

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
– PMBqBM - SBBq

EMYLLI ARECO PEREIRA

**Atividade Citotóxica da Viridicatum toxina A obtida de *Penicillium sp.* e sua
Potencialidade no Tratamento de células Tumorais Humanas**

CAMPO GRANDE – MS

2023

EMYLLI ARECO PEREIRA

**Atividade Citotóxica da Viridicatum toxina A obtida de *Penicillium sp.* e sua
Potencialidade no Tratamento de células Tumorais Humanas**

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

Orientadora: Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo

CAMPO GRANDE – MS

2023

EMYLLI ARECO PEREIRA

Atividade Citotóxica da Viridicatum toxina A obtida de *Penicillium sp.* e sua Potencialidade no Tratamento de células Tumorais Humanas

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

_____ de _____ de 2023

Comissão Examinadora:

Prof^a Dra. Renata Trentin Perdomo

Prof^a Dra. Ana Camila Micheletti

Prof^a Dra. Susana Elisa Moreno

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ouvir sempre minhas orações e me dar forças para não desistir.

À minha orientadora, professora Dra. Renata Trentin Perdomo por todos os ensinamentos, puxões de orelha, paciência e, sobretudo, por todo apoio e confiança durante esses anos.

Aos meus pais, Dircelene e Jusiney, por estarem ao meu lado em TODOS os momentos, independente da distância. Obrigada por todas as conversas, palavras de apoio e suporte incondicional.

À minha irmã Lolo, pela torcida e por todas as mensagens que me davam o combustível para seguir em frente.

Ao meu companheiro de jornada, noivo e eterno namorado, Saulo. Não tenho palavras para descrever o quanto a sua presença foi essencial durante todo esse processo. Obrigada por tudo, se estou aqui, grande parte do crédito é seu, por não me deixar desistir e me resgatar todas as vezes que os dias sombrios me lavavam para longe.

À toda a minha família, avó, tios, tias, primos e primas que direta ou indiretamente, estiveram envolvidos nesta trajetória.

À minha amiga, irmã, Isabela, que esteve presente durante todos os passos desta pesquisa. Obrigada pelo auxílio em todos os experimentos, pelo companheirismo, incentivo e suporte absoluto. Jamais serão esquecidas as nossas tardes no laboratório, regadas a café ou energético, sempre juntas até o fim. Serei eternamente grata pela relação de irmandade de construimos juntas.

Ao meu amigo, Melquisedeque, por dividir a carga dos experimentos durante muitos e muitos dias, por trazer tranquilidade nos momentos de desespero e pelas boas risadas que dividimos, mas sobretudo, pelo apoio intelectual e emocional que sempre estivemos dispostos a dividir.

À Giovana, por toda paciência e disponibilidade para ensinar todos os processos dentro do laboratório de cultura celular.

À profa. Denise Brentan (LAPNEM, UFMS), pela concessão da amostra de Viridicatum toxina A utilizada nos experimentos.

A todos do laboratório de Cultura Celular e Biologia Molecular que contribuíram direta ou indiretamente nesta pesquisa.

Ao Programa Multicêntrico de Bioquímica e Biologia Molecular, ao qual tive, e tenho o prazer de fazer parte. Por meio deste, tive muitos aprendizados e realizações.

Ao coordenador do PMBqBM, Malson Lucena, pelo amparo e presteza em resolver todos os problemas que eventualmente surgiam.

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul por toda infraestrutura que possibilitou a realização deste curso de mestrado.

RESUMO

As Viridicatum toxinas (VTs) são substâncias produzidas por fungos endofíticos de várias espécies dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces*. Reconhecida por suas ações antimicrobianas, é considerada um potente antibiótico pertencente à família das tetraciclinas; ambas apresentam um núcleo de carboxamida tetracíclico em sua composição. Além dessa atividade antibiótica, a Viridicatum toxina A (VTA) e seus análogos, Viridicatum toxina B, C, D, E, F, espirohexalina e previridicatumtoxin, apresentaram em estudos anteriores, resultados promissores de citotoxicidade em células neoplásicas de pulmão, cólon e colo de útero *in vitro*. Neste estudo foram realizados experimentos a fim de verificar a citotoxicidade da Viridicatum toxina A, utilizando o modelo de cultura celular em monocamada. As linhagens de câncer de mama (MCF7), mama triplo-negativo (MDA-MB-231), rim (786-0), fígado (HepG2) e cólon (HT29), foram tratadas nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL e apresentaram resultados de GI₅₀ entre 6,13 e 16,12 µg/mL, com seletividade para todas elas na concentração de 10 µg/mL. Posteriormente duas linhagens de interesse, 786-0 e MDA-MB-231 foram submetidas ao teste com laranja de acridina e brometo de etídeo, nas concentrações da GI₅₀ e 2x GI₅₀, que se aproximavam muito à concentração seletiva, afim de verificar a viabilidade celular, onde ambas as linhagens apresentaram alterações morfológicas que indicaram presença de morte celular pela via de apoptose. O que é reforçado, principalmente por conta de estudos prévios envolvendo a Viridicatum toxina A, que demonstraram a indução de apoptose em células de câncer de colo do útero (HeLa), através da parada da via G2/M, além disso, na linhagem de mama triplo-negativo, as tetraciclinas, quais são estruturalmente semelhantes às VTs, induziram apoptose através da inibição das MMPs (metaloproteinases de matriz). Sendo assim, concluímos através deste, que a VTA é uma substância com potencial para agente antitumoral por apresentar atividade antiproliferativa e citotóxica potente, seletiva na concentração de 10 µg/mL e com indícios de estimular injúria celular pela via de morte celular por apoptose.

Palavras chaves: Viridicatum toxina A, cultura celular, citotoxicidade.

ABSTRACT

Viridicatum toxins (VTs) are substances produced by endophytic fungi of various species of the *Penicillium*, *Aspergillus*, and *Paecilomyces* family. Recognized for its antimicrobial actions, it is considered a potent antibiotic belonging to the tetracycline family; both have a tetracyclic carboxamide nucleus in their composition. In addition to this antibiotic activity, Viridicatum toxin A (VTA) and its analogues, Viridicatum toxin B, C, D, E, F, spirohexalin and previridicatumtoxin, have shown in previous studies, promising results of cytotoxicity in neoplastic cells of lung, colon and cervixus in vitro. In this study, experiments were performed to verify the cytotoxicity of Viridicatum toxin A, using the monolayer cell culture model. Breast (MCF7), triple-negative breast (MDA-MB-231), kidney (786-0), liver (HepG2) and colon (HT29) cancer lines were treated at concentrations of 0.1, 1, 10 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and showed GI50 results between 6.13 and 16.12 $\mu\text{g}/\text{mL}$, with selectivity for all of them at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Subsequently, two strains of interest, 786-0 and MDA-MB-231 were tested with acridine orange and ethidium bromide, at concentrations of GI50 and 2x GI50, which were very close to the selective concentration, in order to verify cell viability, where both strains showed morphological changes that indicated presence of cell death by apoptosis pathway. This is reinforced, mainly, by previous studies involving Viridicatum toxin A, which demonstrated the induction of apoptosis in cervical cancer cells (HeLa), through the arrest of the G2/M pathway; moreover, in triple-negative breast lineage, tetracyclines, which are structurally similar to VTs, induced apoptosis through the inhibition of MMPs (matrix metalloproteinases). Thus, we conclude that ATV is a substance with potential as an antitumor agent for presenting potent antiproliferative and cytotoxic activity, selective at the concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and with indications of stimulating cell injury by the apoptosis cell death pathway.

Key Words: Viridicatumtoxin A, cell culture, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - processo de morte celular por apoptose e necrose.	5
Figura 2 – Taxas de mortalidade de câncer de mama no Brasil e regiões, 1980 a 2020.	2
Figura 3 – cultura em monocamada de linhagens celulares aderentes.	8
Figura 4 - Estrutura Viridicatum toxina e tetraciclina.	13
.....	13
Figura 5 - Viridicatum toxina A (VTA) e seus análogos Viridicatum toxina B (VTB), C (VTC), D (VTD), E (VTE), F (VTF), Spirohexaline e Previridicatumtoxin. Em vermelho há diferenças estruturais em relação a estrutura original.	14
Figura 6 – <i>Bromélia balansae</i> Mez.....	16
Figura 7 - Esquema de demonstração placa teste e placa T0.	19
Figura 8 - Porcentagem de crescimento celular (%) e concentração (µg/mL) em todas as linhagens celulares testadas com o composto Viridicatum toxina A.....	23
Figura 9 - Porcentagem de crescimento em 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL em todas as linhagens testadas com o composto Viridicatum toxina A.....	24
Figura 10 – Avaliação morfológica 786-0.	27
Figura 11 – Avaliação morfológica MDA-MB-231.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

786-0	Linhagem de adenocarcinoma renal
CMT's	Tetraciclinas quimicamente modificadas
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOXO	Doxorrubicina
EtBR	Brometo de etídeo
HepG2	Linhagem de carcinoma de fígado
HT-29	Linhagem de adenocarcinoma de cólon
INCA	Instituto Nacional do câncer
IS	Índice de seletividade
MCF7	Linhagem de adenocarcinoma de mama
MDA-MB-231	Linhagem de adenocarcinoma de mama triplo-negativo
MMP'S	Metaloproteinases de matriz
MRSA	<i>Staphylococcus Aureus</i> Resistente à Meticilina
NIH-3T3	Linhagem de fibroblasto murino
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PTM'S	Modificações pós traducionais
RPMI	Meio de cultura <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
SISGEM	Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético
SRB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
UPPS	Undecaprenil pirofosfato sintase
VT	Viridicatum toxina
VTA	Viridicatum toxina A

VTB	Viridicatum toxina B
VTC	Viridicatum toxina C
VTD	Viridicatum toxina D
VTE	Viridicatum toxina E
VTF	Viridicatum toxina F

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
2.1. CÂNCER E APOPTOSE	2
2.2. CULTURA CELULAR	7
2.3. FUNGOS ENDOFÍTICOS.....	9
2.4. TETRACICLINAS.....	10
2.5. VIRIDICATUM TOXINA.....	12
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. OBJETIVO GERAL	15
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1. OBTENÇÃO DO ISOLADO.....	16
4.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	17
4.3. LINHAGENS CELULARES.....	17
4.4. CULTIVO CELULAR	17
4.5. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (atividade antiproliferativa)	18
4.5.1. Definições e termos utilizados na avaliação da citotoxicidade:	20
4.6. ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)	20
4.7. ENSAIO DE FLUORESCENCIA COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDEO (avaliação de apoptose e integridade de membrana).....	20
4.8. ANÁLISE DE DADOS	21
5. RESULTADOS	22
5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	22
5.2. ÍNDICE DE SELETIVIDADE	24
5.3. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE ME MEMBRANA E APOTOSE	25
5.3.1. 786-0: Adenocarcinoma renal	26
5.3.2. MDA-MB-231: Adenocarcinoma de mama.....	27
6. DISCUSSÃO.....	29
7. CONCLUSÃO.....	32
8. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

As Viridicatum toxinas (VT) são produzidas por fungos endofíticos de várias espécies, dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Paecilomyces*, sendo um metabólito fúngico destes. Uma rara classe de antibiótico policetídeo pertencente à família das tetraciclinas, as Viridicatum toxinas tem atividade biológica bem reconhecida como agente antimicrobiano. Essa substância se apresenta com forte papel antibacteriano, inclusive contra cepas resistentes a antibióticos convencionais, como a oxitetraciclina (PUBCHEM, 2021; SHANG *et al.*, 2015).

O primeiro composto da classe das Viridicatum toxina foi isolado em 1973 denominado Viridicatum toxina A (VTA) (HUTCHISON *et al.*, 1973), posteriormente seus análogos, a Viridicatum toxina B (VTB) (ZHENG *et al.*, 2008), previridicatumtoxin (CHOOI *et al.*, 2012), espirohexalina (INOKOSHI *et al.*, 2013), e os mais recentes Viridicatum toxinas C (VTC), D (VTD), E (VTE) e F (VTF) (SHANG *et al.*, 2015) foram identificados, tendo estudos concentrados em sua ação antimicrobiana, principalmente por conta de sua relação próxima às tetraciclinas.

Além de sua ação antibiótica, as Viridicatum toxinas apresentam demais funções promissoras, uma delas diz respeito à citotoxicidade desta substância em células do câncer. Um estudo realizado na última década demonstrou a atividade das VTs em algumas linhagens celulares neoplásicas, como NHCl-H460 (Pulmão), KB3-1 (Carcinoma de colo do útero), e SW620 (Carcinoma de cólon) com valores de IC₅₀ em destaque para a VTA e VTB (SHANG *et al.*, 2015).

