UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CAMPUS DUQUE DE CAXIAS
PROFESSOR GERALDO CIDADE

BEATRIZ SANTOS DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AUTOFÁGICA DA MANILKARA HUBERI

DUQUE DE CAXIAS

2024

BEATRIZ SANTOS DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AUTOFÁGICA DA MANILKARA HUBERI

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Rio de Janeiro – Campus Duque de Caxias – Professor Geraldo Cidade, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas - Biofísica

Orientadora: Prof.ª Drª. Janaína Fernandes

Aprovado em:_____/____/_____, por:

Profa . Drª. Janaina Fernandes / Universidade Federal do Rio deJaneiro (Campus Professor Geraldo Cidade – Duque de Caxias)

Prof. Jorge Luis Mendonça Tributino / Universidade Federal do Rio de Janeiro(Campus Professor Geraldo Cidade – Duque de Caxias)

Prof. Dr. Roberto Tarazi / Universidade Federal do Rio de Janeiro(Campus Professor Geraldo Cidade – Duque de Caxias)

Oliveira, B.S.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE AUTOFÁGICA DA MANILKARA HUBERI

Trabalho de Conclusão de curso (monografia) – Universidade Federal do Rio deJaneiro – Campus Duque de Caxias, 2024

1.Câncer; 2. Apoptose; 3.Autofagia ; 4. ,*Manilkara huberi;*

Às grandes mulheres da minha vida que me inspiram a sonhar entre uma batalha e outra: Daniela, Sônia e Dona Rosália, eu jamais seria um terço da coragem que sou se não tivesse sido lapidada pelas mãos de vocês.

Ao homem da minha vida: Marcos, obrigado por ser o melhor pai que uma garota poderia desejar, cada conversa no carro era um aprendizado valioso e eu sinto que nunca serei capaz de agradecer tudo o que aprendi com suas vivencias e conselhos.

Aos irmãos que tenho, as de sangue e aqueles do meu coração: Brenda, Eduardo, Bárbara, Ammeh, Bruno, Merida, Rian e Cinthia. Obrigado por sonharem comigo cada sonho absurdo e segurarem a barra comigo em cada choro, sempre me colocando para cima e me lembrando de quem eu realmente sou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu mentor espiritual, aos amigos espirituais, todos os meus guias e o grande Mestre Jesus que me ajudam todos os dias em minha caminhada. Agradeço a minha família por todo o amor incondicional, apoio emocional e financeiro para viver esse sonho tão longe de casa, meus pais, tia Sônia, meus irmãos Ammeh, Brenda, Eduardo e Babi que sempre estiveram do meu lado e me incentivaram, minha vó Rosália e toda a família que carinhosamente explanava ao mundo seu orgulho e carinho por ter uma futura Biofísica, mesmo que por muitas vezes todos tivessem medo no meu futuro na ciência ou não entendessem o que de fato eu estudava.

Agradeço muito ao meu psicólogo Glauber por me ajudar na minha evolução pessoal e a superar as dificuldades que me assombraram ao seguir nesse curso que era meu sonho, mas era constantemente oprimido pela depressão e ansiedade, ele me guiou na busca pelo autoconhecimento e essa foi a chave para entender tudo.

Aos amigos que fiz por aqui que se tornaram uma família aqui no Rio de Janeiro, Isa, Anderson, Cinthia, Dona Creusa, Claudinha, Fernanda, Tia Jaque e principalmente Merida que foi minha irmã e minha maior parceira de caminhada, choro, alegria e conselhos, ela junto de seus guias, sua sabedoria e suas cartas nunca me desampararam e me deram forças para continuar viva mais um novo dia e seguir em busca do meu sonho de um dia ser Astronauta. Também a Rian e Amon que foram minha última casa e meu refúgio nos momentos mais difíceis da graduação.

Agradeço grandemente minha orientadora Janaina Fernandes que me abriu um mundo de oportunidades e me ajudou a descobrir todo o potencial que eu tinha, com Jessica que se tornou uma irmã para mim essas duas foram as grandes responsáveis por me ensinar tudo que sei e me dar coragem para me tornar a cientista inspiradora para os outros colegas de faculdade, agradeço também aos amigos que fiz no laboratório Matheus e Marcos, que sempre me ajudaram e socorreram com seus melhores conselhos como meus veteranos de curso que me ajudaram a tornar a graduação um pouco mais leve. A toda equipe técnica do meu laboratório NUMPEX-BIO, pela assistência, auxílio, aprendizados e suporte para todos os meus experimentos e dúvidas em minha jornada e principalmente ao técnico Bruno, cada puxão de orelha foi muito valioso para o meu crescimento e sou grata por isso.

Agradeço aos professores que me ajudaram em minha jornada, aqueles que disseram que eu não tinha futuro nesse curso e que me tornaram teimosa buscando provar o oposto, mas principalmente aos professores que me incentivaram a continuar deixando brilhar em mim os meus sonhos e que merecem ser nomeados aqui: Carol, Juliany, Marisa, Fernando, Mariela, Karim, Marjoly, William, Dornelles e Lizette. Vocês me deram vontade de viver de novo.

“Devemos acreditar que temos
vocação para alguma coisa,
e que essa coisa deve, a qualquer
custo, ser alcançada”

MARIE CURIE

RESUMO

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), o câncer de pulmão é, desde 2020, o terceiro mais comum em homens e o quarto mais comum em mulheres no Brasil, já em taxas de mortalidade mundial ele segue sendo o primeiro entre homens e o segundo entre mulheres mostrando uma incidência de 2,12 milhões de novos casos. O procedimento mais utilizado para este tumor é a quimioterapia, entretanto, há frequentes problemas de resistência ao tratamento entre os pacientes o que mostra a necessidade por novas terapias alternativas que sejam eficazes e menos tóxicas ao paciente. O estudo do potencial antitumoral de extratos de plantas nativas pode revelar novas entidades químicas capazes de tratar esses tumores, bem como agir como adjuvantes associados à drogas já em uso clínico. Entre as vias intracelulares que podem ser exploradas para o tratamento de câncer, estão a apoptose e a autofagia. Enquanto a apoptose se caracteriza pela morte celular programada e ativada por caspases, a autofagia envolve a formação de autofagossomos, que apresentam diversas moléculas marcadoras, como ATGs e LC3II, e que, dependendo do estímulo, pode levar ao resgate da morte celular ou induzir apoptose. Dessa forma, o objetivo deste trabalho feito em parceria com a Universidade Federal do Pará, foi avaliar a capacidade de extratos de *Manilkara huberi* induzir apoptose e/ou autofagia em linhagem de câncer de pulmão de não pequenas células (H460). O extrato MH1 gerou a sub-fração P10, que foi sub-fracionada gerando a subfração MHF7. Para avaliar a atividades dessas amostras, as célula foram tratadas com o extrato MH1, a partição P10 e a subfração MHF7 por 48h, nas concentrações 10, 25, 50 e 100 ug/ml, e a morte foi avaliada por MTT e a apoptose por fragmentação de DNA (citometria de fluxo). Análises morfológicas foram realizadas por microscopia de campo claro e a presença dos marcadores moleculares por imunofluorescência. Todas subfrações com composição semelhante (saponinas triterpênicas). Utilizamos também o inibidor de autofagia 3-metiladenina (3MA) para observar sua interferência na atividade dos extratos. Os resultados mostraram que extratos *M. huberi* induziram autofagia e morte celular na linhagem H460. Foi possível ver um significativo aumento na população de células em sub-G1 no tratamento de MH1, P10 e MHF7. Foi possível observar ao analisar a morfologia das células, a formação de vacúolos autofágicos de maneira dose dependente nas células que foram tratadas com MH1, P10 e MHF7, indicando que as subfrações estão induzindo autofagia. Além disso, observamos que a inibição com 3MA no tratamento com MH1 e P10 aumentaram a morte celular por apoptose. Assim, podemos concluir que os extratos de M. huberi induzem tanto autofagia quanto apoptose, que a apoptose é exacerbada quando a autofagia é inibida. Os próximos passos desse trabalho envolvem a identificação dos componentes desses extratos bem como as proporções de cada composto identificado, além da análise de outras proteínas envolvidas nesse mecanismo.

ABSTRACT

According to data from the National Cancer Institute (INCA), since 2020, lung cancer is the third most common cancer among men and the fourth most common among women in Brazil. Globally, in terms of mortality rates, it remains the leading cause of cancer death in men and the second among women, with an incidence of 2.12 million new cases. Chemotherapy is the most widely used treatment for this tumor; however, there are frequent problems of resistance to treatment among patients, highlighting the need for alternative therapies that are effective and less toxic. Research on the antitumor potential of native plant extracts may reveal new chemical entities capable of treating these tumors and serving as adjuvants alongside drugs already in clinical use. Among the intracellular pathways that can be explored for cancer treatment are apoptosis and autophagy. Apoptosis is characterized by programmed cell death activated by caspases, whereas autophagy involves the formation of autophagosomes, which display several marker molecules, such as ATGs and LC3II, and, depending on the stimulus, can rescue the cell from death or induce apoptosis. Thus, this study, conducted in partnership with the Federal University of Pará, aimed to evaluate the ability of M. huberi extracts to induce apoptosis and/or autophagy in non-small cell lung cancer (H460) cell lines. The MH1 extract produced the P10 subfraction, which was subsequently subfractionated to produce the MHF7 subfraction. To evaluate the activity of these samples, the cells were treated with the MH1 extract, the P10 fraction and the MHF7 subfraction for 48 hours at concentrations of 10, 25, 50 and 100 µg/mL. Cell death was assessed by MTT assay and apoptosis by DNA fragmentation (flow cytometry). Morphological analyses were conducted using bright-field microscopy, and molecular markers were detected by immunofluorescence. All subfractions had similar compositions (triterpene saponins). We also used the autophagy inhibitor 3-methyladenine (3MA) to observe its interference with the extract activity. The results showed that M. huberi extracts induced autophagy and cell death in the H460 cell line. A significant increase in the sub-G1 cell population was observed with MH1, P10, and MHF7 treatments. Morphological analysis of the cells revealed dose-dependent formation of autophagic vacuoles in cells treated with MH1, P10, and MHF7, indicating that the subfractions are inducing autophagy. Furthermore, inhibition of 3MA in MH1 and P10 treatments increased apoptosis-induced cell death. Thus, we can conclude that M. huberi extracts induce both autophagy and apoptosis, with apoptosis being exacerbated when autophagy is inhibited. The next steps of this work involve identifying the components of these extracts and determining the proportions of each compound identified, as well as analyzing other proteins involved in this mechanism.

