



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
Departamento de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



VANESSA KAPLUM

FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDINAS DE *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) COVILLE: ATIVIDADE EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER CERVICAL, TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH E ENSAIO CLÍNICO FASE I

Maringá – PR

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Fração Enriquecida em Proantocianidinas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.)
Coville: Atividade em Linhagens Celulares de Câncer Cervical, Tumor Sólido de
Ehrlich e Ensaio Clínico Fase I**

VANESSA KAPLUM

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos), da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Maringá – PR

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

K17f Kaplum, Vanessa
Fração enriquecida em proantocianidinas de *Stryphnodendron adstringens*(Mart.) coville: atividade em linhagens celulares de câncer cervical, tumor sólido de Ehrlich e ensaio clínico fase I / Vanessa Kaplum. -- Maringá, 2018.
105 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.

1. *Stryphnodendron adstringens*(Mart). 2. Atividade in vivo. 3. Ensaio Clínico Fase I. 4. Proantocianidinas. 5. Linhagens celulares de câncer cervical. 6. Mecanismo de ação. I. Nakamura, Celso Vataru, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. III. Título.

CDD 21.ed. 615.321

Mariza Nogami - CRB 9/1569

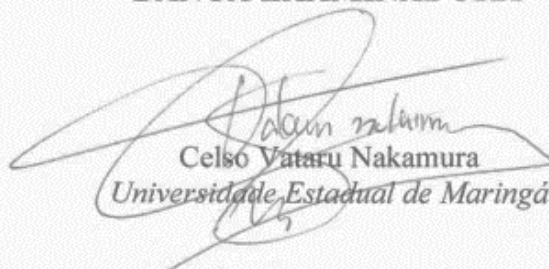
VANESSA KAPLUM

FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDINAS DE *Stryphnodendron adstringens* (MART.) COVILLE: ATIVIDADE EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER CERVICAL, TUMOR SÓLIDO DE EHRlich E ENSAIO CLÍNICO FASE I

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 09 de outubro de 2018.

BANCA EXAMINADORA


Celso Vataru Nakamura
Universidade Estadual de Maringá


Karin Juliane Pelizzaro Rocha
Unicesumar – Centro Universitário de Maringá


Marcia Edilaine Lopes Consolaro
Universidade Estadual de Maringá


Marco Antonio Costa
Universidade Estadual de Maringá


Sueli Fumie Yamada Oga
Universidade Estadual de Londrina

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, bloco B08 e no Laboratório de Biologia Farmacêutica, bloco K80.

Parte deste trabalho foi publicado em: KAPLUM, V et al. Proanthocyanidin Polymer-Rich Fraction of *Stryphnodendron adstringens* Promotes *in Vitro* and *in Vivo* Cancer Cell Death via Oxidative Stress. *Frontiers in Pharmacology*, v. 9, n. 694, p. 1-18, 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais, Evaldo e Inês,
ao meu esposo, Juliano Henrique e ao meu irmão José Augusto
que são meu alicerce e minha fonte de inspiração na busca por novos desafios.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todos os momentos que me fez forte para superar as dificuldades e, pela fé concedida para acreditar que até o impossível aos meus olhos poderia acontecer;

Aos meus pais, Evaldo e Inês, que sempre foram meu alicerce e minha fonte de inspiração. Agradeço pela compreensão quando não consegui estar presente no dia-a-dia da família. Agradeço a torcida, o estímulo e a confiança de que tudo daria certo;

Ao meu irmão, José Augusto, pelo apoio e incentivo para a concretização deste trabalho e, busca dos meus sonhos;

Ao meu esposo, Juliano Henrique, que com uma paciência infinita e um amor incondicional esteve ao meu lado fazendo-me uma pessoa melhor. Agradeço por me fazer acreditar que seria possível realizar este sonho. Muito obrigada!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, pelo voto de confiança concedido desde a iniciação científica. Por toda orientação, paciência, compreensão e ensinamentos, imprescindíveis para o meu crescimento acadêmico e pessoal;

Ao Prof. Dr. Benedito Prado Dias Filho, ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, à Prof^ª. Dr^ª. Marcia Edilaine Lopes Consolaro, à Prof^ª. Dr^ª. Maria Aparecida Fernandez, à Prof^ª. Me. Márcia Constantino Colli, ao Prof. Dr. Marco Antônio Costa, ao Prof. Dr. Nelson Shozo Uchimura, à Prof^ª. Dr^ª. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager e à Prof^ª. Dr^ª. Tânia Ueda-Nakamura meus sinceros agradecimentos por terem colaborado das mais diversas maneiras para a realização deste trabalho;

À todas as mulheres que participaram do Ensaio Clínico Fase I, meu muito obrigada!

À secretária do PCF, Francisca Helena Mesquita de Carvalho, muito obrigada por toda paciência com minhas dúvidas e pela sua dedicação ao programa;

Aos companheiros do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos que já concluíram seus trabalhos ou que ainda estão concluindo, agradeço a ajuda, convivência e confraternizações, tudo isso dá vida ao nosso laboratório e traz alegria para a nossa rotina;

À todos que, em algum momento contribuíram com a realização deste trabalho, de forma direta ou indireta, os meus sinceros agradecimentos.

Muito obrigada!!!

“Ora et labora”

(São Bento)

KAPLUM, V 2018. Fração Enriquecida em Proantocianidinas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville: Atividade em Linhagens Celulares de Câncer Cervical, Tumor Sólido de Ehrlich e Ensaio Clínico Fase I. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 105 p.

RESUMO

O câncer cervical é o quarto câncer mais frequente em mulheres no mundo, causado pela infecção com o papilomavírus humano (HPV), principalmente por HPVs de alto risco HPV16 e HPV18. Os medicamentos disponíveis para o tratamento do câncer nem sempre atingem os efeitos terapêuticos esperados. Assim é imprescindível a busca por novas alternativas, sendo que tais alternativas terapêuticas devem ser seguras para uso humano. Desta forma, o objetivo do trabalho foi investigar a atividade antitumoral *in vitro* e o mecanismo de ação da fração enriquecida em proantocianidinas de *Stryphnodendron adstringens* (**F2**) em linhagens celulares de câncer cervical, incluindo HeLa (HPV18-positivo), SiHa (HPV16-positivo) e C33A (HPV-negativo), além de avaliar a atividade antitumoral *in vivo* e a segurança em seres humanos. A viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT. A migração celular foi determinada por meio do ensaio de cicatrização da ferida. O mecanismo de ação foi investigado por meio da análise ultraestrutural e pela avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), níveis de tióis reduzidos, metabolismo mitocondrial, expressão dos genes Bax, BCL-2, caspase 9 e caspase 3, juntamente com a avaliação da lipoperoxidação, integridade do DNA e da membrana celular. A atividade *in vivo* foi avaliada por meio do modelo murino de tumor sólido de Ehrlich. A segurança do gel intravaginal contendo 5% de **F2** foi avaliada por meio do Ensaio Clínico Fase I. A fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* reduziu a viabilidade das linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A de forma tempo- e dose-dependentes e inibiu a migração celular nas três linhagens celulares. Nas linhagens celulares HeLa e SiHa (IC₅₀) houve intenso estresse oxidativo, devido a elevada produção de EROs e depleção nos níveis de tióis reduzidos. Além disso, o tratamento com **F2** também induziu danos mitocondriais suficientes para desencadear a apoptose mediada pela mitocôndria, como despolarização do potencial de membrana mitocondrial, redução nos níveis de ATP intracelular e aumento na relação Bax/BCL-2, associado ao aumento na expressão de caspase 9, caspase 3, e danos no DNA. Além destas alterações, na linhagem celular C33A tratada com concentrações referentes à IC₅₀ e IC₉₀, e nas linhagens celulares HeLa e SiHa tratadas com a IC₉₀ de **F2** também houve aumento na lipoperoxidação e ruptura da membrana celular, indicando um progresso para a apoptose tardia/necrose. A inibição da produção de EROs pelo antioxidante

o sintético *N*-acetilcisteína suprimiu significativamente o estresse oxidativo nas três linhagens celulares. No modelo murino de tumor sólido de Ehrlich, houve redução significativa no volume e no peso tumoral após o tratamento com **F2**. Além de aumentar a lipoperoxidação no tumor indicando que **F2** também induziu estresse oxidativo no modelo tumoral *in vivo*. O Ensaio Clínico Fase I demonstrou que o gel vaginal contendo 5% de **F2** administrado por via intravaginal foi seguro e bem tolerado, visto que não apresentou alterações nos parâmetros sistêmicos e locais avaliados. Desta forma, a fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* pode ser um candidato em potencial para o tratamento do câncer cervical.

Palavras-chave: *Stryphnodendron adstringens*, proantocianidinas, linhagens celulares de câncer cervical, mecanismo de ação, atividade *in vivo*, Ensaio Clínico Fase I

KAPLUM, V 2018. Proanthocyanidin Polymer-rich Fraction of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville: Cervical Cancer Cell Lines Activity, Ehrlich Solid Tumor Model and Clinical trial Phase I. Ph.D. Thesis, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. 105 p.

ABSTRACT

Cervical cancer is the fourth most common cancer that affects women worldwide, mainly through human papilloma virus (HPV) infection with high-risk HPV16 and HPV18. The drugs available for the cancer treatment do not always reach the expected therapeutic effects, so it is imperative to search for new alternatives. Furthermore, therapeutic alternatives must be safe for human use. The present study investigated the *in vitro* anticancer activity and mechanism of action of a proanthocyanidin polymer-rich fraction of *Stryphnodendron adstringens* (**F2**) in cervical cancer cell lines, including HeLa (HPV18-positive), SiHa (HPV16-positive), and C33A (HPV-negative) cells, as well as the *in vivo* antitumor activity, and the safety for humans. Cell viability was determined by the MTT assay. Cell migration was determined by the wound healing assay. The mechanism of action was investigated by performing ultrastructural analysis and evaluating reactive oxygen species (ROS) production, reduced thiol levels, mitochondrial metabolism, BCL-2 family expression, caspase expression, lipoperoxidation, DNA and cell membrane integrity. *In vivo* activity was evaluated using the murine Ehrlich solid tumor model. The safety of intravaginal gel containing 5% of **F2** was evaluated by a clinical trial Phase I. Proanthocyanidin polymer-rich fraction of *S. adstringens* time- and dose-dependently reduced cell viability of HeLa, SiHa and C33A cells, and significantly inhibited the migration of cervical cancer cells. In the HeLa and SiHa cells (IC₅₀) there were intense oxidative stress due to increase in ROS and depletion of reduced thiol levels. Treatment with **F2** also induced mitochondrial damage sufficient to trigger mitochondria-dependent apoptosis, such as mitochondrial membrane potential depolarization, reduction of intracellular levels of ATP, and increase in Bax-BCL-2 ratio, associated with an increase in caspase 9 and 3 expression, and DNA damage. In C33A cells treated with IC₅₀ and IC₉₀, and HeLa and SiHa cells treated with IC₉₀ of **F2** also there were increase in lipoperoxidation and cell membrane disruption, indicating progress to late apoptosis/necrosis. The inhibition of ROS production by *N*-acetylcysteine significantly suppressed oxidative stress in all three cell lines. In the murine Ehrlich solid tumor model, there was a significant decrease in the tumor volume and weight after treatment with **F2**. Also, significantly increased lipoperoxidation in the tumor indicating that **F2** also induces oxidative stress in the *in vivo* model. Clinical trial Phase I showed that the intravaginal gel containing 5% of **F2** was safe and well tolerated, without

relevant systemic or local alterations in the parameters evaluated. These findings indicate that the proanthocyanidin polymer-rich fraction of *S. adstringens* may be a potential chemotherapeutic candidate for cervical cancer treatment.

Keywords: *Stryphnodendron adstringens*, proanthocyanidins, cervical cancer cell lines, mechanism of action, *in vivo* activity, clinical trial Phase I

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação do genoma viral do HPV16. Fonte: Adaptado de SANJOSÉ et al. (2018).25
- Figura 2. Ciclo de vida do papilomavírus humano (HPV). Fonte: Adaptado de MOODY (2017).26
- Figura 3. Progressão da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e associação com lesões intraepiteliais escamosas em células infectados e com o câncer invasivo. Fonte: Adaptado de WOODMAN; COLLINS; YOUNG (2007).28
- Figura 4. (A) *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. (B) Folíolos e cascas picadas de *S. adstringens*. Fonte: Acervo pessoal.33
- Figura 5. Provável estrutura química dos polímeros de proantocianidinas presentes na fração aquosa de *S. adstringens*. Fonte: ISHIDA et al. (2006)37
- Figura 6. Esquema das vias intrínseca e extrínseca de ativação da morte celular por apoptose. Fonte: Adaptado de MACFARLANE; WILLIAMS (2004).40
- Figura 7. Desenho experimental das metodologias empregadas no presente trabalho.48
- Figura 8. Atividade citotóxica em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) e queratinócitos humano imortalizados (HaCaT). (A-C) Células tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (1-100 µg/mL) por 24 e 48 h, e a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT. Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. *p ≤ 0,05, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni). (D) Concentração capaz de reduzir 50% da densidade óptica (IC₅₀) das linhagens celulares HaCaT, HeLa, SiHa e C33A após 24 e 48 h de tratamento. *p ≤ 0,05, atividade citotóxica nas linhagens celulares HeLa, SiHa ou C33A significativamente diferente quando comparado com a linhagem celular HaCaT (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). (E) Alterações morfológicas em linhagens celulares de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com **F2** (IC₅₀ ou IC₉₀) por 24 h com ou sem pré-incubação com *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h.62
- Figura 9. Análise da migração celular por meio do ensaio de cicatrização da ferida em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A). (A, D, G) Células controle (células não tratadas). (B, C, E, F, H, I) Células tratadas com fração enriquecida em proantocianidinas por 24 h e observadas em microscópio invertido de contraste de fase. Os dados representam a porcentagem de fechamento da ferida ± DP de três experimentos. *p ≤ 0,05, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett).63
- Figura 10. Análise das alterações ultraestruturais por meio da microscopia eletrônica de transmissão em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração

enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas sem (A-I) ou com (a-i) *N*-acetilcisteína por 2 h antes do tratamento com **F2**. O grupo controle (células não tratadas) das linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foi representado por A, a, D, d, G e g, respectivamente. As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com a IC₅₀ foram representadas por B, b, E, e, H e h, respectivamente. As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com a IC₉₀ foram representadas por C, c, F, f, I e i, respectivamente. O grupo controle (células não tratadas) apresentou organelas com ultraestrutura característica. M, mitocôndria; g, complexo de Golgi; n, núcleo. As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A que foram tratadas com a IC₅₀ e IC₉₀ de **F2** apresentaram alterações ultraestruturais, incluindo inchaço mitocondrial (asterisco branco), perda das cristas mitocôndrias (asterisco preto), ruptura da membrana celular (seta preta), alterações na membrana nuclear (seta branca) e, autolisossomo (AL). Escala das barras = 0,5 µm em D, E, H, e c-g e 1 µm em A-C, F, G, I, a, b, h, e i. 65

Figura 11. Análise do tipo de morte celular por meio da dupla marcação com laranja de acridina e iodeto de propídio em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. As barras representam a análise quantitativa da fluorescência das micrografias determinada em 200 células em triplicata. Os seguintes critérios foram aplicados: células viáveis (núcleo verde com estruturas intactas), apoptose inicial (núcleo verde brilhante com cromatina condensada), apoptose tardia (densas áreas alaranjadas com cromatina condensada) e necrose secundária (núcleo laranja-avermelhado). *p ≤ 0,05, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). ^ap ≤ 0,05, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). 66

Figura 12. Aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e depleção nos níveis de tióis reduzidos em células de câncer cervical. Produção EROs (A), produção de peróxido de hidrogênio (B) e, níveis de tióis reduzidos (C) em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento. O controle positivo foi o H₂O₂ (200 µM). Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. *p ≤ 0,05, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). ^ap ≤ 0,05, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). [#]p ≤ 0,05, diferença significativa entre o tratamento com e sem NAC (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni). 68

Figura 13. Despolarização do potencial de membrana mitocondrial (ΔΨ_m) e redução nos níveis de ATP intracelular em células de câncer cervical. (A) Quantificação do ΔΨ_m por meio do marcador TMRE. (B) Análise da microscopia de fluorescência do ΔΨ_m pelo marcador TMRE (fluorescência vermelha) e análise da integridade do DNA pelo marcador Hoechst 33342 (fluorescência azul), mostrando fragmentação do DNA (asterisco branco) e condensação da cromatina (seta branca). (C) Os níveis de ATP intracelular foram determinados por meio do reagente Cell Titer-GLO. As células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) foram tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-

incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. O controle positivo foi o CCCP (100 µM) e o KCN (1000 µM) para A e C, respectivamente. Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). ^a $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). # $p \leq 0,05$, diferença significativa entre o tratamento com e sem NAC (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni). 70

Figura 14. Alterações na expressão do RNAm do fator pró-apoptóticos e anti-apoptóticos em células de câncer cervical. A PCR em tempo real dos níveis de expressão relativa do RNAm do gene Bax (A), BCL-2 (B) e da relação Bax/BCL-2 (C) em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 12 h. As células pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). ^a $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). # $p \leq 0,05$, diferença significativa entre o tratamento com e sem NAC (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni). 71

Figura 15. Aumento na expressão do RNAm das caspases 9 e 3 em células de câncer cervical. A PCR em tempo real dos níveis de expressão relativa do RNAm do gene caspase 9 (A) e caspase 3 (B) em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 12 h. As células pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). ^a $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). # $p \leq 0,05$, diferença significativa entre o tratamento com e sem NAC (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni). 72

Figura 16. Fragmentação do DNA em células de câncer cervical. A fragmentação do DNA foi avaliada por meio da eletroforese em gel de agarose 1% nas células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. O marcador de peso molecular foi o 100 bp DNA Ladder. Os experimentos foram realizados em triplicata, reproduzindo resultados similares. 73

Figura 17. Aumento na lipoperoxidação e na ruptura da membrana celular em células de câncer cervical induzido por **F2**. Lipoperoxidação (A) e integridade da membrana celular (B) nas células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (**F2**; IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. Os controles positivos foram H₂O₂ (200 µM) e digitonina (80 µM) para A e B, respectivamente. Os dados representam a média ±

DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). ^a $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). # $p \leq 0,05$, diferença significativa entre o tratamento com e sem NAC (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni). 74

Figura 18. Atividade antitumoral in vivo da fração **F2** em camundongos BALB/c com tumor sólido de Ehrlich. O tratamento incluiu o controle (controle não tratado) e **F2** (150 mg/kg/dia). Ambos tratamentos foram administrados por via oral e diariamente durante 28 dias. (A) As dimensões do tumor sólido de Ehrlich foram obtidas semanalmente para realizar o cálculo do volume tumoral. (B) O tumor sólido de Ehrlich foi pesado após o animal ser eutanasiado. (C) Lipoperoxidação pela técnica de TBARS em termo de malonaldeído (MDA). Os dados representam a média \pm DP (n = 5/grupo). * $p \leq 0,05$, significativamente diferente entre o grupo controle e o grupo **F2** (teste de Mann-Whitney). # $p \leq 0,05$, significativamente diferente entre o grupo controle e o grupo **F2** (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni). 75

Figura 19. Esquema da distribuição das mulheres recrutadas para participar do Ensaio Clínico Fase I do gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (**F2**). 76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Parâmetros hematológicos de 30 mulheres antes e após o tratamento com o gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (F2) por via intravaginal durante 14 dias. Os dados representam a média \pm DP, sendo comparados com os valores de referência de cada parâmetro. RDW: amplitude de distribuição dos eritrócitos; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média..... 77

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos de 30 mulheres antes e após o tratamento com o gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (F2) por via intravaginal durante 14 dias. Os dados representam a média \pm DP, sendo comparados com os valores de referência de cada parâmetro. γ GT: gama glutamil transferase; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase..... 79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA: Análise de variância

ATP: *Adenosine triphosphate*, em inglês

CCCP: Carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona

cm: Centímetros

CO₂: Dióxido de carbono

DMEM: *Dulbecc's modification of Eagle's medium*, em inglês

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic acid*, em inglês.

DP: Desvio padrão

DPPP: Difenil-1-pirenilfosfina

DTNB: Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)

EAC: Ehrlich ascites carcinoma, em inglês.

EROs: Espécies reativas de oxigênio.

h: Horas

HPV: *Human papillomavirus*, em inglês

HSIL: Lesão intraepitelial escamosa de alto grau, em português

IC₅₀: *Inhibitory concentration 50%* (Concentração capaz de reduzir 50% da densidade óptica das células tratadas em comparação com o controle)

IC₉₀: *Inhibitory concentration 90%* (Concentração capaz de reduzir 90% da densidade óptica das células tratadas em comparação com o controle)

IP: Iodeto de propídio

L: Litro

LSIL: Lesão intraepitelial escamosa de baixo grau, em português

kg: Quilogramas

MET: Microscopia eletrônica de transmissão

mg: Miligramas

M: Molar

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

mg: Miligramas

mm: Milímetros

nm: Nanômetros

NAC: *N*-acetilcisteína

NIC: Neoplasia intraepitelial cervical

PCR: Reação em cadeia da polimerase, em português

PBS: *Tampão fosfato de salina*, em inglês

pH: Potencial hidrogeniônico

RNA: *Ribonucleic acid*, em inglês

rpm: Rotações por minuto

SFB: Soro fetal bovino inativado.

TMRE: Tetrametilrodamina-etil-éster

µg: Microgramas

µL: Microlitros

µm: Micrometros

µM: Micromolar

$\Delta\Psi_m$: Potencial de membrana mitocondrial

°C: Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)	25
2.1.1	Papilomavírus humano (HPV) e o câncer cervical.....	29
2.1.2	Tratamento: das displasias cervicais até o câncer cervical.....	30
2.2	CÂNCER E AS PLANTAS MEDICINAIS	31
2.2.1	Gênero <i>Stryphnodendron</i>	31
2.2.2	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	32
2.2.2.1	Composição química.....	35
2.3	MORTE CELULAR	38
2.3.1	Processo de morte celular por apoptose, necrose ou autofagia	38
2.3.2	Estresse oxidativo <i>versus</i> morte celular.....	42
2.3.3	Polifenóis <i>versus</i> estresse oxidativo/ morte celular	43
2.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E SEGURANÇA: DOS ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS ATÉ OS ENSAIOS CLÍNICOS.....	44
3	OBJETIVOS.....	47
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	DESENHO EXPERIMENTAL	48
4.2	MATERIAL.....	49
4.3	PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDAS DA CASCA DE <i>Stryphnodendron adstringens</i>	49
4.4	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E O MECANISMO DE AÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDINAS (F2) EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL	49
4.4.1	Linhagens celulares e cultivo celular	49
4.4.2	Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT.....	50
4.4.3	Morfologia das células de câncer cervical.....	50
4.4.4	Ensaio da cura da ferida em células de câncer cervical.....	50
4.4.5	Microscopia eletrônica de transmissão de células de câncer cervical.....	51
4.4.6	Análise do tipo de morte celular pela dupla marcação com laranja de acridina e iodeto de propídio em células de câncer cervical.....	51

4.4.7	Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de câncer cervical	52
4.4.8	Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em células de câncer cervical	52
4.4.9	Nível de tióis reduzidos em células de câncer cervical	53
4.4.10	Potencial de membrana mitocondrial e integridade do DNA em células de câncer cervical	53
4.4.11	Níveis de ATP intracelular em células de câncer cervical	54
4.4.12	Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real em células de câncer cervical	54
4.4.13	Fragmentação do DNA em células de câncer cervical revelada pela eletroforese	55
4.4.14	Lipoperoxidação em células de câncer cervical	56
4.4.15	Integridade da membrana celular em células de câncer cervical	56
4.4.16	Análise estatística	56
4.5	ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vivo</i> DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDINAS (F2)	57
4.5.1	Animais	57
4.5.2	Manutenção das células de carcinoma ascítico de Ehrlich	57
4.5.3	Modelo murino de tumor sólido de Ehrlich	57
4.5.4	Lipoperoxidação em tumor sólido de Ehrlich	58
4.5.5	Análise estatística	58
4.6	ENSAIO CLÍNICO FASE I DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDINAS (F2)	58
4.6.1	Produção do gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas (F2)	58
4.6.2	Desenho do Ensaio Clínico Fase I	59
4.6.3	Seleção e tratamento	59
4.6.4	Exames médicos e laboratoriais	60
4.6.5	Análise estatística	60
5	RESULTADOS	61
5.1	FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDINAS (F2) REDUZIU A VIABILIDADE CELULAR, INDUZIU ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E INIBIU A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL	61
5.2	F2 INDUZIU ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL	63
5.3	ANÁLISE DO TIPO DE MORTE CELULAR PELA DUPLA MARCAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA E IODETO DE PROPÍDIO EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL	65

5.4	F2 INDUZIU AUMENTO NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DEPLEÇÃO NOS NÍVEIS DE TIÓIS REDUZIDOS EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL	67
5.5	F2 INDUZIU DESPOLARIZAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E REDUÇÃO NOS NÍVEIS DE ATP INTRACELULAR EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL	69
5.6	F2 INDUZIU ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DO RNAm DO FATOR PRÓ-APOPTÓTICO, ANTI-APOPTÓTICO E CASPASES EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL	71
5.7	F2 INDUZIU FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL	73
5.8	F2 INDUZIU LIPOPEROXIDAÇÃO E RUPTURA DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL	73
5.9	F2 APRESENTOU ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>in vivo</i> EM TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH.....	75
5.10	F2 MOSTROU-SE SEGURA E BEM TOLERADA NO ENSAIO CLÍNICO FASE I 75	
6	DISCUSSÃO.....	80
7	CONCLUSÃO	88
8	REFERÊNCIA	89
	ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	104
	ANEXO B – Certificado do Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP).....	105

1 INTRODUÇÃO

Dentre os membros da família *Papillomaviridae* há o papilomavírus humano (HPV), com destaque para o gênero *Alphapapilomavirus* em razão da sua importância clínica, o qual é classificado conforme a habilidade oncogênica em HPVs de baixo e de alto risco (BURD; DEAN, 2016; SCHIFFMAN et al., 2016). Os HPVs de alto risco apresentam maior potencial oncogênico e são representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59 (MITTAL; BANKS, 2017).

Mais de 99% dos casos de câncer cervical estão associados ao vírus HPV, sendo que os HPVs de alto risco HPV16 e HPV18 são responsáveis por 55% e 18% dos casos, respectivamente (JOHNSON et al., 2018; SERRANO et al., 2018). O câncer cervical é considerado o quarto câncer mais frequente em mulheres no mundo (SMALL et al., 2017; SERRANO et al., 2018). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCa), em 2013 foram registrados 5.430 casos fatais e, para 2018 a estimativa de novos casos de câncer cervical é de 16.340 (INCA, 2018a).

A vida de milhões de pessoas é interrompida por variados tipos de câncer, visto que em muitas situações os medicamentos disponíveis não atingem os efeitos terapêuticos esperados, seja por falta de atividade ou até por resistência tumoral ao tratamento (HOUSMAN et al., 2014; KUMAR et al., 2016). Neste sentido, os polifenóis naturais são intensamente estudados devido ao seu potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos, inclusive para o tratamento do câncer cervical (MOGA et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

Stryphonodendron adstringens (Mart.) Coville é popularmente conhecido como barbatimão (ALBUQUERQUE et al., 2007; GLASENAPP et al., 2014). Estudos já foram conduzidos para avaliar cientificamente as atividades biológicas de *S. adstringens*, os quais comprovaram a atividade cicatrizante, antiulcerativa, anti-inflamatória, antinociceptiva, antisséptica e antimicrobiana (LIMA et al., 2016; SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018).

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), as cascas secas de *S. adstringens* contêm polifenóis, sendo uma reconhecida e abundante fonte de taninos, como as proantocianidinas (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996a, 1996b, 1999; ISHIDA et al., 2006; SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018). Diversos trabalhos avaliam o efeito promissor dos polifenóis frente a linhagens de células tumorais (KAMPA et al., 2007; MOGA et al., 2016; LOSADA-ECHEBERRÍA et al., 2017; ALAM; ALMOYAD; HUQ, 2018). Da mesma forma, a avaliação da atividade anticâncer dos polifenóis classificados como taninos,

especificamente taninos condensados ou proantocianidinas é amplamente investigada em algumas espécies vegetais (NANDAKUMAR; SINGH; KATIYAR, 2008; ZHOU et al., 2016). Contudo, ainda há um amplo potencial inexplorado para a terapia do câncer em várias plantas ricas em proantocianidinas, como no caso de *S. adstringens* (CAI et al., 2017).

Os polifenóis são considerados antioxidantes naturais, contudo estudos mostram que os antioxidantes naturais também são capazes de atuar como pró-oxidantes (EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016). Desta forma, o tratamento com polifenóis capazes de induzir o estresse oxidativo é uma estratégia para a terapia do câncer (MILEO; MICCADEI, 2016; STEPANIC et al., 2015).

O estresse oxidativo resulta da perda de equilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e o sistema antioxidante endógeno da célula (SOSA et al., 2013). Os níveis de EROs intracelulares influenciam nas respostas celulares, de forma que baixos níveis são necessários para manter o crescimento e a proliferação celular. Já, níveis de EROs persistentemente elevados podem resultar em danos oxidativos (MOLONEY; COTTER, 2017).

Conforme a intensidade, o estresse oxidativo pode induzir a morte celular (FULDA et al., 2010). A apoptose é considerada um tipo de morte celular regulada, sendo dividida em vias intrínseca e extrínseca (SINHA et al., 2013). Na via intrínseca, distúrbios resultam na formação de poros na mitocôndria, mecanismo controlado pelos fatores pró-apoptóticos e anti-apoptóticos da família BCL-2 (SINHA et al., 2013). Desta forma, ocorre a ativação da caspase 3 e fragmentação do DNA, eventos característicos da apoptose (PROKHOROVA et al., 2015).

Os ensaios pré-clínicos pretendem avaliar a segurança e a eficácia com propósito de viabilizar a realização de pesquisas em seres humanos (GOLDIM, 2007). Em trabalhos prévios, a fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (**F2**) mostrou-se segura nos testes de genotoxicidade, toxicidade aguda e crônica em roedores (COSTA et al., 2010, 2013).

Em seres humanos, a avaliação da segurança toxicológica inicia-se com o Ensaio Clínico Fase I (GOLDIM, 2007). Conforme COSTA (2011), as formulações vaginais contendo 0,5% e 1,25% de **F2** foram seguras e bem toleradas, com base nos parâmetros avaliados.