Uma vez que esta substância apresenta perspectivas para uso como fármaco, este trabalho realizou a triagem da VTA como agente citotóxico contra 5 tipos de células tumorais humanas: MCF7 (adenocarcinoma de mama), 786-0 (adenocarcinoma renal), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo resistente), HepG2 (carcinoma hepatocelular), HT-29 (adenocarcinoma colorretal) e uma linhagem não tumoral para avaliar toxicidade, NIH-3T3 (fibroblasto murino).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÂNCER E APOPTOSE

O câncer representa uma doença de extrema importância no cenário mundial. Somente no ano de 2020 foram contabilizados 19,3 milhões de novos casos ao redor do mundo, ocasionando a morte de cerca de 10 milhões de pessoas. (SUNG *et al.*, 2021).

Mesmo se tratando de uma das doenças mais antigas da história da humanidade, tendo registros descobertos recentemente em ancestrais humanos com mais de 1,6 milhão de anos (BERGER *et al.*, 2016), por ser classificada como uma doença maligna e uma das protagonistas nos casos de morbidade, o câncer atinge todos os países do globo impactando profundamente aspectos sociais e econômicos destes (MATTIUZZI; LIPPI, 2019).

No Brasil o câncer de mama é um dos mais recorrentes e segundo o INCA (instituto nacional do câncer) para o ano de 2022 foram estimados cerca de 66.280 novos casos da doença e ao longo das últimas décadas a taxa de mortalidade apresenta uma tendência ascendente em todas as regiões do país (Figura 1).

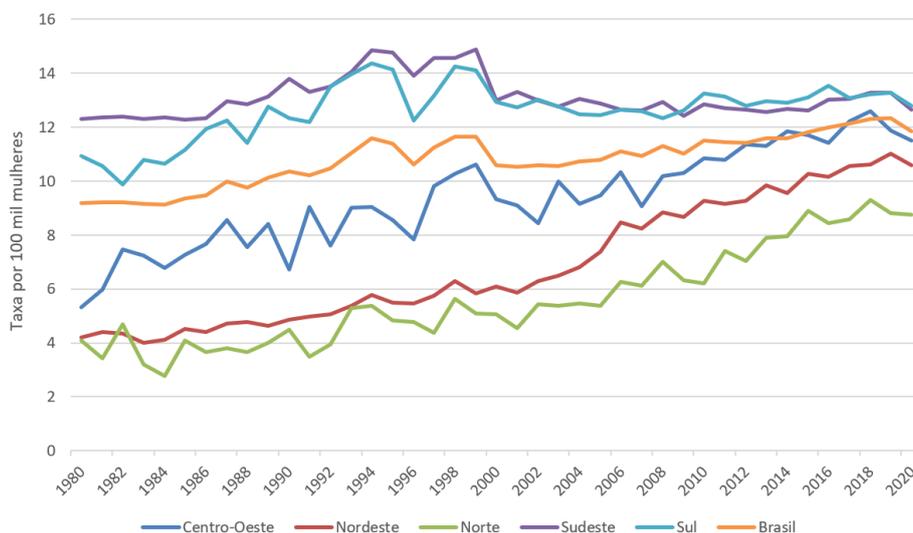


Figura 1 – Taxas de mortalidade de câncer de mama no Brasil e regiões, 1980 a 2020.

Fonte: Inca. Atlas de Mortalidade por Câncer. Acesso em: 13 de out 2022.

Ao falarmos de câncer é importante conhecermos alguns termos como tumor e neoplasia, que dizem respeito a proliferação anormal do tecido, que de forma total ou parcial saem do controle e surtem efeitos muitas vezes agressivos

ao organismo humano. O que difere uma neoplasia maligna de uma neoplasia benigna é justamente a característica de proliferação das células em questão, uma vez que para ser classificado como maligno o crescimento celular deve ser considerado desordenado, enquanto na neoplasia benigna, apesar do crescimento não ser controlado, é considerado um processo ordenado (INCA, 2011).

O processo de replicação celular que ocorre de forma estritamente ordenada é o ciclo celular, em que as informações genéticas são transmitidas e replicadas de uma geração celular para outra (ISRAELS; ISRAELS, 2000). Nos eucariotos este processo é dividido em duas fases, interfase e mitose, e para que um ocorra é necessário que o evento anterior seja finalizado de forma correta, como por exemplo no caso da mitose em que o evento só se inicia após a síntese completa do DNA (HARTWELL; WEINERT, 1989).

Na interfase temos três fases, G1, S e a fase G2. Já na mitose temos algumas subdivisões: prófase, onde ocorre a condensação dos cromossomos; metáfase, em que os cromossomos se alinham; anáfase, na qual os cromossomos se separam, e por fim a telófase, onde ocorre a descondensação dos mesmos (MURAKAMI; NURSE, 2000).

Sabe-se que a instabilidade genética que leva ao aparecimento de células cancerígenas está diretamente relacionada com a desregulação do ciclo celular, pois para que a formação do câncer ocorra são necessários diversos processos que envolvem a replicação celular, seja nos pontos de checagem, seja nas vias de morte celular (WILLIAMS; STOEBER, 2012).

Quando há sinais de síntese incompleta ou dano ao DNA celular, por exemplo, um gene importantíssimo denominado p53 é ativado por meio de modificações pós-traducionais (PTMs) que desencadeia a expressão de genes-alvo que estão diretamente relacionados à parada do ciclo celular, que ocorre para a realização do reparo no DNA e caso esta reparação seja impraticável, a célula é levada a morte (JOERGER; FERSHT, 2016)

Outro processo que também está relacionado tanto à formação, quanto à progressão tumoral é a inflamação, pois no processo inflamatório os macrófagos

associados a tumores penetram no tecido que contém células em mutação, liberando fatores de crescimento, promovendo a angiogênese e consequente processo de metástase, em que as células neoplásicas invadem outros tecidos (MANTOVANI, 2005).

Sendo classificados em relação a suas características bioquímicas e morfológicas, a morte celular ocorre através de alguns processos como a autofagia, senescência, necrose e apoptose: morte celular programada, que em organismos multicelulares pode ser induzida por diversos estímulos intracelulares e extracelulares. (CASTEDO *et al.*, 2004; DIMRI, 2005; OKADA; MAK, 2004).

A autofagia ocorre em decorrência de vários fatores como dano celular e privação de nutrientes, sendo um processo catabólico onde as células por meio da via lisossomal degradam seus próprios componentes (YANG; KLIONSKY, 2010). A senescência está diretamente relacionada com o envelhecimento celular, este que pode levar ao encurtamento dos telômeros e danos ao DNA. A título de exemplo, para impedir a proliferação destas células, este processo induz a parada irreversível da proliferação celular, exercendo um papel relevante na prevenção da formação de tumores (VARGAS *et al.*, 2012).

A necrose, conhecida como morte celular acidental, decorrente de processos extremos onde a célula se encontra em condições fisiológicas inviáveis como na privação de nutrientes, hipóxia e na exposição a substâncias tóxicas por exemplo (WALKER *et al.*, 1988). Além disso, essa via de morte celular apresenta características únicas que a difere das demais. Nela ocorre o aumento do diâmetro celular em muitas vezes o tamanho original da célula, degradação do DNA nuclear de forma aleatória e distensão das organelas celulares (HALL *et al.*, 1997).

Esta via de morte celular, é de modo frequente relacionada com a perda celular repentina em patologias nos seres humanos, além de associar-se a processos inflamatórios em decorrência de componentes intracelulares que são liberados no espaço extracelular, após o rompimento da membrana plasmática (PROSKURYAKOV *et al.*, 2003). Apenas uma parte destes componentes pode efetivamente ser fagocitado, e aqueles que não são fagocitados podem causar

lesão tecidual que leva a ativação ou resultante potencialização da resposta pró-inflamatória (KRYSKO *et al.*, 2006).

A apoptose é reconhecida como a morte celular programada, podendo ser considerada como uma forma fisiológica de morte que não desencadeia processos inflamatórios. Isso se deve aos corpos apoptóticos produzidos ao final desta via, sendo formados pelo conteúdo celular que é envolto por uma membrana plasmática antes de ser liberado no meio extracelular, o que facilita o reconhecimento destes por células fagocíticas (LAWEN, 2003).

Na apoptose ocorrem diversos processos característicos. Em contraste à necrose, as células em apoptose sofrem retração, o que faz com que a aderência entre as células e a matriz extracelular seja perdida; no citoplasma ocorre a formação de vacúolos; a cromatina nuclear é condensada e se fragmenta em várias partes que são englobados pelos que virão a se tornar, corpos apoptóticos (GRIVICICH *et al.*, 2007) (Figura 2).

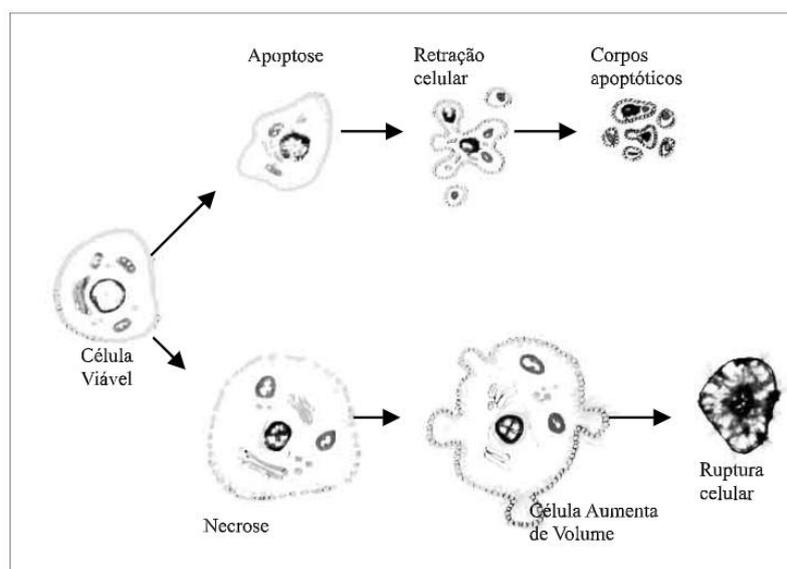


Figura 2 - processo de morte celular por apoptose e necrose.
Fonte: (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Levando em consideração a grande variabilidade de tumores, compostos por células com características distintas, tem-se a necessidade de empregar várias estratégias terapêuticas no tratamento da doença, e por esse motivo, a dificuldade de tratamento dessas patologias é tão significativa (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Atualmente existem vários tipos de tratamento para os diversos tipos de cânceres diagnosticáveis, dentre eles temos a retirada cirúrgica do tumor; a radioterapia, que utiliza da radiação direcionada em uma localização precisa para destruir células cancerígenas e é empregado no tratamento de tumores sólidos (FURNARI, 2009); as mais recentes imunoterapias, onde algumas classes atuam impedindo especificamente a inibição de efetores imunológicos, revigorando e potencialmente expandindo respostas imunes anticâncer pré-existentes (CHEN; MELLMAN, 2013); e as quimioterapias onde substâncias químicas são utilizadas isoladamente ou em conjunto a fim de interferir no desenvolvimento e proliferação das células tumorais (BONASSA; GATO, 2016).

Outras opções farmacológicas são a hormonioterapia e a terapia alvo, sendo que esta última utiliza anticorpos com especificidade às células danosas, reduzindo assim efeitos colaterais por não atingir de forma agressiva os tecidos saudáveis (Bland et al.,2017).

A quimioterapia pode ser indicada como adjuvante, para pacientes que passaram pela cirurgia, como neoadjuvante, a ser realizada antes do processo cirúrgico e como terapia principal em casos de metástase (BLAND *et al.*, 2017; KENNEDY, 1965).

Os quimioterápicos que são utilizados para o tratamento do câncer, porém, afetam tanto as células cancerígenas, quanto células saudáveis, fato este que está envolvido em um dos maiores desafios no tratamento da doença, uma vez que, em decorrência da baixa seletividade, os efeitos colaterais sentidos pelo paciente podem ser significativos, interferindo na recuperação e adesão ao tratamento (LEBARON *et al.*, 1988). Apesar disso, alguns quimioterápicos apresentam níveis de seletividade maiores, o que ocorre muitas vezes por conta das diferenças quantitativas entre os processos metabólicos das células saudáveis e neoplásicas (PENILDON, 2006).

Portanto uma das maiores dificuldades encontradas no âmbito científico e nas indústrias farmacêuticas é a obtenção de um fármaco quimioterápico que seja seletivo para a neoplasia, atuando de forma eficiente na destruição da célula cancerígena sem prejudicar outros tecidos saudáveis.

2.2. CULTURA CELULAR

Cultura celular refere-se ao procedimento onde células são retiradas de um tecido antes do seu crescimento e inseridas em um local específico contendo meio de cultura que forneça nutrientes essenciais como vitaminas, minerais, fatores de crescimento, entre outros, além de serem condicionadas em um ambiente rico em CO₂ e O₂, com regulação de temperatura e pressão osmótica. Dentre os mais diversos tipos celulares cultivados, temos as linhagens aderentes, dependentes de ancoragem, e não aderentes cultivadas de forma suspensa (GONÇALVES; SOBRAL, 2020).

