 2000.
22. GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, 31, 1869–1883, 2012.
23. GARCIA-MAYEA, Y. et al. Insights into new mechanisms and models of cancer stem cell multidrug resistance. **Semin Cancer Biol.** 60:166-180, 2019.
24. GHANNAM, A. et al. Isolation, Structural characterization, and antiproliferative activity of phycocolloids from the red seaweed *Laurencia papillosa* on MCF-7 human breast cancer cells. **Int J Biol Macromol.** 108:916-926, 2018.
25. GHOSE, R. et al. *Hypnea musciformis*-mediated Ag/AgCl-NPs inhibit pathogenic bacteria, HCT-116 and MCF-7 cells' growth in vitro and Ehrlich ascites carcinoma cells in vivo in mice. **IET Nanobiotechnol.** 16(2):49-60, 2022.
26. GOSH, S. & MAITY, P. Vascular endothelial growth factor immunoneutralization in combination with cisplatin reduces EAC tumor growth. **International Immunopharmacology**, 6: 1550–1559, 2006.
27. GUEDES, E. A. C.; SILVA, T. G.; AGUIAR, J. S.; BARROS, L. D.; PINOTTI, L. M.; SANT'ANA, E. G. Cytotoxic activity of marine algae against cancerous cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 668–673, 2013.

28. GUERRA, MR et al. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Rev. Bras. Cancerol.** 51(3):227-34, 2005.
29. HANAHAN, D. & WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell.** 144, 2011.
30. INCA. 2020 Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Incidência do câncer no Brasil.** Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil/>>. Acesso em 20 de setembro de 2022.
31. KABIR, S. R. Et al. Pea lectin inhibits growth of Ehrlich ascites carcinoma cells by inducing apoptosis and G2/M cell cycle arrest in vivo in mice. **Phytomedicine**, 20(14), 1288–1296, 2013.
32. KAZBOWSKA, K. et al. In Vitro and In Vivo Anticancer Effects of Sterol Fraction from Red Algae *Porphyra dentata*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1-10, 2013.
33. KUMMAR, V. V. et al. Robbins patologia básica. 9ed. **Grupo GEN**, 2016.
34. KUMAR, A. & JAIKAT, V. Natural products as multidrug resistance modulators in cancer. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 176, 268e291, 2019.
35. LOEWENTHAL, H. & JAHN, G. Übertragung-Suersuche Mit Carcinomatöser Mause-Asciteslussigkeit Und Ihr Verhalten Gegen Physikalische Und Chemische Einwirkungen. **Z. Krebsforsch.** 37: 439-447, 1932.
36. LYU, Q. et al. Proteomic analysis of scallop hepatopancreatic extract provides insights into marine polysaccharide digestion. **Scient. Rep.** 6, 34866, 2016.

37. MAHARANA, D. et al. Oxidative stress tolerance in intertidal red seaweed *Hypnea musciformis* (Wulfen) in relation to environmental components. **Environ Sci Pollut Res.** 2015.
38. MICHEL, A. F. R. M. et al. Evaluation of antiinflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 25; 150(2): 576-82, 2013.
39. MICHEL, A. F. R. M. et al. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, 165, 29–38, 2015.
40. NICOLETTI, I. et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 139, p. 271-279, 1991.
41. OZASLAN, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology** v. 10 (13), p. 2375-2378, 2011.
42. POYTON, R.O et al. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. **Trends Endocrinol Metab.** 20:332–340, 2009.
43. PULASKI, B. A. & Ostrand-Rosenberg, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. **Current Protocols in Immunology**, 20.2.1-20.2.16, 2000.
44. QURISHI, Y. et al. Potential role of natural molecules in health and disease: Importance of boswellic acid. **J. Med. Plants Res.**, 4, 2778-2785, 2010.
45. RIBEIRO, A. F. C. et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 22 (2); 364-73, 2012.