Considerando a necessidade de alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer, em particular para o câncer cervical, e a relevante atividade anticâncer dos polifenóis, especialmente das proantocianidinas. O presente trabalho objetivou avaliar a atividade anticâncer *in vitro* e o mecanismo de ação da fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (**F2**) em células de câncer cervical, além da atividade antitumoral *in vivo* e, a segurança em seres humanos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PAPILOMAVÍRUS HUMANO (HPV)

O papilomavírus humano (HPV) é membro da família *Papillomaviridae*. Considerado um vírus espécie-específico, assim o HPV só é capaz de infectar humanos. Inclusive, a infecção tem tropismo para tecidos específicos do hospedeiro, como para o epitélio cutâneo ou mucosa (AKSOY; GOTTSCHALK; MENESES, 2017).

Os HPVs medem aproximadamente 50 a 60 nanômetros (nm) de diâmetro, não são envelopados e apresentam capsídeo com simetria icosaédrica. O material genético é constituído por uma dupla fita de DNA circular, com aproximadamente 8000 pares de bases nucleotídicas. O genoma do HPV é constituído basicamente por 3 regiões, divididas em região controladora longa LCR (do inglês *long control region*), região tardia L (do inglês *late*) e região precoce E (do inglês *early*), mostrado na Figura 1 (HARDEN; MUNGER, 2017; SPURGEON; LAMBERT, 2017; VIARISIO; GISSMANN; TOMMASINO, 2017; SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018).

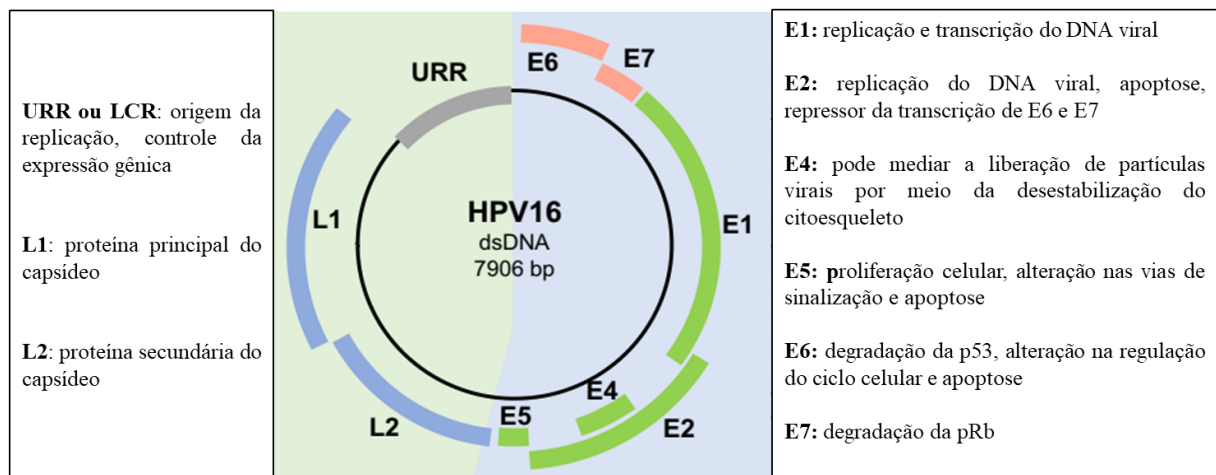


Figura 1. Representação do genoma viral do HPV16. Fonte: Adaptado de SANJOSÉ et al. (2018).

A LCR, também intitulada como região regulatória superior URR (do inglês *upstream regulatory region*), é uma região não codificante que controla a replicação e a pós-transcrição viral, contribuindo para a regulação da expressão viral (SCHIFFMAN et al., 2016; GRAHAM, 2017).

A região tardia (L) codifica as proteínas responsáveis pela formação do capsídeo viral, sendo divididas em proteína principal (L1) e proteína secundária (L2). O capsídeo viral é formado por 72 capsômeros pentaméricos, composto principalmente pela proteína L1. A

proteína L1 também é utilizada para organização filogenética e classificação do HPV nos diferentes papilomavírus, em razão da sua grande conservação (HARDEN; MUNGER, 2017).

A região precoce (E) codifica 6 proteínas, identificadas como E1, E2, E4, E5, E6 e E7. As proteínas E1 e E2 são fundamentais para o início da replicação viral, sendo que E2 também está relacionada com a regulação da expressão dos oncogenes virais E6 e E7. A proteína E4 está associada ao colapso no citoesqueleto durante o processo de liberação das partículas virais. A proteína E5 influencia na proliferação celular e na apoptose por cooperar com as oncoproteínas E6 e E7, além de alterar as vias de sinalização e a resposta do sistema imune (VENUTI et al., 2011; DIMAIO; PETTI, 2013; CRUZ-GREGORIO; MANZO-MERINO; LIZANO, 2018).

Já a expressão dos oncogenes E6 e E7 são essenciais para a transformação celular em razão da interação com as proteínas supressoras de tumor p53 e a proteína retinoblastoma (pRb), respectivamente. A oncoproteína E7 é capaz de interagir e inativar reguladores do ciclo celular, visto que ao fosforilar a pRb ocorre a liberação do fator de transcrição E2F-1, o qual reinicia o ciclo celular ao fazê-lo progredir da fase G1 para a fase S. Além disso, a oncoproteína E6 induz a ubiquitinação da p53, desta forma a p53 ubiquitinada fica susceptível à degradação proteossomal, reduzindo assim a ocorrência de apoptose nas células infectadas. Desta forma, a ação conjunta das oncoproteínas E6 e E7 permite a sobrevivência das células infectadas com o HPV (MITTAL; BANKS, 2017; VIARISIO; GISSMANN; TOMMASINO, 2017).

HPV tem tropismo por células basais, tanto do epitélio escamoso quanto mucosa, em decorrência da sua capacidade de multiplicação celular. Geralmente, HPV penetra no epitélio escamoso por meio de micro-abrasões, forma de infecção observada no epitélio cérvico-vaginal (Figura 2). Ou ainda, atinge a monocamada de células basais que constituem a junção escamo-colunar do cérvix vaginal (HARDEN; MUNGER, 2017).

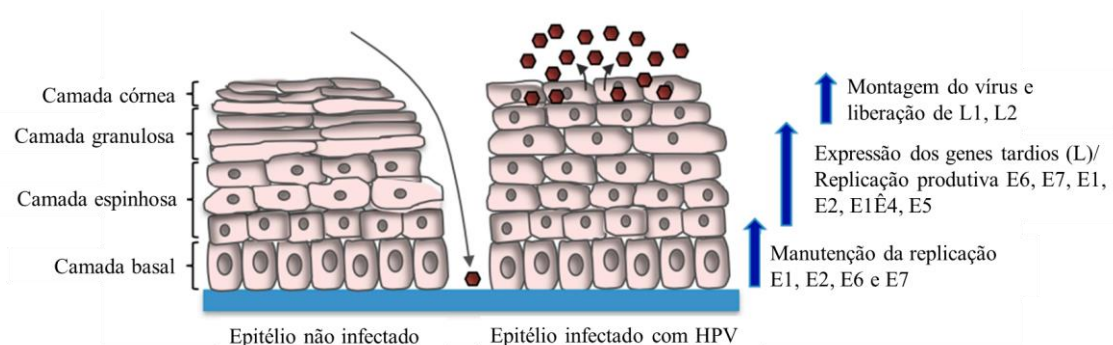


Figura 2. Ciclo de vida do papilomavírus humano (HPV). Fonte: Adaptado de MOODY (2017).

Após penetrar na célula, o DNA do HPV permanece na forma episomal, ou seja, na forma circular. Além disso, mantém uma baixa taxa de multiplicação viral, de forma que há cerca de 50 a 100 cópias virais por célula. Conforme ocorre a diferenciação celular, os genes E1, E2, E6, E7, L1 e L2 são sintetizados e ocorre a montagem da partícula viral nas últimas camadas do epitélio, isso constitui a fase produtiva da multiplicação viral; sendo que ocorre uma reinfeção cíclica das células não infectadas com as partículas virais (MOODY, 2017).

Contudo, a infecção persistente com HPV pode resultar em uma eventual integração do genoma viral com o DNA celular, constituindo assim a fase não produtiva, onde não se completa o ciclo de vida normal do HPV, portanto não há produção de partículas virais. Contudo, há uma intensa expressão das oncoproteínas E6 e E7 em razão da não inserção ou degradação do gene E2 durante a integração do genoma viral (HARDEN; MUNGER, 2017; OYERVIDES-MUÑOZ et al., 2018).

Desta forma, as células infectadas pelo HPV perdem o controle da divisão celular, ocasionando alterações na maturação e na arquitetura típica do tecido, sendo que, tais alterações podem ser identificadas por meio do exame de Papanicolau. A evolução da infecção pelo HPV pode resultar em displasias cervicais que são divididas em lesões intraepiteliais escamosa de baixo grau (LSIL) e lesões intraepiteliais escamosa de alto grau (HSIL) (BURD; DEAN, 2016).

A LSIL também é identificada como neoplasia intraepitelial cervical grau I (NIC I), geralmente relacionada com a forma episomal do HPV, onde são encontradas células com núcleo atípico, por exemplo; sendo possível progredir para HSIL, também denominadas como neoplasia intraepitelial cervicais grau II e III (NICs II e III), onde o HPV pode encontrar-se na forma episomal ou integrado ao DNA celular. Nesta classificação, as células apresentam-se isoladas ou em pequenos grupos, além de aumentar a relação núcleo/citoplasma e multinucleação (Figura 3) (NAYAR; WILBUR, 2015; HARDEN; MUNGER, 2017).

Assim, a evolução progressiva da NIC I, NIC II e NIC III pode culminar no câncer *in situ* e até no câncer invasivo, dependendo de qual genoma viral integrou-se ao genoma celular (Figura 3) (GRAHAM, 2017). Entretanto, há indícios de que o câncer cervical pode evoluir diretamente de lesões do tipo NIC I, ou ainda o epitélio infectado pelo HPV pode rapidamente apresentar alterações típicas de lesões do tipo NIC III (NEDJAI et al., 2018).

Além disso, nem todos os casos de câncer cervical estão associados com a forma integrada do vírus, visto que em cerca de 15% dos casos de câncer o HPV se encontra na forma episomal, mas também pode ser encontrado em ambas as formas dentro da célula infectada (GROVES; COLEMAN, 2015; MCBRIDE; WARBURTON, 2017).

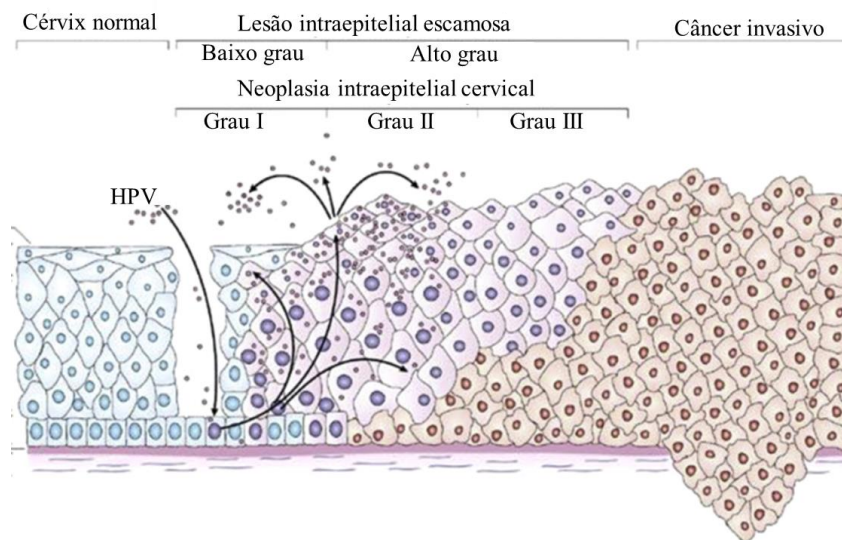


Figura 3. Progressão da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e associação com lesões intraepiteliais escamosas em células infectadas e com o câncer invasivo. Fonte: Adaptado de WOODMAN; COLLINS; YOUNG (2007).

Há mais de 200 genótipos do HPV identificados até o momento, sendo agrupados em 5 diferentes gêneros, conforme a estrutura do genoma viral e o tropismo para os diferentes tecidos epiteliais humanos, chamados de *Alpha-*, *Nu-*, *Mu-*, *Beta-* e *Gamapapilomavírus* (SANJOSÉ; BROTONS; PAVÓN, 2018).

O gênero *Alphapapilomavírus* possui tropismo pelo epitélio cutâneo e mucosa (BURD; DEAN, 2016). Neste gênero concentram-se os HPVs com maior importância clínica, sendo classificados conforme a habilidade oncogênica em HPVs de baixo risco e HPVs de alto risco, tendo este último o maior potencial oncogênico (BURD; DEAN, 2016; SCHIFFMAN et al., 2016).

Os HPVs de baixo risco oncogênico são representados pelos tipos 6, 11, 40, 42, 43, 54, 61, 70, 72 e 81. Geralmente associados a quadros de verrugas na região anogenital, mas também podem causar lesões intraepiteliais escamosa de baixo grau (LSIL). Cerca de 90% dos casos de lesões anogenitais ou condilomas acuminados são causados pelos HPVs 6 e 11 (SERRANO et al., 2018).

Os HPVs de alto risco são representados pelos tipos 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58 e 59, conforme a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (MITTAL; BANKS, 2017). Geralmente estão associados à ocorrência de lesões intraepiteliais escamosa de alto grau (HSIL) que podem evoluir para o câncer cervical. Além disso, também podem induzir ao câncer anal, vulvar, vaginal, peniano, de cabeça e de pescoço (VIARISIO; GISSMANN; TOMMASINO, 2017).

Os HPV's 16 e 18 são responsáveis por grande parte dos casos de câncer cervical (GRAHAM, 2017; SERRANO et al., 2018). Ambos HPV's estão associados a infecções persistentes e integração ao genoma celular, com considerável produção das oncoproteínas E6 e E7. Assim, há alterações no processo apoptótico e na proliferação resultando na transformação celular (VIARISIO; GISSMANN; TOMMASINO, 2017).

A integração do genoma do HPV pode transformar as células a ponto de imortalizá-las e possibilitar seu crescimento em condições artificiais, ou seja, *in vitro*. A linhagem celular HeLa possui de 10 a 50 cópias do HPV18 integrado ao genoma celular, sendo originária de um adenocarcinoma. Já a linhagem celular SiHa apresenta 1-2 cópias do HPV16 integrado ao genoma celular, sendo oriunda de um carcinoma escamoso grau II (DIAO et al., 2015). Por outro lado, a linhagem celular C33A não possui o genoma do vírus HPV integrado ao seu DNA, sua imortalização decorre de uma mutação na p53 (DING et al., 2007).

2.1.1 Papilomavírus humano (HPV) e o câncer cervical

Aproximadamente 15-20% dos casos de cânceres identificados no mundo estão relacionados com causas virais, podendo estar atrelado a infecções pelo papilomavírus humano (HPV) de alto risco, vírus Epstein-Barr (EBV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus linfotrófico da célula T humana (HTLV-1), herpesvírus associado ao Sarcoma de Kaposi (KSHV) e o poliomavírus das células de Merkel (MCV), por exemplo (SOTO; SONG; MCLAUGHLIN-DRUBIN, 2017).

A transmissão do HPV é por contato sexual, sendo a doença sexualmente transmissível (DST) mais prevalente no mundo dentre as infecções virais (BODA et al., 2018). Contudo, em raras situações pode ocorrer a transmissão materno-fetal durante o parto. Grande parte das pessoas sexualmente ativas entrarão em contato com o HPV, mesmo que não apresentem verrugas genitais ou displasias cervicais ao longo da vida (WORKOWSKI; BOLAN, 2015).

Mais de 99% dos casos de câncer cervical estão associados ao HPV, e como mencionado anteriormente os HPV's de alto risco HPV16 e HPV18 são responsáveis por 55% e 18% dos casos, respectivamente (JOHNSON et al., 2018; SERRANO et al., 2018). O câncer cervical é considerado o quarto câncer mais frequente em mulheres no mundo. Além disso, também é o quarto câncer mais fatal no mundo. Estima-se a ocorrência de mais de 500.000 novos casos anualmente com cerca de 270.000 mortes a nível mundial (SMALL et al., 2017; SERRANO et al., 2018).

Grande parte dos casos de câncer cervical diagnosticados no mundo, cerca de 84%, encontram-se em regiões menos desenvolvidas. A Ásia concentra uma parcela significativa da porcentagem de novos casos e mortes, seguido pela África e pelas Américas (SERRANO et al., 2018).

Em 2016, a incidência do câncer cervical no Brasil foi estimada em 15,85/100.000 mulheres, o que representa o terceiro câncer mais incidente nas mulheres. Entretanto, a incidência varia conforme a região geográfica, sendo maior na região Norte com 23,97/100.000 mulheres e menor na região Sudeste, com cerca de 11,30/100.000 mulheres (COLPANI et al., 2016; ALMEIDA et al., 2017).

No Brasil, a mortalidade do câncer cervical em 2014 foi de 4,88/100.000 mulheres, representando o quarto câncer mais letal. Da mesma forma, houve variação na mortalidade dentre as diferentes regiões do Brasil, e a região Norte novamente desponta com 11,75/100.000 mulheres (ALMEIDA et al., 2017). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCa), em 2013 foram registrados 5.430 casos fatais e, para 2018 a estimativa de novos casos de câncer cervical é de 16.340 (INCA, 2018a).

2.1.2 Tratamento: das displasias cervicais até o câncer cervical

O número de casos de câncer cervical poderia ser menor se houvesse um adequado diagnóstico, tratamento e acompanhamento das displasias cervicais (CASTLE et al., 2017). As lesões do tipo LSIL são transitórias e em cerca de 90% dos casos regredem espontaneamente dentro de 2 anos (SCHIFFMAN; WENTZENSEN, 2013). Contudo, aproximadamente 10% das lesões do tipo LSIL progridem para HSIL dentro de 2 anos (QUINT et al., 2013).

Geralmente, as lesões HSIL são tratadas por meio de métodos excisionais ou por métodos ablativos. No primeiro, a lesão é removida por meio de conização com bisturi ou alta frequência, por exemplo. Já nos métodos ablativos a lesão é destruída *in situ* por meio da crioterapia, eletrocoagulação ou termocoagulação, por exemplo (CASTLE et al., 2017).

Além disso, a terapia fotodinâmica e formulações tópicas com fármacos capazes de modificar a resposta imune, como o imiquinod, podem ser alternativas para o tratamento das displasias cervicais (KOENEMAN et al., 2016; PARK; PARK, 2016).

Já as lesões do tipo NIC III podem progredir para o câncer cervical invasivo em 12% a 40% dos casos, e um dos principais fatores para a progressão é a infecção persistente com os HPVs de alto risco (BEKOS et al., 2018). Entretanto, outros fatores também podem influenciar como, multiparidade, uso prolongado de contraceptivos hormonais, fumo e infecção

concomitante com microorganismos sexualmente transmissíveis (SCHIFFMAN et al., 2016; BODA et al., 2018).

O câncer cervical é classificado por meio de parâmetros clínicos, de forma que o estadiamento tumoral varia desde o “Estágio 0” caracterizado pelo carcinoma *in situ* até o “Estágio IVb” quando há metástase para órgãos distantes, de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FREEMAN et al., 2012).

O tratamento do câncer cervical depende do estadiamento da doença e de fatores pessoais, como idade e desejo de maternidade (INCA, 2018b). Sendo que, a terapia pode ser por meio da remoção cirúrgica parcial ou total da região afetada, com ou sem uso de radioterapia. Além disso, é possível a associação com a quimioterapia, geralmente realizada com cisplatina, mas outros quimioterápicos também podem ser utilizados, como o paclitaxel, o topotecano e a gemcitabina (SCHIFFMAN et al., 2016; TSUDA; WATARI; USHIJIMA, 2016; WU; JERONIMO; FELDMAN, 2017; INCA, 2018b).

2.2 CÂNCER E AS PLANTAS MEDICINAIS

Globalmente, milhões de vidas são interrompidas pelos mais diversos tipos de câncer. Assim, a pesquisa por novas formas de prevenção e tratamento do câncer é imprescindível e urgente (KUMAR et al., 2016).

As plantas medicinais são fonte de diversos medicamentos utilizados para o tratamento do câncer, como por exemplo a vincristina e a vimblastina originários da *Catharanthus roseus* ou *Vinca rosea*; a podofilotoxina originária da *Podophylum peltatum*; o taxol originário do *Taxus brevifolia* e, a camptotecina isolada da *Camptotheca acuminata* (JUÁREZ, 2014).

Contudo, em muitas situações os medicamentos disponíveis não atingem os efeitos terapêuticos esperados, seja por falta de atividade ou até por resistência tumoral ao tratamento (HOUSMAN et al., 2014). Em decorrência destas situações deve-se buscar novos candidatos para a terapia do câncer. Neste sentido, os polifenóis naturais são intensamente estudados, em razão do seu potencial para o desenvolvimento de medicamentos para o tratamento do câncer, inclusive para o tratamento do câncer cervical (MOGA et al., 2016; ZHOU et al., 2016).

2.2.1 Gênero *Stryphnodendron*

O gênero *Stryphnodendron* pertence à família Fabaceae, subfamília Mimosoideae, ordem Fabales; sendo composto por cerca de 42 espécies, as quais se distribuem pela América

Central e América do Sul, com destaque para o território brasileiro (OCCHIONI, 1990; LOPES et al., 2009).

As espécies do gênero *Stryphnodendron* são adaptadas ao clima tropical e subtropical. Assim, podem ser encontradas em diversos tipos de vegetação típicas do Brasil, contudo concentram-se no Cerrado e na Amazônia, onde pode-se encontrar espécies anãs prostradas com aproximadamente 50 centímetros de altura ou até árvores de grande porte com 35 a 40 metros de altura (OCCHIONI, 1990).

A atividade farmacológica das cascas das espécies de *Stryphnodendron* é atribuída a presença de altas concentrações de taninos, os quais conferem o característico sabor adstringente, decorrente da precipitação de proteínas salivares (SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018).

2.2.2 *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville

S. adstringens (Mart.) Coville é popularmente conhecido como barbatimão, barbatimão-verdadeiro, barba-de-timão, casca-da-virgindade, faveira e barbatimão-branco. Os povos indígenas chamavam-no de *Ibatimó*, que significa árvore que aperta, devido as suas propriedades adstringentes (PANIZZA et al., 1988; ALBUQUERQUE et al., 2007; GLASENAPP et al., 2014).

Além disso, a espécie *S. adstringens* possui como sinônimos: *Acacia adstringens* Mart., *Mimosa barbadetiman* Vell., *Mimosa virginalis* Arruda, *Stryphnodendron barbadetiman* (Vell.) Mart., e *Stryphnodendron barbatimao* Mart. Outras espécies são erroneamente intituladas na literatura como barbatimão, mas são reconhecidas como falso-barbatimão, sendo elas: *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes, *Pithecellobium cochliocarpum* (Gomez) Macbr., e *Dimorphandra mollis* Benth. (OCCHIONI, 1990; SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018).

A distribuição geográfica desta espécie ocorre nas cinco regiões do país, concentrando-se nos estados de Tocantins, Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (GLASENAPP et al., 2014).

S. adstringens caracteriza-se por ser uma planta arbórea de porte pequeno, tortuosa, com ramos curtos e grossos. As cascas são recuadas no sentido transversal, com coloração pardo-esverdeada na superfície externa e pardo-avermelhada na superfície interna. A árvore pode atingir de quatro a nove metros de altura, mas seu crescimento é lento. As folhas são alternas, grandes, duplicado-pinadas com aproximadamente 30 cm de comprimento. As inflorescências

são do tipo espigas delgadas, enquanto o fruto é do tipo legume alongado (Figura 4) (SANCHES et al., 2007; SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018).



Figura 4. (A) *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville. (B) Folíolos e cascas picadas de *S. adstringens*. Fonte: Acervo pessoal.

Baseando-se na etnofarmacologia, diversos estudos já foram conduzidos para avaliar cientificamente as atividades biológicas de *S. adstringens*. Assim, trabalhos já comprovaram a atividade do barbatimão como cicatrizante, antiulcerativo, anti-inflamatório, antinociceptivo, antisséptico, antimicrobiano e antiprotozoário (LIMA et al., 2016; SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018). Assim, há um notável interesse do Ministério da Saúde na integração de *S. adstringens* às políticas públicas de saúde, demonstrado por meio da sua inclusão na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse SUS (RENISUS, 2018).

O uso etnofarmacológico mais comum das cascas do barbatimão é como cicatrizante. Estudos mostram que a fração acetato de etila 1% obtida da casca do barbatimão foi capaz de cicatrizar feridas excisionais na pele de ratos em até 10 dias de tratamento tópico (HERNANDES et al., 2010). Da mesma forma, o extrato aquoso 10% das cascas de barbatimão cicatrizou completamente as feridas de ratos tratados durante 14 dias (COELHO et al., 2010).

Outro estudo avaliou o tratamento de pacientes com úlcera de decúbito, onde 100% das lesões cicatrizaram após tratamento com a pomada contendo 3% do fitocomplexo fenólico do barbatimão (MINATEL et al., 2010). No mercado nacional, já existe um medicamento registrado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) produzido a partir do barbatimão com indicação para cicatrização de diversos tipos de lesões cutâneas, sendo comercializado como FITOSCAR® e produzido pela empresa Apsen Farmacêutica (<http://www.apsen.com.br>).

O extrato bruto de *S. adstringens* e suas frações também promoveram redução nas lesões na mucosa gástrica induzidas por estresse agudo ou etanol-acidificado, quando comparado com o medicamento de referência, cimetidina (AUDI et al., 1999). Da mesma

forma, Martins et al. (2002) observaram que o extrato de barbatimão inibiu a ulceração gástrica em ratos.

A atividade anti-inflamatória do extrato da casca de barbatimão foi observada em modelos agudos e crônicos de inflamação em ratos, sendo tão efetiva na inibição da inflamação quando a fenilbutazona, anti-inflamatório não esteroide de referência (LIMA; MARTINS; DE SOUZA, 1998). Além disso, extratos de *S. adstringens* apresentaram atividade inibitória *in vitro* do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) e efeito anti-inflamatório em modelo agudo de artrite (HENRIQUES et al., 2016).

Diversos extratos e frações de *S. adstringens* apresentam notável atividade antimicrobiana. Na literatura, a atividade antibacteriana já está descrita contra *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sobrinus*, por exemplo (AUDI et al., 2004; SOUZA et al., 2007a, 2007b; SOARES et al., 2008; GOMES et al., 2009; PEREIRA et al., 2011).

Da mesma forma, o *S. adstringens* apresentou relevante atividade antifúngica já descrita na literatura. ISHIDA et al. (2006) avaliaram o extrato bruto e frações da casca de barbatimão em cepas de referência e/ou isolados clínicos de *Candida albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Candida* sp. e, obtiveram resultados de inibição acima de 7,8 mg/L, os quais são comparáveis ao da nistatina (medicamento de referência). Sendo a atividade atribuída aos taninos condensados, responsáveis pela perda da integridade da parede celular das leveduras. Além disso, as frações das cascas de *S. adstringens* também inibiram a proliferação das células planctônicas e do biofilme de *C. albicans* e de espécies não-*albicans* (incluindo isolados resistentes ao fluconazol) (LUIZ et al., 2015; FREITAS et al., 2018).

Desordens gênito-urinárias também integram o grupo dos usos etnofarmacológicos mais comuns para as cascas do barbatimão, principalmente nos casos de candidíase vulvovaginal (SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018). Baseando-se no uso popular, foi avaliada a atividade *in vivo* da fração aquosa das cascas de *S. adstringens* em modelo murino de candidíase vaginal, e o tratamento foi capaz de controlar eficientemente a infecção vaginal causada por *C. albicans* e *C. glabrata* (FREITAS et al., 2018).

Há relatos de outras atividades antifúngicas do barbatimão em *Cryptococcus neoformans*, *Trychophyton rubrum* e *Pythium insidiosum*, por exemplo (ISHIDA et al., 2009; MELO E SILVA; DE PAULA; ESPINDOLA, 2009; TROLEZI et al., 2017). A atividade antiprotozoário de *S. adstringens* já foi mostrada em *Herpetomonas samuelpessoai*, em

Trypanosoma cruzi, e em *Leishmania amazonensis* (HERZOG-SOARES; ALVES, 2002; HOLETZ et al., 2002, 2005; LUIZE et al., 2005; HERZOG-SOARES et al., 2006).

Em 2015, foi publicada a patente “*Pharmaceutical composition using Stryphnodendron extracts for treating HPV infection*” sob número de publicação US9023405 B2. Na qual citava inicialmente diversas espécies do gênero *Stryphnodendron*, além *Pithecellobium avaremotemo* e *Abarema cochliocarpos*. Contudo, todas as atividades biológicas contempladas no registro foram relacionadas à *A. cochliocarpos*, inclusive a atividade nas lesões do tipo condiloma acuminado provocadas pelo HPV (LINS NETO et al., 2015).

Diversos trabalhos avaliam o efeito promissor de diferentes tipos de polifenóis frente a linhagens de células tumorais (KAMPA et al., 2007; MOGA et al., 2016; LOSADA-ECHEBERRÍA et al., 2017; ALAM; ALMOYAD; HUQ, 2018). Da mesma forma, a avaliação da atividade anticâncer de polifenóis classificados como taninos, especificamente taninos condensados ou proantocianidinas é amplamente investigada em algumas espécies vegetais, como nas sementes de *Vitis vinifera* (NANDAKUMAR; SINGH; KATIYAR, 2008; ZHOU et al., 2016). Contudo, ainda há um amplo potencial inexplorado para a terapia do câncer em várias plantas ricas em proantocianidinas, como no caso de *S. adstringens* (CAI et al., 2017).

Nesta busca, SABINO et al. (2018) investigaram a ação da fração aquosa das folhas de *S. adstringens* em linhagens celulares de câncer de mama humano, especificamente nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-435. Houve redução na viabilidade celular, alterações na morfologia celular, fragmentação do DNA, além da indução de apoptose e autofagia nas células tratadas.

2.2.2.1 Composição química

Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), as cascas secas de *S. adstringens* contêm cerca de 8% de taninos. Já os extratos das cascas podem apresentar de 25 a 39% de taninos (SANTOS et al., 2002; MENDONÇA et al., 2012). De forma que a concentração de taninos pode ser maior dependendo de fatores como as condições climáticas, local e época de coleta da planta e até da metodologia de extração adotada (REZENDE et al., 2015; YANG et al., 2018a).