O desenvolvimento da cultura celular ocorreu frente a necessidade dos ramos de pesquisas médicas relacionados a produção de vacinas e a compreensão de doenças neoplásicas e com o andamento das pesquisas e experimentos relacionados a cultura celular foram desenvolvidos diferentes tipos de cultura, como a cultura celular primária, na qual as células podem ser originadas diretamente de um tecido, conservando parcialmente as características deste (FRESHNEY, 2005) e a cultura celular imortalizada, onde as células primárias que são cultivadas *in vitro* se multiplicam continuamente através da manutenção e troca dos meios de cultura utilizados (CARREL, 1912).

Através da cultura celular imortalizada iniciou-se o que conhecemos como subcultivo, em que as células são transferidas de um ambiente para outro que possibilite novamente seu crescimento e proliferação, este processo é conhecido como repique celular e beneficia toda a operação de conservação e perpetuação da linhagem celular (POLLARD; WALKER, 1997).

O modelo mais simples de cultura celular é em monocamada, em que as células crescem em um recipiente na forma bidimensional (2D) (Figura 3) onde se aderem a uma superfície plana facilitando a distribuição dos nutrientes fornecidos pelo meio de cultura de forma homogênea, o que possibilita uma melhor absorção dos fatores de crescimento pelas células (HUANG *et al.*, 2013).

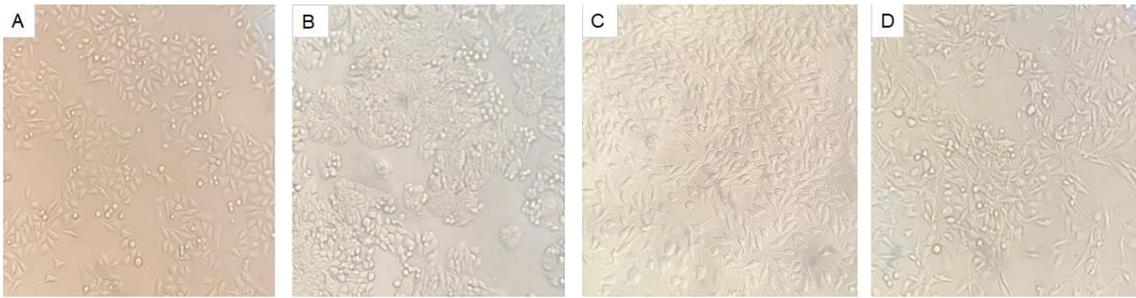


Figura 3 – cultura em monocamada de linhagens celulares aderentes.
Fonte: Compilação do autor¹

¹Fotomicrografias em aumento de 40x de células neoplásicas aderentes de (A) HepG2; (B) HT-29; (C) MCF7 e (D) MDA-MB-231.

Além disso, a cultura celular em monocamada é composta por células mais planas e alongadas do que as que são observadas em modelos *in vivo*, e essa morfologia diferenciada favorece diversos processos como a proliferação, diferenciação, apoptose e expressões de alguns genes e proteínas, o que possibilita a criação de um ambiente composto basicamente por células em proliferação, uma vez que as células mortas acabam por se desprender da superfície, sendo retiradas com certa facilidade durante o processo da troca do meio de cultura (HUH *et al.*, 2011).

Por todas essas características, a cultura celular 2D foi e ainda é muito utilizada na triagem de novas drogas, porém existem algumas limitações quanto a este modelo uma vez que, na cultura em monocamada as células não são capazes de reproduzir sua matriz extracelular como em modelos *in vivo* (DUVAL *et al.*, 2017; EDMONDSON *et al.*, 2014).

A cultura celular possibilitou simular diversos parâmetros *in vitro* do que antes só era possível investigar *in vivo*, como por exemplo a avaliação da citotoxicidade, que é um processo que pode causar danos celulares diretos ao organismo com efeitos sistêmicos e fisiológicos, e na maioria dos ensaios *in vitro* é possível avaliar esses efeitos a nível celular, chegando muito próximo a resultados encontrados em organismos vivos (FRESHNEY, 2005).

Dentre os tipos celulares cultivados para a pesquisa, a cultura de células neoplásicas é muito utilizada na triagem de fármacos em potencial, em que também se utiliza de linhagens não neoplásicas, uma vez que no tratamento das

neoplasias com o uso dos quimioterápicos, os fármacos não apresentam especificidade, desta forma sua ação não se restringe somente às células malignas, e células saudáveis também são afetadas e destruídas (BONASSA; GATO, 2016; EDMONDSON *et al.*, 2014).

Produtos naturais e seus derivados são amplamente utilizados nessa triagem, visando seu potencial citotóxico contra as células neoplásicas (ALTEI, 2014).

2.3. FUNGOS ENDOFÍTICOS

Os fungos endofíticos são aqueles que vivem no interior de plantas sem causar nenhum sintoma ou prejuízo a mesma. É de conhecimento no meio científico que muitos fungos são capazes de produzir diversos metabólitos secundários com capacidades farmacêuticas (FREIRE *et al.*, 2014), como os antibióticos, medicamentos utilizados essencialmente no tratamento de infecções (KIESLICH, 1986).

Os antibióticos foram os primeiros metabólitos secundários oriundos de fungos endofíticos que tiveram reconhecimento da comunidade científica. Sabe-se através da história que os Chineses utilizavam fungos para tratar ferimentos nos pés, essa terapêutica acontecia por meio do uso de sapatos mofados. Há registros dessa técnica desde 3000 A.C, muito embora a Penicilina considerada o antibiótico mais eficaz da humanidade, só tenha sido descoberta em 1928 por Alexander Flemming por meio de culturas de *Penicillium chrysogenum* (TAKAHASHI; LUCAS, 2008).

Os produtos naturais produzidos pelos fungos endofíticos manifestam uma gama de propriedades biológicas antimicrobianas, neuroprotetoras, imunossupressoras, antidiabéticas, antioxidantes, anticolinesterásicas e citotóxicas (BENTLEY, 1997; FREIRE *et al.*, 2014; HARPER *et al.*, 2003; RATEB; EBEL, 2011). Esses metabólitos são agrupados em várias classes, abrangendo os alcalóides, esteróides, ácidos fenólicos, terpenos, quinonas, isocumarinas, entre muitos outros (ZHANG *et al.*, 2006).

Uma das propriedades dos metabólitos fúngicos muito visada ultimamente é sua ação anticancerígena, sendo o Taxol (paclitaxel) o fármaco de maior importância nesse cenário, produzido pelo fungo *Taxomyces andreanae* (STIERLE *et al.*, 1993). Porém, existem diversos fungos capazes de produzir metabólitos além do paclitaxel, com propriedades de inibição da atividade proliferativa do câncer (GONÇALVES *et al.*, 2013).

2.4. TETRACICLINAS

As tetraciclina representam um grupo de produtos naturais e semi sintéticos produzidos por várias espécies de *Streptomyces spp.* Com sua ação voltada contra uma grande pluralidade de microorganismos, as tetraciclina são fortes agentes bacteriostáticos com ação inibitória da síntese proteica, essa característica fez com que essas substâncias se tornassem uma classe de antibióticos muito utilizados a partir de sua descoberta (VICENTE; PEREZ-TRALLERO, 2010).

Benjamin Duggar foi o responsável por descobrir o primeiro antibiótico pertencente à família das tetraciclina no ano de 1948, uma substância denominada clortetraciclina, produzida através da fermentação natural de uma bactéria denominada *Streptomyces aureofaciens*. A partir desse momento diversos integrantes da classe das tetraciclina foram produzidos (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010).

Os antibióticos de tetraciclina podem ser divididos em grupos, sendo esses: produtos naturais (primeira geração) como as cortetraciclina; compostos de segunda geração ou semi-sintéticos tendo como exemplo a minociclina; tetraciclina de terceira geração ou glicilciclina tal como a tigeciclina; e as conhecidas como *Chemically Modified Tetracyclines* (CMTs), que são tetraciclina quimicamente modificadas (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

A primeira geração das tetraciclina é formada por seus agentes primários, que tem como características a baixa absorção e lipofilicidade; Os componentes da segunda geração podem ser até 5 vezes mais lipofílicos que os

da geração anterior, além de serem melhor absorvidos pelas células; A terceira geração apresenta um maior espectro de ação, sendo utilizada contra microorganismos multirresistentes (VICENTE; PEREZ-TRALLERO, 2010); O quarto grupo compreende as tetraciclinas quimicamente modificadas (CMTs), que por suas modificações estruturais possibilitam avaliar as atividades não antibióticas dessas substâncias (GARCÍA-ÁLVAREZ; OTEO, 2010).

De acordo com NELSON (1998 p.5) as tetraciclinas apresentam uma estrutura molecular simples contendo um núcleo composto por um sistema de quatro anéis naftaleno carboxamida tetracíclico, sendo este extremamente necessário para que se tenha uma ação antimicrobiana.

O mecanismo de ação dos antibióticos de tetraciclinas se dá pela ligação a um sítio da subunidade 30s e 50s do ribossomo bacteriano, impedindo assim a ligação do aminoacil-tRNA no sítio A do ribossomo e a adição de aminoácidos, impedindo assim a síntese protéica (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010).

Por suas propriedades, as tetraciclinas se tornaram medicamentos muito utilizados na prática clínica, porém seu uso indiscriminado ao longo dos anos contribuiu para o surgimento de cepas bacterianas resistentes, o que impulsionou a criação dos análogos de tetraciclina que surgiram com o intuito de contornar os mecanismos de resistência bacteriana (CHOPRA; ROBERTS, 2001).

Inúmeros experimentos acerca das tetraciclinas atestam suas propriedades farmacológicas no tratamento de doenças não infecciosas. Essas substâncias possuem propriedades não antibióticas, demonstrando eficácia no tratamento de doenças como artrite reumatóide e câncer (GUERRERO *et al.*, 2011).

Foram observadas relações positivas entre as CMTs na inibição da expressão das enzimas MMP's (metaloproteinases de matriz) e nos potenciais metastáticos de vários tumores malignos, abrangendo o câncer de cólon, pulmão, cabeça e pescoço, mama, entre outros (ACHARYA *et al.*, 2004). Em contrapartida, estudos demonstraram que as CMTs, análogas das tetraciclinas

com a alteração ligada a remoção do grupo dimetilamino da posição C4, tem a capacidade de eliminar a ação antibacteriana e conseqüentemente potencializar os efeitos anticancerígenos focados na prevenção da angiogênese e o processo de metástase por meio da capacidade de inibição dessas MMP's (PEREIRA-MAIA *et al.*, 2010).

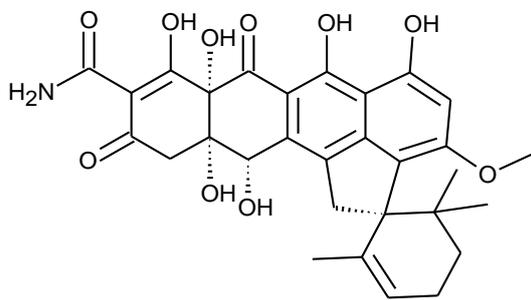
2.5. VIRIDICATUM TOXINA

A Viridicatum toxina (VT) é um antibiótico pertencente à classe das tetraciclinas, sendo produzida por fungos endofíticos pertencentes aos gêneros *Penicillium* e *Paecilomyces*. Embora apresentem semelhanças estruturais, as Viridicatum toxinas são de origem fúngica, enquanto as tetraciclinas de origem bacteriana, além de apresentarem diferentes espectros de ação (LI *et al.*, 2020).

As Viridicatum toxinas e as tetraciclinas apresentam uma característica em comum, ambas têm um núcleo de carboxamida tetracíclico em sua composição (CHOOI *et al.*, 2010). Apesar das semelhanças, uma particularidade capaz de diferenciar essas substâncias é que as Viridicatum toxinas apresentam em sua composição a porção espiro de duas unidades isoprenóides, que leva a formação de dois anéis suplementares, além da ausência da porção 4-dimetilamino (KABUTO *et al.*, 1976) (figura 4).

A VT foi isolada, pela primeira vez em 1973 como uma micotoxina de *Penicillium viridicatum*, uma substância que se apresentava como um pigmento amarelado brilhante. Sua fórmula molecular ($C_{30}H_{31}NO_{10}$) foi determinada por meio de espectrometria de massas (HUTCHISON *et al.*, 1973). Já sua estrutura molecular foi determinada por meio de métodos cristalográficos de raios X por Kabuto *et al.* (1976).

Viridicatum toxina



Tetraciclina

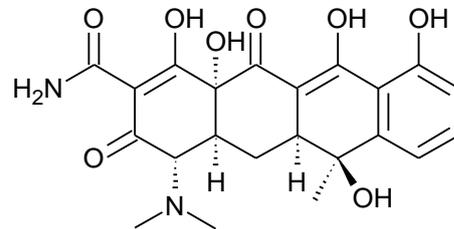


Figura 4 - Estrutura Viridicatum toxina e tetraciclina.
Fonte: De autoria própria.