LISTA DE ABREVIATURAS

3MA: 3 – Metiladenina.

ALK - Linfoma quinase Anaplásico

DMSO – crioprotetor mas também utilizado para diluição dos extratos

EGFR - Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico

GTP - guanosina trifosfato

MAPK - Proteíno-quinases ativadas por mitógenos

INCA - Instituto Naciona de Câncer.

NSCLC - Non-small cell lung cancer (Sigla em inglês para Câncer de Pulmão de Não Pequenas Células).

KRAS - Oncogene, um gene que desempenha um papel no câncer, é um dos genes que faz parte da família RAS

OMS - Organização Mundial de Saúde.

OPAS - Organização Pan-Americana de Saúde

PI3K - Enzima que desencadeia reações químicas dentro da célula, transmitindo sinais para a execução de funções celulares

RAS - Um proto-oncogene humano que pode sofrer mutações que contribuam para o desenvolvimento de câncer

Rb - gene retinoblastoma

SCLC – Small Cell Lung Cancer (sigla em inglês para câncer de pulmão de pequenas células)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo celular.

Figura 2: Dados sobre Câncer de pulmão no Brasil.

Figura 3: Gráfico da relação do consumo de tabaco e o aumento do número de mortes por câncer de pulmão.

Figura 4: Brasil: estabelecimentos municipais com fitoterapia no SUS por município, segundo quatro modalidades de produção (planta fresca, planta seca, fitoterápico manipulado e fitoterápico industrializado) em 2012.

Figura 5: *Manilkara huberi.*

Figura 6: As vias autofágicas em mamiferos.

Figura 7: Gênese e desenvolvimento do autofagossomo e participação das diferentes proteínas ATG em seus 6 estágios (nucleação, alongamento, formação do autofagossomo maduro, fusão, degradação e reciclagem.

Figura 8: Fotomicrografia de uma secção de pâncreas exócrino com células em apoptose (setas).

Figura 9: Vias intrínseca mitocondrial e extrínseca da apoptose.

Figura 10: Linhagem celular de câncer de pulmão de não pequenas células – H460.

Figura 11: Esquema de fracionamento de extrato e subfração.

Figura 12: Exemplo de microscópia de campo claro.

Figura 13: Representação esquemática do princípio geral da técnica de imunofluorescência.

Figura 14: Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água).

Figura 15: Representação esquemática da técnica de citometria de fluxo. FSC Criado com Biorender.

Figura 16: Inibição de viabilidade em células tratadas com A7 (MH1).

Figura 17: MH1 induziu extensa vacuolização dependente da dose em células H460.

Figura 18: MH1 melhorou a expressão dos principais marcadores de autofagia.

Figura 19: A fase hidroalcoólica do MH1 (P10) induziu forte vacualização no H460.

Figura 20: O subfracionamento de P10 rendeu extratos altamente ativos.

Figura 21: A Inibição de extratos e frações de *M. huberi* autofagia induzida por 3MA aumentou a morte celular em H460.

Figura 22: Subfração MHF7 induz vacuolização de maneira dose dependente.

Figura 23: Inibição de viabilidade em células tratadas com MHF7.

Figura 24: Extratos e subfrações induzem fragmentação de DNA em H460.

Sumário

RESUMO 7
ABSTRACT 8
LISTA DE ABREVIATURAS 9
LISTA DE FIGURAS 10
1. INTRODUÇÃO 14
1.1. Câncer e suas causas 14
1.2. Câncer de Pulmão 18
1.3. Tratamento 21
1.4. Fitoterápicos e a Biodiversidade Brasileira 22
1.5. *Manilkara huberi* 24
1.6. Autofagia 25
1.7. Apoptose 30
2. JUSTIFICATIVA 32
3. OBJETIVOS 33
3.1 Objetivo geral 33
3.2 Objetivos específicos 33
4 MATERIAIS E MÉTODOS 33
4.1 Linhagem e Cultivo Celular 34
4.2 Extratos da Manilkara huberi 34
4.3 Analise morfológica por microscopia de campo claro 36
4.4 Imunofluorescência 37
4.5 Inibição da viabilidade por MTT 39
4.6. Fragmentação de DNA por Citometria de fluxo 40
4.7. Análise estatística 42
5. RESULTADOS 42
5.1. Inibição de viabilidade em células tratadas com A7 (MH1) 42
5.2. MH1 induziu extensa vacuolização de maneira dose dependente em células H460. 43
5.3. MH1 melhorou a expressão dos principais marcadores de autofagia 46
5.4. A fase hidroalcoólica do MH1 (P10) induziu forte vacuolização no H460 47
5.5. O sub fracionamento de P10 rendeu extratos altamente ativos 49
5.6. A Inibição de extratos e frações de *M. huberi* autofagia induzida por 3MA aumentou a morte celular em H460. 52
5.7. Subfração MHF7 induz vacuolização de maneira dose dependente 54
5.8. Inibição de viabilidade em células tratadas com MHF7 55
5.9. Extratos e subfrações induzem fragmentação de DNA em H460. 56
6. DISCUSSÃO 57
7. CONCLUSÃO 60
8. PERSPECTIVAS FUTURAS 60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 61

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer e suas causas.

Câncer é o termo atribuído a um grupo de mais de 100 doenças que compartilham as mesmas características descritas como um crescimento descontrolado das células que podem invadir tecidos adjacentes e assim, provocando metástase e se espalhando por todo o corpo (FERLAY et al., 2015). Seu crescimento exacerbado se dá por uma perda de controle do ciclo celular, levando à proliferação desordenada de suas células, dando origem a um grupo heterogêneo de doenças malignas que também compartilham essas características (INCA, 1996-2018).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é considerado uma das principais causas de morte no mundo e sua alta na incidência pode ser atribuído a diversos fatores como por exemplo, ao envelhecimento da população e à exposição a fatores de risco como o sedentarismo, o uso de tabaco e a adoção de uma dieta ocidental (JEMAL et al., 2011).

O câncer é considerado uma doença genética, desenvolvendo-se a partir do acúmulo de alterações no DNA; tais como mutações; de células saudáveis, transformando-as progressivamente em células malignas (JORDE et al., 2000). É importante estabelecer a diferença entre tumor e câncer, visto que nem todo tumor é um câncer. O tumor ou neoplasia é originado através do crescimento e proliferação desregulada de uma célula, uma neoplasia (tumor) pode ser classificada como benigna ou maligna. A benigna é caracterizada pelo crescimento celular organizado, frequentemente lento, com limites definidos e principalmente não apresenta propriedades invasivas de tecidos ou órgãos próximos, não apresentando o risco de se disseminar para outras regiões corporais mais distantes do nicho original, ou seja, de desenvolver o processo metastático (INCA, 1996-2018).

Diferente da neoplasia benigna, a maligna apresenta um crescimento celular e proliferação celular descontrolados, devido à perda da regulação do ciclo celular e é caracterizada por apresentar propriedades invasivas de tecidos e órgãos vizinhos, podendo se desprender deste nicho e então através da corrente sanguínea ou pelo sistema linfático, se disseminar para outros tecidos e órgãos distantes do nicho primário, formando o tumor secundário através de um processo conhecido como metástase, representando uma grande problemática e levando milhares de pacientes a óbitos mundialmente (BELIZÁRIO, 2002). Para que uma neoplasia possa ser considerada maligna, constituindo verdadeiramente o câncer, suas células devem apresentar as seguintes propriedades: (1) perda do controle do ciclo celular, apresentando reprodutibilidade superior à normalidade de 1016 divisões celulares; (2) serem imortalizadas, apresentando divisões celulares infinitas devido a manutenção da telomerase, uma enzima que em condições normais é

perdida após um dado limite de divisões celulares (em torno de 1016) ; (3) presença de alterações cromossômicas estruturais ou numéricas; (4) perda das propriedades adesivas, como pela perda de proteínas de adesão à matriz extracelular (MEC); (5) perda de sua funcionalidade e de diferenciação; (6) propriedades invasivas, possibilitando a metástase; (7) indução do processo de angiogênese, fundamental para que o câncer possa receber os nutrientes e oxigênio através da corrente sanguínea, e dessa forma se desenvolver (BELIZÁRIO, 2002).

É importante observar que algumas dessas mutações aleatórias nos genes que controlam a proliferação e a apoptose são herdados pelo crescimento do tumor, com as mutações causando resistências às células serem induzíveis para a morte (BERTRAN, 2000). O Câncer é o resultado de uma doença na qual as células filhas coordenam o fenótipo maligno que é um resultado de alterações gênicas. As células estão constantemente se multiplicando e, durante este período de divisão celular, estão sob a influência de muitos carcinógenos, o que leva ao processo de mutação do material genético, que são as raízes de seu crescimento proliferativo independente dos mecanismos de controle do ciclo celular (WARD, 2002).