Compostos fenólicos caracterizam-se por apresentar pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxila ligados, sendo que os polifenóis possuem múltiplos anéis fenólicos em sua estrutura (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD, 2006). Os polifenóis compreendem um dos mais diversificados e numerosos grupos de substâncias, com mais de 8000 estruturas fenólicas já publicadas (ZHANG et al., 2015).

Os polifenóis são uma importante e abrangente categoria de metabólitos secundários. Geralmente, os metabólitos secundários não estão associados com processos vitais da planta mas sim, com a proteção contra o ataque de patógenos (fungos, bactérias, vírus), herbívoros e mudanças provocadas pela radiação, variação de temperatura, estresse hídrico ou nutricional (OLIVOTO et al., 2017; WINK, 2018).

Os taninos são metabólitos secundários de natureza polifenólica, solúveis em água, com peso molecular entre 500 e 3.000 Daltons. Além disso, apresentam uma grande quantidade de hidroxilas ligadas aos anéis fenólicos que conferem a capacidade de precipitar alguns alcaloides, proteínas e gelatina. Característica responsável pela adstringência dos taninos, em razão das ligações entre os grupos hidroxila e as proteínas salivares (SMERIGLIO et al., 2017).

Da mesma forma, os taninos também são utilizados comercialmente para precipitar proteínas com objetivo de transformar pele em couro, aumentando a resistência do tecido ao apodrecimento. Característica explorada por muitos anos, sendo inclusive responsável pela origem da denominação “tanino”, proveniente da palavra francesa “tan” (cascas de carvalho usadas tradicionalmente para produzir o couro) que é derivado do termo celta “tann-”, que significa carvalho (QUIDEAU et al., 2011).

Os taninos não são um grupo químico unificado, visto que apresentam uma ampla gama de estruturas químicas e pesos moleculares (ZHANG et al., 2015). Conforme a estrutura química e as propriedades, os taninos podem ser distribuídos em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados (MELONE et al., 2013).

Os taninos hidrolisáveis possuem um grupo poliol central (geralmente D-glucose), onde os grupos hidroxila são substituídos por grupos fenólicos ligados a moléculas de ácido gálico ou ácido elágico, sendo classificados como galotaninos ou elagiotaninos, respectivamente. Uma peculiaridade destas moléculas é de serem hidrolisadas por ácidos e bases fracas, enzimas e água quente (SMERIGLIO et al., 2017).

Os taninos condensados, também conhecidos como proantocianidinas, caracterizam-se por serem formados por polímeros de flavan-3-ol ou ainda de flavan-3,4-diol. Tais monômeros de proantocianidinas, também chamados de catequina ou epicatequina, ligam-se por ligações carbono-carbono, principalmente do tipo C4 → C8 ou C4 → C6 no caso das proantocianidinas do tipo B. Já as proantocianidinas do tipo A, apresentam ligações adicionais de carbono-carbono do tipo C2 → C7 (SMERIGLIO et al., 2017).

As proantocianidinas são polímeros complexos que se distinguem por suas ligações carbono-carbono não serem susceptíveis a hidrólise (CROZIER; JAGANATH; CLIFFORD,

2006; ASHOK; UPADHYAYA, 2012). Contudo, quando as proantocianidinas sofrem clivagem catalisada por ácidos, formam-se pigmentos avermelhados, típicos da classe das antocianinas (TSAO, 2010).

Conforme o número de hidroxilas presente nos anéis fenólicos, as proantocianidinas podem ser classificadas, por exemplo em: procianidinas, prodelfinidinas, prorobinetinidinas, properlargonidinas, profisetinidinas, probinetinidinas, proguibourinidinas, proteracacianidinas, promelacacianidina e prodistenidina (LOPES et al., 2009; NEILSON; O'KEEFE; BOLLING, 2016).

As proantocianidinas são abundantes na dieta, estando presentes em alimentos e bebidas, como frutas (uva, maçã, pêsego, pera, amora, morango, framboesa, etc), castanhas, cereais, chocolate, cacau, chá, vinho e cerveja, por exemplo (NEILSON; O'KEEFE; BOLLING, 2016).

Adicionalmente, as cascas de *S. adstringens* são uma reconhecida e abundante fonte de proantocianidinas (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996a, 1996b, 1999; SANTOS et al., 2002; SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018). Conforme ISHIDA et al. (2006), na fração aquosa das cascas de *S. adstringens* há polímeros de proantocianidinas, constituídos por unidades de prodelfinidinas e prorobinetinidinas com cerca de 2114 Daltons, no qual provavelmente predominam as ligações do tipo C4 → C8 (Figura 5).

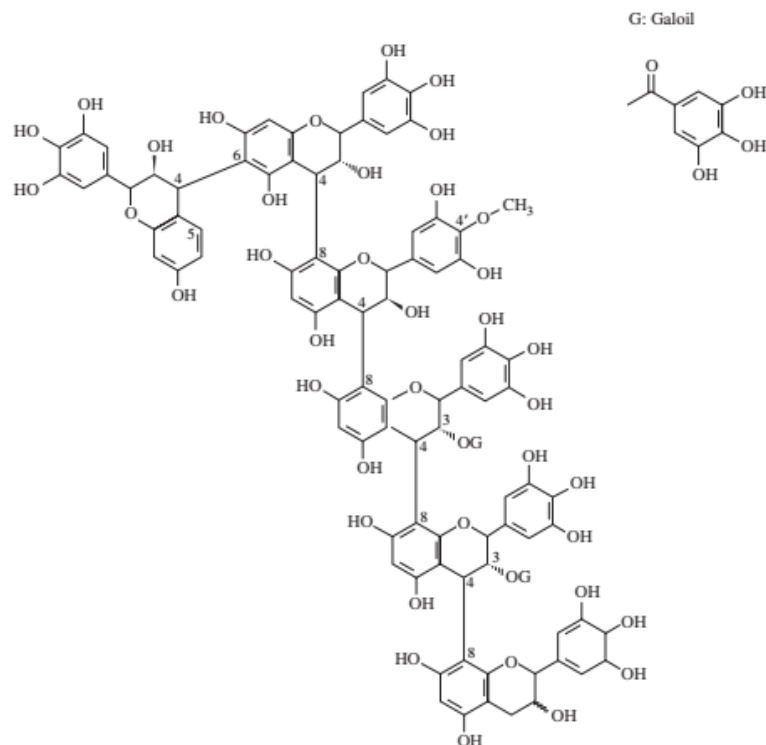


Figura 5. Provável estrutura química dos polímeros de proantocianidinas presentes na fração aquosa de *S. adstringens*. Fonte: ISHIDA et al. (2006)

2.3 MORTE CELULAR

A morte celular regulada baseia-se na existência de uma maquinaria molecular capaz de acelerar ou retardar o processo de morte, sendo que também pode ser modulada por intervenções farmacológicas ou genéticas. A morte celular regulada ocorre em duas situações opostas, a primeira transcorre na ausência de perturbações exógenas e, objetiva a renovação fisiológica de tecidos. Situação geralmente denominada como morte celular programada. Na segunda forma de atuação há influência de intensas e/ou prolongadas perturbações intracelulares ou extracelulares, que impedem as respostas adaptativas capazes de modular o estresse e, assim restaurar a homeostase celular (GALLUZZI et al., 2018).

A morte celular é frequentemente classificada baseando-se nas alterações morfológicas da célula em três formas principais. A primeira forma é a morte celular tipo I ou apoptose, onde a célula apresenta encolhimento citoplasmático, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, “*blebs*” de membrana, culminando na formação de corpos apoptóticos. A segunda forma é a morte celular do tipo II ou autofagia, na qual há uma intensa vacuolização citoplasmática. E, a última forma é a morte celular do tipo III ou necrose, que se caracteriza pela perda da integridade da membrana celular, resultando no extravasamento do conteúdo citoplasmático (GALLUZZI et al., 2007).

Contudo, GALLUZZI et al. (2018) propõem que a classificação de morte celular seja atualizada, passando a considerar principalmente os aspectos moleculares que modulam a iniciação, execução e propagação da morte celular, associado a relevância fisiopatológica de cada tipo de morte celular. Desta forma, as principais classificações de morte celular regulada são: (1) apoptose por via intrínseca; (2) apoptose por via extrínseca; (3) necrose direcionada pela permeabilização mitocondrial; (4) necroptose; (5) ferroptose; (6) piroptose; (7) partanatos; (8) entose; (9) NETose; (10) morte celular dependente de lisossomos; (11) morte celular dependente de autofagia e (12) morte celular imunogênica.

2.3.1 Processo de morte celular por apoptose, necrose ou autofagia

Em diversos trabalhos, a apoptose é considerada como sinônimo de morte celular programada, contudo esta denominação não é adequada. Devido ao fato da necrose também poder ser regulada por vias de sinalização, sendo possível que ocorra a morte celular programada por necrose (GALLUZZI et al., 2007). Conforme o Comitê de Nomenclatura sobre Morte Celular de 2018, a apoptose é classificada como uma forma de morte celular regulada (GALLUZZI et al., 2018).

A apoptose é influenciada diretamente pelas cisteíno-proteases ou caspases, especificamente pelas caspases iniciadoras 8, 9 e 10 e, pelas caspases executoras ou efetoras 3, 6 e 7 (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). A apoptose divide-se em duas vias, sendo elas: via extrínseca ou mediada por receptor de morte e, via intrínseca ou mediada pela mitocôndria (SINHA et al., 2013).

Na via extrínseca de morte celular, há ativação dos receptores de morte presentes na membrana celular, que incluem a superfamília de receptores de Fatores de Necrose Tumoral (TNF-R1, TRAILR1 e TRAILR2), além dos receptores de morte FAS (CD95 ou APO-1), por exemplo. Após a ligação do ligante no receptor de morte ocorre o recrutamento de proteínas adaptadoras, como a FADD. Ao ligar-se, a FADD libera um domínio de morte (DD) que recruta pró-caspases. O complexo formado promove a ativação das caspases iniciadoras 8 ou 10, que por sua vez ativam as caspases efetoras 3, 6 e 7 (Figura 6) (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

A descrição acima refere-se a apoptose via extrínseca de “células tipo I”, a qual geralmente ocorre em células do timo e linfócitos maduro. Contudo, há um outro caminho dentro da via extrínseca da apoptose, denominado de “células tipo II”. No qual a caspase 8 cliva o fator pró-apoptótico Bid para sua forma truncada tBid, que é capaz de permeabilizar a membrana externa da mitocôndria. Sendo geralmente identificado nos hepatócitos, células pancreáticas beta e na maioria das células tumorais (Figura 6) (GALLUZZI et al., 2018).

Na via intrínseca, a apoptose é mediada pela mitocôndria (Figura 6). De forma que, indutores estimulam distúrbios na mitocôndria que resultam na formação de poros, mecanismo controlado pela família BCL-2. A família BCL-2 é composta pelos fatores pró-apoptóticos Bax, Bak, Bok, Bid, Bim, Bik, Bad, Bmf, Hrk, Noxa, Puma, Blk, etc. e pelos fatores anti-apoptóticos BCL-2, BCL-w, A1, MCL-1, etc (SINHA et al., 2013). Assim, a formação de poros na membrana externa da mitocôndria decorre principalmente, do desequilíbrio entre os fatores pró-apoptóticos Bax e Bak e o fator anti-apoptótico BCL-2. Desta forma, fatores apoptogênicos são liberados, como o citocromo c, o qual liga-se ao fator apoptótico de ativação de protease 1 (Apaf-1) e a pró-caspase 9, formando o complexo denominado apoptossomo. Desta forma, o apoptossomo é responsável pela ativação da caspase efetora 3. Além disso, também é liberado no citoplasma a proteína Diablo/Smac e HTRA2/Omi que inativam os inibidores da apoptose (IAPs) (PROKHOROVA et al., 2015; REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016).

A atividade catalítica das caspases efetoras 3, 6, e 7 é a responsável pelas alterações morfológicas e bioquímicas relacionadas com a apoptose, como a fragmentação do DNA,

exposição da fosfatidilserina e a formação de corpos apoptóticos. Sendo que a ativação da caspase 3 favorece a fragmentação do DNA por meio da inativação proteolítica da subunidade alfa do fator de fragmentação do DNA (ICAD), e consequente ativação catalítica do CAD (NAGATA, 2005; GALLUZZI et al., 2018).

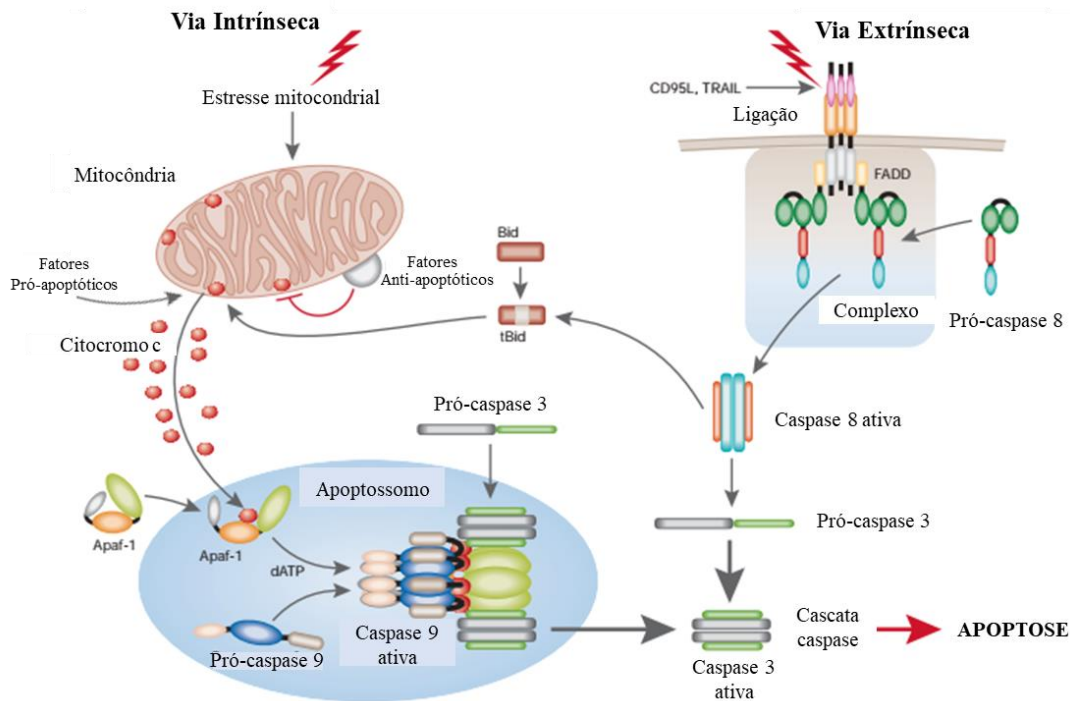


Figura 6. Esquema das vias intrínseca e extrínseca de ativação da morte celular por apoptose. Fonte: Adaptado de MACFARLANE; WILLIAMS (2004).

A necrose caracteriza-se principalmente pela perda da integridade da membrana celular, além de aumento do volume celular, inchaço das organelas e condensação moderada da cromatina (GALLUZZI et al., 2007). Por muito tempo foi considerada somente como um modo de morte acidental, mas estudos demonstram que há regulação por vias de sinalização, sendo denominadas como necrose direcionada pela permeabilização mitocondrial, necroptose, partanatos, ferroptose e piroptose (GALLUZZI; BRAVO-SAN PEDRO; KROEMER, 2014).

A necrose direcionada pela permeabilização mitocondrial geralmente decorre de um intenso estresse oxidativo e acúmulo de cálcio intracelular. De forma que ocorre uma abrupta permeabilização da membrana interna da mitocôndria, resultando em uma rápida despolarização do potencial de membrana mitocondrial e em uma ruptura osmótica da membrana interna e externa da mitocôndria. O mecanismo molecular desta morte ainda está sob intensa investigação, mas resultados indicam a influência da permeabilidade do complexo de poros de transição, que se localizam nas junções da membrana interna e externa da

mitocôndria. Sendo um processo de morte independente da ativação de caspases (GALLUZZI; BRAVO-SAN PEDRO; KROEMER, 2014; GALLUZZI et al., 2018).

A necroptose decorre de perturbações na homeostase intracelular ou extracelular que induzem a ativação de receptores de morte, como FAS e TNFR1. A necroptose é um processo de morte independente da mitocôndria e da ativação de caspases, de forma que após a iniciação do receptor, ocorre a ativação da proteína RIPK3 pela RIPK1 (do inglês, *receptor integrating protein kinases*) que culmina no complexo necroptossoma, se a caspase 8 estiver bloqueada ou ausente (GALLUZZI et al., 2018).

Na partanatos ocorre uma hiperativação da poli(ADP-ribose) polimerase 1 (PARP1) que causa severos danos no DNA, também há danos na mitocôndria que geram uma catástrofe bioenergética, sendo que não há influência de caspases. A ferroptose é dependente de altas concentrações de ferro, que influenciam na depleção do sistema antioxidante culminando em uma intensa lipoperoxidação. Na piroptose, geralmente há ativação das caspases inflamatórias, resultando em danos no DNA e permeabilização da membrana celular (GALLUZZI; KEPP; KROEMER, 2016; GALLUZZI et al., 2018).

Deve-se avaliar com cuidado os experimentos *in vitro*, visto que nos estágios finais da apoptose geralmente há uma completa ruptura da membrana celular, resultando assim em células com morfologia típica de morte celular por necrose, ou seja, ocorre um processo de necrose secundária (BERGHE et al., 2010).

A autofagia é um processo catabólico responsável pela reciclagem e degradação de componentes celulares danificados. Assim, a autofagia controla a sobrevivência e a morte celular conforme a extensão dos danos celulares (NAVARRO-YEPES et al., 2014). O processo citoprotetivo da autofagia é útil para sobrevivência durante o estresse celular (como acúmulo de EROs), resultando em células resistentes ao estresse, mas também permite a sobrevivência de células tumorais (SUI et al., 2013; POILLET-PEREZ et al., 2015).

A morte celular dependente de autofagia caracteriza-se por uma massiva vacuolização do citoplasma, desde que sem relação com outros tipos de morte, como a necroptose ou ferroptose (GALLUZZI et al., 2007, 2018). Os vacúolos autofágicos são compostos por uma dupla membrana lipídica, contudo após a fusão com lisossomos ocorre a degradação da camada interna gerando os autolisossomos (KLIONSKY; ESKELINEN; DERETIC, 2014; WANG; FENG, 2015).

2.3.2 Estresse oxidativo *versus* morte celular

O estresse oxidativo resulta basicamente da perda de equilíbrio entre a geração de EROs e o sistema antioxidante endógeno da célula (SOSA et al., 2013). As EROs são radicais, íons ou moléculas com elétrons desemparelhados, intensamente reativos e produzidos principalmente pela mitocôndria (SINHA et al., 2013). Sendo divididas em radicais livre, como por exemplo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e radical hidroxila (OH^{\cdot}) e, em moléculas não- radicais, como por exemplo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl) (LIOU; STORZ, 2010).

Os níveis de EROs intracelulares influenciam nas respostas celulares, de forma que baixos níveis são necessários para manter o crescimento e a proliferação celular. Contudo, níveis de EROs persistentemente elevados podem resultar em danos oxidativos e, até morte celular (MOLONEY; COTTER, 2017).

O sistema antioxidante intracelular é responsável por modular os níveis de EROs. A detoxificação pode ser realizada por meio de enzimas antioxidantes endógenas, como por exemplo a superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase. Ademais, moléculas não-enzimáticas também detoxificam EROs, como por exemplo a glutathione. Sendo que a proteína glutathione é o principal tiol celular (MARENCO et al., 2016).

A habilidade celular para resistir ao estresse e manter a homeostase celular influencia no tipo de dano que a célula pode sofrer. De forma que o estresse oxidativo pode resultar por exemplo, na redução dos níveis de ATP, elevação da concentração de cálcio intracelular, danos no DNA, alterações na membrana celular, redução nos níveis de glutathione, comprometimento da cadeia transportadora de elétrons, alteração na regulação da expressão gênica. Culminando nos diferentes tipos de morte celular, como apoptose, necrose e/ou autofagia (FULDA et al., 2010; MAO et al., 2017).

As células tumorais diferem das células normais principalmente pela capacidade de resistir aos mecanismos de morte celular. Durante o processo de tumorigênese, a concentração de EROs é muito maior nas células tumorais, do que nas células normais. Para compensar, há uma intensificação na atividade do sistema antioxidante endógeno das células tumorais, permitindo que estas células permaneçam vivas (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013; PANIERI; SANTORO, 2016; SAHA et al., 2017). Assim, aumento nos níveis de EROs nas células tumorais são mais nocivos que em células normais. Apesar das células tumorais terem uma alta capacidade antioxidante, também são mais sensíveis que as células normais a fatores que promovam o acúmulo de EROs, fato interessante para ser explorado na terapia. Desta forma, a

indução do estresse oxidativo nas células tumorais pode ser considerada uma estratégia para o tratamento do câncer (GORRINI; HARRIS; MAK, 2013; STEPANIC et al., 2015; MILEO; MICCADEI, 2016; PANIERI; SANTORO, 2016).

2.3.3 Polifenóis *versus* estresse oxidativo/ morte celular

Os polifenóis são considerados antioxidantes naturais e, indicados para a prevenção de diversas doenças, como o câncer. Contudo, estudos demonstram que os antioxidantes naturais também são capazes de agir como pró-oxidantes, induzindo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), distúrbios no sistema antioxidante endógeno, e até danos no DNA (LEÓN-GONZÁLEZ; AUGER; SCHINI-KERTH, 2015; EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016; SZNARKOWSKA et al., 2017).

O comportamento pró-oxidante dos polifenóis geralmente é dependente da concentração e da presença de metais redox-ativos, como o ferro e o cobre (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011; EGHBALIFERIZ; IRANSHAHI, 2016; PIZZINO et al., 2017). Na literatura há diversos trabalhos comprovando o potencial dos polifenóis para induzir o estresse oxidativo, provavelmente via reações catalisadas pelos metais de transição, assim há geração de EROs, especialmente ânion superóxido e radical hidroxila (MILEO; MICCADEI, 2016; MAO et al., 2017).

As proantocianidinas são polifenóis naturais, as quais também se atribui a dualidade de serem antioxidantes ou pró-oxidantes, desta forma podem ter sua atividade relacionada com a prevenção ou com o tratamento do câncer (LEÓN-GONZÁLEZ; AUGER; SCHINI-KERTH, 2015; CAI et al., 2017; YANG et al., 2018b).

O comportamento pró-oxidante das proantocianidinas provavelmente está relacionado com diversos danos celulares, podendo resultar em estresse oxidativo e até outros processos de morte celular (LEÓN-GONZÁLEZ; AUGER; SCHINI-KERTH, 2015). De forma que as proantocianidinas geralmente provocam a morte celular por indução da apoptose, interrupção do ciclo celular e inibição da angiogênese, como já observado em células de câncer de mama, ovário, cólon, próstata, melanoma, pulmão e câncer cervical (CAI et al., 2017).

A relação das proantocianidinas com a morte celular por apoptose também é frequentemente atrelada à disfunções mitocondriais, como observado nas células de carcinoma colorretal (HCT-116) tratadas com proantocianidinas de sementes de uva (ZHANG et al., 2017). Ou ainda, em células de câncer de mama (MDA-MB-231) tratadas com proantocianidinas de *Uncaria rhynchophylla* (CHEN et al., 2017).

Além disso, um dos motivos para as proantocianidinas induzirem a apoptose possivelmente deve-se a redução na expressão de proteínas anti-apoptóticas, ou ainda ao aumento de proteínas pró-apoptóticas (CAI et al., 2017). Como observado após o tratamento de célula de adenocarcinoma esofágico (EAC) e câncer cervical (HeLa e SiHa) com extratos contendo proantocianidinas de “cranberry” e de sementes de uva, respectivamente (CHEN; LIU; ZHENG, 2014; KRESTY et al., 2015).

Stryphnodendron adstringens induziu disfunções mitocondriais diretamente em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos após o tratamento com o extrato bruto das suas cascas. Onde aparentemente ocorreu desacoplamento da fosforilação oxidativa, inibição da cadeia transportadora de elétrons e inibição da ATP-sintase (REBECCA et al., 2003).

Ainda com relação a *S. adstringens*, a fração aquosa das folhas também é rica em proantocianidinas, e induziu a fragmentação do DNA e a apoptose em células de câncer de mama humano, especificamente MCF-7 e MDA-MB-435 (SABINO et al., 2018).

2.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E SEGURANÇA: DOS ENSAIOS PRÉ-CLÍNICOS ATÉ OS ENSAIOS CLÍNICOS

Os ensaios pré-clínicos compreendem os testes realizados *in vitro* e *in vivo* com intuito de avaliar a segurança e a eficácia dos compostos, possibilitando assim a realização de pesquisas em seres humanos. De forma que os ensaios pré-clínicos buscam identificar possíveis riscos aos humanos que participarão dos ensaios clínicos (GOLDIM, 2007).

O “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” propõe alguns estudos pré-clínicos para avaliação da segurança, como por exemplo o estudo de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, além de toxicidade de dose única (aguda) e toxicidade de doses repetidas (crônica) (BRASIL, 2013).

Na literatura já há estudos que avaliam a segurança de extratos e frações oriundos de *S. adstringens*. No ensaio de genotoxicidade em camundongos *Mus musculus* (Swiss), a fração aquosa não foi capaz de provocar efeito genotóxico até a concentração de 2.250 mg/kg/dia administrado por via oral (COSTA et al., 2010).

Além disso, nos ensaios de toxicidade aguda realizado em camundongos *Mus musculus* (Swiss) verificou-se que a Dose Letal (DL₅₀) foi de 3.015 mg/kg/dia e, em doses inferiores houve reversão de possíveis efeitos colaterais induzidos pela administração oral da fração

aquosa de *S. adstringens* (COSTA et al., 2013). Dado semelhante ao resultado da DL₅₀ encontrado por Rebecca et al. (2002), que foi de 2.699 mg/kg/dia.

No ensaio de toxicidade crônica, realizado em ratos Wistar com administração oral da fração aquosa de *S. adstringens* nas concentrações de 10, 100 e 200 mg/kg/dia por 90 dias não houve diferença significativa nos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados. Da mesma forma que a avaliação histopatológica de timo, esôfago, estômago, duodeno, pulmão, coração, fígado, rins, baço, adrenais e gônadas também não apresentou alterações significativas (COSTA et al., 2013).

Segundo o Documento das Américas sobre as Boas Práticas Clínicas, o ensaio clínico é qualquer pesquisa conduzida em seres humanos que objetiva avaliar as reações adversas ao produto, além dos efeitos clínicos/farmacológicos do produto de forma a determinar sua segurança e eficácia (OPAS, 2005).

No Brasil, a regulamentação dos ensaios clínicos aprimorou-se com as resoluções nº 196/96 e 251/97 que dispõem sobre a pesquisa envolvendo seres humanos, sendo revisadas por meio da Resolução nº 466 de 2012 (BRASIL, 1996, 1997, 2012). O ensaio clínico é dividido em 4 etapas, correspondentes as Fases I, II, III e IV (OPAS, 2005).

O Ensaio Clínico Fase I é o primeiro estudo em seres humanos e, objetiva avaliar a segurança e a tolerabilidade em um pequeno número de sujeitos, que pode variar de 20 a 80 voluntários saudáveis. Já no Ensaio Clínico Fase II, busca-se investigar a eficácia e a segurança do produto em pacientes com a patologia para a qual almeja-se uma nova alternativa terapêutica, associado a determinação da dose terapêutica. A Fase II realiza-se em um pequeno grupo de pacientes, normalmente entre 50 e 100 pacientes (OPAS, 2005; GOLDIM, 2007; LORUSSO; BOERNER; SEYMOUR, 2010).

A Fase III é semelhante a Fase II do ensaio clínico, contudo o número de paciente é consideravelmente maior para que se identifique o maior número possível de reações adversas. Sendo geralmente realizado em vários países ao mesmo tempo, caracterizando uma pesquisa multicêntrica. A última etapa do Ensaio Clínico é a Fase IV, que ocorre no período de pós-comercialização, ou seja, enquanto o medicamento for comercializado será necessário manter a vigilância sobre as possíveis reações adversas que venham a ocorrer (OPAS, 2005; GOLDIM, 2007; LORUSSO; BOERNER; SEYMOUR, 2010).

Os medicamentos fitoterápicos são regulamentados por diversas diretrizes e resoluções (CARVALHO et al., 2011, 2014). Sendo classificados em produtos fitoterápicos tradicionais e em medicamentos fitoterápicos. No primeiro caso, a segurança e a eficácia são comprovados

com base no uso tradicional. Já, para os medicamentos fitoterápicos, a segurança e eficácia devem ser comprovados por meio de ensaios pré-clínicos e clínicos (CARVALHO et al., 2018).

Conforme o guia “Instruções operacionais: Informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos”, os ensaios clínicos conduzidos com medicamentos fitoterápicos também observam os preceitos seguidos pelos medicamentos alopáticos ou convencionais (BRASIL, 2008).

Entretanto, os ensaios clínicos com plantas medicinais brasileiras ainda são escassos, apesar da abundante biodiversidade nacional e do considerável uso tradicional de plantas medicinais pela população (DUTRA et al., 2016). Dentre as publicações nacionais, há o Ensaio Clínico Fase I do extrato das folhas de *Maytenus ilicifolia* administrado por via oral, sendo que foi bem tolerado e com poucas alterações bioquímicas, hematológicas e na função psicomotora (TABACH; DUARTE-ALMEIDA; CARLINI, 2017).

Além disso, PAULO et al. (2009) realizaram o Ensaio Clínico Fase I do produto fitoterápico composto por *Schinus terebinthifolius*, *Plecthanthus amboinicus* e *Eucalyptus globulus* administrado por via oral durante 8 semanas, o qual foi bem tolerado e sem alterações clínicas, laboratoriais e nem reações adversas significativas.

O Ensaio Clínico Fase I da suplementação oral com óleo de palma durante 60 dias mostrou que o concentrado de polifenóis foi seguro e sem efeitos colaterais relevantes, considerando os fatores avaliados. Sendo que a segurança foi avaliada por meio de exame de urina e sangue onde foram analisados os parâmetros hematológicos, perfil lipídico, além da função hepática, renal e endócrina (FAIRUS et al., 2018).