Em 2014 a Viridicatum toxina teve a sua estrutura revisada por Nicolaou et al. e renomeada como Viridicatum toxina A e hoje sabe-se que várias espécies de *Penicillium* são capazes de produzir este metabólito. Em 2008, seu análogo, a Viridicatum toxina B foi descoberta (ZHENG *et al.*, 2008) e a partir deste período, vários análogos foram descritos, sendo a previridicatumtoxin (CHOOI *et al.*, 2012), espirohexalina (INOKOSHI *et al.*, 2013), e os mais recentes Viridicatum toxinas C, D, E e F (SHANG *et al.*, 2015) (figura 5).

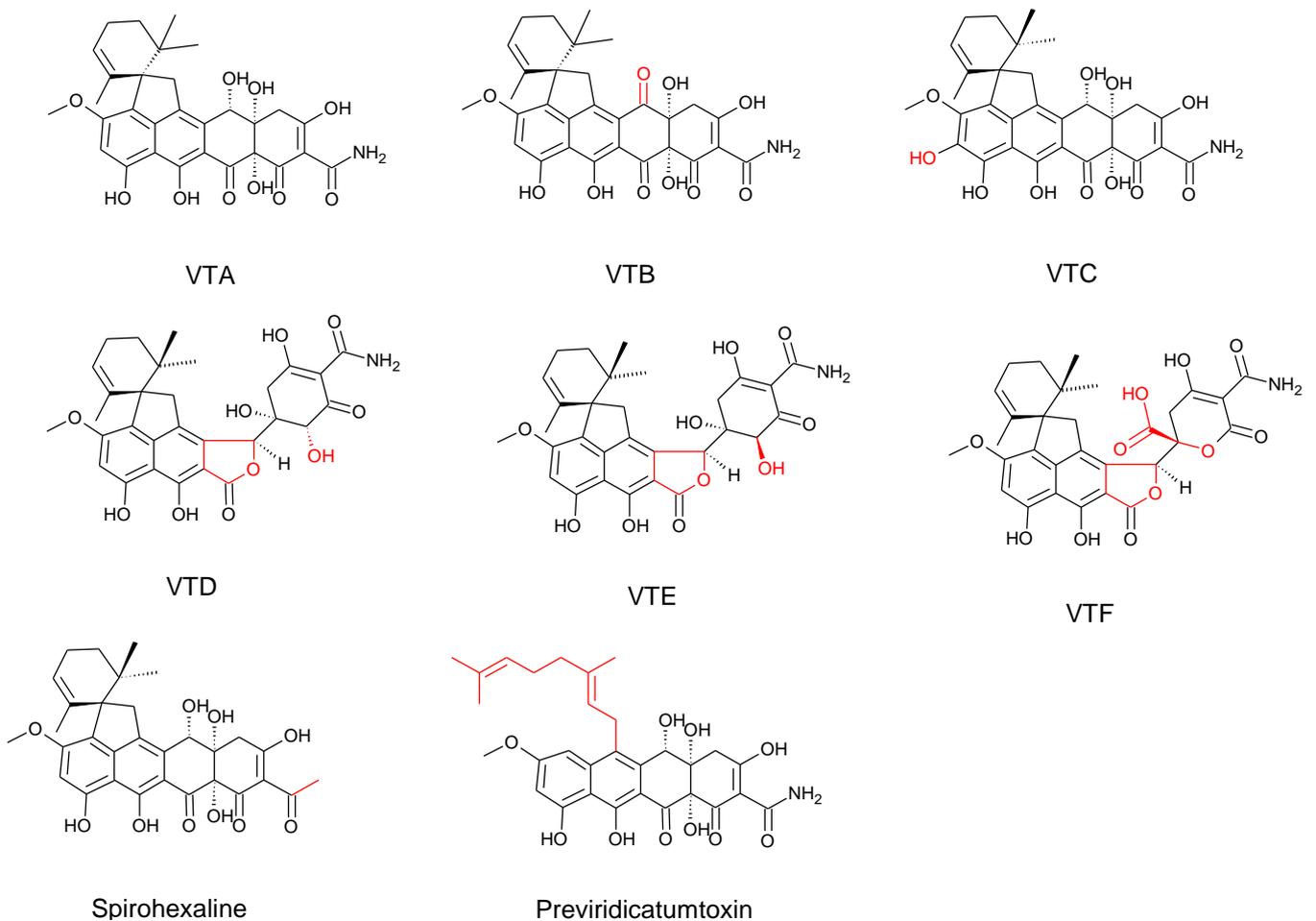


Figura 5 - Viridicatum toxina A (VTA) e seus análogos Viridicatum toxina B (VTB), C (VTC), D (VTD), E (VTE), F (VTF), Spirohexaline e Previridicatumtoxin. Em vermelho há diferenças estruturais em relação a VTA.

Fonte: De autoria própria.

Foram relatadas potentes atividades de Viridicatum toxina A e B contra bactérias gram-positivas, compreendendo as resistentes à metilina *Staphylococcus aureus* (MRSA). Estudos recentes demonstram que a Viridicatum toxina exerce sua atividade antibacteriana através da inibição da undecaprenil pirofosfato sintase (UPPS), uma enzima muito importante para a biossíntese de peptidoglicanos das bactérias (NICOLAOU *et al.*, 2014).

Uma pesquisa realizada por Li et al (2020) confirmou o forte poder de inibição das UPPS pela Viridicatum toxina A com valores de IC₅₀ de 4,1 µM em *Staphylococcus aureus* e 3,9 µM para *Escherichia coli*. O estudo também demonstrou que a Viridicatum toxina A pode exercer atividade inibitória sobre o

ribossomo 70s das células bacterianas apesar de ainda ser considerado um inibidor fraco deste (LI *et al.*, 2020).

Além de seus efeitos antimicrobianos, uma característica bastante promissora das Viridicatum toxinas é sua ação citotóxica em diversas linhagens de células do câncer, como Shang *et al.* descreve em sua pesquisa, demonstrando valores promissores de IC₅₀ para Viridicatum toxina A e B, como seus demais análogos (tabela 1).

Tabela 1: Valores de IC₅₀ (µM) de Viridicatum toxina A e seus análogos.

Substância	Câncer de Cólon (SW620)	Câncer de Colo do útero (KB3-1)	Câncer de Pulmão (NCI-H460)
Viridicatum Toxina A	1,0	2,5	1,0
Viridicatum Toxina B	0,6	1,6	0,6
Viridicatum Toxina C	17,4	11,0	9,2
Viridicatum Toxina D	20,7	>30	24,2
Viridicatum Toxina E	>30	>30	>30
Viridicatum Toxina F	>30	>30	>30
Espirohexalina	16,7	6,3	11,3
Previridicatumtoxina	6,0	4,1	5,3

Fonte: (SHANG *et al.*, 2015).

Dentre os análogos apresentados, a Viridicatum Toxina A e B são as que apresentam os valores de IC₅₀ mais promissores.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade citotóxica da Viridicatum toxina A e sua potencialidade no tratamento de células tumorais humanas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a atividade antiproliferativa da Viridicatum toxina A frente às linhagens neoplásicas de mama, cólon, próstata, fígado, intestino e não neoplásica NIH-3T3 em modelo 2D em 48 horas;
- b) Determinar o índice de seletividade.
- c) Avaliar o efeito citotóxico (citostático e citocida)
- d) Avaliar a viabilidade celular e apoptose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO DO ISOLADO

A viridicatum toxina A foi obtida de uma linhagem de *Penicillium sp.* isolado de folhas de *Bromelia balansae* Mez (Bromeliaceae) (figura 6) e fornecido devido à parceria com o LaPNEM da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FACFAN/UFMS), sendo registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SisGen), sob o número AE8625B.



Figura 6 – *Bromélia balansae* Mez
Fonte: Christine Yee, 2020.

4.2. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra foi suspensa em DMSO (Dimetilsulfóxido) na concentração de 0,1 g/mL, alíquotadas e congeladas.

No momento de uso, foi descongelada e diluída em meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) para que a maior concentração de DMSO utilizada fora no máximo 0,25%, de modo a não alterar a viabilidade celular (Iwamoto *et al.*, 2015).

4.3. LINHAGENS CELULARES

As linhagens celulares utilizadas foram fornecidas pelo laboratório de biologia molecular e cultura celular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sendo elas MCF7 (adenocarcinoma de mama), 786-0 (adenocarcinoma renal), MDA-MB-231 (adenocarcinoma de mama triplo resistente), HepG2 (carcinoma hepatocelular), HT-29 (adenocarcinoma colorretal) e NIH-3T3 (fibroblasto murino).

As linhagens MCF7, 786-0, MDA-MB-231, HepG2 e HT-29 foram cultivadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute), e a linhagem NIH-3T3 cultivada em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino e mantidas em incubadora com ambiente controlado a 37°C e 5% de CO₂.

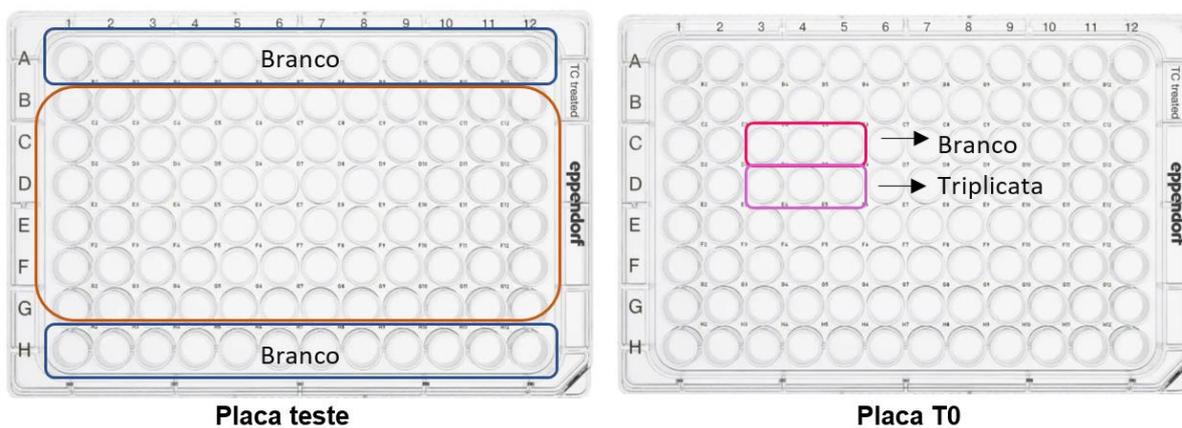
4.4. CULTIVO CELULAR

Todas as linhagens celulares estavam armazenadas em nitrogênio líquido. Para os testes de citotoxicidade as células foram descongeladas e transferidas para um tubo cônico de 15 mL com 9 mL de meio RPMI 1640 ou DMEM contendo gentamicina 50 µg/mL e 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) das marcas Soral (Campo Grande-MS) ou Cultilab (Campinas-SP) e centrifugadas por 4 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi aspirado e o pellet de células foi ressuspenso com 5mL de meio. A suspensão de células foi transferida para 1

frasco de manutenção de 25 cm² e incubada a 37 °C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até formação da monocamada com aproximadamente 80% de confluência (FRESHNEY, 2005). Para a manutenção e crescimento celular, as células atingiam 80% de confluência e eram quimicamente retiradas do frasco de cultura por ação da enzimática da tripsina (0,5ml de solução de tripsina-EDTA 2,5 g/L). Assim, após aspiração do meio de cultura, adicionou-se 0,5mL de tripsina no frasco de manutenção que permaneceu por 3 a 5 minutos em incubadora, para o desprendimento das células. A suspensão de células é transferida para tubo cônico com meio completo (antibiótico, SFB (10%)) 3X o volume de tripsina utilizada, para a neutralização desta após centrifugação por 4 minutos a 1000 rpm. O pellet é ressuspendido em meio completo para a contagem das células.

4.5. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (atividade antiproliferativa)

Após obtenção da densidade celular suficiente (3×10^4 /mL), foi iniciado o experimento com SRB – método de coloração que se baseia na afinidade corante sulforodamina B pelas proteínas básicas presentes nas células íntegras, fixadas pelo ácido tricloroacético (SKEHAN, 1990), preparando uma placa triplicata de suspensão celular e uma triplicata apenas com o meio de cultura (branco) denominada T0. Ao mesmo tempo foi preparada a placa teste, os poços das linhas A e H representam os brancos da amostra (onde não foi colocada suspensão celular), nos demais poços foram colocadas $7,5 \times 10^3$.ml⁻¹ células. A placa T0 e placa teste foram levadas para a incubadora a 37°C (5% de CO₂) durante 24 horas.



Placa teste

Placa T0

Figura 7 - Esquema de demonstração placa teste e placa T0.

Fonte: De autoria própria.