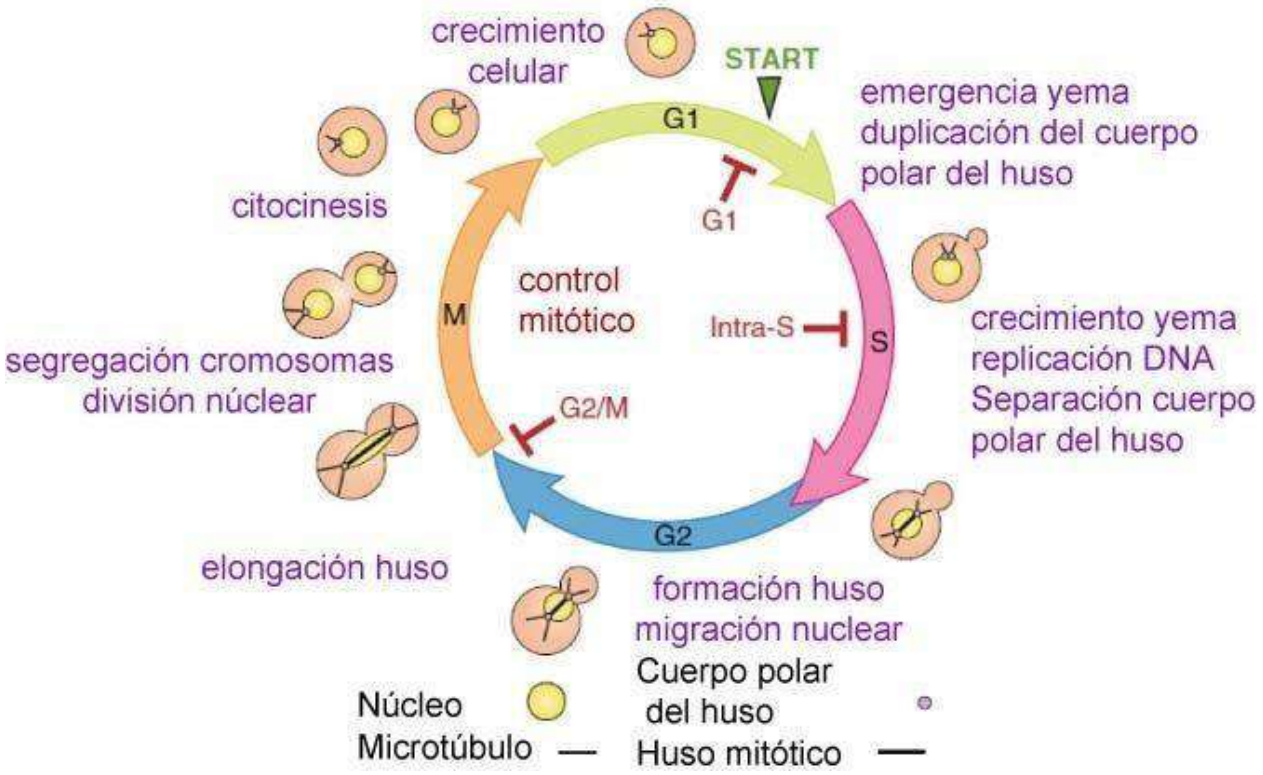


Figura 1. Ciclo celular. O esquema descreve os fenômenos que ocorrem na célula em cada fase do ciclo, bem como a morfologia característica de cada fase. Indicando alguns pontos de verificação do ciclo celular; G1 que bloqueia o início, intra-S que reduz a taxa de replicação, o ponto de verificação de transição G2-M que interrompe o ciclo nesta transição e controle mitótico interno [Modificado de (Finn et al. 2011)].

O ciclo celular (Figura 1) é um processo crucial para a reprodução, crescimento e renovação celular (PÉREZ ATILAMO et al., 2024). Consiste em várias fases: G1, S e G2 (interfase), seguidas de mitose (prófase, metáfase, anáfase e telófase) e citocinese (CRUZ et al., 2015; PÉREZ ATILAMO et al., 2024). O ciclo é rigidamente regulado por proteínas, incluindo ciclinas e cinases dependentes de ciclina, que controlam a progressão por meio de pontos de verificação específicos (MONTALVO, 2020). Esses pontos de verificação servem como mecanismos de controle de qualidade, garantindo a integridade do material genético e evitando a criação de células com múltiplos erros (DÍAZ et al., 2010; MONTALVO, 2020). As vias de sinalização são ativadas por meio de sinais extracelulares que iniciam a cascata através de uma sequência de proteínas: (receptor -> proteína G -> proteína kinase -> fatores de transcrição). A evolução pelo ciclo é controlada por uma família de proteínas denominada quinases dependentes de ciclinas (CDKs), importantes na transição entre a fase G1 para a fase S e na transição da fase G2 para a fase M. Em contrapartida, há um grupo de inibidores que atuam regulando e impedindo negativamente as vias de sinalização de progressão do ciclo celular. Irregularidades nos genes de progressão e inibição do ciclo celular podem atribuir à célula vantagens de crescimento e desenvolvimento sobre as células saudáveis (WARD, 2002). Em nível transcricional, essas mutações ocorrem por deleções, adição ou substituição de nucleotídeos (MEZA– JUNCO et al., 2006).

Múltiplas são as causas do câncer, podendo ser externas ou internas ao indivíduo, frequentemente relacionando-se entre si. Os fatores externos geralmente associados a fatores ambientais; como a exposição à radiação; e aos hábitos de vida do indivíduo, como a sua alimentação e a adoção ao tabagismo (INCA, 1996-2018). Enquanto os fatores internos geralmente encontram associados a condições genéticas previamente existentes, provenientes de modificações epigenéticas; mudanças herdadas e presentes na expressão gênica (SUVÁ et al., 2013).

Os cânceres podem ainda ser hereditários ou esporádicos. Os hereditários são aqueles que se desenvolvem mediante a transmissão entre gerações de fatores que conduzem ao câncer - tal como um gene mutado - mediante um padrão de herança mendeliano bem estabelecido, geralmente autossômico dominante, tornando o risco de transmissão para os próximos descendentes elevados - cerca de 50% (DANTAS et al., 2009). Já os esporádicos são cânceres que ocorrem ao acaso na população e de alta frequência; representando cerca de 90% dos casos. São resultantes do acúmulo de alterações genéticas adquiridas ao longo da vida do indivíduo, não apresentando relação hereditária. Estima-se que o câncer hereditário só tenha relação com 5 a 10% dos casos diagnosticados (MALZYNER, 2014). Apesar do importante relacionamento entre os fatores internos e externos no desenvolvimento do câncer; processo este denominado de carcinogênese; observa-se um grande destaque dos fatores externos neste processo. O primeiro relato da ocorrência

de câncer atrelado a fatores ambientais ocorreu em 1775 por Percival Pott, um médico inglês que constatou um relacionamento entre a elevada ocorrência de câncer na cavidade nasal e no epitélio do saco escrotal - em limpadores de chaminés - com o contato e consequente inalação da fuligem por eles, visto ao potencial cancerígeno dos componentes desta fuligem. (BROWN & THORNTON, 1957). A partir de então passou-se a observar com mais atenção a relação entre câncer e os fatores externos, possibilitando que atualmente já seja de amplo conhecimento os principais fatores externos associados a ocorrência do câncer.

Mediante estudos realizados, cerca de 80-90% dos casos diagnosticados de câncer estão ligados a fatores externos. Dentre estes destacam-se: o tabagismo, considerado um grande fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pulmão; a exposição exacerbada à radiação solar sem devida proteção, considerado um grande fator para o desenvolvimento de câncer de pele; e ainda algumas infecções virais, que podem dar origem a alguns tipos de câncer, tais como o vírus da hepatite B – associado à ocorrência de câncer hepático e o vírus HTLV, que pode levar a ocorrência de leucemias. Além destes, vem se estudando o potencial dos componentes químicos dos alimentos, principalmente daqueles industrializados, de causarem o câncer (INCA, 1996-2018). Levando em consideração o grande número de casos associados a fatores externos, o câncer é considerado principalmente uma doença genética adquirida, que vai se desenvolvendo ao longo do tempo mediante o acúmulo de mutações, até que possa ser detectado clinicamente e de acordo com estudos realizados com sequenciamento de DNA, são necessárias por exemplo, aproximadamente 11 mil mutações no DNA de uma célula do revestimento interno do colón intestinal para que a mesma possa se transformar em maligna, possibilitando o início do câncer (BELIZÁRIO, 2002).

Existem diferentes tipos de câncer, se diferenciando pelo local em que se iniciam em: sarcomas, iniciando-se em um tecido mesenquimal, tais como ósseo, muscular; carcinomas, iniciando-se em um tecido epitelial, representando o principal tipo de câncer – em torno de 80% dos casos, principalmente pela susceptibilidade deste tecido a frequente exposição à agentes cancerígenos, tanto físicos quanto químicos; e podem ainda ser classificados em neoplasias malignas hematopoiéticas e linfoides, tais como leucemias e linfomas, além de cânceres que acometem células nervosas (THOMPSON & THOMPSON, 2008). Diante de todo esse cenário nos deparamos com os cinco tumores mais frequentes em todo o mundo, são eles o câncer de pulmão, mama e colorretal, próstata e estômago (BRAY et al.,2018), onde o de pulmão tem detido as maiores preocupações.

1.2. Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão ocupa a terceira posição entre os mais prevalentes em homens e a quarta posição em mulheres no Brasil (INCA, 2023).Globalmente, continua liderando as estatísticas de mortalidade entre homens e está em segundo lugar entre mulheres (INCA, 2018) e sabemos inclusive que ele é o mais comum de todos os tumores do mundo, pelo menos a cada ano, 1,8 milhões de pessoas recebem o diagnóstico e 1,6 milhões de pessoas chegam a óbito (HIRSCH et al., 2016).