No Ensaio Clínico Fase I de diferentes concentrações de curcumina (500 – 2000 mg) administrado por via intravaginal durante 14 dias ocorreram pequenas reações adversas, como prurido e corrimento vaginal. Além disso, as mulheres não apreciaram a coloração alaranjada da formulação. Apesar disso, a administração intravaginal da curcumina foi bem tolerada e segura (GATTOC et al., 2017).

Nosso grupo de pesquisa realizou o Ensaio Clínico Fase I do gel vaginal contendo 0,5% e 1,25% de fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (F2), no qual mulheres saudáveis administraram as formulações por via intravaginal durante 14 dias. Ambas formulações mostraram-se seguras e bem toleradas, visto que não ocorreram alterações significativas nos parâmetros clínicos e laboratoriais avaliados (COSTA, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a atividade anticâncer *in vitro* e o mecanismo de ação da fração enriquecida em proantocianidinas de *Stryphnodendron adstringens* (F2) em células de câncer cervical, incluindo as linhagens celulares HeLa (HPV18-positivo), SiHa (HPV16-positivo) e C33A (HPV-negativo); avaliar a atividade antitumoral *in vivo* por meio do modelo murino de tumor sólido; avaliar a segurança em seres humanos por meio do Ensaio Clínico Fase I.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a viabilidade das linhagens celulares HeLa, SiHa, C33A e HaCaT tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens*;
- Avaliar *in vitro* a migração das linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens*;
- Avaliar *in vitro* o efeito da fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* nas linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A sobre:
 - a morfologia e ultraestrutura celular;
 - a produção de EROs;
 - os níveis de tióis reduzidos;
 - o potencial de membrana mitocondrial;
 - a produção de ATP intracelular;
 - a expressão dos genes Bax, BCL-2, caspase 9 e caspase 3;
 - a integridade do DNA;
 - a lipoperoxidação;
 - a integridade da membrana celular.
- Avaliar a atividade antitumoral *in vivo* da fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* em modelo murino de tumor sólido de Ehrlich;
- Avaliar a segurança e tolerabilidade da formulação vaginal contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* por meio do Ensaio Clínico Fase I.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DESENHO EXPERIMENTAL

A Figura 7 representa o desenho experimental das metodologias empregadas na realização do presente trabalho.

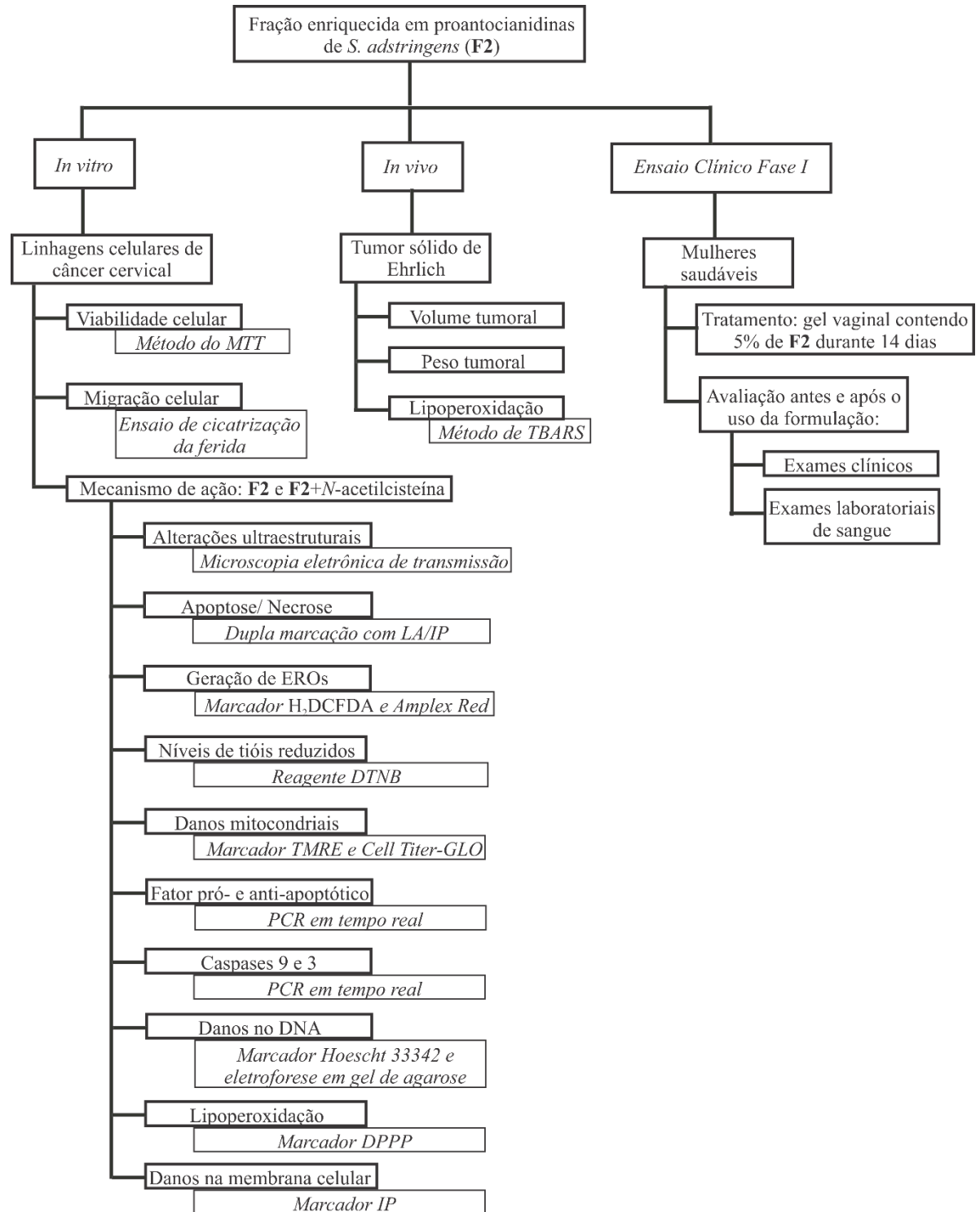


Figura 7. Desenho experimental das metodologias empregadas no presente trabalho.

4.2 MATERIAL

Foram utilizados os seguintes materiais: soro fetal bovino (SFB; Gibco Invitrogen); Meio Dulbecco's Eagle modificado (DMEM; Gibco Invitrogen); carbonilcianida m-clorofenilhidrazona (CCCP); 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT); 2',7' diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCFDA); Amplex® Red; Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit; ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTNB ou Reagente de Ellman); tetrametilrodamina-etil-éster (TMRE);); Carbopol 940®; Cell Titer-Glo® Luminescent Cell Viability Assay; Hoechst 33342; difenil-1-pirenilfosfina (DPPP); iodeto de propídio (IP); dimetilsulfóxido (DMSO); ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA); *N*-acetilcisteína (NAC) e dodecil sulfato de sódio (SDS).

4.3 PREPARAÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDAS DA CASCA DE *Stryphnodendron adstringens*

As cascas do caule de *S. adstringens* foram coletas em São Jerônimo da Serra, norte do Paraná, Brasil em março de 2014. Um voucher da amostra foi depositado no herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUEM 28197). As cascas foram secas em estufa de ar circulante e pulverizadas em moinho de martelos. Conforme ISHIDA et al. (2006), o extrato bruto da casca foi obtido a partir de turbo extração em acetona:água (7:3; v/v). O extrato bruto foi filtrado em funil de Buchner e o solvente orgânico foi removido em rotaevaporador e liofilizado. A fração enriquecida em proantocianidinas (**F2**) foi obtida pela partição do extrato bruto em água: acetato de etila (500 mL; 1:1; v/v).

4.4 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR E O MECANISMO DE AÇÃO DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDINAS (**F2**) EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

4.4.1 Linhagens celulares e cultivo celular

As linhagens celulares de câncer cervical incluídas foram HeLa (HPV18-positivo), SiHa (HPV16-positivo) e C33A (HPV-negativo; mutação na p53), além de queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT). As células foram doadas pela Dra. Luiza L. Villa (ICESP, Escola de Medicina, Universidade de São Paulo), Dra. Silvy S. Maria-Engler (Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo) e pela Dra. Marcia E. L. Consolaro (Universidade Estadual de Maringá). As linhagens de células foram mantidas a 37 °C em estufa com atmosfera

úmida e tensão de 5% de CO₂, cultivadas em Meio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco Invitrogen, New York, EUA) suplementado com 2 mM de L-glutamina, 10% de SFB e antibióticos (50 U/mL de penicilina e 50 mg/mL de estreptomicina).

4.4.2 Avaliação da viabilidade celular pelo método colorimétrico MTT

A avaliação de **F2** sobre a viabilidade celular foi realizada por meio do ensaio colorimétrico do MTT, conforme adaptação de SOUZA et al. (2017). As linhagens celulares HeLa, SiHa, C33A e HaCaT foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL em meio DMEM acrescido de 10% de SFB, sendo adicionado 100 µL/poço, e incubado por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada de células. A fração enriquecida em proantocianidinas (**F2**) foi adicionada ou não sobre a monocamada celular nas concentrações de 1, 10, 25, 50 e 100 µg/mL e, incubadas por 24 e 48 h. Após a incubação, os poços foram lavados com 100 µL de PBS, foi adicionado 50 µL de solução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) na concentração de 2 mg/mL e, incubado por 4 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂ (protegido da luz). Posteriormente, foi adicionado 150 µL de DMSO e realizado a leitura em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS) a 570 nm. A concentração capaz de reduzir 50% e 90% da densidade óptica das células tratadas (IC₅₀ e IC₉₀, respectivamente) em comparação com o controle foi determinada por meio de regressão não linear.

4.4.3 Morfologia das células de câncer cervical

As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL, sendo adicionado 500 µL/poço em placas de cultura de 24 poços e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada de células. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC₅₀ e IC₉₀ correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. A morfologia celular foi observada em microscópio invertido de contraste de fase (40X; Olympus CKX41).

4.4.4 Ensaio da cura da ferida em células de câncer cervical

O ensaio da cura da ferida avaliou a inibição da migração celular induzida pela fração enriquecida em proantocianidinas nas linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A. Metodologia foi adaptada de LIANG; PARK; GUAN (2007). As células foram ressuspensas a densidade de $2,5$

x 10^5 cels/mL, sendo adicionado 500 μ L/poço em placa de cultura de 24 poços e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada de células. Então, o meio de cultura foi substituído por meio DMEM contendo 0,5% de SFB e, as células foram incubadas por 6 h. Em seguida, a cicatriz na monocamada celular foi produzida por meio de um risco feito com a ponteira de 200 μ L. As células foram tratadas com a **F2** (IC₅₀ e IC₉₀ correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. No tempo 0 h e 24 h a cicatriz foi visualizada em microscópio invertido de contraste de fase (4x; Olympus CKX41). A porcentagem de crescimento celular na região da cicatriz foi avaliada para determinar a capacidade de migração celular.

4.4.5 Microscopia eletrônica de transmissão de células de câncer cervical

As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL em frasco para cultura e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC₅₀ e IC₉₀ correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. As células foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) por 2 h a 25 °C. As células foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% por 60 min a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (acetona 50%, 70%, 90% e 100%). O material foi incluído em concentrações crescente de resina Epon, iniciando com a proporção de Epon/acetona igual a 1:2 até Epon puro, sendo polimerizado a 60 °C por 72 h. Os cortes ultrafinos foram realizados em ultramicrotomo (espessura de aproximadamente 60 nm) e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Então, foram observados em microscópio eletrônico de transmissão JEM 1400 JEOL.

4.4.6 Análise do tipo de morte celular pela dupla marcação com laranja de acridina e iodeto de propídio em células de câncer cervical

O tipo de morte celular foi analisado por meio da dupla marcação com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP). Metodologia adaptada de NG et al. (2013) e HAJREZAIE et al. (2015). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL, sendo adicionado 500 μ L/poço em placa de cultura de 24 poços contendo lamínula redonda e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O

experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC₅₀ e IC₉₀ correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. As células foram marcadas com LA (10 µg/mL) e IP (4 µg/mL) por 15 min no escuro. A fluorescência foi analisada usando microscópio de fluorescência Olympus BX51 e, as imagens foram capturadas usando a câmera UC30 dentro de 30 min. Os critérios de identificação foram os seguintes: células viáveis apresentaram núcleo verde com estruturas intactas; células em apoptose inicial apresentaram núcleo verde brilhante indicando condensação da cromatina; células em apoptose tardia apresentaram densas áreas alaranjadas de cromatina condensada e núcleos laranja-avermelhados indicaram necrose secundária. O número de células viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia e em necrose secundária foi determinado por meio da contagem de 200 células em triplicata.

4.4.7 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de câncer cervical

A produção de espécies reativas de oxigênio foi determinada por meio do marcador H₂DCFDA. Metodologia adaptada de SOUZA et al. (2017). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de 2,5 x 10⁵ cels/mL, sendo adicionado 500 µL/poço em placa de cultura de 24 poços e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC₅₀ e IC₉₀ correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. O controle positivo utilizado foi o peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 200 µM). As células foram marcadas com 10 µM de H₂DCFDA por 30 min no escuro, removidas por tripsinização e, ressuspensas em PBS. A intensidade de fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (VICTOR™ X3, PerkinElmer) com comprimentos de onda de excitação e de emissão igual a 488 e 530 nm, respectivamente. A intensidade da fluorescência foi normalizada por meio do número de células (SOUZA et al., 2017).

4.4.8 Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em células de câncer cervical

A produção de peróxido de H₂O₂ foi determinada por meio do reagente Amplex Red. Metodologia adaptada de DIKALOV; HARRISON (2014). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de 2,5 x 10⁵ cels/mL, sendo adicionado 500 µL/poço em placa de cultura de 24 poços e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O

experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC₅₀ e IC₉₀ correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. O controle positivo utilizado foi o peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 200 µM). As células foram removidas por tripsinização, ressuspensas em PBS e marcadas com 12 µM de Amplex Red e 0,05 UI/mL de peroxidase. A intensidade de fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (VICTOR™ X3, PerkinElmer) com comprimentos de onda de excitação e de emissão igual a 530 e 590 nm, respectivamente. A intensidade da fluorescência foi normalizada por meio do número de células (SOUZA et al., 2017).

4.4.9 Nível de tióis reduzidos em células de câncer cervical

Os níveis de tióis reduzidos foram detectados por meio do reagente DTNB. Metodologia adaptada de LAZARIN-BIDÓIA et al. (2013). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL, sendo adicionado 500 µL/poço em placa de cultura de 24 poços e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC₅₀ e IC₉₀ correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. O controle positivo utilizado foi o peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 200 µM). Tampão Tris-HCl (10 mM; pH 2,5) foi adicionado e sonificado. Os debris celulares foram removidos por centrifugação. Em seguida, 100 µL do sobrenadante, 100 µL do tampão fosfato (500 mM; pH 7,5) e 20 µL do DTNB (1mM) foi colocado em cada poço da placa de 96 poços. A absorbância foi lida a 412 nm em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS).

4.4.10 Potencial de membrana mitocondrial e integridade do DNA em células de câncer cervical

O potencial de membrana mitocondrial foi analisado por meio do marcador TMRE. Metodologia adaptada de CROWLEY; CHRISTENSEN; WATERHOUSE (2016). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL, sendo adicionado 500 µL/poço em placa de cultura de 24 poços e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC₅₀ e IC₉₀ correspondente para cada

linhagem celular) por 24 h. O controle positivo foi o CCCP (100 μM). As células foram marcadas com TMRE (25 nM) por 30 min a 37 °C ao abrigo da luz, tripsinizadas e ressuspensas em PBS. A intensidade de fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (VICTOR™ X3, PerkinElmer) com comprimentos de onda de excitação e de emissão igual a 540 e 595 nm, respectivamente. Em outro experimento, as células foram marcadas com TMRE (25 nM) e Hoescht 33342 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 30 min ao abrigo da luz. A fluorescência foi analisada usando microscópio de fluorescência Olympus BX51 e, as imagens foram capturadas usando a câmera UC30.

4.4.11 Níveis de ATP intracelular em células de câncer cervical

Níveis de adenosina trifosfato (ATP) intracelular foi determinado por meio do reagente Cell Titer-GLO. Metodologia adaptada de GAO et al. (2011). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL, sendo adicionado 500 $\mu\text{L}/\text{poço}$ em placa de cultura de 24 poços e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO_2 . O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC_{50} e IC_{90} correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. O controle positivo utilizado foi o cianeto de potássio (KCN; 1000 μM). As células foram removidas por tripsinização, ressuspensas em PBS e, marcadas com o reagente Cell Titer-GLO por 10 min a temperatura ambiente. A intensidade de luminescência foi quantificada em espectrofluorímetro (VICTOR™ X3, PerkinElmer).

4.4.12 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real em células de câncer cervical

As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL em frasco para cultura e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO_2 . O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC_{50} e IC_{90} correspondente para cada linhagem celular) por 12 h. O RNA foi extraído utilizando-se fenol:clorofórmio (25:25; v/v) e tratado com DNase I (Invitrogen) para remover DNA genômico contaminante. DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 1 μg de RNA total por meio do kit iScript cDNA (Bio-Rad) utilizando o equipamento termociclador (Mastercycler, Eppendorf). A PCR em tempo real foi realizada utilizando-se SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) no equipamento

LightCycler 96 System (Roche Applied Science). A análise dos produtos da PCR foi realizada pelo LightCycler 96 software (Roche Applied Science). Todos os procedimentos foram conduzidos conforme as instruções do fornecedor. Segundo HERNANDEZ-FLORES et al. (2011), foram obtidas as seguintes sequências de nucleotídeos (primers): Bax (F: 5'-TTTGCTTCAGGGTTTCATCC-3' e R: 5'-CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA-3'); BCL-2 (F: 5'-GCAGGCGACGAGTTTGAAC-3' e R: 5'-GTGTCTGGTCATTTCCGACTGA-3'); Caspase 3 (F: 5'-ATACTCCACAGCACCTGGTTAT-3' e R: 5'-AATGAGAGGGAAATACAGTACCAA-3'); Caspase 9 (F: 5'-GTACGTTGAGACCCTGGACGAC-3' e R: 5'-GCTGCTAAGAGCCTGTCTGTCACT-3') e 18S rRNA gene (F: 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3' e R: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'). As condições de amplificação foram 95 °C para pré-desnaturação por 10 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C por 15 seg e 60 °C por 60 seg. O nível de expressão de cada amostra foi normalizado pelo gene controle interno 18S rRNA de acordo com a fórmula do ΔCt fórmula ($\text{Ct}_{\text{gene alvo}} - \text{Ct}_{18\text{S rRNA}}$). Os níveis de expressão relativa do RNAm foram calculados utilizando o método de quantificação relativa $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, onde os valores de $\Delta\Delta\text{Ct}$ foram calculados baseando-se no ΔCt células tratadas - ΔCt células controle (SCHMITTGEN; LIVAK, 2008).

4.4.13 Fragmentação do DNA em células de câncer cervical revelada pela eletroforese

Conforme metodologia adaptada de XU et al. (2012). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL, sendo adicionado 2.000 μL /poço em placa de cultura de 6 poços e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO_2 . O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC_{50} e IC_{90} correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. As células foram lisadas em solução contendo Tris-HCl (10 mM; pH 8), EDTA (1 mM), NaCl (100 mM), SDS (0,5%) e, proteinase k (20 mg/mL) a 65 °C por 15 min. Em seguida, foi adicionado a RNase (1 mg/mL) a 37 °C por 15 min. O DNA foi purificado utilizando-se fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1; v/v). A eletroforese do DNA foi realizada em gel de agarose 1% em Tris/ácido bórico/EDTA a 90 V por 1 h, e o DNA foi marcado com SYBR safe (Invitrogen). O marcador de peso molecular utilizado foi o 100 bp DNA Ladder. As imagens foram obtidas utilizando o equipamento In-vivo MS FX PRO (Carestream Molecular Imaging, Carestream Health).

4.4.14 Lipoperoxidação em células de câncer cervical

A lipoperoxidação foi detectada por meio do marcador DPPP, conforme SOUZA et al. (2017). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL, sendo adicionado 500 μ L/poço em placa de cultura de 24 poços e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC₅₀ e IC₉₀ correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. O controle positivo utilizado foi o peróxido de hidrogênio (H₂O₂; 200 μ M). As células foram removidas por tripsinização, ressuspensas em PBS e marcadas com DPPP (50 μ M) por 15 min a temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (VICTOR™ X3, PerkinElmer) com comprimentos de onda de excitação e de emissão igual a 351 e 460 nm, respectivamente. A intensidade da fluorescência foi normalizada por meio do número de células (SOUZA et al., 2017).

4.4.15 Integridade da membrana celular em células de câncer cervical

A integridade da membrana celular foi avaliada por meio do marcador iodeto de propídio (IP). Metodologia adaptada de AFSAR et al. (2016). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foram ressuspensas a densidade de $2,5 \times 10^5$ cels/mL, sendo adicionado 500 μ L/poço em placa de cultura de 24 poços e, incubadas por 24 h a 37 °C com tensão de 5% de CO₂. O experimento foi realizado após pelo menos 80% de confluência da monocamada celular. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h. Então, as células foram tratadas com a **F2** (IC₅₀ e IC₉₀ correspondente para cada linhagem celular) por 24 h. O controle positivo utilizado foi a digitonina (80 μ M). As células foram removidas por tripsinização, ressuspensas em PBS e marcadas com IP (4 μ g/mL) por 5 min a temperatura ambiente. A intensidade de fluorescência foi quantificada em espectrofluorímetro (VICTOR™ X3, PerkinElmer) com comprimentos de onda de excitação e de emissão igual a 480 e 580 nm, respectivamente. A intensidade da fluorescência foi normalizada por meio do número de células (SOUZA et al., 2017).

4.4.16 Análise estatística

Os dados mostrados em tabela e gráficos expressam a média \pm desvio padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata ou triplicata. Os dados

foram analisados utilizando teste ANOVA (one-way ou two-way), seguido pelo pós-teste de Dunnett ou Bonferroni, considerando $p \leq 0,05$ significativo. Análise estatística foi realizada no software Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, 2007).

4.5 ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vivo* DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDINAS (F2)

4.5.1 Animais

Camundongos BALB/c machos (20-25 g) entre 4 e 6 semanas de idade foram obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Os animais foram mantidos a temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, e com ciclos claro/escuro de 12 h. A dieta foi mantida com ração Nuvilab (fabricante Nuvital) e água *ad libitum*. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (Protocolo 4534200417/2017).

4.5.2 Manutenção das células de carcinoma ascítico de Ehrlich

Conforme metodologia adaptada de CALIXTO-CAMPOS et al. (2015). As células de carcinoma ascítico de Ehrlich (EAC) foram cultivadas *in vivo* em camundongos BALB/c machos. Após 7 a 10 dias de infecção, os animais foram eutanasiados e as células EAC foram removidas por punção intraperitoneal. Sendo removido de 2 a 3 mL de fluido ascítico, em seguida as células foram lavadas com PBS, contadas e ressuspensas. As células EAC (1×10^6 cél/mL) foram inoculadas por via intraperitoneal em animais saudáveis, para obtenção do tumor ascítico.

4.5.3 Modelo murino de tumor sólido de Ehrlich

Conforme metodologia adaptada de ELSHERBINY et al. (2016). As células de carcinoma ascítico de Ehrlich (1×10^7 cels/mL) foram injetadas por via subcutânea no flanco direito de camundongos BALB/c para obter o tumor sólido de Ehrlich. Após 15 dias, quando se desenvolveu uma massa palpável, os animais foram separados em dois grupos ($n = 5$ animais/grupo), sendo divididos em: grupo controle (tratado com PBS) e grupo tratado com a **F2** (150 mg/kg/dia). O tratamento foi administrado diariamente por via oral, por meio de gavagem, durante 28 dias. A solução estoque de **F2** foi preparada diariamente em PBS. As dimensões do tumor sólido de Ehrlich foram mensuradas semanalmente com um paquímetro digital (DIGIMESS® 150 mm). O volume do tumor sólido de Ehrlich (VT) foi calculado por

meio da seguinte fórmula: $VT (mm^3) = 0,52 \times A (mm) \times [B(mm)^2]$, onde A e B são os maiores e os menores diâmetros do tumor, respectivamente. No 28º dia de tratamento, os animais foram eutanasiados e, o tumor sólido foi removido e pesado.

4.5.4 Lipoperoxidação em tumor sólido de Ehrlich

A lipoperoxidação foi analisada por meio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Metodologia adaptada de LAZARIN-BIDÓIA et al. (2013). Após a eutanásia, o tumor sólido foi pesado (aproximadamente 200 mg) e sonificado em tampão fosfato de potássio (100 mM; pH 7,4). Os debris celulares foram removidos por centrifugação. O sobrenadante foi aquecido em uma solução contendo ácido tiobarbitúrico (0,37%), ácido tricloroacético (15%) e ácido clorídrico (0,25 N) durante 45 min a 95 °C. Então, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi removido. Em seguida, 300 µL do sobrenadante, 300 µL de butanol e 30 µL de solução saturada de NaCl foram reunidas e a absorbância foi lida a 532 nm em leitor de microplaca (BIO-TEK Power Wave XS). A concentração de TBARS foi calculada baseado no $\epsilon = 153.000 M^{-1}cm^{-1}$.

4.5.5 Análise estatística

Os dados mostrados em tabela e gráficos expressam a média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando o teste de Mann-Whitney e pelo teste ANOVA (two-way), seguido pelo pós-teste de Bonferroni, considerando $p \leq 0,05$ significativo. Análise estatística foi realizada no software Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, 2007).

4.6 ENSAIO CLÍNICO FASE I DA FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDINAS (F2)

4.6.1 Produção do gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas (F2)

A formulação farmacêutica foi preparada por meio da dispersão do polímero Carbopol 940® em água destilada estéril (1%; p/v). Em seguida, foi neutralizado com solução saturada de carbonato de sódio até pH 6, aproximadamente. O conservante da formulação foi o metilparabeno (0,2%). Após, foi incorporada a fração enriquecida em proantocianidinas (F2) na concentração de 5% (p/p) ao gel tópico. A metodologia utilizada para a produção da formulação foi adaptada de COSTA et al. (2018). A formulação foi acondicionada em bisnaga farmacêutica plástica e, dispensada em embalagem lacrada juntamente com os aplicadores vaginais graduados.

4.6.2 Desenho do Ensaio Clínico Fase I

O Ensaio Clínico Fase I do gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas (F2) em mulheres saudáveis foi não-randomizado, visto que somente um tipo de formulação foi distribuída para as participantes da pesquisa. Além disso, o presente ensaio clínico foi aberto dado que as participantes da pesquisa e o médico foram informados sobre a composição da formulação. O ensaio clínico foi aprovado pelo Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP/UEM) sob parecer de aprovação 1.453.763. Sendo que foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki e com os guias de Boas Práticas Clínicas. Todos os sujeitos envolvidos receberam instruções sobre a pesquisa clínica e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.6.3 Seleção e tratamento

A seleção das mulheres saudáveis foi conduzida no Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM/UEM), de acordo com a ordem de entrada no serviço de atendimento, sendo que, a seleção seguiu os critérios de inclusão e exclusão descritos abaixo.

Os critérios de inclusão foram mulheres saudáveis com idade entre 18 e 60 anos, sendo que, o quadro clínico foi avaliado por meio do exame clínico e de parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Os critérios de exclusão foram:

- Mulheres com menos de 18 anos ou mais de 60 anos;
- Mulheres com sintomatologia clínica característica de candidíase vulvovaginal e/ou histórico recente de displasia cervical;
- Mulheres grávidas e/ou amamentando;
- Mulheres que não iniciaram a vida sexual;
- História de doença hepática, renal, cardíaca, endócrina, epiléptica ou neoplásica maligna;
- Uso de medicação regular por até 2 semanas antes do início do Ensaio Clínico Fase I, com exceção do anticoncepcional e terapia de reposição hormonal;
- Ser usuária crônica de álcool ou drogas ilícitas;
- Ser alérgica aos componentes da formulação;
- Solicitação da paciente para retirar-se do estudo, que poderia ser realizada a qualquer momento e por qualquer razão, conforme TCLE.

Durante o período de 04/2016 a 12/2017, foram selecionadas 40 mulheres saudáveis. Contudo, 2 mulheres foram excluídas, permanecendo 38 mulheres saudáveis que receberam o gel contendo 5% de **F2** e os aplicadores vaginais graduados.

As voluntárias da pesquisa foram instruídas a administrar 4 g da formulação por via intravaginal com auxílio do aplicador vaginal graduado, uma vez ao dia (preferencialmente à noite) durante 14 dias.

Todas as voluntárias da pesquisa receberam instruções para contatar a equipe de pesquisa no caso de aparecimento de qualquer sintoma indesejável durante a administração do gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas (**F2**).

4.6.4 Exames médicos e laboratoriais

As mulheres que atenderam aos critérios de inclusão e que não se enquadraram nos critérios de exclusão na admissão, tiveram seu quadro clínico avaliado antes e após o uso da formulação por meio dos seguintes exames:

- Exame clínico realizado pelo médico por meio de questionamentos sobre o sistema geniturinário (ardência vaginal, corrimento, disúria, prurido vulvar e ulcerações), digestivo (diarreia, náusea e vômito), cardiovascular (palpitação), respiratório (dispneia e tosse) e sistema cutâneo (reação alérgica e eczema).
- Exames laboratoriais de sangue (hemograma, creatinina, ureia, ácido úrico, gama glutamil transferase (γ GT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, bilirrubinas totais e frações, proteínas totais e frações, sódio, potássio e gonadotrofina coriônica humana (β -hCG)).

4.6.5 Análise estatística

Os dados apresentados nas tabelas expressam a média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando o teste de Wilcoxon, onde valores com $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. A análise estatística foi realizada no software programa Prism 5 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

5 RESULTADOS

5.1 FRAÇÃO ENRIQUECIDA EM PROANTOCIANIDINAS (F2) REDUZIU A VIABILIDADE CELULAR, INDUZIU ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS E INIBIU A MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

A fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (F2) apresentou atividade citotóxica tempo- e dose-dependentes nas linhagens celulares de câncer cervical HeLa (HPV18-positivo), SiHa (HPV16-positivo) e C33A (HPV-negativo) (Figura 8A-C). Após 24 h de tratamento a IC₅₀ para a linhagem celular HeLa foi igual a 20,0 µg/mL, já para a linhagem celular SiHa foi igual a 35,4 µg/mL e, para a linhagem celular C33A foi igual a 33,5 µg/mL (Figura 8D). Além disso, após 24 h de tratamento, a IC₉₀ para as linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foi igual a 64,6, 56,1 e 51,8 µg/mL, respectivamente. O tratamento durante 48 h aumentou a atividade citotóxica de F2, resultando em um IC₅₀ igual a 15,3, 21,3 e 15,6 µg/mL para as linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A, respectivamente (Figura 8D).