Passadas 24 horas as placas teste foram retiradas da incubadora, a placa T0 foi corada pelo método de sulforrodamina B (SRB) e a leitura foi realizada em 540nm. A placa T0 é importante como ponto inicial do experimento, mostrando crescimento celular e viabilidade antes da inserção das amostras. Estes dados são usados para mensurar a GI₅₀ (inibição de crescimento de 50%) (HOUGHTON *et al.*, 2007).

Enquanto isso as amostras foram colocadas em triplicata na placa teste, nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL. Como controle positivo foi utilizado doxorrubicina nas concentrações 0,025, 0,25, 2,5 e 25 µg/mL, foi levada para incubadora e mantida nas mesmas condições da placa T0, durante 48 horas.

Após 48 horas a placa foi retirada da incubadora e corada pelo método de SRB, que consiste em: aspirar o sobrenadante dos poços, adicionar 100 µL de TCA 20% (ácido tricloroacético), incubar a 4°C protegido da luz, durante 30 minutos. Logo após, a placa é lavada em água corrente para tirar o excesso de TCA e em placa seca é adicionado 50 µL de SRB, incubado por 30 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, as placas são lavadas com ácido acético 1%, para retirar o excesso de corante e após a secagem da placa foi adicionado 100 µL de triz base (10 mM) para solubilizar o corante ligado às proteínas de membranas das células e levada para agitação por 20 minutos. Por fim, o resultado foi obtido em absorbância de 540 nm. A

porcentagem de crescimento de cada amostra-teste foi calculada em software-SoftMax Pro6.3, utilizando-se as fórmulas segundo Monks et al., (1991). A concentração que inibe 50% de crescimento foi determinado usando o programa Origin Versão 6.0.

4.5.1. Definições e termos utilizados na avaliação da citotoxicidade:

Os testes de citotoxicidade *in vitro* envolvem avaliação de viabilidade e proliferação celular após as células serem expostas a qualquer xenobiótico (FRESHNEY, 2005). Esta avaliação pode ser realizada por contagem de células viáveis e inviáveis e pela obtenção de concentrações de inibição de crescimento parcial (GI₅₀ growth inhibitions – Concentração para inibir crescimento de 50% das células) ou total (TGI total growth inhibition – concentração para inibir crescimento de 100% das células) ou ainda, de morte celular (LC₅₀ – *Letal Concentration* – concentração para matar 50% das células) (HOUGHTON et al., 2007). O ensaio de citotoxicidade é eficiente como *screening* de substâncias ativas em células neoplásicas. É possível observar atividade citostática e citocida. A atividade citocida é observada quando ocorre morte celular e a citostática quando ocorre inibição do crescimento celular (MONKS et al., 1991).

4.6. ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS)

O índice de seletividade (IS) foi calculado pela relação entre o IC₅₀ da linhagem celular não-tumoral (NIH/3T3) e a IC₅₀ para células cancerígenas e indica o quanto a amostra tem maior efeito antiproliferativo para células tumorais, sugerindo uma proteção às células normais e diminuição de efeitos colaterais (SUFFNESS, 1990; BADISA et al., 2009; VAN LEEUWEN et al, 2012)

4.7. ENSAIO DE FLUORESCENCIA COM LARANJA DE ACRIDINA E BROMETO DE ETÍDEO (avaliação de apoptose e integridade de membrana)

Para avaliar a viabilidade celular e triagem de apoptose, foi usado a coloração por laranja de acridina e brometo de etídio. O experimento foi realizado em placa de 6 poços com lamínulas acopladas. A suspensão de células MDA-MB-231 e 786-0 em fase de crescimento logarítmico foram distribuídas 300.000 células por poço adicionada sobre a lamínula de 18mm e incubadas por 24 horas. Logo após foram tratadas com amostras teste com a concentração de GI_{50} e novamente incubadas por 48 horas. Após incubação os poços foram lavados com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e as lamínulas foram destacadas e colocadas em lâminas para coloração com uma solução de Laranja de acridina e de Brometo de etídio (EtBr) em 20 μ L de PBS com volume final de 30 μ L. Em seguida as lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41), aumento 400X. Como controle positivo foi utilizada a doxorrubicina, também na concentração de GI_{50} .

O princípio do teste de baseia no fato de que nas células integras ocorre o efluxo do brometo de etídeo, o que não permite que as mesmas se coram de vermelho-alaranjado, porém em células com algum dano ou mudança estrutural, o brometo de etídeo atravessa a membrana celular, intercalando as bases nitrogenadas do DNA, emitindo assim a fluorescência e possibilitando a identificação das estruturas modificadas (THOMPSON, 1995).

Por essa metodologia é possível distinguir quatro populações celulares, baseado na integridade da membrana: (I) células vivas com a membrana íntegra coram-se uniformemente de verde; (II) células em apoptose, onde a membrana está rompida e possui fragmentação do DNA mostram uma coloração verde no núcleo, citoplasma e corpos apoptóticos; (III) células em processo de apoptose tardia mostram pontos corados de laranja e (IV) células necróticas, apresentam coloração laranja uniforme por toda extensão celular (MCGAHON *et al.*, 1995).

4.8. ANÁLISE DE DADOS

A porcentagem de crescimento celular obtida segundo MONKS *et al.* (1991) foi utilizada na elaboração de gráficos por regressão não linear para obtenção da GI_{50} e TGI em programa de análise de dados Origin 6.0.

5. RESULTADOS

5.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

A citotoxicidade da Viridicatum toxina A foi avaliada pelo método de sulforodamina B frente as linhagens neoplásicas de adenocarcinoma renal (786-0), adenocarcinoma de mama (MCF7), adenocarcinoma de mama triplo resistente (MDA-MB-231), carcinoma hepatocelular (HepG2) e adenocarcinoma colorretal (HT-29) e em uma linhagem não neoplásica de fibroblasto murino (NIH-3T3).

As células foram tratadas em quatro concentrações padronizadas de 0,1, 1, 10, e 100µg/mL, e a leitura da absorbância foi realizada em 48 horas evidenciando as porcentagens de crescimento e inibição celular levando em consideração o controle negativo, positivo (doxorubicina) e a T0 (valor de absorbância com 24h de crescimento, cuja leitura foi realizada no momento de tratamento da placa teste). Desta forma, com estes resultados prévios, obteve-se os valores de GI₅₀ (concentração que inibe 50% da proliferação celular), onde as linhagens 786-0, MCF7 e MDA-MB-231 apresentaram melhores resultados (Tabela 2), a TGI (concentração para inibir crescimento de 100%) e LC₅₀ (concentração para matar 50% das células).

Através dos valores de GI₅₀ podemos avaliar a amostra com atividade forte (até 50) atividade moderada (50 a 100) e atividade fraca (101 a 250), amostras com valores acima de 250 são consideradas inativas.

Tabela 2: Valores de GI₅₀ (µg/mL) de Viridicatum toxina A frente as linhagens celulares.

Substância	Linhagens celulares					
	786-0	MCF7	HepG2	HT-29	MDA-MB-231	NIH-3T3
Viridicatum toxina A	6,13	9,11	16,12	7,07	11,70	10,91
Doxo	1,42	0,02	0,25	0,22	0,25	0,02

Doxo= Doxorubicina; 786-0 = adenocarcinoma rim; HEP-G2= câncer de fígado; MDA-MB-231= câncer de mama (triplonegativo); MCF-7= câncer de mama; HT-29= câncer de colón; NIH-3T3= célula não neoplásica, fibroblasto murino;

Na figura 8 é possível visualizar a atividade antiproliferativa do composto Viridicatum toxina A nas linhagens celulares em todas as concentrações utilizadas (0,1, 1, 10, 100 µg/mL), onde podemos verificar que sua atividade é dependente da concentração, sendo mais ativa nas concentrações de 10 e 100 µg/mL, onde a porcentagem de crescimento diminui de forma abrupta. Além disso a atividade inibitória sobre as células tumorais na concentração de 10 µg/mL apresentaram diferença significativa comparado com a inibição das células NIH/3T3 nesta mesma concentração. Os valores de inibição celular forma de 72,7% para 786-0; 41,6% para MDA, 32,1% para HepG2, 100% para MCF-7 e 84,2 para HT-29. Enquanto para NIH/3T3 apresentou inibição de apenas 3,8%.

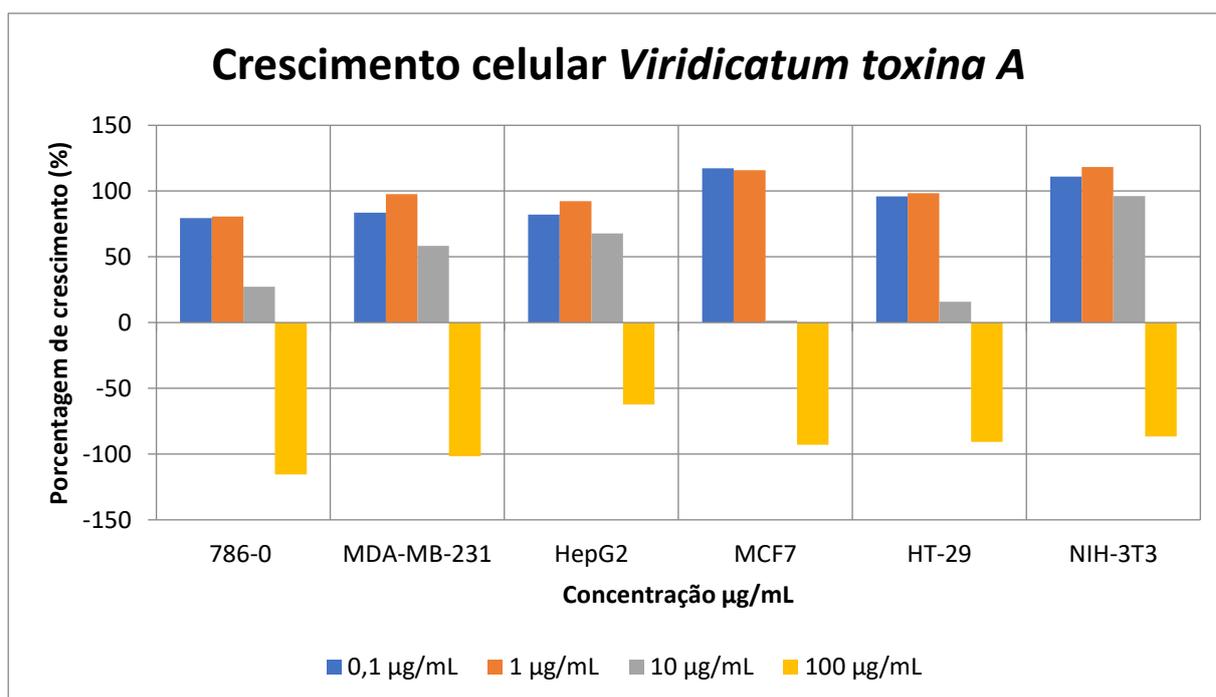


Figura 8 - Porcentagem de crescimento celular (%) e concentração (µg/mL) em todas as linhagens celulares testadas com o composto Viridicatum toxina A.

Na figura 9 é possível observar que todas as linhagens testadas com a VTA apresentam atividade citostática até a concentração de 10 µg/mL e citocida na concentração de 100 µg/mL.

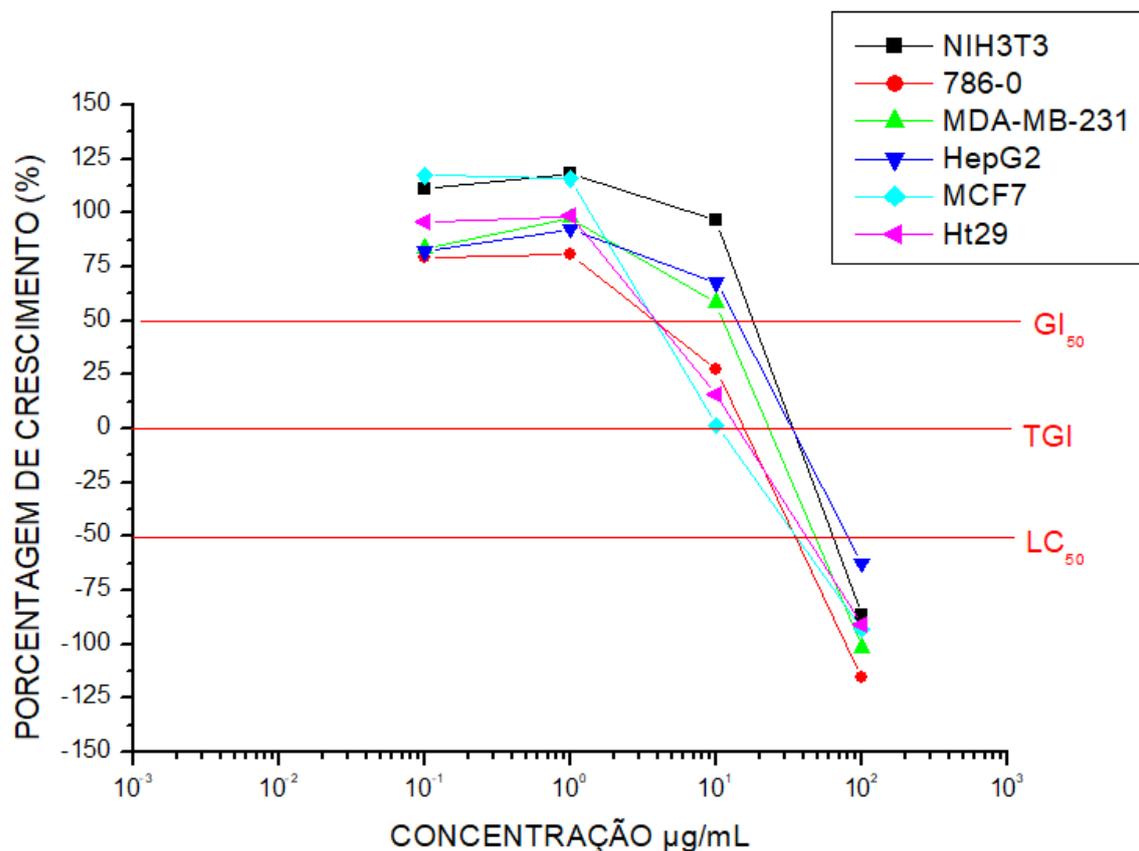


Figura 9 - Porcentagem de crescimento em 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL em todas as linhagens testadas com o composto Viridicatum toxina A.