Seu subtipo chamado de câncer de pulmão de não pequenas células, representa cerca de 38% dos casos de câncer no país, ele é um tumor maligno no tecido epitelial de revestimento dos brônquios que em alguns casos pode se espalhar através de metástases para diversas partes do corpo, se tornando cada vez mais agressivo para os pacientes e sabe-se que, aproximadamente, 80 a 85% dos diagnósticos são para esse tipo e muitos pacientes possuem prognóstico insatisfatório, onde temos como principal fator de risco para o desenvolvimento do tumor o tabagismo e sua incidencia se dando tanto em fumantes ativos como em fumantes passivos - aqueles expostos a fumaça dos fumantes ativos (LU et al., 2020). Além de ser um dos mais agressivos e de acordo com dados do OPAS em 2023, ele é o tipo de câncer que mais causa morte.

Figura 2. Dados sobre Câncer de pulmão no Brasil. (O GLOBO, 2023)

Os estudos do Instituto do Câncer – INCA, de 2022, apontam ainda que no Brasil cerca de 29 mil pessoas já morreram em decorrencia da doença que possuí sua maior incidencia em homens de 50 a 70 anos com consumo excessivo de tabaco, essa doença se torna ainda mais letal já que apenas

16% são diagnosticados no estágio inicial, pelo fato de ser uma doença silenciosa o tumor muitas vezes acaba por ser diagnosticado em estágios mais avançados ou quando se há a presença de metastase, fazendo com que tenhamos uma taxa de sobrevida relativa de cinco anos para câncer de pulmão em 18% em média (15% para homens e 21% para mulheres, e daqueles 16% de cânceres diagnosticados em estagio inicial cerca de 56% tem uma tava de sobrevida em cinco anos.

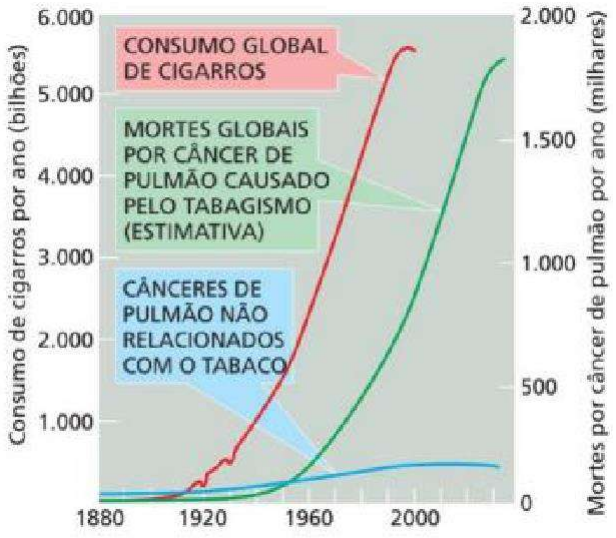


Figura 3. Gráfico da relação do consumo de tabaco e o aumento do número de mortes por câncer de pulmão.
(Alberts, Bruce et al., 2017 - Dados de R.N. Proctor, Nat. Rev. Cancer 1:82–86, 2001.)

Esta associação entre o progresso do tumor com a utilização do tabaco é aceita desde a década de 1950 onde os estudos demonstraram que a mortalidade por câncer de pulmão era diretamente proporcional com a carga tabágica (Fig.2) (DOLL & HILL.,1954).

Cerca de 87% dos diagnósticos para o câncer de pulmão tem relação com a exposição ao tabaco e as chances de um fumante ativo desenvolver o carcinoma são de 24 vezes maior que os não fumantes (LU et al., 2020). A utilização do tabaco está associada a outros fatores que auxiliam na progressão do tumor como baixo nível socioeconômico, desnutrição, imunodepressão e mutações que promovem a tumorigênese (DE GROOT et al.,2018). Cerca de mais de 4.000 substâncias foram identificadas do tabaco, entre os mais de 60 agentes tumorais presentes no tabaco e na fumaça do cigarro, há duas classes fundamentais, que são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e nitrosaminas, cujo o processo metabólico de substâncias cancerígenas inaladas foi revisado por Spivack em 2008. Além disso o tabagismo passivo, onde pessoas que convivem com fumante são expostas aos quimicos nocivos gerados na fumaça do cigarro que chega a conter mais de 7000 mil substancias químicas tóxicas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022) também tem sua marca de

causa desse tipo de câncer, apesar de uma porcentagem mais baixa em cerca de 15%. A gravidade dessa associação entre tabaco e o Câncer de Pulmão de não pequenas células é tão grande que o Tabagismo foi classificado como uma doença além de inserido na 11ª Classificação Internacional de Doenças [CID-11] para Estatísticas de Mortalidade e Morbidade, alocado no grupo de "transtornos mentais, comportamentais ou do neurodesenvolvimento" dentro de “distúrbios devido ao uso de nicotina" (WHO, 2022). Outro avanço que se fez necessário foi a lei de proibição do fumo em locais fechados que entrou em vigor no Brasil a partir de 2011.

Em geral, como a maioria dos compostos orgânicos carcinógenos derivados do tabaco são insolúveis em meio aquoso, há necessidade de oxidação e conjugação para a excreção para meios aquosos. O receptor de hidrocarbonetos de arilo se liga a hidrocarbonetos aromáticos recebidos. Neste contexto de detoxificação destes compostos, os membros da família do citocromo p450, ativam 14 aromáticos policíclicos, enquanto os membros pertencentes à família glutationa – S – tranderona, inativam esses carcinógenos, onde os fenótipos combinados podem aumentar a ativação de carcinogênicos e prejudicar a inativação, contribuindo para o aumento de risco para o desenvolvimento do câncer. (SPIVACK et al., 2008). Tais substâncias presentes no tabaco promovem danos no DNA mediante ativação de moléculas pró-carcinogênicas que causam bloqueio do crescimento celular e a regulação celular normal, ocasionando o desenvolvimento do câncer. (WARREN AND CUMMINGS., 2013). A ativação dos oncogenes é um processo que contribui para tumorigênese, e inclui mecanismos moleculares como amplificação, mutação pontual, translocação e superexpressão de proteínas, ou então o aumento do nível transcricional do gene.

Um dos primeiros genes a serem identificados como supressor tumoral foi o gene retinoblastoma (Rb), quando mutado, sua função é alterada e se torna relevante na tumorigênese. Ele é descrito como um componente importante da via reguladora INK4A/CICLINAD1/pRb/E2F, inativada na maioria dos tumores, e é encontrado na sua forma mutada em sequenciamentos genômicos de retinoblastomas, osteossarcomas e câncer de pulmão de não pequenas células (DYSON, 2016) (CHEN et al.,2020). Um gene de supressão tumoral que também frequentemente sofre mutações no câncer de pulmão é o p53. Em resposta a diferentes tipos de estresse celular, a proteína tp53 é rapidamente estabilizado e passa a se localizar no núcleo, que após ser ativada, se liga ao promotor p21 estimulando sua expressão e bloqueando a progressão do ciclo celular. Porém, a forma mutada da p53 não é capaz de promover a ativação de p21, contribuindo para o aumento de células malignas. A função da p53 é relativa e depende do seu contexto, dependendo dos seus efeitos na ativação da atividade transcricional em alguns lugares, enquanto reprime outros, cujo equilíbrio resulta em reparação do DNA, apoptose, senescência ou autofagia (DAI & GU, 2010;

CHEN et al., 2020). No câncer de pulmão 15 das mutações nestes genes supressores de tumores se relacionam com a utilização do tabaco, com expressão alterada em 40% a 70% no SCLC e 40% a 60% no NSCLC. A mutação em p53 confere um pior prognóstico em pacientes com NSCLC. (STEELS et al., 2001). Os pró- oncongênicos membros da família RAS (KRAS, NRAS e HRAS), são responsáveis por codificar uma família de proteínas de ligação de GTP (guanosina trifosfato). Tais moléculas regulam o crescimento celular, diferenciação e apoptose ao interagir com vários efetores a jusante, como proteínas ativadas por mitógenos (MAPK), cascata de sinalização de fosfoinositídeo 3-quinases (PI3K) e transdutor de sinal e ativador transcricional (STAT) (RIELY et al., 2009) (TAO et al., 2014). Cerca de 15 a 25% dos casos de NSCLC possuem mutações em KRAS e mais de 90% dos casos mutantes KRAS ocorrem nos éxons 2 e 3 (BROSE et al., 2002). Tais mutações dificultam a atividade intrínseca de GTPase de RAS e confere resistência aos ativadores de GTPase, ocasionando o acúmulo de RAS no seu estado ligado a GTP ativo, sustentando a ativação da via de sinalização RAS (GUO et al., 2020). As mutações em KRAS tem um papel fundamental na tumorigênese pulmonar e possuem relação com o tabagismo (THU et al., 2012). A mutação em KRAS é um fator de pior prognóstico, inclusive no NSCLC após a ressecção cirúrgica. Mutações em outros genes de RAS também ocorrem em adenocarcinomas, porém com uma frequência menor (GROSSI et al., 2003).

1.3. Tratamento

O tratamento do NSCLC baseia-se em quimioterapias à base de platina (XIÃO et al., 2016), radioterapias (BHATIA et al., 2016), ressecção cirúrgica (VAN DER PIJL et al., 2010) e terapia alvo (FENG.,2017). As substâncias à base de platina iniciam seus efeitos citotóxicos através de ligações ao DNA, interferindo no mecanismo de reparo (YU., 2017). Porém o tratamento contínuo é evitado devido ao desenvolvimento de resistência ao fármaco (ZHAO et al., 2014). Devido a busca de biomarcadores para a identificação precoce de doenças, inúmeras moléculas potenciais para o diagnóstico de câncer de pulmão foram investigados, como receptores de tirosina quinase como EGFR (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico) e ALK (Linfoma quinase Anaplásico). Porém, a grande dificuldade é a determinação específica para cada paciente, em particular a combinação mais eficaz que resulte em um tratamento ideal com baixos efeitos colaterais. (LEMJABBAR-ALAOUI et al., 2015; VILLALOBOS AND WISTUBA., 2017). Por estas razões, muitos pesquisadores têm procurado novas substâncias que possuam efeito antitumoral, mas que sejam menos tóxicas para o paciente e possam reverter a resistência. Os compostos fitoquímicos se tornaram uma

opção promissora já que eles possuem vários benefícios para distúrbios como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, além de possuírem atividades antioxidantes e anti-inflamatórias, interferindo em mediadores pró-inflamatórios (AL-ISHAQ et al.,2020).