Para os queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT), a IC₅₀ foi igual a 55,4 e 48,1 µg/mL para os tratamentos durante 24 e 48 h, respectivamente (Figura 8D). Sendo que, F2 apresentou uma atividade citotóxica significativamente menor na linhagem celular HaCaT do que nas linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A, em ambos os tempos de tratamento.

A morfologia das linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com F2 foi observada em microscópio invertido de contraste de fase. As três linhagens celulares tratadas com a IC₅₀ de F2 apresentaram alterações morfológicas, como irregularidades no formato e descolamento da superfície de crescimento (Figura 8E). Notáveis alterações na morfologia foram observadas nas células tratadas com a IC₉₀ de F2, incluindo irregularidade no formato, descolamento celular da superfície de crescimento e, formação de área clara em formato circular em torno do núcleo. As células pré-incubadas com *N*-acetilcisteína (NAC) por 2 h antes do tratamento com F2 (IC₅₀ ou IC₉₀) apresentaram morfologia preservada, embora haja aumento na vacuolização citoplasmática nas células tratadas com a IC₉₀.

A migração celular foi analisada por meio do ensaio de cicatrização da ferida. As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com F2 (IC₅₀ ou IC₉₀) apresentaram uma inibição significativa da migração celular quando comparado com o controle (Figura 9). Para as linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A, a porcentagem de migração celular no controle (células não tratadas) foi igual a 30,6%, 64,3% e 84,1%, respectivamente. Nas células tratadas com F2, a migração celular foi menor que 10% para as três linhagens celulares (Figura 9).

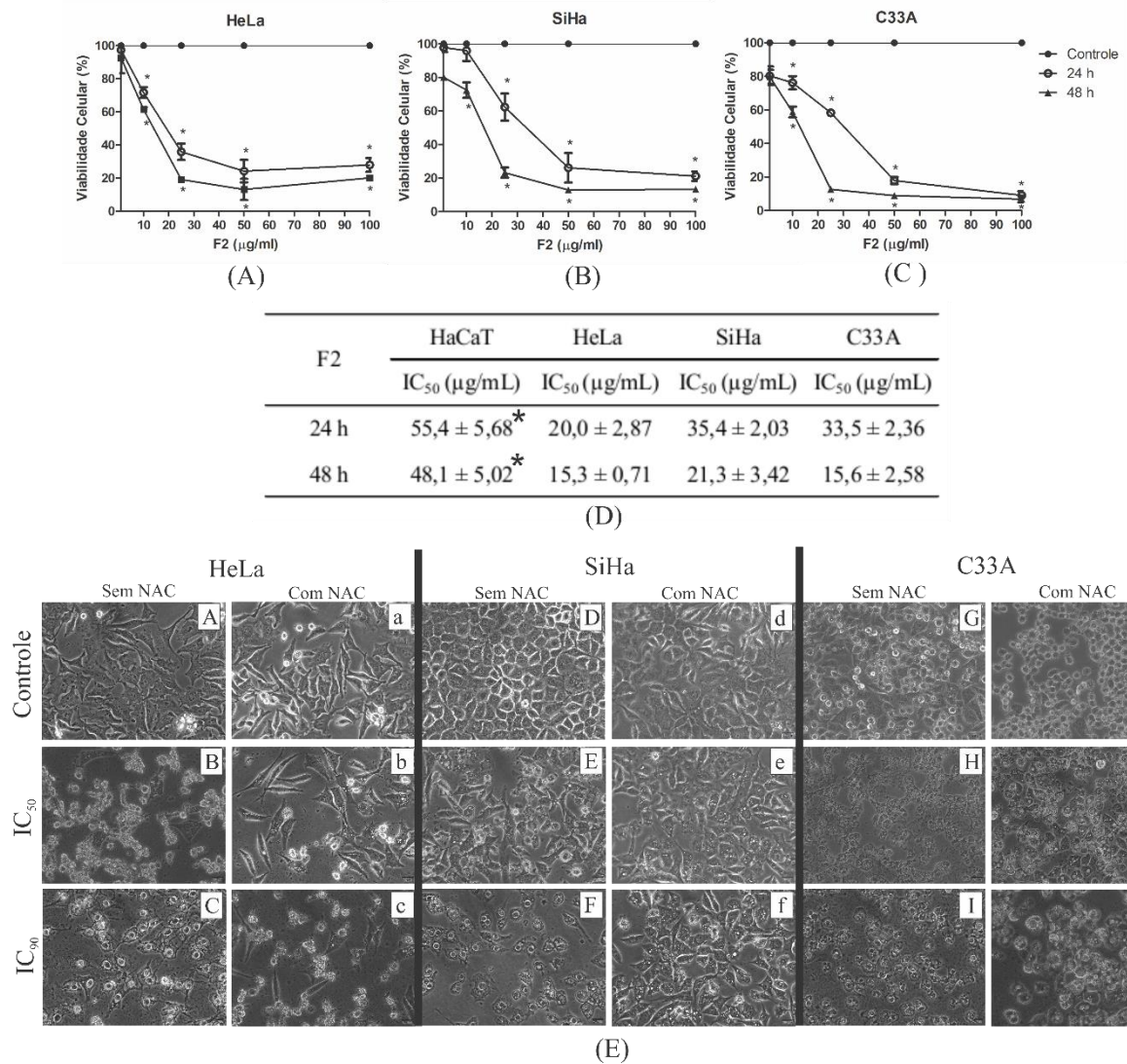


Figura 8. Atividade citotóxica em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) e queratinócitos humano imortalizados (HaCaT). (A-C) Células tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (1-100 µg/mL) por 24 e 48 h, e a viabilidade celular foi avaliada por meio do ensaio de MTT. Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni). (D) Concentração capaz de reduzir 50% da densidade óptica (IC₅₀) das linhagens celulares HaCaT, HeLa, SiHa e C33A após 24 e 48 h de tratamento. * $p \leq 0,05$, atividade citotóxica nas linhagens celulares HeLa, SiHa ou C33A significativamente diferente quando comparado com a linhagem celular HaCaT (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). (E) Alterações morfológicas em linhagens celulares de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com **F2** (IC₅₀ ou IC₉₀) por 24 h com ou sem pré-incubação com *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h.

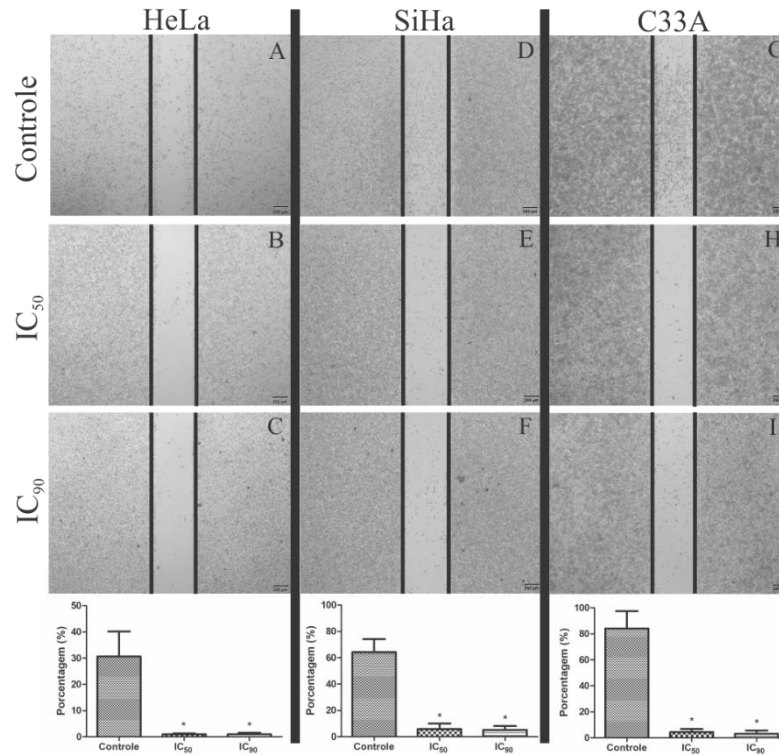


Figura 9. Análise da migração celular por meio do ensaio de cicatrização da ferida em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A). (A, D, G) Células controle (células não tratadas). (B, C, E, F, H, I) Células tratadas com fração enriquecida em proantocianidinas por 24 h e observadas em microscópio invertido de contraste de fase. Os dados representam a porcentagem de fechamento da ferida \pm DP de três experimentos. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett).

5.2 F2 INDUZIU ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

O tratamento com **F2** (IC_{50}) resultou em alterações ultraestruturais na linhagem celular HeLa, como inchaço mitocondrial e, aumento no número de autolisossomos quando comparado com o controle (Figura 10B). Alterações similares foram observadas na linhagem celular SiHa, associado à perda das estruturas típicas das cristas mitocondriais (Figura 10E). As linhagens celulares HeLa e SiHa tratadas com IC_{90} de **F2** apresentaram ruptura da membrana celular e alterações na membrana nuclear quando comparadas com as células não tratadas (Figura 10C e F, respectivamente). A linhagem celular C33A tratada com a IC_{50} e IC_{90} de **F2** apresentaram inchaço mitocondrial, perda das cristas mitocondriais, ruptura da membrana celular e alterações na membrana nuclear quando comparado com o controle (Figura 10H e I, respectivamente). As células pré-incubadas com NAC por 2 h antes do tratamento com a IC_{50} de **F2** apresentaram mitocôndria, membrana celular e membrana nuclear com ultraestrutura preservada, além de

autolisossomos (Figura 10b, e e h). O tratamento com IC₉₀ de **F2** após pré-incubação com NAC resultou em inchaço mitocondrial, perda das cristas mitocondriais e, aumento no número e tamanho dos autolisossomos, quando comparado com o controle (Figura 10c, f e i). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A que não foram tratadas com **F2**, ou seja, o grupo controle, não apresentaram alterações ultraestruturais (Figura 10A, a, D, d, G e g)

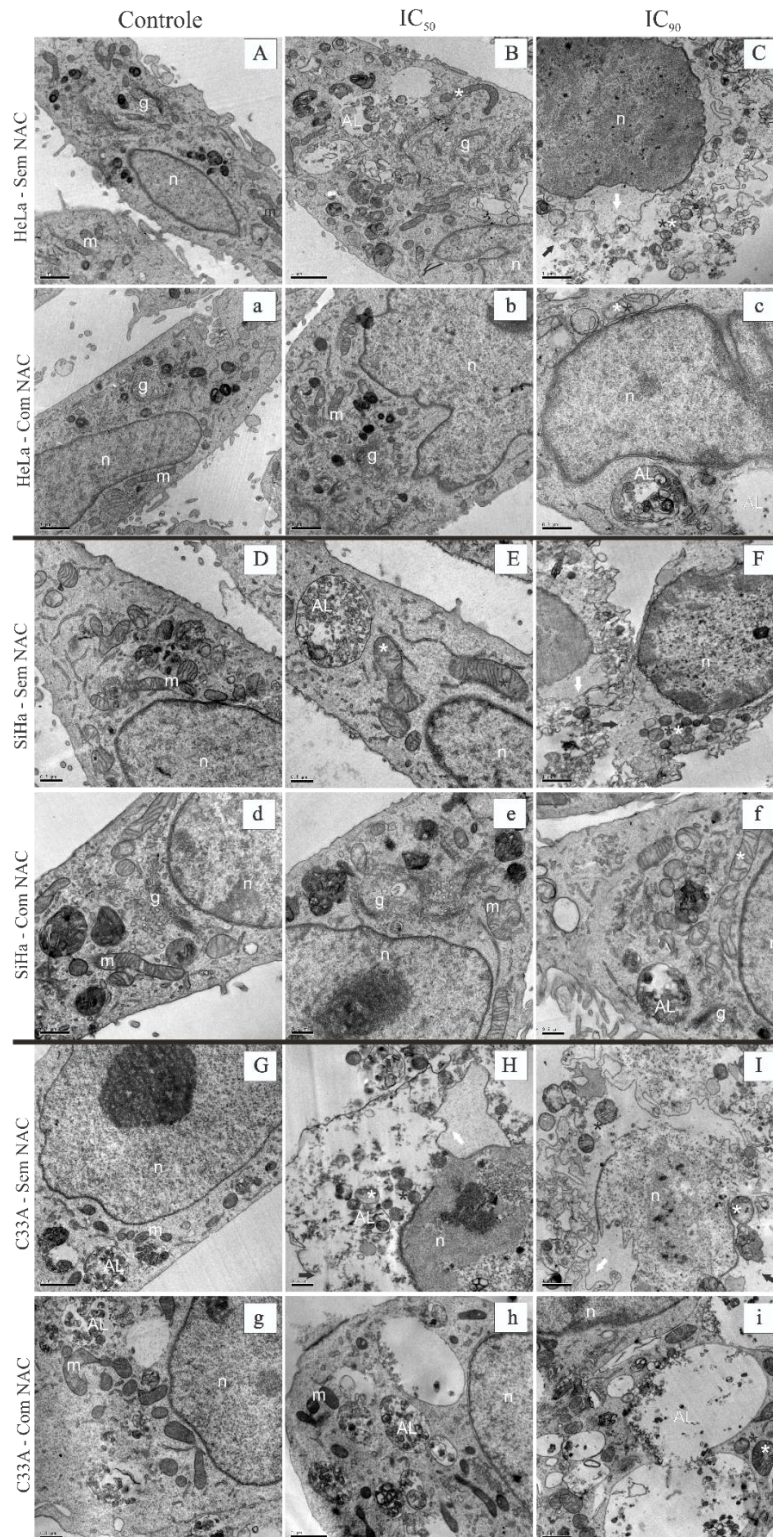


Figura 10. Análise das alterações ultraestruturais por meio da microscopia eletrônica de transmissão em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas sem (A-I) ou com (a-i) *N*-acetilcisteína por 2 h antes do tratamento com **F2**. O grupo controle (células não tratadas) das linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A foi representado por A, a, D, d, G e g, respectivamente. As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com a IC₅₀ foram representadas por B, b, E, e, H e h, respectivamente. As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com a IC₉₀ foram representadas por C, c, F, f, I e i, respectivamente. O grupo controle (células não tratadas) apresentou organelas com ultraestrutura característica. M, mitocôndria; g, complexo de Golgi; n, núcleo. As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A que foram tratadas com a IC₅₀ e IC₉₀ de **F2** apresentaram alterações ultraestruturais, incluindo inchaço mitocondrial (asterisco branco), perda das cristas mitocondrias (asterisco preto), ruptura da membrana celular (seta preta), alterações na membrana nuclear (seta branca) e, autolisossomo (AL). Escala das barras = 0,5 µm em D, E, H, e c-g e 1 µm em A-C, F, G, I, a, b, h, e i.

5.3 ANÁLISE DO TIPO DE MORTE CELULAR PELA DUPLA MARCAÇÃO COM LARANJA DE ACRIDINA E IODETO DE PROPÍDIO EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

A quantificação das células apoptóticas e necróticas foi realizada por meio da dupla marcação com laranja de acridina e iodeto de propídio, no qual as células viáveis apresentam núcleo verde com estrutura intacta, células em apoptose inicial apresentam núcleo verde brilhante com cromatina condensada, células em apoptose tardia apresentam densas áreas alaranjadas com cromatina condensada e, células em necrose secundária apresentam núcleo laranja-avermelhado (NG et al., 2013; HAJREZAIE et al., 2015).

As três linhagens celulares tratadas com **F2** (IC₅₀ e IC₉₀) apresentaram significativa redução nas células viáveis (Figura 11). Após o tratamento com a IC₅₀ de **F2**, as linhagens celulares HeLa e SiHa apresentaram um aumento na porcentagem de células em apoptose inicial (50,6% e 44,2%, respectivamente), em apoptose tardia (23,0% e 33,0%, respectivamente) e em necrose secundária (27,0% e 22,8%, respectivamente). A pré-incubação com NAC manteve aproximadamente 50% das células viáveis para ambas linhagens celulares. Após o tratamento com a IC₉₀, um aumento na porcentagem de células em apoptose tardia (43,0% e 51,3%, respectivamente) e em necrose secundária (42,0% e 27,3%, respectivamente) foi observado nas linhagens celulares HeLa e SiHa. As linhagens celulares HeLa e SiHa pré-incubadas com NAC e tratadas com a IC₉₀ apresentaram 12% e 10% das células em necrose secundária, respectivamente.

Após tratamento com a IC₅₀ e IC₉₀ de **F2**, a linhagem celular C33A mostrou um aumento na porcentagem de células em apoptose tardia (43,5% e 23,0%, respectivamente) e em necrose secundária (37,6% e 77,0%, respectivamente). As células pré-incubadas com NAC e tratadas com a IC₅₀ e IC₉₀ apresentam 56,6% e 18,5% de células viáveis e 2,3% e 21,0% de células em necrose secundária, respectivamente (Figura 11).

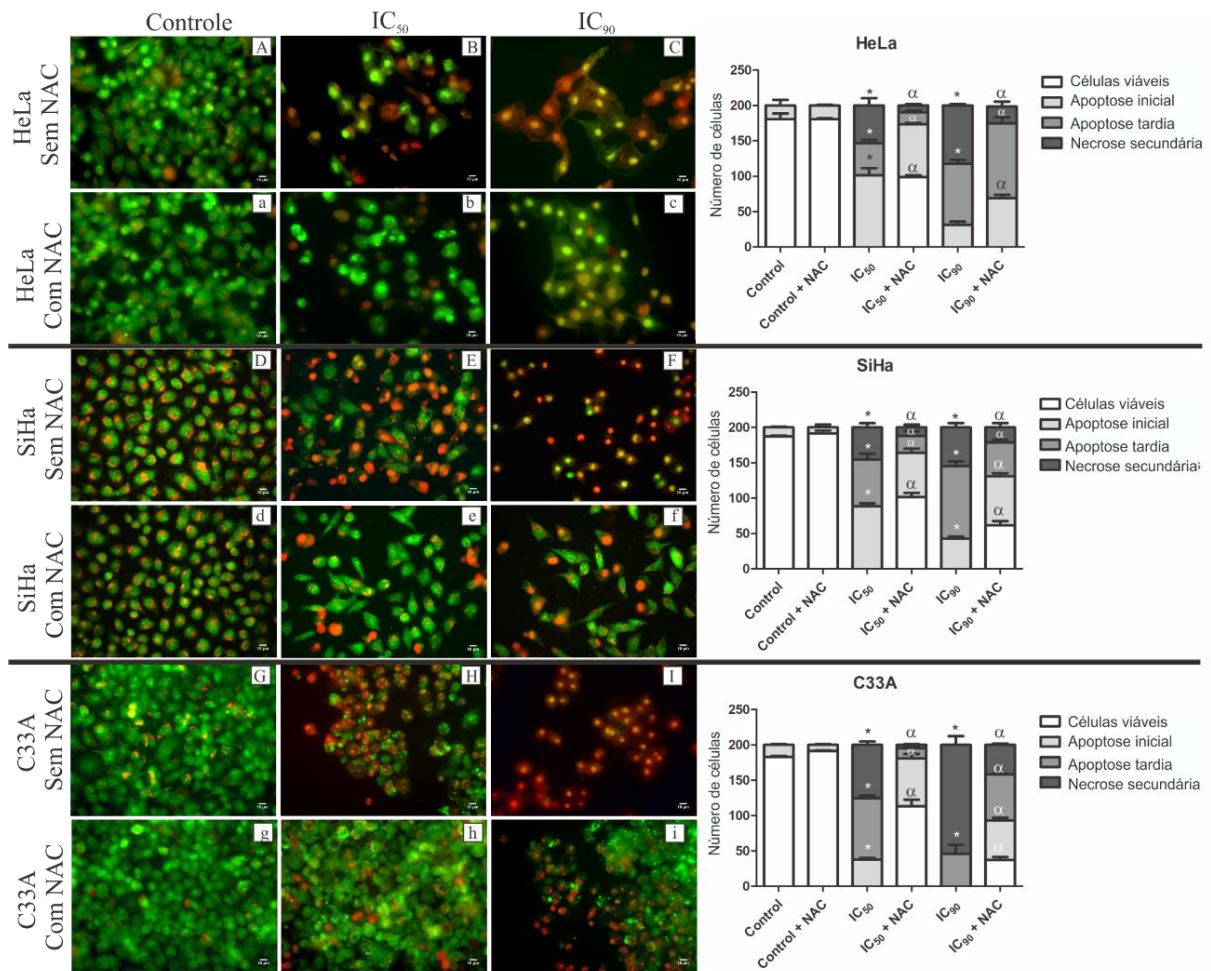


Figura 11. Análise do tipo de morte celular por meio da dupla marcação com laranja de acridina e iodeto de propídio em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. As barras representam a análise quantitativa da fluorescência das micrografias determinada em 200 células em triplicata. Os seguintes critérios foram aplicados: células viáveis (núcleo verde com estruturas intactas), apoptose inicial (núcleo verde brilhante com cromatina condensada), apoptose tardia (densas áreas alaranjadas com cromatina condensada) e necrose secundária (núcleo laranja-avermelhado). * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). $^{\alpha}p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett).

5.4 F2 INDUZIU AUMENTO NA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E DEPLEÇÃO NOS NÍVEIS DE TIÓIS REDUZIDOS EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de câncer cervical foi analisada por meio do marcador H_2DCFDA , o qual é clivado por esterases e oxidado por EROs obtendo o 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), que emite uma intensa fluorescência verde brilhante (YAZDANI, 2015). As linhagens celulares HeLa e SiHa apresentaram um aumento significativo na produção de EROs após o tratamento com a IC_{50} (434% e 307%, respectivamente) e IC_{90} (1.628% e 564%, respectivamente; Figura 12A). As células pré-incubadas com o antioxidante NAC apresentaram menor produção de EROs após o tratamento com IC_{50} e IC_{90} . Da mesma forma, a linhagem celular C33A exibiu aumento na produção de EROs quando tratadas com a IC_{90} de **F2** (1.628%), já a pré-incubação com NAC preveniu a produção de EROs. O controle positivo, H_2O_2 , aumentou a produção de EROs.

A produção de um tipo específico de EROs, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), foi analisada por meio do marcador Amplex Red; o qual é catalisado pela peroxidase (HRP) produzindo a resofurina, que apresenta uma intensa fluorescência (DEBSKI et al., 2016). As três linhagens celulares tratadas com **F2** apresentaram um aumento nos níveis de H_2O_2 , sendo que o aumento foi igual a 157%, 320% e 1.084% para as linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com a IC_{50} , respectivamente (Figura 12B). Da mesma forma, para o tratamento com a IC_{90} de **F2** houve aumento de 260%, 1.018% e 1.202% para as linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A, respectivamente (Figura 12B). Tal efeito foi observado em uma menor intensidade nas células pré-incubadas com NAC.

O nível de tióis reduzidos foi determinado usando o DTNB ou reagente de Ellman. Este reagente utiliza o sistema de reciclagem da glutathiona (GSH), onde o GSSG é progressivamente reduzido a GSH pela glutathiona redutase e produz o produto colorido ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, com absorvância máxima em 412 nm (CHEN et al., 2008; WINTHER; THORPE, 2014). Houve uma significativa redução nos níveis de tióis reduzidos após o tratamento das linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A com a IC_{50} (29%, 65% e 58%, respectivamente) e IC_{90} (42%, 66% e 82%, respectivamente; Figura 12C). Nas linhagens celulares pré-incubadas com NAC, houve um menor decréscimo nos níveis de tióis reduzidos, especialmente nas linhagens celulares SiHa e C33A tratadas com a IC_{50} (17% e 20%, respectivamente) e IC_{90} (11% e 38%, respectivamente).

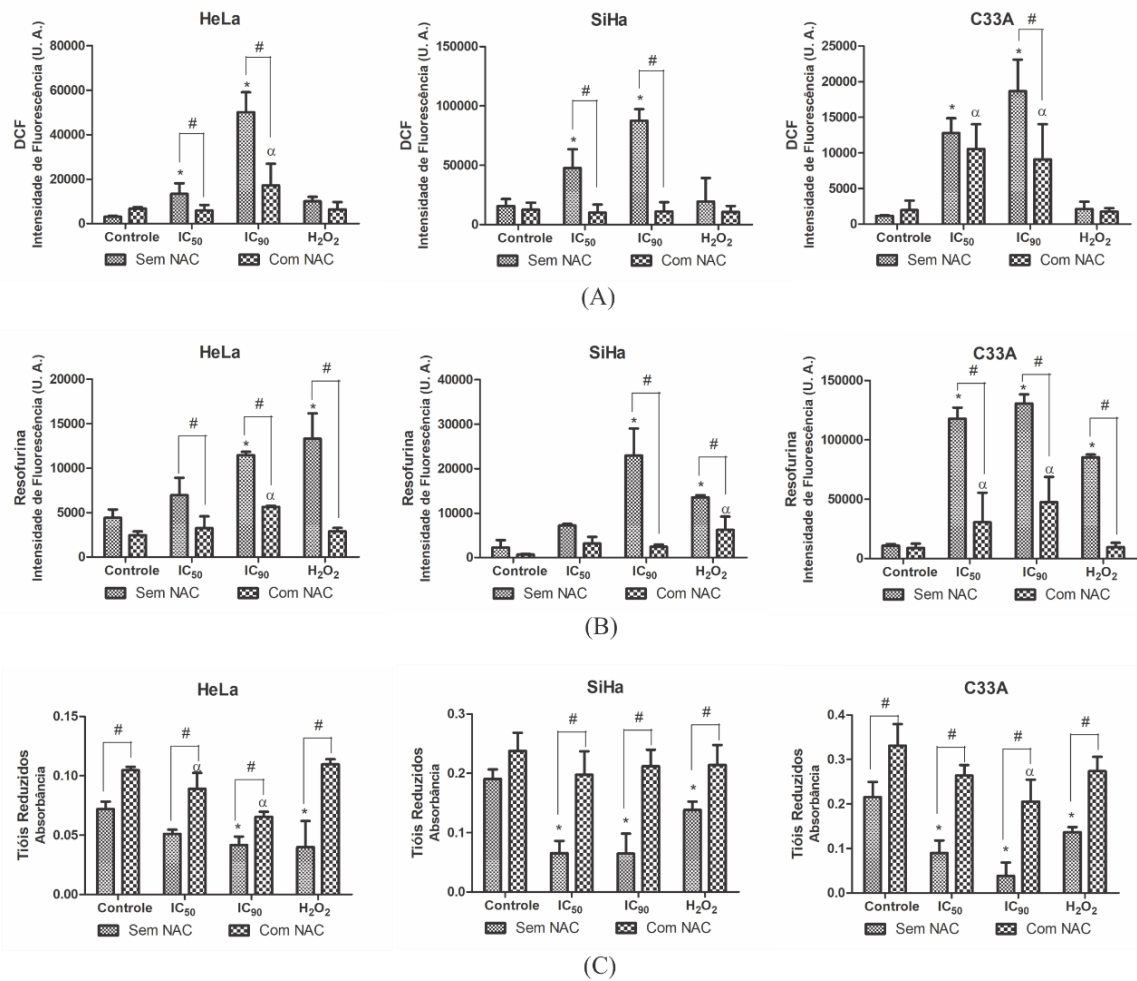


Figura 12. Aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e depleção nos níveis de tióis reduzidos em células de câncer cervical. Produção EROs (A), produção de peróxido de hidrogênio (B) e, níveis de tióis reduzidos (C) em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento. O controle positivo foi o H₂O₂ (200 μM). Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). $\alpha p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). # $p \leq 0,05$, diferença significativa entre o tratamento com e sem NAC (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

5.5 F2 INDUZIU DESPOLARIZAÇÃO DO POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL E REDUÇÃO NOS NÍVEIS DE ATP INTRACELULAR EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

Considerando as alterações ultraestruturais na mitocôndria das linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com **F2**, foi analisado o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) utilizando o marcador catiônico TMRE. Este marcador acumula-se em mitocôndrias ativas e emite fluorescência vermelha nas mitocôndrias polarizadas (WALSH et al., 2017). As três linhagens celulares tratadas com **F2** (IC₅₀ e IC₉₀) apresentaram uma significativa redução dose-dependente no $\Delta\Psi_m$ comparado com o controle (células não tratadas). A quantificação em espectrofluorímetro revelou que houve redução do $\Delta\Psi_m$, sendo que nas linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com a IC₅₀ a redução do $\Delta\Psi_m$ foi igual a 31,5%, 46,3% e 44,4%, respectivamente. Já na linhagem celular tratada com a IC₉₀, a redução do $\Delta\Psi_m$ foi igual a 49,1%, 52,7% e 49,5%, respectivamente. O $\Delta\Psi_m$ das células pré-incubadas com NAC apresentou uma menor despolarização. O desacoplador de membrana, CCCP, induziu a despolarização do $\Delta\Psi_m$ (Figura 13A).

De forma complementar, o $\Delta\Psi_m$ também foi avaliado por meio da microscopia de fluorescência (Figura 13B). As células do controle (células não tratadas; Fig. 13A, a, D, d, G, g) apresentaram intensa fluorescência vermelha, tipicamente encontrada em mitocôndrias polarizadas. Após o tratamento com **F2** (IC₅₀ e IC₉₀), a fluorescência vermelha diminuiu consideravelmente. As células pré-incubadas com NAC ainda apresentaram fluorescência vermelha. Desta forma, foram encontrados resultados similares para as alterações do $\Delta\Psi_m$ em ambas as técnicas.

A Figura 13C representa os níveis de ATP intracelular, determinados por meio do reagente Cell Titer-Glo, em células de câncer cervical. Um significativo decréscimo nos níveis de ATP intracelular foi observado nas linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com a IC₅₀ (49,7%, 71,4% e 73,2%, respectivamente) e IC₉₀ (94,4%, 96,7% e 84,3%, respectivamente) de **F2**. Nas células pré-incubadas com NAC e tratadas com a IC₉₀, os níveis de ATP intracelular reduziram 46,2%, 39,8% e 53,8% nas linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A, respectivamente. No controle positivo, KCN, houve redução na intensidade da luminescência (Figura 13C).