Efeito da VTA nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 µg/mL, testado com SRB nas linhagens celulares (NIH-3T3, 786-0, MDA-MB-231, HepG2, MCF7 e HT-29). GI₅₀ (inibição de 50% das células), TGI (inibição de 100% das células e LC₅₀ (morte de 50% das células).

5.2. ÍNDICE DE SELETIVIDADE

Para avaliação do índice de seletividade foi realizado a cultura celular de NIH/3T3 (fibroblasto murinho) e as linhagens cancerígenas 786-0, MCF7, HepG2, HT-29 e MDA-MB-231, seguido por ensaio de SRB, onde foi testada a amostra de Viridicatum toxina A, que não apresentou seletividade para nenhuma das linhagens, seguindo esta metodologia (tabela 3).

Tabela 3: Valores de GI₅₀ (μM) e índice de seletividade (IS) da amostra de Viridicatum toxina A.

	Linhagens celulares				
	786-0	MCF7	HepG2	HT-29	MDA-MB-231
Viridicatum toxina A GI ₅₀ (μg)	6,13	9,11	16,12	7,07	11,7
IS	1,78	1,19	0,67	1,54	0,93

IS: Índice de seletividade.

5.3. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE ME MEMBRANA E APTOSE

Duas linhagens de interesse foram selecionadas para a realização do ensaio de fluorescência para avaliar a morfologia celular e evidenciar os corpos apoptóticos que podem estar presentes após o tratamento com Viridicatum toxina A no tempo de 48 horas. Com os resultados prévios do ensaio de Sulforodamina B, foi escolhida linhagem e concentração a serem utilizadas, sendo as linhagens 786-0 que se destacou por seu baixo valor de GI₅₀ e MDA-MB-231 que apesar de não apresentar o melhor resultado de GI₅₀, trata-se de uma linhagem de câncer de mama triplo-negativo, que apresenta pior prognóstico quando comparado aos demais subtipos, pois não expressam receptores de estrógeno, progesterona e HER2 (BLAND *et al.*, 2017; SOTIRIOU; PUSZTAI, 2009), impossibilitando a ação de fármacos que utilizam destes receptores no tratamento da doença.

O tratamento com a Viridicatum toxina A foi feito em 48 horas. A concentração selecionada foi o valor de GI₅₀ e 2x GI₅₀, para a VTA e somente o valor de GI₅₀ para a DOXO (controle positivo). A leitura foi feita em microscópio de fluorescência em aumento de 400x, onde pudemos avaliar que as células que apresentam integridade da membrana celular se coram em verde em proporção uniforme; células em apoptose apresentam fragmentação do DNA celular com corpos apoptóticos, coloração verde no núcleo e citoplasma; as células em apoptose tardia demonstram pontos corados em laranja e as células em processo de necrose se apresentam com núcleo e citoplasma corados em laranja.

5.3.1. 786-0: Adenocarcinoma renal

Os resultados obtidos ao final do experimento, foram capazes de evidenciar alguns elementos importantes: O controle negativo (CN) (A1, A2, A3), quando avaliado microscopicamente apresenta células aparentemente íntegras, levando em consideração o princípio da metodologia que nos permite caracterizar células saudáveis através da coloração verde vibrante. No controle positivo (CP) (B1, B2, B3) e nas duas concentrações de VTA, GI_{50} (C1, C2, C3) e $2x GI_{50}$ (D1, D2, D3), a apresentação das células sobre a fluorescência é vista de maneira diferente frente a metodologia abordada, uma vez que temos a presença da coloração alaranjada, que por sua vez, indica a presença de estruturas modificadas (Figura 10).

Outro ponto importante a ser observado é com relação a morfologia das células. No CN as células permaneceram com a morfologia característica de linhagens aderentes que são provenientes de tecidos epiteliais, aderindo-se a superfície e dependentes da interação célula-célula (FRESHNEY, 2005). No controle positivo e nas duas concentrações de tratamento (GI_{50} e $2x GI_{50}$) a interação célula-célula começa a ser prejudicada. Na imagem do controle positivo (B3), temos a evidencia da possível formação de corpos apoptóticos (seta vermelha), enquanto na imagem aproximada das células tratadas com a VTA na concentração de $2x GI_{50}$ (D3), as células apresentam-se evidentemente retraídas (seta azul) em comparação ao CN, sendo um dos processos envolvidos na morte programada por apoptose.

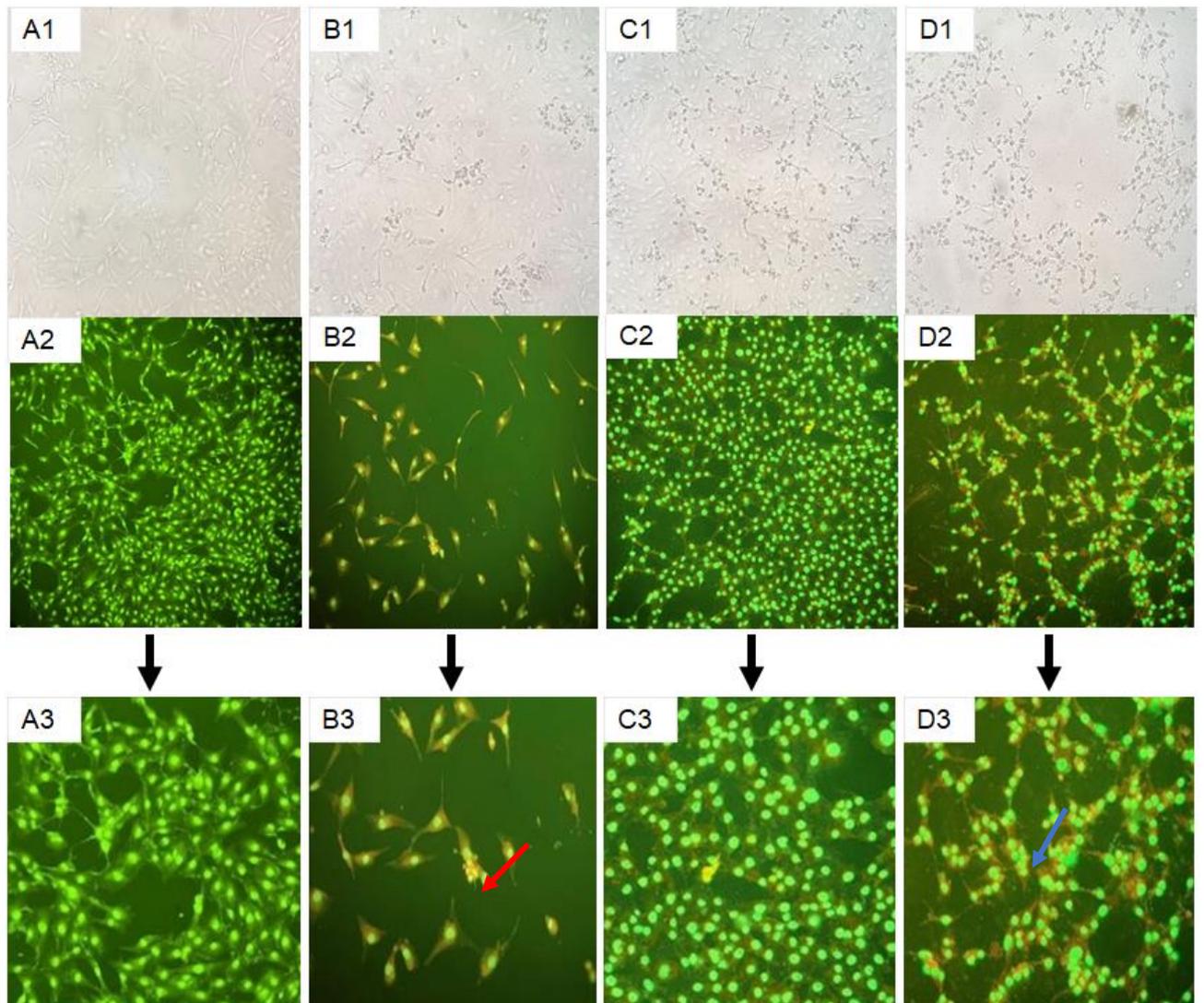


Figura 10 – Avaliação morfológica 786-0.

Fotomicrografias sobre aumento de 400x em microscópio invertido e de fluorescência em células de 786-0. **A: controle negativo**; (A1): a fresco; (A2): fluorescência; (A3): aproximação. **B: controle positivo**; (B1): a fresco; (B2): fluorescência; (B3): aproximação. **C: tratamento VTA (GI_{50})**; (C1): a fresco; (C2): fluorescência; (C3): aproximação. **D: tratamento VTA ($2X GI_{50}$)**; (D1): a fresco; (D2): fluorescência; (D3): aproximação.

5.3.2. MDA-MB-231: Adenocarcinoma de mama

Na linhagem de MDA-MB-231, o controle negativo, também demonstrou apresentar células com integridade, coradas de verde vibrante (A1, A2, A3).

Na imagem do controle positivo, a fresco (B1) podemos observar um menor número de células em comparação com o controle negativo e na

fluorescência (B2) é possível verificar sinais de apoptose danos ao citoplasma celular e núcleos (corados em laranja), sendo melhor visualizado na imagem aproximada B3 (seta vermelha).

Já nas duas concentrações de VTA podemos observar que houve um desprendimento celular, este que pode estar relacionado com a perda de aderência e contato célula-célula que ocorre quando há indução de apoptose.