1.4. Fitoterápicos e a Biodiversidade Brasileira.

Os Fitoterápicos, ou medicamentos fitoterápicos, são derivados de plantas medicinais e ganharam atenção como tratamentos alternativos para várias condições de saúde. Esses remédios naturais são frequentemente considerados mais acessíveis e menos agressivos do que os medicamentos tradicionais (PEREIRA *et al*., 2022, LUCENA & GUEDES, 2020). Pesquisas têm mostrado resultados promissores no uso de fitoterápicos para tratar obesidade e hipertensão, com estudos relatando reduções significativas na porcentagem de gordura corporal e potenciais benefícios cardiovasculares (PEREIRA *et al*., 2022, LUCENA & GUEDES, 2020). A fitoterapia é um tipo de tratamento na medicina que é utilizada desde as antigas civilizações como a chinesa, indiana, egípcia e grega. Hoje, a utilização de fitoterápicos é um método racional que se baseia em dados científicos utilizados em tratamentos médicos de várias doenças (ALVES, 2013). Havia uma expectativa muito grande em relação ao Brasil considerando a sua extensa e diversificada flora (YUNES et al., 2001), isso porque o país têm uma longa história de uso tradicional, apoiada pela nossa rica biodiversidade e diversidade cultural do país (SARAIVA et al., 2015). O governo brasileiro inclusive, implementou políticas para promover o uso de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no sistema de saúde pública desde 2006 (FERREIRA et al., 2023) quando implementou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos aumentando o uso deles dentro do SUS, com diversas modalidades espalhadas por todo o país (Figura 4).

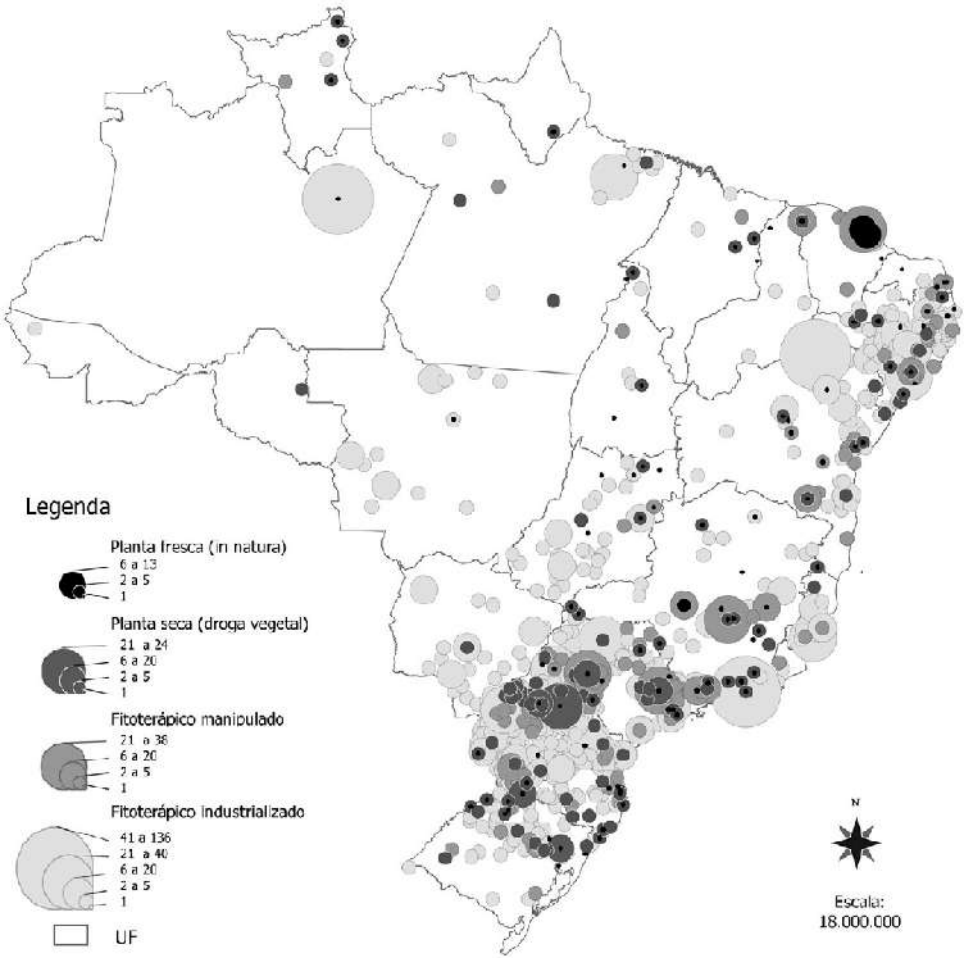


Figura 4: Brasil: estabelecimentos municipais com fitoterapia no SUS por município, segundo quatro modalidades de produção (planta fresca, planta seca, fitoterápico manipulado e fitoterápico industrializado) em 2012. Fonte: RIBEIRO, L. H. L., 2019

As florestas Atlântica e Amazônica formam cerca de 30% do restante das florestas tropicais encontradas na superfície terrestre, acolhendo uma grande diversidade biológica (MEDEIROS, 2004). Porém, mesmo com toda essa biodiversidade, o desenvolvimento e a produção em todas as etapas de um medicamento oriundo de vegetais está longe de alcançar todo seu potencial (ALVES, 2013). A utilização de fitoterápicos é um método racional e alopático que tem como base evidências científicas empregadas no tratamento clínico de várias patologias. Já foram descritos a eficácia de plantas medicinais no tratamento de doenças como Alzheimer, doenças cardíacas, malária, leishmania, esquistossomose, câncer, herpes, artrite, além de atividades antibióticas, anti-inflamatórias, anti-úlcera, antinociceptivo, antidiabético e antidiurético (ALVES., 2013). Por isso, se torna cada vez mais necessário os estudos e conhecimentos da nossa biodiversidade na flora brasileira e o potencial das plantas ao nosso redor.

1.5. Manilkara huberi

A *Manilkara huberi* (Figura 5) é uma espécie madeireira amazônica predominante em florestas de terra firme, com altura de até 50 metros. Possui o nome popular de Maçaranduba, ela é muito explorada por sua madeira de alta densidade e alto valor comercial, as populações de sua espécie estão vulneráveis devido a exploração predatória para extração ilegal de madeira e também às alterações climáticas.

A espécie exibe estrutura genética espacial significativa até 300 m, com fluxo limitado de sementes e pólen, sugerindo que grandes áreas são necessárias para manejo e conservação eficazes (AZEVEDO et al., 2007). A extração seletiva impacta significativamente as populações de M. huberi, com aumento nas taxas de mortalidade observadas até sete anos após a colheita, principalmente entre árvores maiores (DIONISIO, 2020). A recuperação da estrutura populacional da espécie é lenta, com a restauração da área basal potencialmente exigindo mais de um século (CASTRO & CARVALHO, 2014). A espécie apresenta baixo dinamismo em densidade, frequência e dominância ao longo de 26 anos pós-exploração, indicando a necessidade de estratégias específicas de manejo e tratamentos silviculturais para promover a regeneração natural e o crescimento de plantas mais jovens (CASTRO & CARVALHO, 2014).

Figura 5 – *Manilkara huberi*. Fonte: https://www.biodiversity4all.org/photos/34591717

Não há estudos que investiguem diretamente o potencial medicinal de *M. huberi*, a maioria

da literatura que está disponível sobre a espécie possui uma maior concentração em seu valor comercial e exploração madeireira, bem como na ecologia, genética populacional e esforços de conservação para preservar as populações selvagens ainda existentes e ainda estudos que discutem principalmente sua distribuição nas florestas da Amazônia e o impacto da exploração madeireira intensiva.

Dessa forma, *M. huberi* ainda segue com seu potencial medicinal inexplorado e um dos primeiros passos na busca em nossa flora sobre o potencial de estudo de plantas para ajudar nos tratamentos de doenças e na preservação de uma espécie nativa, começa pela busca por diferentes vias intracelulares exploráveis para o tratamento do câncer, como o caso da apoptose e a autofagia.

1.6. Autofagia

A autofagia é um processo catabólico conservado em células eucarióticas que mantém a homeostase celular degradando organelas e macromoléculas danificadas (POLEWSKA, 2012; MILTON-LASKIBAR et al., 2018; MURATI et al., 2020). Ela desempenha um papel duplo no câncer, potencialmente o início do tumor suprimindo danos crônicos e instabilidade genômica, ao mesmo tempo em que apoia o crescimento de células tumorais mantendo funções mitocondriais (CORTEZ DA SILVA et al., 2020). A autofagia é regulada por vários estímulos fisiológicos, com privação de nutrientes e estresse energético sendo os indutores mais fortes (MURATI et al., 2022). O processo envolve a formação de autofagossomos, que se fundem com lisossomos para degradação de conteúdo (POLEWSKA, 2012). Pesquisas destacaram a importância da autofagia na manutenção da saúde durante infecções, câncer e doenças neurodegenerativas (MURATI et al., 2022). No entanto, a autofagia excessiva pode levar à morte celular (MURATI et al., 2022).

Autofagia vem do grego, " *auto"* que significa "si mesmo" e " *fagia* " que significa "comer" e é usada para descrever o conjunto de reações moleculares que resultam na degradação de componentes intracelulares nos lisossomos, um processo descrito pela primeira vez em 1963 por Christian de Duve enquanto observava como pequenas vesículas chamadas lisossomas ajudavam na limpeza celular, descoberto essa que lhe rendeu inclusive um Prêmio Nobel em 1974. Já na década de 1990, Yoshinori Oshumi descreveu um conjunto de genes que estariam relacionados à autofagia, conhecido como ATG, que o levou a receber o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina em 2016 (HARNETT MM et al., 2016).