46. ROCHA, K. B. F. et al. Effect of Arrabidaea chica extract against chemically induced breast cancer in animal model. **Acta Cir Bras.** 34(10): e201901001, 2019.
47. RUAN, B. F. et al. Review of the Components of Seaweeds as Potential Candidates in Cancer Therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, 18, 354-366, 2018.
48. SARASWATHY, M. & GONG, S. Different strategies to overcome multidrug resistance in cancer, **Biotechnol. Adv.** 31,1397e1407, 2013.
49. SARTORI, A.C.N. & BASSO, C.S. CÂNCER DE MAMA: UMA BREVE REVISÃO DE LITERATURA. **Perspectiva.** v.43, n.161, p.7-13, 2019.
50. SHI, Q. et al. Overview on the antiviral activities and mechanisms of marine polysaccharides from seaweeds. **Carbohydrate Research** 453-454, 2017.
51. SHOEIB, N.A. et al. In-vitro cytotoxic activities of the major bromophenols of the red alga Polysiphonia lanosa and some novel synthetic isomers. **J. Nat. Prod.** 67(9), 1445-1449, 2004.
52. SILVA. S.L.O. Avaliação do potencial antitumoral de Padiga gymnospora em linhagem de leucemia CCRF-CEM. **Monografia.** Universidade federal de Alagoas, 2016.
53. SINGH, S. et al. Natural Products as Anticancerous Therapeutic Molecules with Special Reference to Enzymatic Targets Topoisomerase, COX, LOX and Aromatase. **Current Protein and Peptide Science**, 19, 238-274, 2018.
54. SOUZA et al. In vitro activities of kappa-carrageenan isolated from red marine alga Hypnea musciformis: Antimicrobial, anticancer and neuroprotective potential. **International Journal of Biological Macromolecules.** 112, 1248-56, 2018.

55. SOUZA, T. P. M. Avaliação in vitro do potencial anticâncer de extratos bruto e fracionados obtidos de folhas de *Bowdichia virgilioides*. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Alagoas, 2015.
56. SOUZA, V.O.; GRANDO, J.P.S.; FILHO, J.O.; Tempo decorrido entre o diagnóstico de câncer de mama e o início do tratamento, em pacientes atendidas no Instituto de Câncer de Londrina (ICL). **RBM Rev Bras Med**, 2008.
57. SOUZA, T. P. M. Padronização do modelo experimental de tumor de Ehrlich em camundongos: avaliação da ação da trifolirizina no crescimento tumoral ascítico. **Qualificação de Doutorado**. Universidade Federal de Alagoas, 2020.
58. SUE-LAO, T. et al. Sulfated Galactans from Red Seaweed *Gracilaria fisheri* Target EGFR and Inhibit Cholangiocarcinoma Cell Proliferation. **Am J Chin Med**. 45(3):615-633, 2017.
59. SULTANA, S. et al. Medicinal Plants Combating Against Cancer - a Green Anticancer Approach. **Asian Pac J Cancer Prev**, 15 (11), 4385-4394, 2014
60. WANG, C.Z.; CALWAY, T.; YUAN, C.S. Herbal medicines as adjuvants for cancer therapeutics. **Am. J. Chin. Med.**, 40, 657-669, 2012.
61. WEIGEL-GOMES, M. V. S. Atividade Antiviral de *Hypnea musciformis*. **Relatório final PIBIC 2017-2018**. Universidade Federal de Alagoas, 2018.
62. WEIGEL-GOMES, M. V. S. Avaliação do potencial antitumoral de extratos de *hypnea musciformis* em CCRF-CEM. **Relatório final PIBIC 2018-2019**. Universidade Federal de Alagoas, 2019.
63. WEIGEL-GOMES, M. V. S. Avaliação de células do infiltrado peritoneal do modelo murino de tumor ascítico de Ehrlich. **Relatório final PIBIC 2019-2020**. Universidade Federal de Alagoas, 2020.

64. WEIGEL-GOMES, M. V. S. Avaliação do efeito antiproliferativo de extratos obtidos de algas marinhas sobre cultura primária de células de tumor de Ehrlich. **Relatório final PIBIC 2020-2021**. Universidade Federal de Alagoas, 2021.
65. WEIGEL-GOMES, M. V. S. Avaliação do potencial antitumoral de *Hypnea musciformis* e *Arrabidaea chica* em linhagem de carcinoma mamário murino. **Relatório final PIBIC 2020-2021**. Universidade Federal de Alagoas, 2022.
66. YUAN, Y. V., WALSH, N. A. Antioxidant and antiproliferative activities of extracts from a variety of edible seaweeds. **Food and Chemical Toxicology**, 44,1144-50, 2006.
67. ZANDI, K. et al. In vitro antitumor activity of *Gracilaria corticata* (a red alga) against jurkat and molt-4 human cancer cell lines. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 40, p. 6787-6790, 2010.