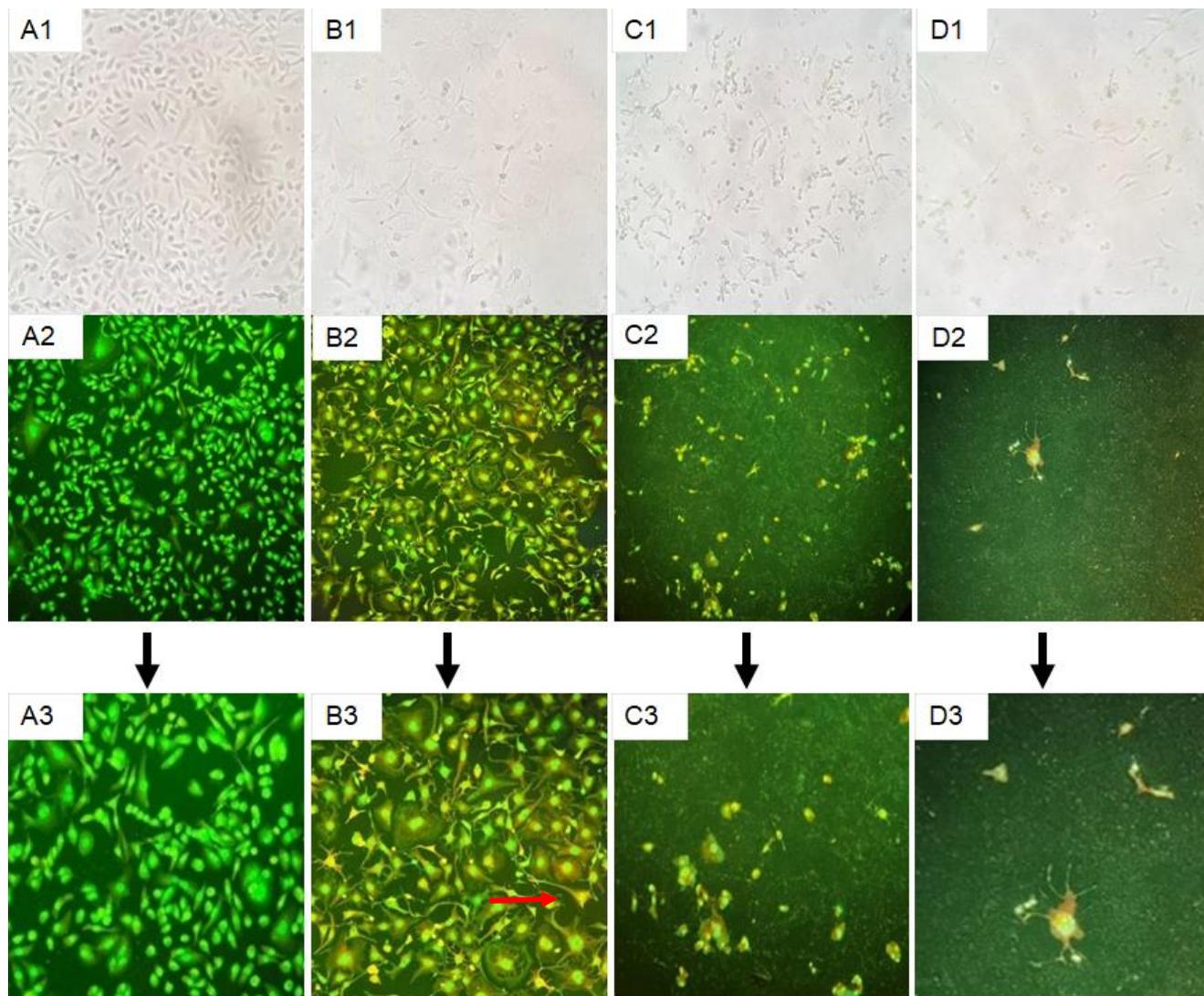


Figura 11 – Avaliação morfológica MDA-MB-231

Fotomicrografias sobre aumento de 40x em microscópio invertido e de fluorescência em células de MDA-MB-231. **A: controle negativo**; (A1): a fresco; (A2): fluorescência; (A3): aproximação. **B: controle positivo**; (B1): a fresco; (B2): fluorescência; (B3): aproximação. **C: tratamento VTA (GI_{50})**; (C1): a fresco; (C2): fluorescência; (C3): aproximação. **D: tratamento VTA ($2X GI_{50}$)**; (D1): a fresco; (D2): fluorescência; (D3): aproximação.

6. DISCUSSÃO

Os fungos endofíticos dos quais as *Viridicatum* toxinas são advindas são considerados ótimos na produção de substâncias bioativas com atividades biológicas antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatória, antivirais, imunossupressoras e anticâncer (HUANG *et al.*, 2001; PURI *et al.*, 2006; STROBEL *et al.*, 1999).

A citotoxicidade é a capacidade que uma substância possui de inibir a proliferação celular ou causar danos e lesões às células, que as levam a morte, e é uma característica avaliada quando se estuda atividade anticâncer. Neste trabalho a VTA apresentou potente citotoxicidade contra todas as linhagens celulares testadas com valores de GI_{50} entre 6,13 a 16,12 $\mu\text{g/mL}$, inclusive para a célula não tumoral (NIH/3T3). A GI_{50} é uma métrica obtida na avaliação citotóxica que representa a concentração que inibe 50% das células e nesta análise isolada, a VTA seria tóxica para células não tumorais, assim como para as células tumorais (atividade anticâncer), demonstrando baixa seletividade. No entanto a dinâmica do efeito antiproliferativo em cada concentração testada permite avaliar o perfil de citotoxicidade da VTA que pode ser semelhante entre os tipos celulares ou pode ser linhagem específica.

Neste contexto observou-se que a atividade antiproliferativa da VTA ocorre de forma significativa a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, mostrando diferença na resposta celular entre as linhagens. Nesta concentração, inibiu 32,1% das células de fígado (HEPG2), 41,6% das células de mama triplo resistentes (MDA-MB-231), 72,7% das células de câncer de rim (786-0), 84,2% das células de câncer de intestino (HT-29) e 100% das células câncer e mama responsiva a hormonioterapia, enquanto a atividade antiproliferativa da VTA nesta concentração nas células não tumorais foi de apenas 3,8%, evidenciando seletividade concentração específica.

Para agentes anticâncer, quanto maior a seletividade do composto, menor a nocividade e os efeitos colaterais sentidos pelo organismo (LEBARON *et al.*, 1988) o que torna a adesão ao tratamento mais fácil para os pacientes.

Estudos sobre a atividade anticâncer da VTA, apesar de escassos, apresentam resultados que corroboram com seu potencial anticâncer, evidenciado contra células de leucemia linfóide crônica em 2013 (LC_{50} entre 0,7 e 3,5 nM), não apresentando seletividade para esta linhagem, uma vez que também apresentou citotoxicidade para células não neoplásicas (BLADT *et al.*, 2013) e em outro estudo, da mesma década, a VTA apresentou valores de IC_{50} entre 1,0 μ M e 2,5 μ M contra células de câncer de pulmão, cólon e colo de útero, porém neste estudo, não foi mencionada seletividade (SHANG *et al.*, 2015).

As características da dinâmica da inibição celular em cada concentração, ou seja, concentrações que configuram efeito citostático da VTA, a torna potencial como coadjuvante a quimioterápicos. Na família das tetraciclinas, em que pertencem as Viridicatum toxinas, vários análogos vêm sendo estudados como possíveis quimioterápicos, como a doxiciclina que quando combinada a quimioterápicos como a cisplatina, potencializa seu efeito, levando a uma possível diminuição na dose administrada, o que significa a redução da toxicidade ao organismo (FOROODI *et al.*, 2009).

Na avaliação do perfil quanto ao efeito que leva à morte celular (efeito citocida), a VTA foi potente em todas as linhagens tumorais e também contra as não tumorais, conferindo ampla toxicidade.

São diversos os mecanismos envolvidos nos processos que levam a inibição da proliferação ou morte celular (CASTEDO *et al.*, 2004; DIMRI, 2005; ISRAELS; ISRAELS, 2000; OKADA; MAK, 2004) e esses mecanismos geralmente são específicos de acordo com a classe dos medicamentos. Por exemplo, as antraciclinas quimioterápicas, medicamentos como a daunorrubicina, doxorubicina, doxorubicina lipossomal, epirubicina, idarubicina e valrubicin, que são antibióticos antitumorais que interferem nas enzimas envolvidas na cópia do DNA durante o ciclo celular (ABIZAID *et al.*, 2004; ALMEIDA *et al.*, 2005).

Desta forma, é possível fazer a analogia entre a tetraciclina e a VTA. Uma vez que não há conhecimento sobre os mecanismos de ação antitumorais da VTA, pode-se inferir e sugerir que a VTA e as tetraciclinas tenham mesmo

mecanismo antitumoral. As tetraciclinas inibem a expressão de MMPs (metaloproteinases de matriz) (ACHARYA *et al.*, 2004).

As MMP's são proteinases que tem como característica principal a dependência dos íons metálicos para que haja atividade catalítica, além disso elas também apresentam a capacidade de degradação de proteínas estruturais que compõem a matriz extracelular (FIGUEIRA, 2006). Nas células tumorais as MMP's são capazes de induzir a transição epitelial-mesenquimal (ETM), evento em que células tumorais com capacidade metastática sofrem as alterações morfológicas que confere às mesmas a capacidade de migração, invasão e proliferação celular, que resultam em metástase (ITOH; NAGASE, 2002).

Uma vez que a expressão dessas metaloproteinases de matriz é inibida, a indução da ETM é prejudicada, o que faz com que o processo de proliferação celular e metástase seja reduzido (GALINDO-HERNANDEZ *et al.*, 2014).

Sabe-se por exemplo que, a superexpressão de MMP's está diretamente relacionada a metástase na linhagem de câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB-231) (HEGEDUS *et al.*, 2008).

A inibição das MMP's também está associada com a indução de apoptose em células cancerígenas, pois leva a um aumento da permeabilidade de membrana das mitocôndrias, que atuam na transdução do sinal de apoptose, contribuindo para a liberação de fatores pró-apoptóticos (RAZAK *et al.*, 2019; VAN LOO *et al.*, 2002). A VTA no nosso estudo estimulou quebra de integridade de membrana celular nas linhagens 786-0 e MDA-MB-231 evidenciada pela coloração alaranjada do brometo de etideo no teste de fluorescência. Além disso, alterações morfológicas observadas, como retração celular e formação de vacúolos, que ocorrem quando a célula está em processo de apoptose (GRIVICICH *et al.*, 2007).

A indução de apoptose é um princípio utilizado por diversos quimioterápicos eficazes no tratamento do câncer, como o taxol e doxorubicina que agem na via intrínseca da morte celular (VOUSDEN; LANE, 2007). Um estudo realizado em 2008 evidenciou que a VTA induziu apoptose nas células de carcinoma cervical (HeLa) através da parada da via G2M do ciclo celular

(CHUNG *et al.*, 2008), via esta que está relacionada diretamente com a proliferação celular e a um pior prognóstico de câncer mama e pancreático por exemplo (OSHI *et al.*, 2021; OSHI *et al.*, 2020).

7. CONCLUSÃO

A VTA é uma substância com potencial para agente antitumoral por apresentar atividade antiproliferativa e citotóxica potente, seletiva na concentração de 10 µg/mL e com indícios de estimular injúria celular pela via de morte celular por apoptose.

8. REFERÊNCIAS

ABIZAID, A.; CÉSAR, F. B.; SILVA, E. M.; FERES, F. *et al.* Stents farmacológicos: novos fármacos. 12, n. 2, p. 96-101, 2004.

ACHARYA, M. R.; VENITZ, J.; FIGG, W. D.; SPARREBOOM, A. Chemically modified tetracyclines as inhibitors of matrix metalloproteinases. **Drug Resist Updat**, 7, n. 3, p. 195-208, Jun 2004.

ALMEIDA, V. L. d.; LEITÃO, A.; REINA, L. d. C. B.; MONTANARI, C. A. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALTEI, W. F. **Triagem biológica, identificação e planejamento de novos candidatos a agentes anticâncer a partir de produtos naturais e compostos sintéticos**. 2014. -, Universidade de São Paulo.

BENTLEY, R. J. P. i. b.; MEDICINE. Microbial secondary metabolites play important roles in medicine; prospects for discovery of new drugs. 40, n. 3, p. 364-394, 1997.

BERGER, L. R.; FRANKLIN, R. D.; HOFFMAN, J. W.; DE BEER, F. *et al.* Earliest hominin cancer: 1.7-million-year-old osteosarcoma from Swartkrans Cave, South Africa. **South African Journal of Science**, Volume 112, n. Number 7/8, 2016.

BLADT, T. T.; DÜRR, C.; KNUDSEN, P. B.; KILDGAARD, S. *et al.* Bio-activity and dereplication-based discovery of ophiobolins and other fungal secondary metabolites targeting leukemia cells. 18, n. 12, p. 14629-14650, 2013.

BLAND, K. I.; COPELAND, E. M.; KLIMBERG, V. S.; GRADISHAR, W. J. **The breast E-book: Comprehensive management of benign and malignant diseases.** Elsevier Health Sciences, 2017. 0323511872.

BONASSA, E. M. A.; GATO, M. I. R. Terapêutica Oncológica Para Enfermeiros e Farmacêuticos. **Atheneu**, p. 650, 2016.

CARREL, A. On the Permanent Life of Tissues Outside of the Organism. **J Exp Med**, 15, n. 5, p. 516-528, May 1 1912.

CASTEDO, M.; PERFETTINI, J. L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K. *et al.* Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, 23, n. 16, p. 2825-2837, Apr 12 2004.

CHEN, D. S.; MELLMAN, I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. **Immunity**, 39, n. 1, p. 1-10, Jul 25 2013.

CHOOI, Y. H.; CACHO, R.; TANG, Y. Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. **Chem Biol**, 17, n. 5, p. 483-494, May 28 2010.

CHOOI, Y. H.; WANG, P.; FANG, J.; LI, Y. *et al.* Discovery and characterization of a group of fungal polycyclic polyketide prenyltransferases. **J Am Chem Soc**, 134, n. 22, p. 9428-9437, Jun 6 2012.

CHOPRA, I.; ROBERTS, M. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. **Microbiol Mol Biol Rev**, 65, n. 2, p. 232-260 ; second page, table of contents, Jun 2001.

CHUNG, K. S.; YIM, N. H.; LEE, S. H.; CHOI, S. J. *et al.* Identification of small molecules inducing apoptosis by cell-based assay using fission yeast deletion mutants. **Invest New Drugs**, 26, n. 4, p. 299-307, Aug 2008.

DIMRI, G. P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer Cell**, 7, n. 6, p. 505-512, Jun 2005.