A autofagia é tida como uma das bases da sobrevivência celular já que permite reduzir o desperdício celular, preservar a energia celular e adaptar-se às diferentes mudanças, regulando a abundância de componentes intracelulares além de contribui para a manutenção de um balanço energético positivo através da degradação e utilização de organelas, glicogénio ou lipídeos (MACHO-GONZÁLEZ, A.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J., 2023).

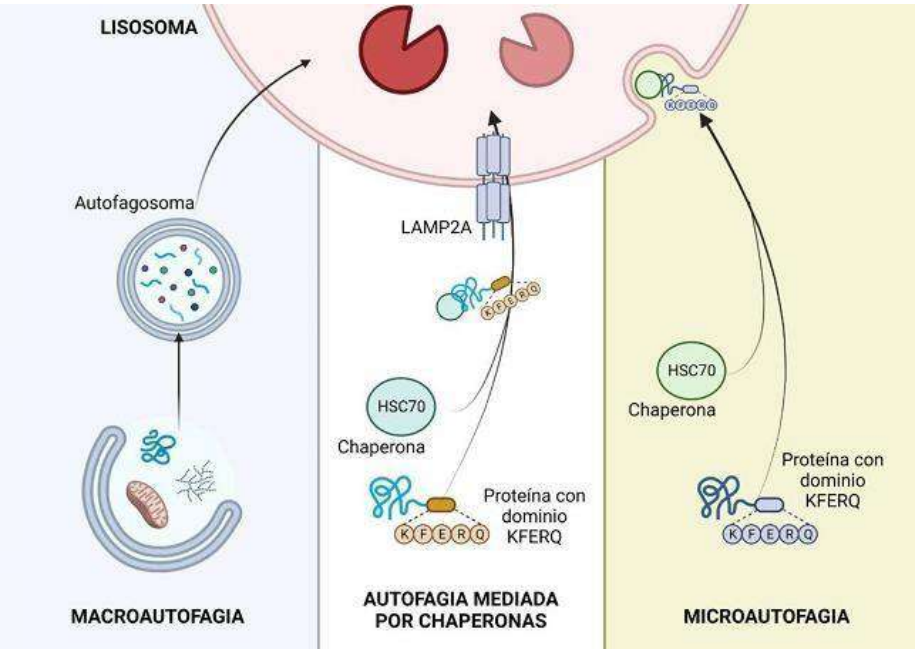


Figura 6. Vias autofágicas em mamíferos. Fonte: (MACHO-GONZÁLEZ, A.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J., 2023)

Conforme a literatura, sabe-se que existem três formas principais de autofagia que já foram descritas em células de mamíferos: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por acompanhantes (Figura 6).

Macroautofagia é a via de reciclagem lisossômica na qual os elementos citosólicos destinados à degradação são sequestrados por uma vesícula de membrana dupla que entrega esse material aos lisossomos (FENG Y, HE D, YAO Z, KLIONSKY DJ. 2014; MEHRPOUR M. et al., 2012). Essa membrana isolante chamada de fagóforo nascente é formada através da montagem de proteínas e lipídios de diferentes organelas como o retículo endoplasmático, aparelho de Golgi ou membrana plasmática e quando ela se fecha da origem ao que se conhece por vacúolo autofágico ou autofagossomo, que se move pelos microtúbulos para se fundir com os lisossomos, que são as organelas que fornecem as enzimas necessárias para ocorrer a

degradação dos componentes sequestrados, criando assim o autofagossomo. Após a hidrólise, os restos de aminoácidos, lipídios e carboidratos chegam ao citosol mediante transportadores e permeasses para reciclagem (MACHO-GONZÁLEZ, A.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J., 2023).

Durante a caracterização desse processo de autofagia a identificação dos genes ATG permitiu compreender mais detalhadamente o processo autofágico com caracterização de diversos ATGs, muitos dos quais possuem ortólogos em eucariotos superiores e uma vez que ocorre o sinal de ativação da autofagia, os genes ATG controlam cada etapa da via da autofagia, desde a formação do autofagossomo até a degradação e reciclagem do material ali dentro (Mehrpour M. et al., 2012).

A autofagia mediada por acompanhantes é a via autofágica pela qual um subconjunto específico de proteínas que atravessam a membrana lisossomal são degradados através da proteína de membrana associada ao lisossoma tipo 2A (LAMP-2A) (FENG Y, HE D, YAO Z, KLIONSKY DJ. 2014). Durante este processo, as proteínas citosólicas destinadas à degradação são reconhecidas pela proteína relacionada ao choque térmico citosólico de 70 kDa (também conhecida como chaperona hsc70) através de um domínio pentapeptídeo (KFERQ) da sequência de aminoácidos da proteína. Uma vez que o complexo acompanhante-substrato atinge a membrana lisossômica ligando-se ao monomérico LAMP-2A, sua multimerização é induzida em um complexo de translocação que transporta a proteína substrato para o lisossoma para degradação. Posteriormente, desdobrado e internalizado, o LAMP-2A é rapidamente degradado no lúmen lisossomal, regulando os níveis do referido receptor e, portanto, limitando a atividade desse tipo de autofagia. A ativação desse tipo de autofagia, além de atuar em resposta às alterações nutricionais, também funciona como mecanismo de defesa contra ataques celulares, no esforço de eliminar proteínas danificadas e garantir a homeostase proteica adequada (MEHRPOUR M. et al., 2012). Por fim, na microautofagia há também o sequestro da carga, mas por invaginação direta ou protrusão do lisossomo, dando origem a pequenas vesículas de parede única provenientes da membrana lisossomal (MEHRPOUR M. et al., 2012).

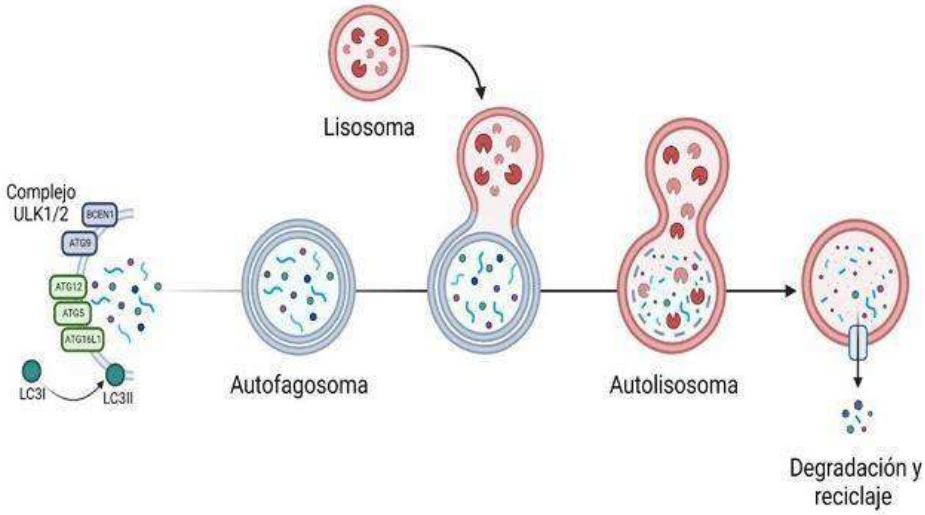


Figura 7. Gênese e desenvolvimento do autofagossomo e participação das diferentes proteínas ATG em seus 6 estágios (nucleação, alongamento, formação do autofagossomo maduro, fusão, degradação e reciclagem. É iniciado pela ativação da quinase ULK1/2- complexo quinase (proteínas quinase semelhante à uridina 1 e 2, respectivamente), que fosforila a proteína Beclin1 (também conhecida como ATG6) que faz parte do complexo iniciador de nucleação do fagóforo e subsequentemente sua conjugação com o complexo ATG5/ATG12/ATG16 (proteínas iniciadoras de autofagia 5, 12 e 16). Continua com o processamento de LC3 (cadeia leve 3 da proteína associada aos microtúbulos) e inserção na membrana do fagóforo. formação do autofagossomo, que então se funde com o lisossomo (autofagolisossomo), onde ocorre a degradação do lisossomo. Fonte: (MACHO-GONZÁLEZ, A.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J., 2023).

Para os fins do presente estudo, os olhares foram voltados para o processo mais comum e bem descrito, a macroautofagia (Figura 7). Inicialmente tem-se controle da formação de fagóforos por Beclin-1 no reticulo endoplasmático e outras membranas em resposta a vias de sinalização de estresse, em seguida a conjugação Atg5–Atg12, interação com Atg16L e multimerização no fagóforo, seguido do processamento de LC3 e inserção na membrana fagófora de extensão e então captura de alvos aleatórios ou seletivos para degradação, finalização do autofagossomo acompanhada de reciclagem de alguns LC3-II/ATG8 por ATG4, seguido de uma fusão do autofagossomo com o lisossomo (criação do autolisossomo) e degradação proteolítica por proteases lisossômicas de moléculas engolfadas.

Este processo pode então ser dividido em cinco simples fases na imagem acima:

1) nucleação

2) alongamento

3) formação do autofagossomo maduro

4) fusão

5) degradação

6) reciclagem

A fase de nucleação é regulada pelo complexo mTORC1, um complexo formado por 5 proteínas: mTOR, Raptor (*proteína associada à regulação do mTOR*), GbetaL ou mLST8 (proteína letal de mamífero 8 com SEC13), PRAS 40 (substrato de 40 kDa de Akt rico em prolina) e DEPTOR, cuja regulação depende da relação AMP/ATP que, por sua vez, está relacionada com o estado nutricional e metabólico. Este complexo bem como as proteínas, são regulados por fosforilação/desfosforilação e ativam as proteínas responsáveis pelo início do processo, através da ativação de UKL1/UKL2 (proteínas quinases semelhantes a uridina 1 e 2, respectivamente) (figura 7).