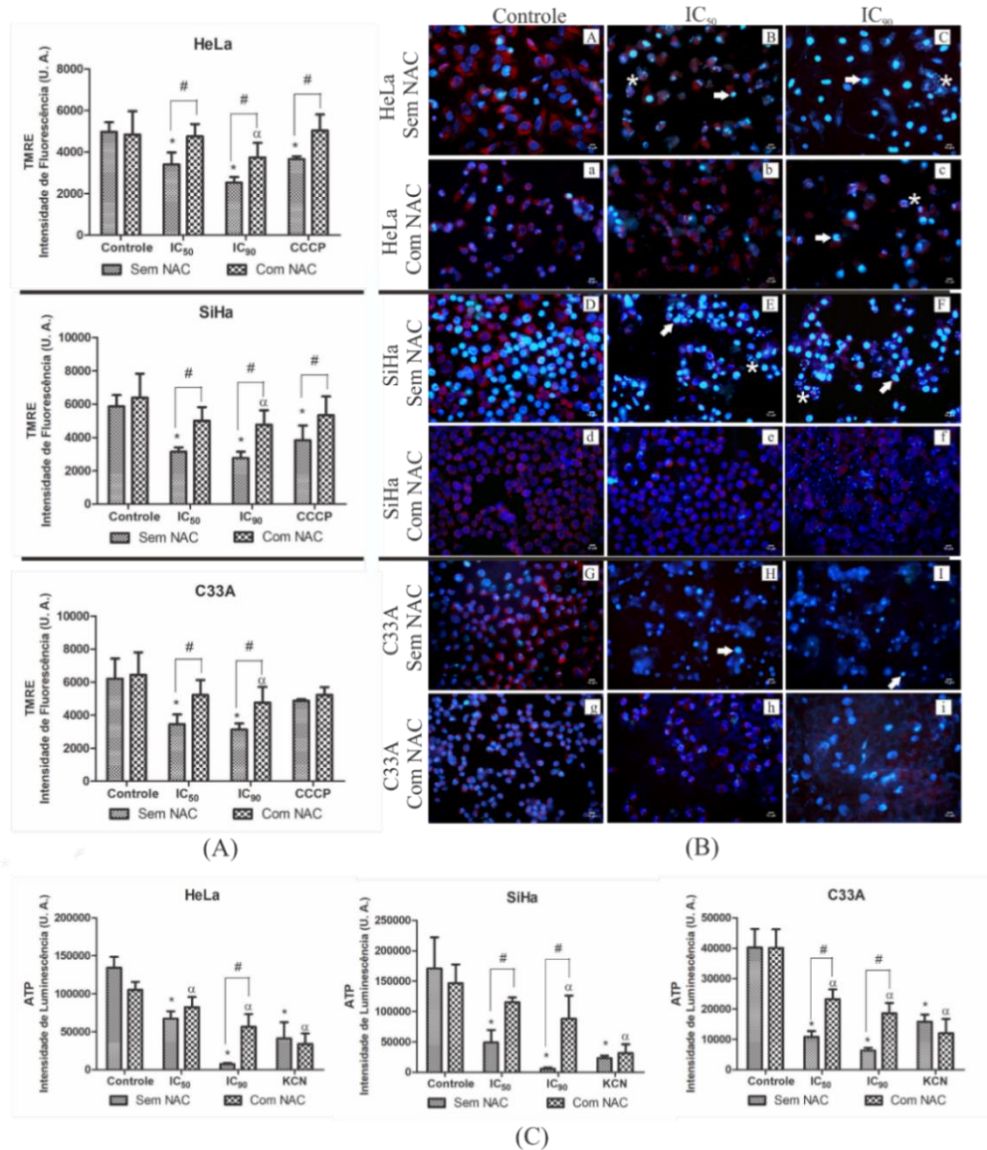


Figura 13. Despolarização do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e redução nos níveis de ATP intracelular em células de câncer cervical. (A) Quantificação do $\Delta\Psi_m$ por meio do marcador TMRE. (B) Análise da microscopia de fluorescência do $\Delta\Psi_m$ pelo marcador TMRE (fluorescência vermelha) e análise da integridade do DNA pelo marcador Hoechst 33342 (fluorescência azul), mostrando fragmentação do DNA (asterisco branco) e condensação da cromatina (seta branca). (C) Os níveis de ATP intracelular foram determinados por meio do reagente Cell Titer-GLO. As células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) foram tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. O controle positivo foi o CCCP (100 μ M) e o KCN (1000 μ M) para A e C, respectivamente. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). ^a $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). # $p \leq 0,05$, diferença significativa entre o tratamento com e sem NAC (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

5.6 F2 INDUZIU ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DO RNAm DO FATOR PRÓ-APOPTÓTICO, ANTI-APOPTÓTICO E CASPASES EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

As proteínas da família BCL-2 representam uma importante via na regulação da apoptose como promotor ou inibidor do processo de morte celular (HATA; ENGELMAN; FABER, 2015). A PCR em tempo real foi utilizada para avaliar os níveis de expressão do RNAm do fator pró-apoptótico (Bax) e anti-apoptótico (BCL-2). As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com **F2** (IC₅₀ e IC₉₀) apresentaram aumento dose-dependente na expressão relativa do RNAm do gene Bax (Figura 14A). As três linhagens celulares apresentaram redução dose-dependente na expressão relativa do RNAm do gene BCL-2 (Figura 14B), aumentando consequentemente a relação Bax/BCL-2 (Figura 14C). As células pré-incubadas com NAC apresentaram um menor aumento na expressão relativa do RNAm do gene Bax e menor redução na expressão relativa do RNAm do gene BCL-2, sugerindo que a *N*-acetilcisteína protegeu as células.

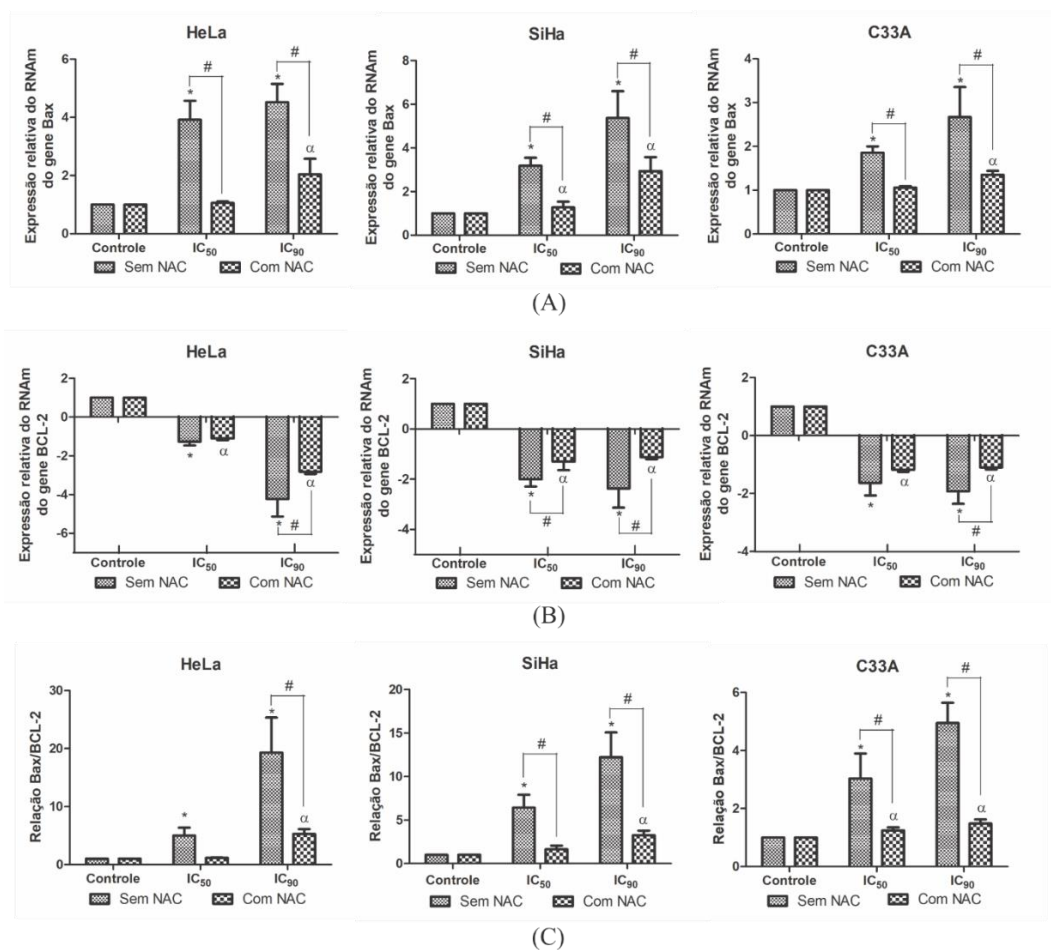


Figura 14. Alterações na expressão do RNAm do fator pró-apoptóticos e anti-apoptóticos em células de câncer cervical. A PCR em tempo real dos níveis de expressão relativa do RNAm do

gene Bax (A), BCL-2 (B) e da relação Bax/BCL-2 (C) em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 12 h. As células pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). ^a $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). # $p \leq 0,05$, diferença significativa entre o tratamento com e sem NAC (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

A maquinaria central da cascata apoptótica envolve as caspases, como a caspase 9 e a caspase 3 (PROKHOROVA et al., 2015). As três linhagens celulares tratadas com **F2** por 12 h apresentaram um aumento dose-dependente nos níveis de expressão relativa do RNAm do gene da caspase 9 e da caspase 3, principalmente para a linhagem celular HeLa e SiHa, respectivamente (Figura 15A, B). Todas as células pré-incubadas com NAC apresentaram níveis iguais ou menores na expressão relativa do RNAm do gene caspase 9 e caspase 3, quando comparado com as células tratadas somente com **F2**.

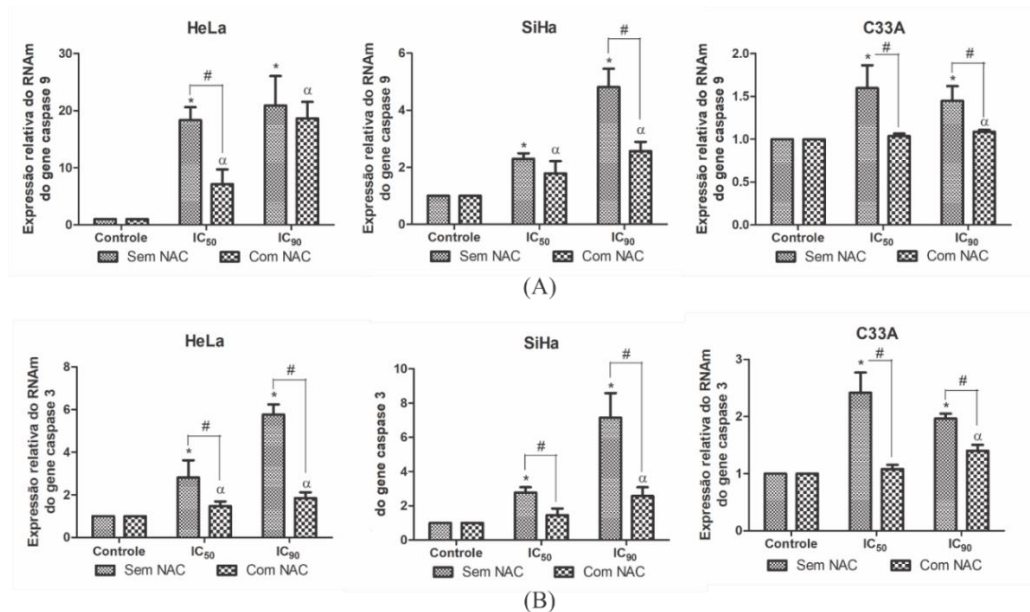


Figura 15. Aumento na expressão do RNAm das caspases 9 e 3 em células de câncer cervical. A PCR em tempo real dos níveis de expressão relativa do RNAm do gene caspase 9 (A) e caspase 3 (B) em células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 12 h. As células pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). ^a $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). # $p \leq 0,05$, diferença significativa entre o tratamento com e sem NAC (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

5.7 F2 INDUZIU FRAGMENTAÇÃO DO DNA EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

A ativação das caspases, principalmente da caspase 3, promove a fragmentação do DNA (LARSEN; SØRENSEN, 2017). A fragmentação do DNA, determinada por meio da eletroforese em gel de agarose, foi observada nas linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A após o tratamento com IC₅₀ ou IC₉₀ de **F2** quando comparado com as células controle (Figura 16). Observações similares foram encontradas na microscopia de fluorescência com Hoescht 33342, na qual também foi observado fragmentação do DNA e condensação da cromatina (Figura 13B). As células pré-incubadas com NAC apresentaram menor fragmentação do DNA (Figura 16).

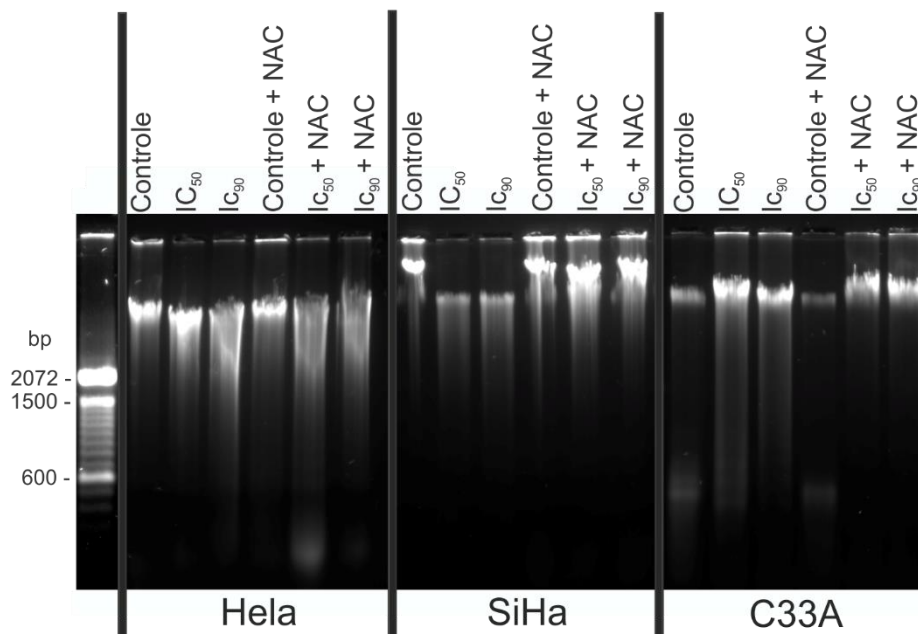


Figura 16. Fragmentação do DNA em células de câncer cervical. A fragmentação do DNA foi avaliada por meio da eletroforese em gel de agarose 1% nas células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. O marcador de peso molecular foi o 100 bp DNA Ladder. Os experimentos foram realizados em triplicata, reproduzindo resultados similares.

5.8 F2 INDUZIU LIPOPEROXIDAÇÃO E RUPTURA DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR EM CÉLULAS DE CÂNCER CERVICAL

A lipoperoxidação foi analisada por meio do marcador DPPP, o qual reage com hidroperóxidos lipídicos para gerar a substância fluorescente óxido de DPPP (OKIMOTO et al., 2000). O tratamento com **F2** aumentou significativamente a peroxidação lipídica nas linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com a IC₅₀ (472%, 670% e 840%,

respectivamente) e IC₉₀ (2.760%, 1.110% e 1.360%, respectivamente). A pré-incubação com NAC resultou em uma menor lipoperoxidação nas células tratadas com **F2** (Figura 17A). O controle positivo, H₂O₂, aumentou a lipoperoxidação.

A integridade da membrana celular foi analisada por meio do marcador iodeto de propídio (IP), uma significativa perda da integridade da membrana celular foi observada nas linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com a IC₅₀ (413%, 418% e 1.540%, respectivamente) e IC₉₀ (3.880%, 1.550% e 1.700%, respectivamente) de **F2** (Figura 17B). As células pré-incubadas com NAC exibiram um menor dano na membrana celular, especialmente quando tratadas com a IC₅₀. O controle positivo, digitonina, aumentou o dano na membrana celular.

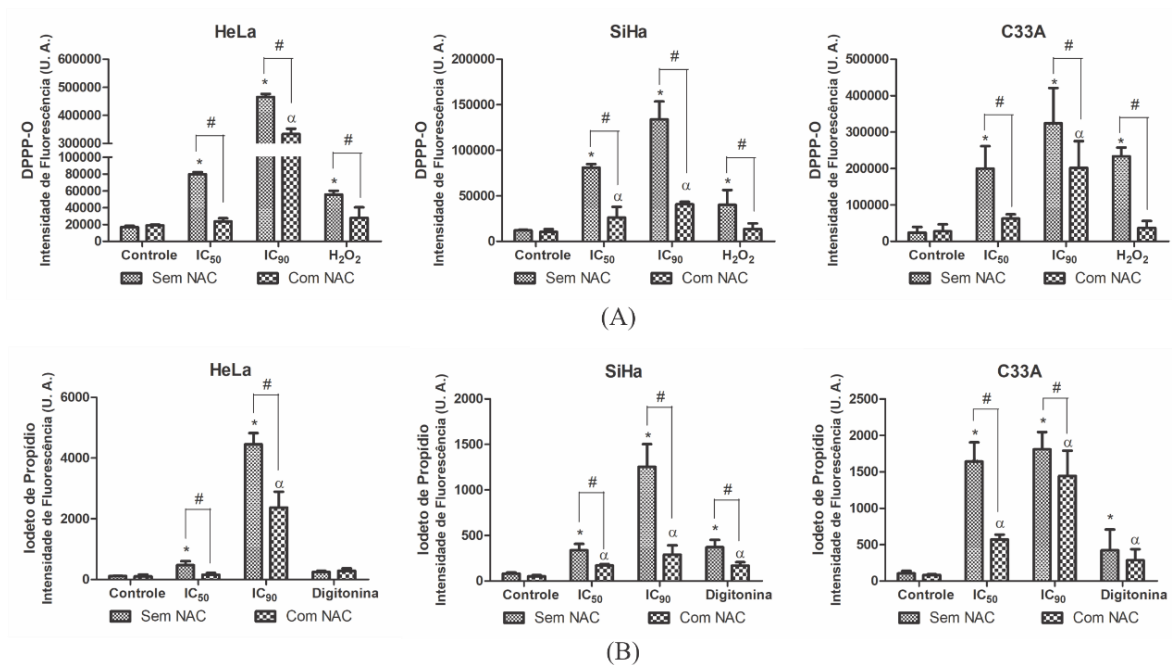


Figura 17. Aumento na lipoperoxidação e na ruptura da membrana celular em células de câncer cervical induzido por **F2**. Lipoperoxidação (A) e integridade da membrana celular (B) nas células de câncer cervical (HeLa, SiHa e C33A) tratadas com a fração enriquecida em proantocianidinas (**F2**; IC₅₀ e IC₉₀) por 24 h. As células foram pré-incubadas com ou sem *N*-acetilcisteína (5 mM) por 2 h antes do tratamento com **F2**. Os controles positivos foram H₂O₂ (200 μM) e digitonina (80 μM) para A e B, respectivamente. Os dados representam a média ± DP de três experimentos realizados em triplicata. * $p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle (células não tratadas; one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). $\alpha p \leq 0,05$, significativamente diferente quando comparado com o controle + NAC (one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Dunnett). # $p \leq 0,05$, diferença significativa entre o tratamento com e sem NAC (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

5.9 F2 APRESENTOU ATIVIDADE ANTITUMORAL *in vivo* EM TUMOR SÓLIDO DE EHRLICH

As avaliações anticâncer em modelos tumorais *in vivo* são essenciais para o desenvolvimento de novos tratamentos. A atividade antitumoral *in vivo* da fração enriquecida em proantocianidinas foi observada no modelo murino de tumor sólido de Ehrlich, no qual camundongos BALB/c foram tratados com 150 mg/kg/dia de **F2** por via oral durante 28 dias. O volume tumoral reduziu significativamente após o tratamento, ocorrendo 67,8% de inibição no crescimento tumoral (Figura 18A). **F2** reduziu significativamente o peso do tumor quando comparado com o controle, com 68,8% de redução no peso tumoral (Figura 18B).

A lipoperoxidação foi analisada no tumor para investigar a influência do estresse oxidativo, sendo realizada por meio do ensaio de TBARS em termo de malonaldeído (MDA) (POMPELLA et al., 1987; KUDRYAVTSEVA et al., 2016), sendo que, o tratamento com **F2** aumentou significativamente a lipoperoxidação no tumor (Figura 18C).

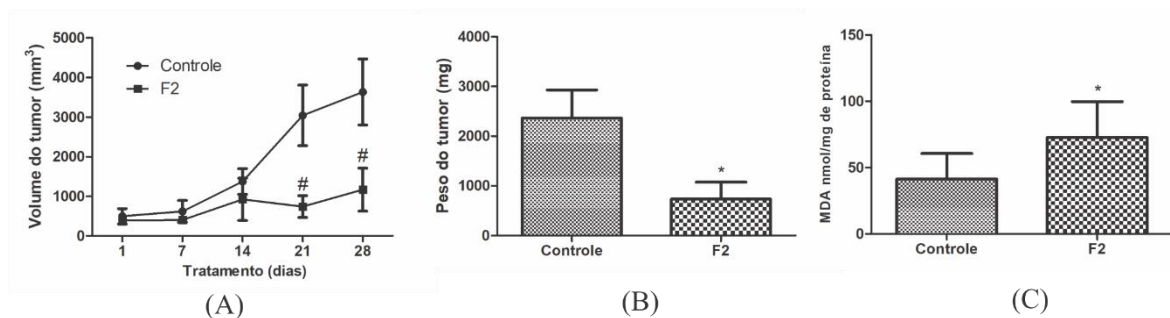


Figura 18. Atividade antitumoral *in vivo* da fração **F2** em camundongos BALB/c com tumor sólido de Ehrlich. O tratamento incluiu o controle (controle não tratado) e **F2** (150 mg/kg/dia). Ambos tratamentos foram administrados por via oral e diariamente durante 28 dias. (A) As dimensões do tumor sólido de Ehrlich foram obtidas semanalmente para realizar o cálculo do volume tumoral. (B) O tumor sólido de Ehrlich foi pesado após o animal ser eutanasiado. (C) Lipoperoxidação pela técnica de TBARS em termo de malonaldeído (MDA). Os dados representam a média \pm DP ($n = 5$ /grupo). * $p \leq 0,05$, significativamente diferente entre o grupo controle e o grupo **F2** (teste de Mann-Whitney). # $p \leq 0,05$, significativamente diferente entre o grupo controle e o grupo **F2** (two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

5.10 F2 MOSTROU-SE SEGURA E BEM TOLERADA NO ENSAIO CLÍNICO FASE I

No Ensaio Clínico Fase I da fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (**F2**), 40 mulheres saudáveis foram recrutadas, mas 2 voluntárias da pesquisa foram excluídas antes de iniciar o tratamento com a formulação por não atender aos critérios de inclusão ou por requerer a saída da presente pesquisa (Figura 19).

Desta forma, 38 mulheres receberam o gel contendo 5% de **F2**, mas 8 sujeitos foram perdidos no seguimento da pesquisa devido à descontinuação do tratamento. Assim, somente 30 mulheres retornaram após o uso da formulação, representando um retorno de 69,7% das mulheres selecionadas. A média de idade das mulheres saudáveis que concluíram o tratamento foi de $32,10 \pm 7,78$ anos (Figura 19).

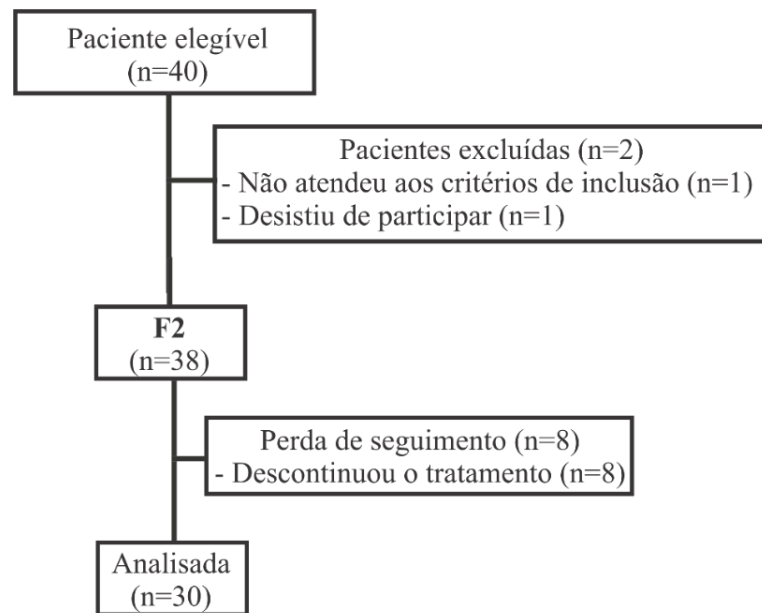


Figura 19. Esquema da distribuição das mulheres recrutadas para participar do Ensaio Clínico Fase I do gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (**F2**).

Após o tratamento com o gel contendo 5% de **F2** por via intravaginal durante 14 dias, não foram relatados casos de ardência vaginal, disúria, prurido vulvar e ulcerações no sistema geniturinário na avaliação clínica. Somente, uma mulher (1/30) relatou corrimento vaginal. Além disso, na avaliação clínica não foram relatadas alterações nos sistemas digestivo, cardiovascular, respiratório e cutâneo após o uso da formulação.

Na Tabela 1 encontram-se os dados do exame de sangue, especificamente o hemograma completo das pacientes antes e após o tratamento com o gel contendo 5% de **F2**. Conforme os valores de referência adotados, as pacientes enquadravam-se dentro da faixa de referência antes e após o uso do gel, apesar da significativa redução nos níveis de eritrócitos. Assim, o hemograma das pacientes ficou dentro da faixa considerada adequada, de forma que uso do gel contendo **F2** não alterou o hemograma, leucograma e níveis de plaquetas das mulheres saudáveis recrutadas.

Tabela 1. Parâmetros hematológicos de 30 mulheres antes e após o tratamento com o gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (F2) por via intravaginal durante 14 dias. Os dados representam a média \pm DP, sendo comparados com os valores de referência de cada parâmetro. RDW: amplitude de distribuição dos eritrócitos; VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: concentração da hemoglobina corpuscular média.

Parâmetros	Tratamento com gel contendo 5% de F2		Valores de referência [#]
	Antes do tratamento	Depois do tratamento	
Eritrócito (milhões/mm ³)	4,69 \pm 0,38	4,56 \pm 0,36*	4,00 - 5,20
Hemoglobina (g/dL)	13,58 \pm 1,24	13,37 \pm 1,02	12,0 - 16,0
Hematócrito (%)	41,06 \pm 3,37	40,39 \pm 2,66	36,0 - 47,0
RDW (%)	12,35 \pm 1,13	13,2 \pm 1,22	10,0 - 15,0
VCM (μ^3)	87,77 \pm 6,52	88,31 \pm 6,87	80,0 - 97,0
HCM (pg)	29,03 \pm 2,68	29,25 \pm 2,74	26,0 - 34,0
CHCM (%)	33,05 \pm 0,94	33,08 \pm 0,81	31,0 - 37,0
Leucócitos (mm ³)	7643,33 \pm 1961,65	7613,33 \pm 2255,99	4.000 - 10.000
Blastos (mm ³)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0
Promielócitos (mm ³)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0
Mielócitos (mm ³)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0
Metamielócitos (mm ³)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0
Bastonetes (mm ³)	4,30 \pm 23,55	18,87 \pm 53,17	0 - 400
Segmentados (mm ³)	4513,10 \pm 1505,04	4525,10 \pm 1779,16	1.800 - 7.500
Eosinófilos (mm ³)	207,70 \pm 187,37	207,67 \pm 168,90	40 - 450
Basófilos (mm ³)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0 - 100
Linfócitos Típicos (mm ³)	2490,93 \pm 573,81	2431,43 \pm 636,62	1.200 - 5.200
Linfócitos Atípicos (mm ³)	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0
Monócitos (mm ³)	424,37 \pm 174,88	382,87 \pm 143,35	80 - 800
Plaquetas (mil/mm ³)	310,97 \pm 67,91	310,87 \pm 71,68	150 - 400

*p \leq 0,05, significativamente diferente entre antes e após o tratamento com F2 (teste de Wilcoxon).

[#], valores de referência informados no laudo emitido pelo laboratório de análises clínicas contratado para realização dos exames.

Na Tabela 2 encontram-se os dados do exame das pacientes antes e após o tratamento com o gel contendo 5% de **F2** onde foram investigados diversos parâmetros com intuito de avaliar a função hepática, renal e metabólica das mulheres saudáveis.

A função hepática foi avaliada por meio da quantificação de gama glutamil transferase (γ GT), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina, bilirrubinas totais e frações. Apesar da significativa redução nos níveis de AST e ALT após o tratamento, os parâmetros que avaliaram a função hepática mantiveram-se dentro da faixa de referência após o tratamento com o gel contendo 5% de **F2**. Indicando assim, que **F2** não foi hepatotóxica na concentração testada (Tabela 2).

Os parâmetros que avaliaram a função renal foram os níveis de ureia e creatinina. De forma que tanto antes quanto após o tratamento com a formulação, os parâmetros que avaliaram a função renal mantiveram-se dentro da faixa de referência, que é de 15 a 45 mg/dL para ureia e de 0,6 a 1,2 mg/dL para creatinina (Tabela 2).

A avaliação dos níveis de proteínas totais e frações tanto antes quanto após o tratamento com a formulação apresentaram-se dentro da faixa de referência. Da mesma forma, os níveis dos eletrólitos sódio e potássio apresentaram-se dentro da faixa de referência adotada. Outro parâmetro avaliado foi o metabolismo de proteínas, por meio da análise dos níveis de ácido úrico, sendo que as pacientes apresentaram resultados de ácido úrico dentro da faixa de referência tanto antes quanto após o uso do gel (Tabela 2).

Assim, o uso de 4 g do gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (**F2**) diariamente via intravaginal por 14 dias não resultou em alterações na função hepática, renal e no metabolismo das mulheres saudáveis recrutadas para realização do Ensaio Clínico Fase I, com base nos parâmetros avaliados.

Além disso, todas as mulheres apresentaram resultado negativo para gonadotrofina coriônica humana (β -hCG) tanto antes quanto após o tratamento com o gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (**F2**), indicando que as mulheres selecionadas não estavam grávidas no início da pesquisa e nem engravidaram durante o uso da formulação.

Tabela 2. Parâmetros bioquímicos de 30 mulheres antes e após o tratamento com o gel contendo 5% de fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (F2) por via intravaginal durante 14 dias. Os dados representam a média \pm DP, sendo comparados com os valores de referência de cada parâmetro. γ GT: gama glutamil transferase; ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase.