DUVAL, K.; GROVER, H.; HAN, L. H.; MOU, Y. *et al.* Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. **Physiology (Bethesda)**, 32, n. 4, p. 266-277, Jul 2017.

EDMONDSON, R.; BROGLIE, J. J.; ADCOCK, A. F.; YANG, L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. **Assay Drug Dev Technol**, 12, n. 4, p. 207-218, May 2014.

FIGUEIRA, R. d. C. S. **Expressão de metaloproteinases de matriz (MMPS) e de seus inibidores (TIMPS e RECK) em modelo de progressão tumoral de Câncer de mama e sua correlação com dados clínicos-patológicos.** 2006. - , Universidade de São Paulo.

FOROODI, F.; DUIVENVOORDEN, W. C.; SINGH, G. Interactions of doxycycline with chemotherapeutic agents in human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 cells. **Anticancer Drugs**, 20, n. 2, p. 115-122, Feb 2009.

FREIRE, F. d. C. O.; VASCONCELOS, F. R.; DE LIMA COUTINHO, I. B. J. E.-R. d. C., Ciência e Tecnologia da UVA. Fungos endofíticos: uma fonte de produtos bioativos de importância para a humanidade. 16, n. 1, 2014.

FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.** 5th Edition ed. 2005. 978-0-471-74759-8.

FURNARI, L. Controle de qualidade em radioterapia.

. **Revista Brasileira de Física Médica**, p. 77-90, 2009.

GALINDO-HERNANDEZ, O.; SERNA-MARQUEZ, N.; CASTILLO-SANCHEZ, R.; SALAZAR, E. P. Extracellular vesicles from MDA-MB-231 breast cancer cells stimulated with linoleic acid promote an EMT-like process in MCF10A cells. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, 91, n. 6, p. 299-310, Dec 2014.

GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; OTEO, J. A. J. R. E. d. Q. Efectos no antimicrobianos de las tetraciclinas. 23, n. 1, 2010.

GONÇALVES, F. J. T.; FREIRE, F. d. C. O.; LIMA, J. S. J. E.-R. d. C., Ciência e Tecnologia da UVA. Fungos endofíticos e seu potencial como produtores de compostos bioativos. 15, n. 1, 2013.

GONÇALVES, J. C. R.; SOBRAL, M. V. **Cultivo de Células: da teoria à bancada.** 2020. 978-65-5942-027-8.

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

GUERRERO, A. C.; MORALES, P. C.; CERDA, E. R.; VELASCO, A. I. F. J. e.-G. El resurgimiento de las Tetraciclinas. 9, 2011.

HALL, D. H.; GU, G.; GARCIA-ANOVEROS, J.; GONG, L. *et al.* Neuropathology of degenerative cell death in *Caenorhabditis elegans*. **J Neurosci**, 17, n. 3, p. 1033-1045, Feb 1 1997.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, 144, n. 5, p. 646-674, Mar 4 2011.

HARPER, J. K.; ARIF, A. M.; FORD, E. J.; STROBEL, G. A. *et al.* Pestacin: a 1,3-dihydro isobenzofuran from *Pestalotiopsis microspora* possessing antioxidant and antimycotic activities. **Tetrahedron**, 59, n. 14, p. 2471-2476, 2003.

HARTWELL, L. H.; WEINERT, T. A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, 246, n. 4930, p. 629-634, Nov 3 1989.

HEGEDUS, L.; CHO, H.; XIE, X.; ELICEIRI, G. L. Additional MDA-MB-231 breast cancer cell matrix metalloproteinases promote invasiveness. **J Cell Physiol**, 216, n. 2, p. 480-485, Aug 2008.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G. *et al.* The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, 42, n. 4, p. 377-387, Aug 2007.

HUANG, H.; DING, Y.; SUN, X. S.; NGUYEN, T. A. Peptide hydrogelation and cell encapsulation for 3D culture of MCF-7 breast cancer cells. **PLoS One**, 8, n. 3, p. e59482, 2013.

HUANG, Y.; WANG, J.; LI, G.; ZHENG, Z. *et al.* Antitumor and antifungal activities in endophytic fungi isolated from pharmaceutical plants *Taxus mairei*, *Cephalataxus fortunei* and *Torreya grandis*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 31, n. 2, p. 163-167, Aug 2001.

HUH, D.; HAMILTON, G. A.; INGBER, D. E. From 3D cell culture to organs-on-chips. **Trends Cell Biol**, 21, n. 12, p. 745-754, Dec 2011.

HUTCHISON, R. D.; STEYN, P. S.; VAN RENSBURG, S. J. Viridicatumtoxin, a new mycotoxin from *Penicillium viridicatum* westling. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 24, n. 3, p. 507-509, 1973.

INCA. **ABC do câncer : abordagens básicas para o controle do câncer**. 2011. ISSN 978-85-7318-188-3. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf.

INOKOSHI, J.; NAKAMURA, Y.; HONGBIN, Z.; UCHIDA, R. *et al.* Spirohexalines, new inhibitors of bacterial undecaprenyl pyrophosphate synthase, produced by *Penicillium brasilianum* FKI-3368. **J Antibiot (Tokyo)**, 66, n. 1, p. 37-41, Jan 2013.

ISRAELS, E.; ISRAELS, L. J. T. o. The cell cycle. 5, n. 6, p. 510-513, 2000.

ITOH, Y.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases in cancer. **Essays Biochem**, 38, p. 21-36, 2002.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A. R. The p53 Pathway: Origins, Inactivation in Cancer, and Emerging Therapeutic Approaches. **Annu Rev Biochem**, 85, p. 375-404, Jun 2 2016.

KABUTO, C.; SILVERTON, J. V.; AKIYAMA, T.; SANKAWA, U. *et al.* X-Ray structure of viridicatumtoxin: a new class of mycotoxin from *Penicillium viridicatum* Westling. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, n. 18, 1976.

KENNEDY, B. Hormone therapy for advanced breast cancer. 18, n. 12, p. 1551-1557, 1965.

KIESLICH, K. J. A.-f. Production of drugs by microbial biosynthesis and biotransformation. Possibilities, limits and future developments (1st communication). 36, n. 4, p. 774-778, 1986.

KRYSKO, D. V.; DENECKER, G.; FESTJENS, N.; GABRIELS, S. *et al.* Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. **Cell Death Differ**, 13, n. 12, p. 2011-2022, Dec 2006.

LAWEN, A. Apoptosis-an introduction. **Bioessays**, 25, n. 9, p. 888-896, Sep 2003.

LEBARON, S.; ZELTZER, L. K.; LEBARON, C.; SCOTT, S. E. *et al.* Chemotherapy side effects in pediatric oncology patients: drugs, age, and sex as risk factors. **Med Pediatr Oncol**, 16, n. 4, p. 263-268, 1988.

LI, W.; LI, L.; ZHANG, C.; CAI, Y. *et al.* Investigations into the Antibacterial Mechanism of Action of Viridicatumtoxins. **ACS Infect Dis**, 6, n. 7, p. 1759-1769, Jul 10 2020.

MANTOVANI, A. Cancer: inflammation by remote control. **Nature**, 435, n. 7043, p. 752-753, Jun 9 2005.

MATTIUZZI, C.; LIPPI, G. Current Cancer Epidemiology. **J Epidemiol Glob Health**, 9, n. 4, p. 217-222, Dec 2019.

MCGAHON, A. J.; MARTIN, S. J.; BISSONNETTE, R. P.; MAHBOUBI, A. *et al.* The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. 46, p. 153-185, 1995.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R. *et al.* Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. 83, n. 11, p. 757-766, 1991.

MURAKAMI, H.; NURSE, P. DNA replication and damage checkpoints and meiotic cell cycle controls in the fission and budding yeasts. **Biochem J**, 349, n. Pt 1, p. 1-12, Jul 1 2000.

NICOLAOU, K. C.; HALE, C. R.; NILEWSKI, C.; IOANNIDOU, H. A. *et al.* Total synthesis of viridicatumtoxin B and analogues thereof: strategy evolution, structural revision, and biological evaluation. **J Am Chem Soc**, 136, n. 34, p. 12137-12160, Aug 27 2014.

OKADA, H.; MAK, T. W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, 4, n. 8, p. 592-603, Aug 2004.

OSHI, M.; PATEL, A.; LE, L.; TOKUMARU, Y. *et al.* G2M checkpoint pathway alone is associated with drug response and survival among cell proliferation-related pathways in pancreatic cancer. 11, n. 6, p. 3070, 2021.

OSHI, M.; TAKAHASHI, H.; TOKUMARU, Y.; YAN, L. *et al.* G2M Cell Cycle Pathway Score as a Prognostic Biomarker of Metastasis in Estrogen Receptor (ER)-Positive Breast Cancer. **Int J Mol Sci**, 21, n. 8, p. 2921, Apr 22 2020.

PENILDON, S. Farmacologia. : Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 2006.

PEREIRA-MAIA, E. C.; SILVA, P. P.; ALMEIDA, W. B. d.; SANTOS, H. F. d. *et al.* Tetraciclinas e glicilciclinas: uma visão geral. **Química Nova**, 33, n. 3, p. 700-706, 2010.

POLLARD, J. W.; WALKER, J. M. **Basic cell culture protocols**. Springer Science & Business Media, 1997. 0896034410.

PROSKURYAKOV, S. Y.; KONOPLYANNIKOV, A. G.; GABAI, V. L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? **Exp Cell Res**, 283, n. 1, p. 1-16, Feb 1 2003.

PURI, S. C.; NAZIR, A.; CHAWLA, R.; ARORA, R. *et al.* The endophytic fungus *Trametes hirsuta* as a novel alternative source of podophyllotoxin and related aryl tetralin lignans. **J Biotechnol**, 122, n. 4, p. 494-510, Apr 20 2006.

RATEB, M. E.; EBEL, R. J. N. p. r. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. 28, n. 2, p. 290-344, 2011.

RAZAK, N. A.; ABU, N.; HO, W. Y.; ZAMBERI, N. R. *et al.* Cytotoxicity of eupatorin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells via cell cycle arrest, anti-angiogenesis and induction of apoptosis. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 1514, Feb 6 2019.

SHANG, Z.; SALIM, A. A.; KHALIL, Z.; QUEZADA, M. *et al.* Viridicatumtoxins: Expanding on a Rare Tetracycline Antibiotic Scaffold. **J Org Chem**, 80, n. 24, p. 12501-12508, Dec 18 2015.

SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. J. N. E. J. o. M. Gene-expression signatures in breast cancer. 360, n. 8, p. 790-800, 2009.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by *Taxomyces andreanae*, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, 260, n. 5105, p. 214-216, Apr 9 1993.

STROBEL, G. A.; MILLER, R. V.; MARTINEZ-MILLER, C.; CONDRON, M. M. *et al.* Cryptocandin, a potent antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis cf. quercina*. **Microbiology (Reading)**, 145 (Pt 8), p. 1919-1926, Aug 1999.

SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; LAVERSANNE, M. *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer J Clin**, 71, n. 3, p. 209-249, May 2021.

TAKAHASHI, J. A.; LUCAS, E. M. F. Ocorrência e diversidade estrutural de metabólitos fúngicos com atividade antibiótica. **Química Nova**, 31, n. 7, p. 1807-1813, 2008.

THOMPSON, C. B. J. S. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. 267, n. 5203, p. 1456-1462, 1995.

VAN LOO, G.; SAELENS, X.; VAN GURP, M.; MACFARLANE, M. *et al.* The role of mitochondrial factors in apoptosis: a Russian roulette with more than one bullet. **Cell Death Differ**, 9, n. 10, p. 1031-1042, Oct 2002.

VARGAS, J.; FELTES, B. C.; POLONI JDE, F.; LENZ, G. *et al.* Senescence; an endogenous anticancer mechanism. **Front Biosci (Landmark Ed)**, 17, n. 7, p. 2616-2643, Jun 1 2012.

VICENTE, D.; PEREZ-TRALLERO, E. [Tetracyclines, sulfonamides, and metronidazole]. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, 28, n. 2, p. 122-130, Feb 2010.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. p53 in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 8, n. 4, p. 275-283, Apr 2007.

WALKER, N. I.; HARMON, B. V.; GOBE, G. C.; KERR, J. F. Patterns of cell death. **Methods Achiev Exp Pathol**, 13, p. 18-54, 1988.

WILLIAMS, G. H.; STOEBER, K. The cell cycle and cancer. **J Pathol**, 226, n. 2, p. 352-364, Jan 2012.

YANG, Z.; KLIONSKY, D. J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Curr Opin Cell Biol**, 22, n. 2, p. 124-131, Apr 2010.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Nat Prod Rep**, 23, n. 5, p. 753-771, Oct 2006.

ZHENG, C. J.; YU, H. E.; KIM, E. H.; KIM, W. G. Viridicatumtoxin B, a new anti-MRSA agent from *Penicillium* sp. FR11. **J Antibiot (Tokyo)**, 61, n. 10, p. 633-637, Oct 2008.