Grande parte do processo é mediado por proteínas da família ATG (proteínas iniciadoras de autofagia), que se ligam a proteínas ou organelas danificadas, marcando-as para a formação de fagóforos (vesículas de membrana dupla que contêm o material a ser reciclado). Algumas proteínas ATG ligam-se aos fagóforos, promovendo sua maturação e fusão com o lisossomo para formar o autofagossomo (REGGIORI F, UNGERMANN C., 2017). Esta fusão permite que as enzimas lisossómicas lidem com a degradação enzimática de substratos, cujos produtos são então exportados para o citoplasma para reciclagem como mencionado anteriormente.

Como elucidado na figura acima, a presença de proteínas ATG é essencial para o bom funcionamento do processo de reciclagem celular, que tem sido observado desempenhar papéis de indiscutível importância na saúde e alterações no processo autofágico estão envolvidas na fisiopatologia de diversos tipos de doenças por isso a importância de um olhar cuidadoso para com este complexo (KERR JS, ADRIAANSE BA, GREIG NH, et al., 2017; RAVIKUMAR B, VACHER C, BERGER Z, et al., 2004).

1.7. Apoptose

Conforme a classificação proposta em 2009 pelo Comitê de Nomenclatura de Morte Celular, existem duas classes de morte celular: a morte celular programada (incluindo a apoptose e a autofagia), e a morte celular não-programada; necrose (KROEMER et al., 2009). Apoptose é um termo que provém do grego *apoptwsiz*, formulado em 1972 por Kerr para se referir a um processo de morte celular programada, proporcionando alterações morfológicas e moleculares, capazes de diferencia-la de outros tipos de morte (GÁLVEZ et al., 2018). As alterações morfológicas celulares características da apoptose, envolvem: o arredondamento celular; no caso de células aderentes; recolhimento dos pseudopodes, redução do volume celular e nuclear; devido a fragmentação citoplasmática e nuclear; modificações nas organelas e formação de vesículas que englobam o conteúdo celular; denominados de corpos apoptóticos e correspondendo a uma das principais características deste processo (KERR et al., 1972; KROEMER et al., 2009).

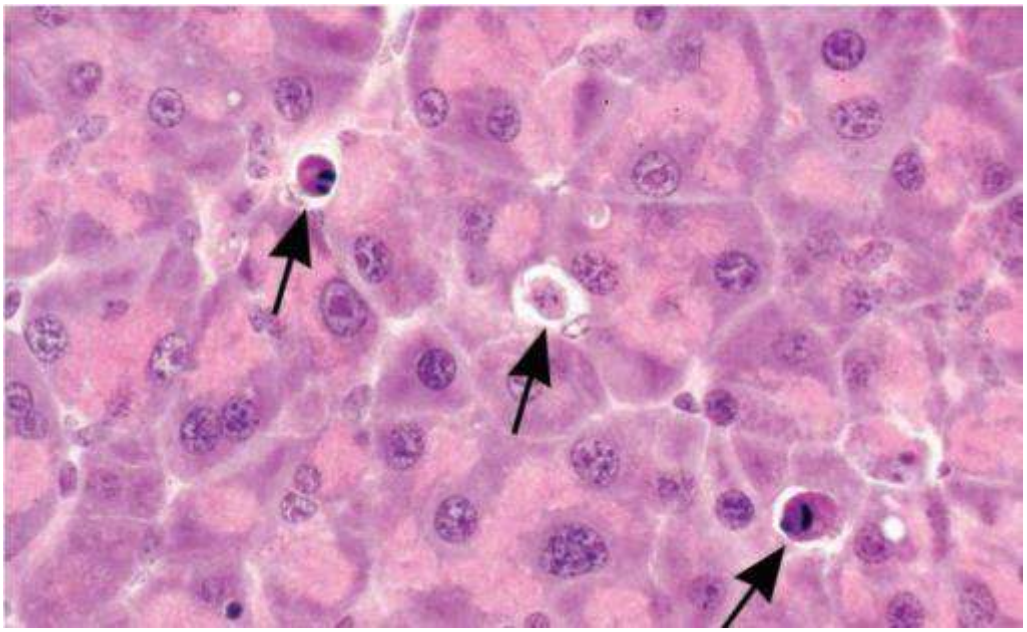


Figura 8: Fotomicrografia de uma secção de pâncreas exócrino com células em apoptose (setas). H&E. Fonte: (ELMORE, 2007).

O desencadeamento da apoptose pode ocorrer a partir de três vias: pela via extrínseca, pela via intrínseca dependente de caspases e ainda pela via intrínseca independente de caspases

(GALLUZZI et al., 2012; GALLUZZI et al., 2018). Com destaque para a via extrínseca e intrínseca por caspases. As caspases são proteases de grande importância para a ocorrência da apoptose; com exceção na apoptose intrínseca independente de caspases.

Inicialmente encontram-se inativas, necessitando ser clivadas para poderem ser ativadas, passando de pró-caspases para caspases (GÁLVEZ et al., 2018). Estas são divididas em dois grupos: as iniciadoras (caspases 2, 8, 9 e 10) e as executoras (caspases 3, 6 e 7) (MCLLWAIN et al., 2013). Independente da via pela qual a apoptose irá decorrer, este processo divide-se em três etapas: iniciação ou ativação, execução e destruição celular (GALLUZZI et al., 2018; WALCZAK, 2013).

Na via extrínseca, a apoptose decorre a partir de sinais de estresse extracelulares; conhecidos como ligantes de morte; que são reconhecidos e transportados por meio de receptores transmembranares; conhecidos como receptores de morte, tal como o receptor FAS (FasR) (GÁLVEZ et al., 2018; JANSSEN et al., 2011). Ocorrendo a interação entre ligantes e receptores de morte, proteínas de ativação são recrutadas; tal como a Fas-associated protein with death domain (FADD); formando o complexo death-inducing signalling complex (DISC), e, portanto iniciando a cascata de caspases, promovendo a apoptose (WONG, 2011).

Enquanto a via intrínseca por caspases são os sinais de estresse intracelulares e ainda extracelulares que promovem a sua ocorrência; entre estes destacam-se: danos ao DNA, deficiência de fatores de crescimento, estresse oxidativo, entre outros (HENGARTNER, 2000; GÁLVEZ et al., 2018). Exercendo um papel essencial nesta via encontram-se a família de proteínas apoptóticas Bcl-2, apresentando papéis fundamentais na regulação deste processo, seja induzindo-o ou reprimindo-o (BORNER, 2003). Esta família proteica divide-se em dois grupos: as proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, entre outras) e as proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, entre outras) (FRENZEL et al., 2009).

As proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xL, encontram-se fora da membrana mitocondrial e atuam impedindo a liberação mitocondrial do citocromo C; elemento fundamental para o desencadeamento da apoptose por esta via; inibindo a ocorrência da apoptose. Enquanto as proteínas pró-apoptóticas; como Bax e Bak; localizam-se no citoplasma e ao receberem a sinalização de estresse celular, são ativadas e deslocam-se para a membrana mitocondrial, onde promovem a formação de poros na membrana, permitindo a liberação do citocromo C (FRENZEL et al., 2009; WALENSKY, 2012). Após a liberação de citocromo C para o citoplasma, este se liga ao fator ativador de proteases apoptóticas (APAF-1), promovendo a obtenção de uma estrutura em que a pró-caspase 9 é recrutada e se associa, denominado de apoptossomo. Neste a pró-caspase 9 é clivada e ativada em caspase 9, que por sua vez ativa a caspase 3, promovendo a ocorrência da

apoptose (CAIN et al., 2002).