Parâmetros	Tratamento com gel contendo 5% de F2		Valores de referência [#]
	Antes do tratamento	Depois do tratamento	
Creatinina (mg/dL)	0,81 \pm 0,09	0,78 \pm 0,07	0,6 - 1,2
Ureia (mg/dL)	24,57 \pm 7,62	24,00 \pm 7,66	15,0 - 45,0
Ácido Úrico (mg/dL)	3,87 \pm 0,78	3,85 \pm 0,88	1,5 - 6,0
γ GT (U/L)	30,59 \pm 22,45	30,09 \pm 20,98	Até 50,0
ALT (U/L)	24,17 \pm 8,91	21,97 \pm 6,79*	Até 36,0
AST (U/L)	22,37 \pm 9,81	19,30 \pm 6,00*	Até 34,0
Fosfatase alcalina (U/L)	62,50 \pm 24,50	63,71 \pm 19,38	42 - 98
Bilirrubina total e frações	Indireta (mg/dL)	0,24 \pm 0,12	Até 0,8
	Direta (mg/dL)	0,18 \pm 0,08	Até 0,4
	Total (mg/dL)	0,42 \pm 0,19	Até 1,2
Proteínas totais e frações	Globulinas (g/dL)	2,98 \pm 0,56	2,3 - 3,2
	Albuminas (g/dL)	4,13 \pm 0,35	3,5 - 5,0
	Proteínas Totais (g/dL)	7,11 \pm 0,51	6,0 - 8,0
Potássio (mEq/L)	4,34 \pm 0,37	4,25 \pm 0,37	3,6 - 5,1
Sódio (mEq/L)	139,10 \pm 2,38	137,63 \pm 2,88	135,0 - 144,0

* $p \leq 0,05$, significativamente diferente entre antes e após o tratamento com F2 (teste de Wilcoxon).

[#], valores de referência informados no laudo emitido pelo laboratório de análises clínicas contratado para realização dos exames.

6 DISCUSSÃO

Diversas propriedades relatadas na medicina tradicional fazem com que *S. adstringens* seja alvo de investigações científicas a fim de comprovar e até identificar novas atividades terapêuticas (SOUZA-MOREIRA; QUEIROZ-FERNANDES; PIETRO, 2018).

As cascas de *S. adstringens* são uma reconhecida e abundante fonte de taninos condensados, também denominados como proantocianidinas (MELLO; PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996a, 1996b, 1999; SANTOS et al., 2002). Da mesma forma, a fração aquosa das cascas de *S. adstringens* também é abundante em polímeros de proantocianidinas, constituídos por unidades de prodelfinidinas e prorobinetinidinas (ISHIDA et al., 2006).

As proantocianidinas são amplamente investigadas para a terapia do câncer (NANDAKUMAR; SINGH; KATIYAR, 2008; ZHOU et al., 2016). Assim, neste trabalho foi avaliada a atividade da fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (**F2**) em linhagens celulares de câncer, especificamente em linhagens celulares de câncer cervical.

No presente trabalho, o tratamento com **F2** reduziu de forma tempo- e dose-dependentes a viabilidade das linhagens celulares de câncer cervical HeLa (HPV18-positivo), SiHa (HPV16-positivo) e C33A (HPV-negativo). Dados semelhantes de atividade citotóxica também foram observados no tratamento de células de câncer cervical com proantocianidinas oriundas de sementes de uva (CHEN; LIU; ZHENG, 2014). Além disso, deve-se destacar que **F2** foi significativamente menos tóxica para os queratinócitos humanos imortalizados (ou linhagem celular HaCaT) quando comparado com as linhagens celulares de câncer cervical. Segundo ISHIDA et al. (2006), a concentração citotóxica de **F2** para macrófagos J774-G8 e para as células VERO foi igual a 125 e 150 µg/mL, respectivamente. No ensaio de hemólise, **F2** não foi hemolítica até a concentração de 1.000 µg/mL (ISHIDA et al., 2006). Resultados *in vitro* que ajudam a reforçar a segurança toxicológica de **F2**.

A migração e a invasão das células tumorais são um dos primeiros passos no processo multietapas da cascata da metástase (CLARK; VIGNJEVIC, 2015; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017). O ensaio de cicatrização da ferida é um método simples e barato capaz de avaliar *in vitro* a migração celular (LIANG; PARK; GUAN, 2007). No ensaio de cicatrização da ferida realizado com as linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A, o tratamento com **F2** inibiu significativamente a migração das células tumorais. Indicando assim, que **F2** provavelmente é capaz de evitar a ocorrência de metástase.

Na microscopia invertida de contraste de fase, a morfologia das três linhagens celulares de câncer cervical mostrou intensas alterações, como irregularidade no formato, descolamento celular e, presença de halo claro em torno do núcleo.

A análise ultraestrutural por meio da microscopia eletrônica de transmissão (MET) é considerada o “padrão ouro” para o entendimento e classificação do tipo de morte celular (VANDEN BERGHE et al., 2013). Geralmente, as células apoptóticas sofrem fragmentação e condensação do núcleo, associado ao inchaço das suas organelas, como por exemplo, inchaço mitocondrial. As células em apoptose podem evoluir para um processo tardio de necrose secundária, que caracteriza-se pela ruptura da membrana celular (WONG, 2011).

Juntamente com a metodologia de MET, também foi realizada a dupla marcação com laranja de acridina (LA) e iodeto de propídio (IP) para auxiliar na classificação do tipo de morte celular. As linhagens celulares HeLa e SiHa tratadas com a IC₅₀ de **F2** apresentaram intensas alterações nucleares e mitocondriais, além de aumento na porcentagem de células em apoptose inicial. Por outro lado, as linhagens celulares HeLa e SiHa tratadas com a IC₉₀ de **F2** também resultaram na ruptura da membrana celular, que é característica de apoptose tardia e necrose secundária, eventos também observados na dupla marcação com LA/IP. Nas células C33A, todas as alterações mencionadas na MET e na dupla marcação com LA/IP foram observadas para ambos os tratamentos com **F2** (IC₅₀ e IC₉₀), indicando a ocorrência de apoptose tardia e necrose secundária.

Contudo, o antioxidante sintético *N*-acetilcisteína (NAC) preservou a ultraestrutura das organelas e aumentou a viabilidade celular na dupla marcação com LA/IP. O NAC é capaz de sequestrar espécies reativas de oxigênio (EROs) e intensificar a ação do sistema antioxidante endógeno devido a capacidade de aumentar a síntese de glutathiona (GSH) (ZAFARULLAH et al., 2003). Provavelmente devido a tais propriedades, houve aumento na viabilidade celular das células pré-incubadas com NAC. Por esta razão, nós avaliamos a ocorrência do estresse oxidativo nas três linhagens celulares.

O estresse oxidativo é definido como a falta de equilíbrio entre a geração de EROs e a atividade do sistema antioxidante endógeno (SOSA et al., 2013). EROs são moléculas reativas de vida curta que contêm elétrons desemparelhados, podendo estar na forma de radical, como o radical hidroxila (OH[•]) ou ainda, na forma não-radicalar, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (MOLONEY; COTTER, 2017). Dentre os antioxidantes endógenos, há os antioxidantes intracelulares que contêm grupos tióis, como a glutathiona (GSH), que é o mais abundante agente sequestrador de EROs da célula (SOSA et al., 2013).

As células tumorais se distinguem por apresentarem um alto nível de estresse oxidativo. Assim, o acúmulo de EROs nas células tumorais é mais prejudicial que nas células normais. Desta forma, um aumento nos níveis de estresse oxidativo induz preferencialmente a morte de células tumorais (PANIERI; SANTORO, 2016; GORRINI; HARRIS; MAK, 2013).

As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com **F2** apresentaram um significativo aumento dose-dependente na geração de EROs e uma significativa depleção no nível de tióis reduzidos, indicando que um intenso estresse oxidativo provavelmente desencadeou o processo de morte celular. Sugerindo que as propriedades pró-oxidantes de **F2** promoveram a morte das linhagens celulares de câncer cervical.

Da mesma forma, outros polifenóis também são capazes de induzir o estresse oxidativo (MILEO; MICCADEI, 2016; MAO et al., 2017). Além disso, a pré-incubação com o antioxidante NAC reverteu o estresse oxidativo, confirmando que este efeito mediou a morte das células tumorais. Na literatura há relatos de que a pré-incubação com NAC também preveniu a ocorrência do estresse oxidativo em outras linhagens tumorais (CHANG et al., 2017; SHIAU et al., 2017).

A mitocôndria é a maior fonte de EROs intracelular e, um aumento desproporcional na produção de EROs, como observado no estresse oxidativo, pode resultar em mitocôndrias disfuncionais (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). Distúrbios na integridade da membrana mitocondrial podem culminar em apoptose, geralmente manifestada pela despolarização do seu potencial de membrana mitocondrial e pela redução nos níveis de ATP (SINHA et al., 2013).

No presente estudo, as três linhagens celulares tratadas com **F2** apresentaram uma significativa redução dose-dependente no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e nos níveis de ATP intracelular. Contudo, nas células pré-incubadas com NAC houve uma menor despolarização do $\Delta\Psi_m$ e níveis mais elevados de ATP intracelular. Indicando que o antioxidante sintético protegeu a integridade da mitocôndria dos danos induzidos pelo excesso de EROs nas células tratadas com a IC_{50} de **F2**. A produção de EROs foi incompletamente sequestrada pelo NAC quando as células foram tratadas com a IC_{90} , também revelado por meio dos danos mitocondriais observados nas micrografias de MET.

Em outro trabalho, *S. adstringens* induziu danos em mitocôndrias isoladas de fígado de ratos devido ao desacoplamento da fosforilação oxidativa, inibição da cadeia transportadora de elétrons e por meio da inibição da ATP-sintase (REBECCA et al., 2003).

Considerando a ocorrência da despolarização do $\Delta\Psi_m$, foi avaliada a integridade da membrana mitocondrial. A despolarização mitocondrial pode resultar na formação de poros, mecanismo controlado pela família BCL-2, especificamente pelos fatores pró-apoptóticos Bax e anti-apoptóticos BCL-2 (SINHA et al., 2013). Sendo que, o aumento nos níveis da proteína Bax leva a formação de poros multiméricos na membrana mitocondrial, resultando na liberação de fatores pró-apoptóticos dentro do citoplasma. As proteínas BCL-2 previnem a liberação destes fatores pró-apoptóticos dentro do citoplasma, protegendo assim a célula da apoptose (HATA; ENGELMAN; FABER, 2015).

Desta forma, a análise da relação Bax/BCL-2 é crítica para avaliar danos na membrana mitocondrial. Sendo que houve um significativo aumento na relação Bax/BCL-2 após o tratamento com **F2** (IC₅₀ e IC₉₀) nas linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A. Por outro lado, nas células pré-incubadas com NAC houve uma redução na relação Bax/BCL-2, reduzindo assim a susceptibilidade das células a apoptose.

No tratamento com **F2**, os danos mitocondriais associados com o aumento da relação Bax/BCL-2 provavelmente induziram a apoptose via intrínseca ou mediada pela mitocôndria. Nesta via, fatores pró-apoptóticos são liberados dentro do citoplasma por meio dos poros formados na membrana mitocondrial. Dentre estes fatores encontra-se o citocromo c, o qual se liga ao fator apoptótico de ativação de protease 1 (Apaf-1) e a pró-caspase 9 para formar o apoptossomo que ativa a pró-caspase 3, promovendo assim os danos celulares característicos da apoptose (ASHKENAZI et al., 2017).

As linhagens celulares HeLa, SiHa e C33A tratadas com **F2** (IC₅₀ e IC₉₀) apresentaram um aumento dose-dependente da expressão do RNAm das caspases 9 e 3. As três linhagens celulares de câncer cervical pré-incubadas com NAC apresentaram igual ou menor nível de expressão do RNAm das caspases 9 e 3 quando comparado com as células tratadas somente com **F2**, confirmando assim que o efeito protetivo do NAC decorre da redução na intensidade do estresse oxidativo celular.

A ativação da caspase 3 favorece a fragmentação do DNA, em razão da inativação proteolítica da subunidade alfa do fator de fragmentação do DNA (ICAD), e consequente ativação catalítica do CAD (NAGATA, 2005; GALLUZZI et al., 2018). Sendo que, a fragmentação do DNA é um evento característico do processo apoptótico (PROKHOROVA et al., 2015). As três linhagens celulares de câncer cervical sofreram fragmentação do DNA após o tratamento com **F2** (IC₅₀ e IC₉₀), resultados revelados por meio da eletroforese em gel de agarose e da marcação com Hoechst 33342, confirmando assim a ocorrência do processo

apoptótico. A fragmentação do DNA também foi observada em células de câncer de mama tratadas com frações das folhas de *S. adstringens* (SABINO et al., 2018).

Além disso, o estresse oxidativo induz a lipoperoxidação, especificamente por meio da geração de hidroperóxidos lipídicos que afetam estruturas lipídicas, como as membranas celulares (KUDRYAVTSEVA et al., 2016). O tratamento com **F2** (IC₅₀ e IC₉₀) aumentou significativamente a lipoperoxidação nas três linhagens celulares de câncer cervical. O acúmulo de hidroperóxidos lipídicos associado com a depleção nos níveis de tióis reduzidos e a redução dos níveis de ATP intracelular podem promover a ruptura da membrana celular, resultando em células com morfologia típica de necrose (HIGUCHI, 2004; RYTER et al., 2007; RASOLA; BERNARDI, 2011). Assim, uma intensa ruptura na membrana celular foi observada após o tratamento com a IC₅₀ de **F2** nas células C33A e nas três linhagens celulares tratadas com a IC₉₀ de **F2**, como já observado na microscopia eletrônica de transmissão e na dupla marcação do LA/IP. A lipoperoxidação foi menor nas células pré-incubadas com NAC. Além disso, a pré-incubação com NAC também reduziu os danos na membrana celular. Tais resultados reforçam que o antioxidante sintético NAC protegeu as três linhagens celulares de câncer cervical por meio da redução do estresse oxidativo.

As linhagens celulares HeLa e SiHa contêm HPV18 e HPV16 integrado ao seu DNA, respectivamente (DING et al., 2007). Nestas linhagens celulares, o tratamento com **F2** induziu o estresse oxidativo e danos mitocondriais. Além disso, também houve ruptura da membrana celular no tratamento com altas concentrações (IC₉₀) de **F2**. A linhagem celular C33A não contém o HPV, mas há uma mutação na p53 que leva a perda do controle do ciclo celular (DING et al., 2007). Na linhagem celular C33A, além do estresse oxidativo, também foi observada uma notável ruptura da membrana celular em ambos tratamentos. As diferentes respostas celulares são provavelmente atribuídas aos diferentes níveis basais de EROs e espécies antioxidantes endógenas em cada linhagem celular (FILIPPOVA et al., 2014).

Os modelos tumorais *in vivo* são essenciais para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer (JUNG, 2014). Dentre os modelos experimentais há o tumor de Ehrlich, que é originário de um adenocarcinoma mamário murino. As células de carcinoma ascítico de Ehrlich podem desenvolver a forma ascítica do tumor quando administrado por via intraperitoneal. Contudo, quando as células de carcinoma ascítico de Ehrlich são inoculadas por via subcutânea, desenvolve-se o tumor sólido (OZASLAN et al., 2013). Na literatura há relatos de diferentes substâncias que tiveram sua atividade antitumoral *in vivo* avaliada por meio do modelo murino

de tumor sólido de Ehrlich (NOAMAN et al., 2008; BISWAS et al., 2016; SRIVASTAVA et al., 2016).

Baseando-se nos promissores resultados de redução da viabilidade celular *in vitro* promovidos pela **F2**, foi avaliada a atividade antitumoral *in vivo* por meio do modelo murino de tumor sólido de Ehrlich. A administração por via oral de 150 mg/kg/dia de **F2** reduziu significativamente o volume e o peso do tumor após 28 dias de tratamento. Resultados semelhantes também foram observados após o tratamento do tumor sólido de Ehrlich com combinações das substâncias vanila e doxorrubicina (ELSHARBINY et al., 2016).

Conforme os resultados obtidos na avaliação do mecanismo de ação *in vitro* pode-se concluir que a atividade pró-oxidante de **F2** induziu o estresse oxidativo nas células de câncer cervical, resultando em uma intensa lipoperoxidação. Da mesma forma, houve aumento da lipoperoxidação nos tumores tratados com **F2**, indicando que **F2** provavelmente induziu estresse oxidativo no modelo tumoral *in vivo*. Como demonstrado em trabalhos prévios, diversos polifenóis causam lipoperoxidação devido a intensa geração de EROs (LEÓN-GONZÁLEZ; AUGER; SCHINI-KERTH, 2015).

Outra vertente fundamental é a avaliação da segurança toxicológica da fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (**F2**). Em estudos prévios, nosso grupo de pesquisa realizou ensaios de toxicidade pré-clínica, como os ensaios de genotoxicidade, toxicidade aguda e toxicidade crônica em roedores.

No ensaio de genotoxicidade, **F2** não foi capaz de provocar efeito genotóxico até a concentração de 2.250 mg/kg/dia por via oral em camundongos *Mus musculus* (Swiss) (COSTA et al., 2010). No ensaio de toxicidade aguda em camundongos Swiss, a Dose Letal (DL₅₀) foi de 3.015 mg/kg/dia e, em doses inferiores houve reversão de possíveis efeitos colaterais (COSTA et al., 2013). Da mesma forma, no ensaio de toxicidade crônica realizado em ratos Wistar com administração oral de **F2** (10, 100 e 200 mg/kg/dia) durante 90 dias não houve diferença significativa nos parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos avaliados (COSTA et al., 2013).

Considerando que **F2** mostrou-se segura nos ensaios pré-clínicos realizados em animais, iniciou-se a avaliação da segurança toxicológica em humanos por meio do Ensaio Clínico Fase I (COSTA, 2011). O Ensaio Clínico Fase I proposto buscou avaliar a segurança e a tolerância do uso intravaginal de **F2**. Para isso, foi desenvolvido o gel vaginal contendo 0,5% e 1,25% de **F2**, sendo a base do gel composta pelo polímero Carbopol® (COSTA et al., 2018). As formulações foram utilizadas por mulheres saudáveis por via intravaginal durante 14 dias,

sendo que não houve alterações significativas nos parâmetros avaliados (avaliação clínica e laboratorial) após o uso de ambas formulações (COSTA, 2011).

Ainda em busca de avaliar a segurança e tolerância da fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* (F2), nós realizamos uma nova etapa do Ensaio Clínico Fase I, onde foi avaliado o uso do gel vaginal contendo 5% de F2 durante 14 dias. No presente trabalho foram selecionadas 38 mulheres saudáveis para o Ensaio Clínico Fase I, das quais 30 retornaram após o uso do gel vaginal contendo 5% de F2, representando um retorno de 69,7% das mulheres selecionadas.

Na avaliação clínica, não houve alterações relevantes no sistema geniturinário, digestivo, cardiovascular, respiratório e cutâneo após o tratamento intravaginal com o gel contendo 5% de F2. Da mesma forma, outro trabalho mostrou que a administração intravaginal do produto natural, curcumina, foi considerada segura (GATTOC et al., 2017).

Os parâmetros hematológicos permaneceram dentro da faixa de referência após o tratamento por 14 dias consecutivos com a formulação. Da mesma forma, após o tratamento, os parâmetros bioquímicos que avaliaram a função hepática permaneceram dentro da faixa de referência. Além disso, não houve alterações significativas na função renal. Resultados semelhantes também foram observados com o extrato das folhas de *Maytenus ilicifolia*, no qual ocorreram poucas alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos, sendo que sua administração foi considerada bem tolerada (TABACH; DUARTE-ALMEIDA; CARLINI, 2017).

Durante o tratamento com a formulação, 7 mulheres (7/38) descontinuaram o uso da formulação por iniciativa própria, devido a diversas razões como, viagem, doença não relacionada com o sistema geniturinário e, esquecimento da aplicação diária da formulação por 14 dias consecutivos. Dentre os sujeitos que descontinuaram o uso da formulação, uma mulher (1/38) foi retirada do Ensaio Clínico Fase I por apresentar edema corporal, provavelmente relacionado à alguma alergia aos componentes da formulação. Além disso, 16% (5/30) das mulheres reportaram um leve desconforto na região pélvica semelhante a uma cólica menstrual, este incômodo provavelmente decorre de uma leve contração uterina.

A formulação apresentou coloração avermelhada em decorrência da alta concentração de taninos oriundos da fração de *S. adstringens*. Sendo que esta coloração avermelhada foi motivo de descontentamento para grande parte das participantes do Ensaio Clínico Fase I. Apesar da intensidade da insatisfação ser diferente entre as mulheres, esta característica

organoléptica é uma limitação para a aceitação da formulação. Dificuldade também enfrentada na administração intravaginal da curcumina (GATTOC et al., 2017).

Por outro lado, 93,33% (28/30) das mulheres que participaram do Ensaio Clínico Fase I reportaram uma efetiva retenção intravaginal do gel contendo 5% de **F2**. Sendo que este ponto positivo decorreu do fato da formulação basear-se no polímero Carbopol®, o qual apresenta uma intensa capacidade mucoadesiva (COOK; BROWN, 2018).

Durante o Ensaio Clínico Fase I, nós enfrentamos dificuldades para recrutar mulheres, visto que são mulheres saudáveis e, a grande maioria alegava que não precisava de tratamento ou que não tinha interesse em participar da pesquisa clínica. Obstáculo também relatado por RANASINGHE et al. (2017).

Conforme NAPPO et al. (2013), a participação em estudos de pesquisa clínica está relacionada predominantemente com algum tipo de benefício pessoal (ganho financeiro e/ou alternativa terapêutica), de forma que o altruísmo não é a principal razão para a adesão de um voluntário à pesquisa clínica. Assim, pode-se concluir que no presente Ensaio Clínico Fase I, o gel contendo 5% de **F2** administrado por via intravaginal durante 14 dias foi seguro e bem tolerado, visto que não apresentou alterações significativas nos parâmetros sistêmicos e locais avaliados. Contudo, tais resultados não descartam possíveis eventos adversos da formulação, especialmente reações de baixa frequência.

Considerando as evidências de segurança obtidas nos Ensaios Clínicos Fase I associado com as atividades *in vitro* e *in vivo* de **F2**, pode-se propor a realização do Ensaio Clínico Fase II do gel vaginal contendo diferentes concentrações de **F2**. Desta forma, pode-se avaliar a atividade farmacológica de **F2** em mulheres com candidíase vulvovaginal, visto que o tratamento com o gel contendo 5% de **F2** foi capaz de controlar eficientemente a infecção vaginal causada por *C. albicans* e *C. glabrata* em modelo murino de candidíase vaginal (FREITAS et al., 2018). Além disso, baseando-se na atividade citotóxica *in vitro* de **F2** em linhagens celulares de câncer cervical e na atividade antitumoral *in vivo* defendidas pelo presente trabalho, pode-se considerar a possibilidade de **F2** ser uma alternativa terapêutica para o tratamento do câncer cervical.

7 CONCLUSÃO

A fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* reduziu a viabilidade das linhagens celulares de câncer cervical HeLa (HPV18-positivo), SiHa (HPV16-positivo) e C33A (HPV-negativo) de forma tempo- e dose-dependentes. Além disso, o tratamento com **F2** inibiu a migração celular nas três linhagens celulares.

Nas linhagens celulares HeLa e SiHa, o tratamento com **F2** (IC₅₀) induziu o estresse oxidativo em razão da intensa produção de EROs e depleção nos níveis de tióis reduzidos. Além disso, também induziu danos mitocondriais suficientes para desencadear a apoptose mediada pela mitocôndria, como despolarização do potencial de membrana mitocondrial, redução nos níveis de ATP intracelular e aumento na relação Bax/BCL-2, associado ao aumento na expressão de caspase 9, caspase 3, e danos no DNA. Além destas alterações, na linhagem celular C33A tratada com concentrações referentes à IC₅₀ e IC₉₀, e nas células HeLa e SiHa tratadas com a IC₉₀ de **F2** também houve aumento na lipoperoxidação e ruptura da membrana celular, indicando um progresso para a apoptose tardia/necrose. A inibição da produção de EROs pelo antioxidante sintético *N*-acetilcisteína suprimiu significativamente o estresse oxidativo nas três linhagens celulares.

A atividade antitumoral *in vivo*, avaliada por meio do modelo murino de tumor sólido de Ehrlich, mostrou que **F2** reduziu o volume e o peso dos tumores de forma significativa. Da mesma forma que nos resultados encontrados *in vitro*, **F2** aumentou significativamente a lipoperoxidação no tumor, indicando que **F2** também induziu estresse oxidativo no modelo tumoral *in vivo*.

O Ensaio Clínico Fase I mostrou que o gel vaginal contendo 5% de **F2** administrado por via intravaginal durante 14 dias foi seguro e bem tolerado, visto que não apresentou alterações nos parâmetros sistêmicos e locais avaliados.

Considerando os resultados de viabilidade em linhagens celulares de câncer cervical, atividade antitumoral *in vivo* e segurança em humanos, podemos concluir que a fração enriquecida em proantocianidinas de *S. adstringens* pode ser um candidato em potencial para o tratamento do câncer cervical.

8 REFERÊNCIA

- AFSAR, T. et al. Growth inhibition and apoptosis in cancer cells induced by polyphenolic compounds of *Acacia hydaspica*: Involvement of multiple signal transduction pathways. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 23077, 2016.
- AKSOY, P.; GOTTSCHALK, E. Y.; MENESES, P. I. HPV entry into cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 13–22, 2017.
- ALAM, M. N.; ALMOYAD, M.; HUQ, F. Polyphenols in Colorectal Cancer: Current State of Knowledge including Clinical Trials and Molecular Mechanism of Action. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–29, 2018.
- ALBUQUERQUE, U. P. DE et al. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 76–91, 2007.
- ALMEIDA, L. M. et al. Human Papillomavirus Genotype Distribution among Cervical Cancer Patients prior to Brazilian National HPV Immunization Program. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2017, p. 1–9, 2017.
- ASHKENAZI, A. et al. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 4, p. 273–284, 2017.
- ASHOK, P. K.; UPADHYAYA, K. Tannins are astringent. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 1, n. 3, p. 45–50, 2012.
- AUDI, E. A. et al. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 3, p. 264–266, 1999.
- AUDI, E. A. et al. Biological activity and quality control of extract and stem bark from *Stryphnodendron adstringens*. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 328–333, 2004.
- BEKOS, C. et al. Influence of age on histologic outcome of cervical intraepithelial neoplasia during observational management: Results from large cohort, systematic review, meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018.
- BERGHE, T. VANDEN et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. **Cell Death & Differentiation**, v. 17, n. 6, p. 922–930, 2010.
- BISWAS, S. et al. *Bulbophyllum sterile* petroleum ether fraction induces apoptosis *in vitro* and ameliorates tumor progression *in vivo*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1419–1427, 2016.
- BODA, D. et al. Human papilloma virus: Apprehending the link with carcinogenesis and unveiling new research avenues (Review). **International Journal of Oncology**, v. 52, n. 3, p. 637–655, 2018.
- BRASIL. Resolução N° 196. Aprova As Diretrizes E Normas Regulamentadoras De Pesquisas

- Envolvendo Seres Humanos. **Ministério da Saúde. Conselho Nacional De Saúde.**, 1996.
- BRASIL. Resolução N° 251. Aprova as normas de pesquisa envolvendo seres humanos para a área temática de pesquisa com novos fármacos, medicamentos, vacinas e testes diagnósticos. **Ministério da Saúde. Conselho Nacional De Saúde.**, 1997.
- BRASIL. Instruções operacionais: Informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos. **Ministério da Saúde Organização Mundial da Saúde**, 2008.
- BRASIL. Resolução N° 466. Aprova as normas e diretrizes regulamentares de pesquisas envolvendo seres humanos. **Ministério da Saúde. Conselho Nacional De Saúde.**, 2012.
- BRASIL. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Agência Nacional De Vigilância Sanitária**, v. Versão II, p. 1–48, 2013.
- BURD, E. M.; DEAN, C. L. Human Papillomavirus. **Microbiology spectrum**, v. 4, n. 4, p. 177–195, 2016.
- CAI, Y. et al. Recent Advances in Anticancer Activities and Drug Delivery Systems of Tannins. **Medicinal Research Reviews**, v. 37, n. 4, p. 665–701, jul. 2017.
- CALIXTO-CAMPOS, C. et al. Quercetin Reduces Ehrlich Tumor-Induced Cancer Pain in Mice. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2015, p. 1–18, 2015.
- CARVALHO, A. C. B. et al. Regulation of herbal medicines in Brazil: advances and perspectives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 467–473, set. 2011.
- CARVALHO, A. C. B. et al. Regulation of herbal medicines in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 158, n. PART B, p. 503–506, 2014.
- CARVALHO, A. C. B. et al. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, n. May 2017, p. 29–35, 2018.
- CASTLE, P. E. et al. Treatment of cervical intraepithelial lesions. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 138, p. 20–25, 2017.
- CHANG, H.-W. et al. Withaferin A Induces Oxidative Stress-Mediated Apoptosis and DNA Damage in Oral Cancer Cells. **Frontiers in Physiology**, v. 8, n. September, p. 1–11, 2017.
- CHEN, Q.; LIU, X.-F.; ZHENG, P.-S. Grape Seed Proanthocyanidins (GSPs) Inhibit the Growth of Cervical Cancer by Inducing Apoptosis Mediated by the Mitochondrial Pathway. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e107045, 2014.
- CHEN, W. et al. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 48, n. 5, p. 1375–1380, 2008.

CHEN, X.-X. et al. Proanthocyanidins from *Uncaria rhynchophylla* induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells while enhancing cytotoxic effects of 5-fluorouracil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 248–260, set. 2017.

CLARK, A. G.; VIGNJEVIC, D. M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 36, p. 13–22, out. 2015.

COELHO, J. M. et al. O efeito da sulfadiazina de prata, extrato de ipê-roxo e extrato de barbatimão na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 37, n. 1, p. 045–051, 2010.

COLPANI, V. et al. Prevalence of papillomavirus in Brazil: a systematic review protocol. **BMJ Open**, v. 6, n. 11, p. e011884, 2016.

COOK, M. T.; BROWN, M. B. Polymeric gels for intravaginal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 270, n. September 2017, p. 145–157, 2018.

COSTA, M. A. et al. Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMÃO) for use as a pharmacological agent. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 58, n. 2, p. 330–335, 2010.

COSTA, M. A. **Investigação da atividade toxicológica e farmacológica da fração rica em polímeros de proantocianidinas, obtida das cascas de *S. adstringens* (Mart.) Coville (Barbatimão)**. 2011. 136 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

COSTA, M. A. et al. Acute and Chronic Toxicity of an Aqueous Fraction of the Stem Bark of *Stryphnodendron adstringens* (Barbatimão) in Rodents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

COSTA, M. A. et al. Pharmaceutical topical gel containing proanthocyanidin polymers-rich fraction from *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 12, n. 10, p. 116–123, 2018.

CROWLEY, L. C.; CHRISTENSEN, M. E.; WATERHOUSE, N. J. Measuring Mitochondrial Transmembrane Potential by TMRE Staining. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 12, p. pdb.prot087361, 2016.

CROZIER, A.; JAGANATH, I. B.; CLIFFORD, M. N. **Plant Secondary Metabolites**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 2006.

CRUZ-GREGORIO, A.; MANZO-MERINO, J.; LIZANO, M. Cellular redox, cancer and human papillomavirus. **Virus Research**, v. 246, n. 22, p. 35–45, 2018.

DEBSKI, D. et al. Mechanism of oxidative conversion of Amplex® Red to resorufin: Pulse radiolysis and enzymatic studies. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 95, p. 323–332, 2016.

- DIAO, M.-K. et al. Integrated HPV genomes tend to integrate in gene desert areas in the CaSki, HeLa, and SiHa cervical cancer cell lines. **Life Sciences**, v. 127, p. 46–52, 2015.
- DIKALOV, S. I.; HARRISON, D. G. Methods for Detection of Mitochondrial and Cellular Reactive Oxygen Species. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 20, n. 2, p. 372–382, 2014.
- DIMAIO, D.; PETTI, L. M. The E5 proteins. **Virology**, v. 445, n. 1–2, p. 99–114, out. 2013.
- DING, B. et al. Role of p53 in antioxidant defense of HPV-positive cervical carcinoma cells following H₂O₂ exposure. **Journal of Cell Science**, v. 120, n. 13, p. 2284–2294, 2007.
- DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.
- EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. **Phytotherapy Research**, v. 30, n. 9, p. 1379–1391, 2016.
- ELSHERBINY, N. M. et al. The synergistic effect between vanillin and doxorubicin in ehrlich ascites carcinoma solid tumor and MCF-7 human breast cancer cell line. **Pathology - Research and Practice**, v. 212, n. 9, p. 767–777, 2016.
- FAIRUS, S. et al. A phase I single-blind clinical trial to evaluate the safety of oil palm phenolics (OPP) supplementation in healthy volunteers. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2018.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 2010. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 1,2.
- FILIPPOVA, M. et al. Cellular Levels of Oxidative Stress Affect the Response of Cervical Cancer Cells to Chemotherapeutic Agents. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–14, 2014.
- FREEMAN, S. J. et al. The Revised FIGO Staging System for Uterine Malignancies: Implications for MR Imaging. **RadioGraphics**, v. 32, n. 6, p. 1805–1827, 2012.
- FREITAS, A. L. D. DE et al. Proanthocyanidin polymeric tannins from *Stryphnodendron adstringens* are effective against *Candida* spp. isolates and for vaginal candidiasis treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 216, p. 184–190, 2018.
- FULDA, S. et al. Cellular Stress Responses: Cell Survival and Cell Death. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1–23, 2010.
- GALLUZZI, L. et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death & Differentiation**, v. 14, n. 7, p. 1237–1243, 2007.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018.
- GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; KROEMER, G. Organelle-specific initiation

of cell death. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 8, p. 728–736, 2014.

GALLUZZI, L.; KEPP, O.; KROEMER, G. Mitochondrial regulation of cell death: a phylogenetically conserved control. **Microbial Cell**, v. 3, n. 3, p. 101–108, 2016.

GAO, H. et al. Tumor Cell Selective Cytotoxicity and Apoptosis Induction by an Herbal Preparation from *Brucea javanica*. **North American journal of medicine & science**, v. 4, n. 2, p. 62–66, 2011.

GATTOC, L. et al. Phase I dose-escalation trial of intravaginal curcumin in women for cervical dysplasia. **Open Access Journal of Clinical Trials**, v. 9, p. 1–10, 2017.

GLASENAPP, J. S. et al. Characterization of diversity and genetic structure in natural populations of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville by means of allozyme markers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 216–224, 2014.

GOLDIM, J. R. A avaliação ética da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 27, n. 1, p. 66–73, 2007.

GOMES, R. T. et al. Susceptibility of oral pathogenic microorganisms to aqueous and ethanolic extracts of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão). **International Journal of Dentistry**, v. 8, n. 1, p. 1–5, 2009.

GORRINI, C.; HARRIS, I. S.; MAK, T. W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 12, p. 931–947, 2013.

GRAHAM, S. V. The human papillomavirus replication cycle, and its links to cancer progression: a comprehensive review. **Clinical Science**, v. 131, n. 17, p. 2201–2221, 2017.

GROVES, I. J.; COLEMAN, N. Pathogenesis of human papillomavirus-associated mucosal disease. **Journal of Pathology**, v. 235, n. 4, p. 527–538, 2015.

HAJREZAIE, M. et al. Apoptotic effect of novel Schiff based $CdCl_2(C_{14}H_{21}N_3O_2)$ complex is mediated via activation of the mitochondrial pathway in colon cancer cells. **Scientific reports**, v. 5, p. 9097, 2015.

HARDEN, M. E.; MUNGER, K. Human papillomavirus molecular biology. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 3–12, 2017.

HATA, A. N.; ENGELMAN, J. A.; FABER, A. C. The BCL2 Family: Key Mediators of the Apoptotic Response to Targeted Anticancer Therapeutics. **Cancer Discovery**, v. 5, n. 5, p. 475–487, 2015.

HENRIQUES, B. O. et al. In Vitro TNF- α Inhibitory Activity of Brazilian Plants and Anti-Inflammatory Effect of *Stryphnodendron adstringens* in an Acute Arthritis Model. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1–15, 2016.

HERNANDES, L. et al. Wound-healing evaluation of ointment from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) in rat skin. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n.

3, p. 431–436, 2010.

HERNANDEZ-FLORES, G. et al. Pentoxifylline sensitizes human cervical tumor cells to cisplatin-induced apoptosis by suppressing NF-kappa B and decreased cell senescence. **BMC Cancer**, v. 11, n. 1, p. 483, 10 dez. 2011.

HERZOG-SOARES, J. D. A. et al. Bioatividade de *S. adstringens*, *S. polyphyllum*, *Caryocar brasiliense*, plantas do cerrados brasileiro, sobre *Trypanosoma cruzi* “in vivo”. **Bioscience Journal**, v. 22, p. 113–118, 2006.

HERZOG-SOARES, J. D. A.; ALVES, R. K. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi) O *Phyllanthus niruri* L. induz caliurese dissociada da diurese e da natriurese em ratos acordados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 1–2, 2002.

HIGUCHI, Y. Glutathione depletion-induced chromosomal DNA fragmentation associated with apoptosis and necrosis. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 8, n. 4, p. 455–464, 2004.

HOLETZ, F. B. et al. Effect of plant extracts used in folk medicine on cell growth and differentiation of *Herpetomonas samuelpeessoai* (kinetoplastida, trypanosomatidae) cultivated in defined medium. **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 3, p. 657–662, 2002.

HOLETZ, F. B. et al. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpeessoai*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 4, p. 397–401, 2005.

HOUSMAN, G. et al. Drug Resistance in Cancer: An Overview. **Cancers**, v. 6, n. 3, p. 1769–1792, 2014.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uter0>. Acesso em: 17 ago. 2018a.

INCA. **Instituto Nacional de Câncer**. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colo_uter0/tratamento1>. Acesso em: 18 ago. 2018b.

ISHIDA, K. et al. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 942–949, 2006.

ISHIDA, K. et al. Activity of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on *Cryptococcus neoformans*: effects on growth, capsule size and pigmentation. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, n. 1, p. 29, 2009.

JOHNSON, H. C. et al. Effect of HPV vaccination and cervical cancer screening in England by ethnicity: a modelling study. **The Lancet Public Health**, v. 3, n. 1, p. e44–e51, 2018.

- JUÁREZ, P. Plant-derived anticancer agents: a promising treatment for bone metastasis. **BoneKEY Reports**, v. 3, n. DECEMBER, p. 1–8, 2014.
- JUNG, J. Human Tumor Xenograft Models for Preclinical Assessment of Anticancer Drug Development. **Toxicological Research**, v. 30, n. 1, p. 1–5, 2014.
- KAMPA, M. et al. Polyphenols and cancer cell growth. In: **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**. [s.l: s.n.]. v. 159p. 79–113.
- KLIONSKY, D. J.; ESKELINEN, E.-L.; DERETIC, V. Autophagosomes, phagosomes, autolysosomes, phagolysosomes, autophagolysosomes... Wait, I'm confused. **Autophagy**, v. 10, n. 4, p. 549–551, 2014.
- KOENEMAN, M. M. et al. TOPical Imiquimod treatment of high-grade Cervical intraepithelial neoplasia (TOPIC trial): study protocol for a randomized controlled trial. **BMC Cancer**, v. 16, n. 1, p. 132, 2016.
- KRESTY, L. A. et al. Cranberry proanthocyanidins inhibit esophageal adenocarcinoma *in vitro* and *in vivo* through pleiotropic cell death induction and PI3K/AKT/mTOR inactivation. **Oncotarget**, v. 6, n. 32, p. 33438–55, 2015.
- KUDRYAVTSEVA, A. V et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 44879–44905, 2016.
- KUMAR, M. et al. Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 531–563, 2016.
- LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 2017.
- LARSEN, B. D.; SØRENSEN, C. S. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. **The FEBS Journal**, v. 284, n. 8, p. 1160–1170, 2017.
- LAZARIN-BIDÓIA, D. et al. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: Confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 60, p. 17–28, 2013.
- LEÓN-GONZÁLEZ, A. J.; AUGER, C.; SCHINI-KERTH, V. B. Pro-oxidant activity of polyphenols and its implication on cancer chemoprevention and chemotherapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 98, n. 3, p. 371–380, 2015.
- LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.
- LIMA, T. C. D. DE et al. Breve revisão etnobotânica, fitoquímica e farmacologia de *Stryphnodendron adstringens* utilizada na Amazônia. **Revista Fitos**, v. 10, n. 3, p. 329–338, 2016.
- LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; DE SOUZA, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytotherapy**

Research, v. 12, n. 3, p. 218–220, 1998.

LINS NETO, M. A. F. et al. **Pharmaceutical Composition Using Stryphnodendron Extracts for Treating HPV Infections** U. S. Patent 9023405 B2, 2015.

LIU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free radical research**, v. 44, n. 5, p. 479–96, 2010.

LOPES, G. C. et al. Chemotaxonomic significance of 5-deoxyproanthocyanidins in *Stryphnodendron* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 12, p. 925–931, 2009.

LORUSSO, P. M.; BOERNER, S. A.; SEYMOUR, L. An overview of the optimal planning, design, and conduct of phase I studies of new therapeutics. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 6, p. 1710–1718, 2010.

LOSADA-ECHEBERRÍA, M. et al. Polyphenols as Promising Drugs against Main Breast Cancer Signatures. **Antioxidants**, v. 6, n. 4, p. 88, 2017.

LUIZ, R. L. F. et al. Proanthocyanidins polymeric tannin from *Stryphnodendron adstringens* are active against *Candida albicans* biofilms. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 68, 2015.

LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania* (L.) *amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 85–94, 2005.

MACFARLANE, M.; WILLIAMS, A. C. Apoptosis and disease: a life or death decision. **EMBO reports**, v. 5, n. 7, p. 674–678, 2004.

MAO, X. et al. Oxidative stress-induced diseases and tea polyphenols. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81649–81661, 2017.

MARENCO, B. et al. Redox Homeostasis and Cellular Antioxidant Systems: Crucial Players in Cancer Growth and Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–16, 2016.

MARTINS, D. T. O.; LIMA, J. C. S.; RAO, V. S. N. The acetone soluble fraction from bark extract of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville inhibits gastric acid secretion and experimental gastric ulceration in rats. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 5, p. 427–431, 2002.

MCBRIDE, A. A.; WARBURTON, A. The role of integration in oncogenic progression of HPV-associated cancers. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 4, p. e1006211, 6 abr. 2017.

MELLO, J. P. DE; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelpinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 807–813, 1996a.

MELLO, J. P. DE; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 3, p. 857–862, 1996b.

- MELLO, J. P. DE; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 8, p. 1105–1107, 1999.
- MELO E SILVA, F.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 511–517, 2009.
- MELONE, F. et al. Tannin Structural Elucidation and Quantitative ³¹P NMR Analysis. 1. Model Compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 39, p. 9307–9315, 2013.
- MENDONÇA, P. C. DE et al. Genetic diversity of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville determined by AFLP molecular markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 16–20, 2012.
- MILEO, A. M.; MICCADEI, S. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–17, 2016.
- MINATEL, D. G. et al. Estudo clínico para validação da eficácia de pomada contendo barbatimão (*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) na cicatrização de úlceras de decúbito. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 67, n. 7, p. 250–256, 2010.
- MITTAL, S.; BANKS, L. Molecular mechanisms underlying human papillomavirus E6 and E7 oncoprotein-induced cell transformation. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 772, p. 23–35, 2017.
- MOGA, M. et al. The Role of Natural Polyphenols in the Prevention and Treatment of Cervical Cancer—An Overview. **Molecules**, v. 21, n. 8, p. 1055, 2016.
- MOLONEY, J. N.; COTTER, T. G. ROS signalling in the biology of cancer. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, p. 1–15, 2017.
- MOODY, C. Mechanisms by which HPV Induces a Replication Competent Environment in Differentiating Keratinocytes. **Viruses**, v. 9, n. 9, p. 261, 2017.
- NAGATA, S. DNA degradation in development and programmed cell death. **Annual Review of Immunology**, v. 23, n. 1, p. 853–875, 2005.
- NANDAKUMAR, V.; SINGH, T.; KATIYAR, S. K. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 378–387, out. 2008.
- NAPPO, S. A.; IAFRATE, G. B.; SANCHEZ, Z. M. Motives for participating in a clinical research trial: A pilot study in Brazil. **BMC Public Health**, v. 13, n. 1, 2013.
- NAVARRO-YEPES, J. et al. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death Versus Survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 21, n. 1, p. 66–85, 2014.
- NAYAR, R.; WILBUR, D. C. **The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology: Definitions, criteria and explanatory notes**. 2015. 3. ed. Springer.

- NEDJAI, B. et al. Molecular progression to cervical precancer, epigenetic switch or sequential model?. **International Journal of Cancer**, v. 7, n. 143, p. 1720-1730, 2018.
- NEILSON, A. P.; O'KEEFE, S. F.; BOLLING, B. W. High-Molecular-Weight Proanthocyanidins in Foods: Overcoming Analytical Challenges in Pursuit of Novel Dietary Bioactive Components. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 43–64, 2016.
- NG, K. et al. Induction of selective cytotoxicity and apoptosis in human T4-lymphoblastoid cell line (CEMss) by boesenbergin a isolated from boesenbergia rotunda rhizomes involves mitochondrial pathway, activation of caspase 3 and G2/M phase cell cycle arrest. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 41, 2013.
- NOAMAN, E. et al. Antioxidant potential by arabinoxylan rice bran, MGN-3/biobran, represents a mechanism for its oncostatic effect against murine solid Ehrlich carcinoma. **Cancer Letters**, v. 268, n. 2, p. 348–359, 2008.
- OCCHIONI, E. M. DE L. Considerações taxonômicas no gênero *Stryphnodendron* Mart. (Leguminosae-mimosoideae) e distribuição geográfica das espécies. **Acta Botanica Brasilica.**, v. 4, n. 2, p. 153–158, 1990.
- OKIMOTO, Y. et al. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. **FEBS Letters**, v. 474, n. 2–3, p. 137–140, 2000.
- OLIVOTO, T. et al. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 2, p. 71–84, 2017.
- OPAS. Boas Práticas Clínicas: Documento das Américas. **Organização Pan-Americana da Saúde. IV Conferência Pan-Americana para harmonização da regulamentação farmacêutica**, p. 88, 2005.
- OYERVIDES-MUÑOZ, M. A. et al. Understanding the HPV integration and its progression to cervical cancer. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 61, n. September 2017, p. 134–144, 2018.
- OZASLAN, M. et al. Ehrlich ascites carcinoma. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 13, p. 2375–2378, 2013.
- PANIERI, E.; SANTORO, M. M. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 6, p. e2253–e2253, 2016.
- PANIZZA, S. et al. *Stryphnodendron adstringens barbadetiman* (Vell.) Martius: teor de tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 10, p. 101–106, 1988.
- PARK, Y.-K.; PARK, C. Clinical efficacy of photodynamic therapy. **Obstetrics & Gynecology Science**, v. 59, n. 6, p. 479–488, 2016.

PAULO, P. T. C. et al. Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius Raddi*, *Plectranthus amboinicus Lour* e *Eucalyptus globulus Labill*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 1 A, p. 68–76, 2009.

PEREIRA, E. et al. *In vitro* Antimicrobial Activity of Brazilian Medicinal Plant Extracts against Pathogenic Microorganisms of Interest to Dentistry. **Planta Medica**, v. 77, n. 04, p. 401–404, 2011.

PIZZINO, G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–13, 2017.

POILLET-PEREZ, L. et al. Interplay between ROS and autophagy in cancer cells, from tumor initiation to cancer therapy. **Redox Biology**, v. 4, p. 184–192, 2015.

POMPELLA, A. et al. Measurement of lipid peroxidation *in vivo*: A comparison of different procedures. **Lipids**, v. 22, n. 3, p. 206–211, 1987.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.

PROKHOROVA, E. A. et al. Role of the nucleus in apoptosis: signaling and execution. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 23, p. 4593–4612, 2015.

QUIDEAU, S. et al. Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011.

QUINT, K. D. et al. Progression of cervical low grade squamous intraepithelial lesions: In search of prognostic biomarkers. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 170, n. 2, p. 501–506, 2013.

RANASINGHE, P. et al. Evaluation of pharmacodynamic properties and safety of *Cinnamomum zeylanicum* (Ceylon cinnamon) in healthy adults: A phase I clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–9, 2017.

RASOLA, A.; BERNARDI, P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. **Cell Calcium**, v. 50, n. 3, p. 222–233, 2011.

REBECCA, M. A. et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n. 1–2, p. 101–104, 2002.

REBECCA, M. A. et al. Effect of *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) on energy metabolism in the rat liver. **Toxicology Letters**, v. 143, n. 1, p. 55–63, 2003.

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1863, n. 12, p. 2977–2992, 2016.

RENISUS. **Relação Nacional de Plantas Medicinais do SUS**. Disponível em: <<http://www.medicinanatural.com.br/plantas-medicinais-do-sus/>>. Acesso em: 1 maio. 2018.

- REZENDE, W. P. et al. Effect of Environmental Factors on Phenolic Compounds in Leaves of *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Modern Chemistry and Applications**, v. 03, n. 02, p. 193, 2015.
- RYTER, S. W. et al. Mechanisms of Cell Death in Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 1, p. 49–89, 2007.
- SABINO, A. P. L. et al. *Stryphnodendron adstringens* (“Barbatimão”) Leaf Fraction: Chemical Characterization, Antioxidant Activity, and Cytotoxicity Towards Human Breast Cancer Cell Lines. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1375–1389, 2018.
- SAHA, S. K. et al. Correlation between oxidative stress, nutrition, and cancer initiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, 2017.
- SANCHES, A. C. C. et al. Estudo morfológico comparativo das cascas e folhas de *Stryphnodendron adstringens*, *S. polyphyllum* e *S. obovatum* - Leguminosae. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 362–368, 2007.
- SANJOSÉ, S. DE; BROTONS, M.; PAVÓN, M. A. The natural history of human papillomavirus infection. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 2–13, 2018.
- SANTOS, S. C. et al. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, n. 4, p. 292–299, 2002.
- SCHIFFMAN, M. et al. Carcinogenic human papillomavirus infection. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16086, 2016.
- SCHIFFMAN, M.; WENTZENSEN, N. Human Papillomavirus Infection and the Multistage Carcinogenesis of Cervical Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 22, n. 4, p. 553–560, 1 abr. 2013.
- SCHMITTGEN, T. D.; LIVAK, K. J. Analyzing real-time PCR data by the comparative Ct method. **Nature Protocols**, v. 3, n. 6, p. 1101–1108, 2008.
- SERRANO, B. et al. Epidemiology and burden of HPV-related disease. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 47, p. 14–26, 2018.
- SHIAU, J.-Y. et al. Phytoagent deoxyelephantopin derivative inhibits triple negative breast cancer cell activity by inducing oxidative stress-mediated paraptosis-like cell death. **Oncotarget**, v. 8, n. 34, p. 56942–56958, 2017.
- SINHA, K. et al. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 7, p. 1157–1180, 2013.
- SMALL, W. et al. Cervical cancer: A global health crisis. **Cancer**, v. 123, n. 13, p. 2404–2412, 2017.
- SMERIGLIO, A. et al. Proanthocyanidins and hydrolysable tannins: occurrence, dietary intake and pharmacological effects. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1244–1262,

2017.

SOARES, S. P. et al. Antibacterial activity of the crude hydroalcoholic extract of *Stryphnodendron adstringens* on dental caries microorganisms. **Revista Odonto Ciência**, v. 23, n. 2, p. 141–144, 2008.

SOSA, V. et al. Oxidative stress and cancer: An overview. **Ageing Research Reviews**, v. 12, n. 1, p. 376–390, 2013.

SOTO, D.; SONG, C.; MCLAUGHLIN-DRUBIN, M. E. Epigenetic Alterations in Human Papillomavirus-Associated Cancers. **Viruses**, v. 9, n. 9, p. 248, 2017.

SOUZA-MOREIRA, T.; QUEIROZ-FERNANDES, G.; PIETRO, R. *Stryphnodendron* Species Known as “Barbatimão”: A Comprehensive Report. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 910, 2018.

SOUZA, R. P. et al. Oxidative Stress Triggered by Apigenin Induces Apoptosis in a Comprehensive Panel of Human Cervical Cancer-Derived Cell Lines. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p. 1–18, 2017.

SOUZA, T. M. et al. Avaliação da atividade anti-séptica de extrato seco de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville e de preparação cosmética contendo este extrato. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 71–75, 2007a.

SOUZA, T. M. et al. Bioprospecção de atividade antioxidante e antimicrobiana da casca de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p. 221–226, 2007b.

SPURGEON, M.; LAMBERT, P. Human Papillomavirus and the Stroma: Bidirectional Crosstalk during the Virus Life Cycle and Carcinogenesis. **Viruses**, v. 9, n. 8, p. 219, 2017.

SRIVASTAVA, S. et al. Quercetin, a Natural Flavonoid Interacts with DNA, Arrests Cell Cycle and Causes Tumor Regression by Activating Mitochondrial Pathway of Apoptosis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 24049, 2016.

STEPANIC, V. et al. Selected Attributes of Polyphenols in Targeting Oxidative Stress in Cancer. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 5, p. 496–509, 2015.

SUI, X. et al. Autophagy and chemotherapy resistance: a promising therapeutic target for cancer treatment. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 10, p. e838–e838, 2013.

SZNARKOWSKA, A. et al. Inhibition of cancer antioxidant defense by natural compounds. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15996–16016, 2017.

TABACH, R.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; CARLINI, E. A. Pharmacological and Toxicological Study of *Maytenus ilicifolia* Leaf Extract Part II-Clinical Study (Phase I). **Phytotherapy Research**, v. 31, n. 6, p. 921–926, jun. 2017.

TROLEZI, R. et al. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 16, n. 1, p. 7, 2017.

- TSAO, R. Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols. **Nutrients**, v. 2, n. 12, p. 1231–1246, 2010.
- TSUDA, N.; WATARI, H.; USHIJIMA, K. Chemotherapy and molecular targeting therapy for recurrent cervical cancer. **Chinese Journal of Cancer Research**, v. 28, n. 2, p. 241–253, 2016.
- VANDEN BERGHE, T. et al. Determination of apoptotic and necrotic cell death *in vitro* and *in vivo*. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 117–129, jun. 2013.
- VENUTI, A. et al. Papillomavirus E5: The smallest oncoprotein with many functions. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 140, 2011.
- VIARISIO, D.; GISSMANN, L.; TOMMASINO, M. Human papillomaviruses and carcinogenesis: well-established and novel models. **Current Opinion in Virology**, v. 26, p. 56–62, 2017.
- WALSH, D. W. M. et al. Live cell imaging of mitochondria following targeted irradiation in situ reveals rapid and highly localized loss of membrane potential. **Scientific Reports**, v. 7, n. April, p. 46684, 2017.
- WANG, N.; FENG, Y. Elaborating the Role of Natural Products-Induced Autophagy in Cancer Treatment: Achievements and Artifacts in the State of the Art. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–14, 2015.
- WINK, M. Plant Secondary Metabolites Modulate Insect Behavior-Steps Toward Addiction? **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. April, p. 1–9, 2018.
- WINTHER, J. R.; THORPE, C. Quantification of thiols and disulfides. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1840, n. 2, p. 838–846, 2014.
- WONG, R. S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 30, n. 1, p. 87, 2011.
- WOODMAN, C. B. J.; COLLINS, S. I.; YOUNG, L. S. The natural history of cervical HPV infection: unresolved issues. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 1, p. 11–22, 2007.
- WORKOWSKI, K. A.; BOLAN, G. A. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015. **MMWR Recommendations and reports**, v. 64, n. RR-03, p. 1–137, 5 jun. 2015.
- WU, E. S.; JERONIMO, J.; FELDMAN, S. Barriers and Challenges to Treatment Alternatives for Early-Stage Cervical Cancer in Lower-Resource Settings. **Journal of Global Oncology**, v. 3, n. 5, p. 572–582, 2017.
- XU, J.-Y. et al. Sanguinarine inhibits growth of human cervical cancer cells through the induction of apoptosis. **Oncology Reports**, v. 28, n. 6, p. 2264–2270, 2012.
- YANG, L. et al. Response of Plant Secondary Metabolites to Environmental Factors. **Molecules**, v. 23, n. 4, p. 762, 2018a.
- YANG, L. et al. Proanthocyanidins against Oxidative Stress: From Molecular Mechanisms to

Clinical Applications. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–11, 2018b.

YAZDANI, M. Concerns in the application of fluorescent probes DCDHF-DA, DHR 123 and DHE to measure reactive oxygen species *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 30, n. 1, p. 578–582, 2015.

ZAFARULLAH, M. et al. Molecular mechanisms of *N*-acetylcysteine actions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 6–20, 2003.

ZHANG, B. et al. A Review of Polyphenolics in Oak Woods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 6978–7014, 2015.

ZHANG, C. et al. Grape seed proanthocyanidins induce mitochondrial pathway-mediated apoptosis in human colorectal carcinoma cells. **Oncology Letters**, v. 14, n. 5, p. 5853–5860, 2017.

ZHOU, Y. et al. Natural Polyphenols for Prevention and Treatment of Cancer. **Nutrients**, v. 8, n. 8, p. 515, 2016.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da fração aquosa de *Stryphnodendron adstringens* no tratamento do tumor de Ehrlich em camundongo Balb/C", protocolada sob o CEUA nº 4534200417 (ID 001229), sob a responsabilidade de **Celso Vataru Nakamura** e equipe; *Vanessa Kaplum* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 09/05/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of the aqueous fraction of *Stryphnodendron adstringens* in the treatment of Ehrlich tumor in mouse Balb / C", utilizing 30 Isogenics mice (30 males), protocol number CEUA 4534200417 (ID 001229), under the responsibility of **Celso Vataru Nakamura** and team; *Vanessa Kaplum* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 05/09/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [07/2017](#) a [09/2017](#)

Área: [Dbs-Ciências Básicas da Saúde](#)

Origem:	Biotério Central da UEM	sexo:	Machos	idade:	21 a 30 dias	N:	10
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	20 a 30 g		
Linhagem:	Swiss						
Origem:	Biotério Central da UEM	sexo:	Machos	idade:	21 a 30 dias	N:	20
Espécie:	Camundongos isogênicos			Peso:	20 a 30 g		
Linhagem:	Balb/C						

Local do experimento: Universidade Estadual de Maringá. Biotério do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Bloco B-08.

Maringá, 20 de agosto de 2018

Profa. Dra. Tatiana Carlesso dos Santos
Coordenadora da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

Dr. Claudemir Martins Soares
Coordenador Adjunto da CEUA/UEM
Universidade Estadual de Maringá

ANEXO B – Certificado do Comitê Permanente de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (COPEP)



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudos clínicos avançados de formulação contendo fração aquosa de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão) aplicado às mulheres para o tratamento de candidíase vulvovaginal

Pesquisador: Celso Vataru Nakamura

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 50565215.3.0000.0104

Instituição Proponente: Núcleo/Incubadora Unitrabalho

Patrocinador Principal: CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.453.763

Apresentação do Projeto:

As plantas medicinais estão inseridas na cultura popular a séculos, contribuindo para o tratamento de diversas enfermidades. Dentre as plantas medicinais comumente utilizadas, encontra-se o *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), que apresenta alto teor de polifenóis, com relatos de diversas atividades como, atividade antimicrobiana e cicatrizante. Estudos anteriores mostraram que a fração aquosa de *S. adstringens* (F2) apresenta atividade antifúngica in vitro, principalmente em *Candida albicans*. Desta forma, o presente trabalho objetiva realizar o ensaio clínico fase I e II da fração F2 em mulheres saudáveis e em mulheres com candidíase vulvovaginal, respectivamente. O ensaio clínico fase I e II será realizado em mulheres atendidas na Clínica da Mulher do Município de Marialva e no Hospital Universitário Regional de Maringá (HUM). Será realizado um ensaio clínico randomizado duplo-cego em mulheres com candidíase vulvovaginal, sendo que o tratamento será realizado com o gel contendo extrato de *S. adstringens* pelo período de 14 dias, conforme orientação médica.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar por meio do ensaio clínico fase I a segurança e perfil farmacocinético do gel contendo fração aquosa de *Stryphnodendron adstringens* em mulheres saudáveis. Já o ensaio clínico fase II objetiva estabelecer a segurança em curto prazo do gel contendo fração aquosa de

Endereço: Av. Colombo, 5790, UEM-PPG
Bairro: Jardim Universitário **CEP:** 87.020-900
UF: PR **Município:** MARINGÁ
Telefone: (44)3011-4597 **Fax:** (44)3011-4444 **E-mail:** copep@uem.br