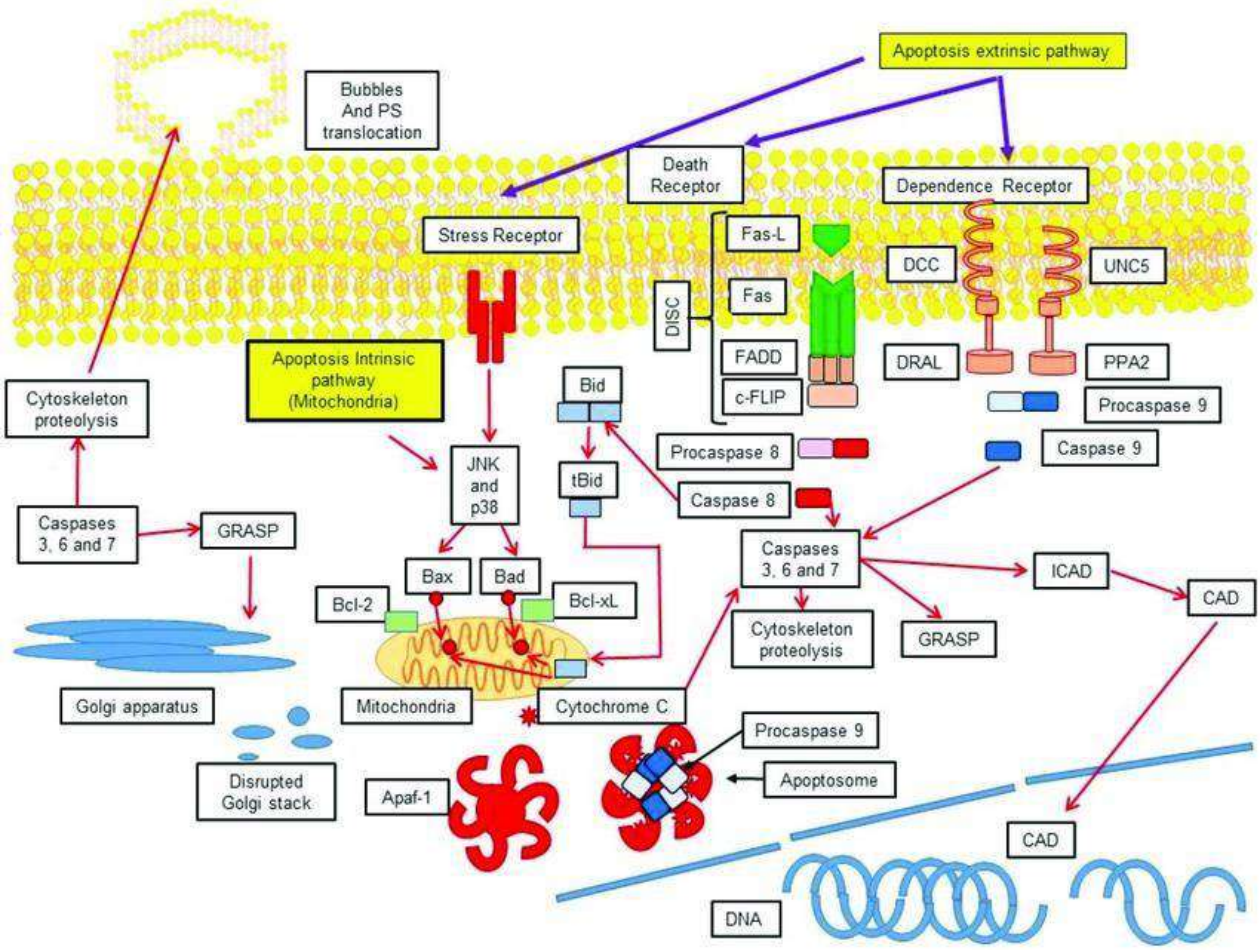


Figura 9: Vias intrínseca mitocondrial e extrínseca da apoptose. Fonte: (GÁLVEZ et al., 2018).

2. JUSTIFICATIVA

Em pacientes oncológicos, como consequência da quimioterapia antitumoral com fármacos convencionais, é frequentemente observado o desenvolvimento de resistencia que se não for devidamente contida pode levar o paciente ao óbito. O câncer de pulmão frequentemente expressa proteínas de resistência a múltiplos medicamentos, que afetam negativamente a resposta à quimioterapia (AP Lario, 2007.), a quimioressistencia chega a ser responsável por 90% de todas as mortes por câncer e 30% das recidivas (ALCÁNTARA COLIN, J. et al., 2023) levando ao uso cada vez maior, mais frequente e doses mais concentradas dos medicamentos, levando não só dor ao paciente, mas também a sua familia, trazendo uma baixa qualidade de vida. A quimiorresistência ocorre quando células cancerígenas

são mais tolerantes ao tratamento e assim se tem um efeito de perdas terapêuticas, estudos recentes descrevem que as bases da quimiorresistência estão em diferentes mecanismos moleculares, onde um dos bem descritos são as bombas de efluxo correspondentes à família de genes ATP-Binding Cassette (ABC). Esses genes codificam proteínas ABC que transportam pequenas moléculas, incluindo os quimioterápicos, para fora da membrana (ALCÁNTARA COLIN, J. et al., 2023), ocasionando a resistencia e com ela a dor adicional ao processo de tratamento.

A busca por um adjuvante ao tratamento convencional pode contribuir para a melhora do tratamento trazendo um novo farmaco menos toxico com maior eficacia, podendo ser usado sozinho ou em conjunto com terapias já existentes que pudessem ser melhoradas para trazer menos danos durante o tratamento e solucionar os problemas de resistencia. Dentro dessa busca, utilizando-se dos conhecimentos da etnobotanica sabemos que as plantas medicinais são eficazes no tratamento de diversas condições e têm o potencial de desempenhar um papel vital na promoção da saúde e no tratamento de doenças (KARINE DA COSTA DUARTE, M.; GOLDFARB DE OLIVEIRA, J., 2024), então poder usar nossa vasta flora para explorar novas plantas que sirvam para esta alternativa seria importante para fortalecer nosso compromisso de proteção com nossas florestas e melhorar cada vez mais a qualidade de saúde dos pacientes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estudar a atividade antitumoral da planta amazônica *Manilkara Huberi* através da avaliação da autofagia e da morte por apoptose, em linhagem de câncer de pulmão de não pequenas células, utilizando extratos e frações da planta.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a viabilidade da linhagem H460 após tratamento com *M. huberi*;
- Avaliar a fragmentação de DNA em H460 induzida pelos extratos e frações;
- Avaliar o potencial de membrana mitocondrial em H460 induzida pelos extratos;
- Avaliar a expressão de proteínas envolvidas na autofagia em H460 induzida pelos extratos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Linhagem e Cultivo Celular.

Para os experimentos, foram utilizadas células da linhagem de câncer de pulmão de não-pequenas células NCI-H460 [H460] (ATCC® HTB-177™). Uma linhagem celular amplamente usada e já bem caracterizada. Sua origem é derivada a partir do fluido pleural de um paciente com câncer de pulmão de grandes células (DN Carney, AF Gazdar, JD Minna, 1982).

Figura 10: Linhagem celular de câncer de pulmão de não pequenas células – H460. Fonte: Acervo pessoal.

As células foram cultivadas em Meio RPMI-1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino conforme as especificações do fornecedor. O soro possui fatores de crescimento, vitaminas e aminoácidos essenciais para o processo do crescimento e foi também acrescentado 0,5% de penicilina, um antibiótico que impede que outros microorganismos se desenvolvam juntamente com as células no meio rico em fatores de crescimento. A cultura permaneceu incubada em uma estufa em atmosfera de 5% de CO_2a 37ºC, imitando a temperatura e as condições que mais se assemelham ao corpo. As células foram mantidas em garrafas apropriadas para culturas aderentes na estufa e com repiques feitos em três dias semanais fixos para garantir o crescimento de células viáveis para os experimentos e todos foram conduzidos em triplicata (n=3).

4.2 Extratos da *Manilkara huberi*

Os extratos de *Manilkara huberi* são recebidos pelo nosso grupo de pesquisa graças a uma parceria com a Universidade Federal do Pará (UFPA), nossos parceiros são responsáveis pelo estudo fitoquímico da planta e os responsáveis por identificar os compostos presentes nela e então nos enviar os extratos e frações em pó ou pasta. Para este estudo fora usados dois tipos de subfrações

derivadas do extrato de *Manilkara Huberi* chamado de MH1, este extrato foi sub-fracionado gerando a fração P10, e esta por sua vez, foi novamente sub-fracionada e gerando nove que receberam nomes de MHF1 a MHF9 onde MHF1 se saiu melhor nos experimentos.

Após ser analisada quimicamente pelos nossos colaboradores, identificou-se as mesmas saponinas triterpênicas como responsáveis pela atividade desses extratos e frações e subfrações, com exceção da subfração MHF7 em um primeiro momento. Após algumas análises dos colaboradores foi descoberto que havia algo talvez diferente em MHF7 e assim se fez necessário trazer ele de volta aos experimentos para avaliar sua atividade.

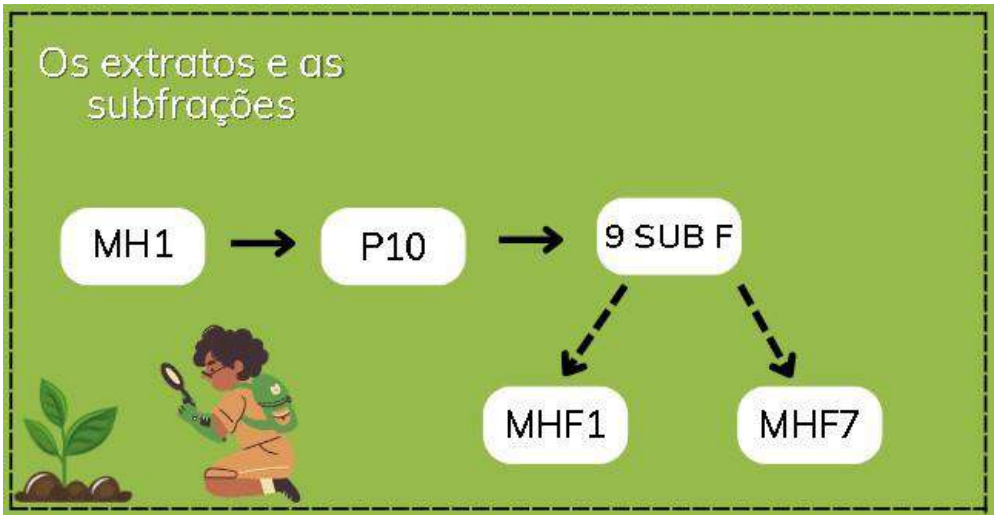


Figura 11: Esquema de fracionamento de extrato e subfração. Fonte: Acervo pessoal.

Os extratos em pó e em pastas são pesados em microtubos onde ele é diluído com o auxilio de DMSO e também meio RPMI sem soro para que o soro não interfira na atividade do extrato. Uma vez diluído, está pronto a solução de estoque e assim usando o cálculo de concentração final e inicial (Ci . Vi = Cf . Vf) e com auxílio de diluição seriada é possível fazer todas as diluições dos extrato, fração e subfrações para os experimentos. O tratamento feito com extrato, fração e subfrações ocorreu por 48h com a ausência ou presença do inibidor de autofagia 3-MA (3-metiladenina).

4.3 Analise morfológica por microscopia de campo claro

No intuito de avaliar a morfologia das células antes e após o tratamento com *M. huberi*, foi utilizada a tecnica de microscopia de campo claro para registrar as alterações morfologicas das células. As imagens foram fotografadas no microscópio Leica DMI 6000 no campo claro para avaliar mudanças em sua morfologia em cada tratamento para procurar diferenças entre eles e em relação ao controle.

Nessa tecnica, o microscopio optico de campo claro é posicionado em direção ao fundo da placa onde temos uma imagem perfeita para a visão de todo o tapete de H460 para registrar se houve ou não mudanças significativas para o experimento, como por exemplo, a formação de vácuolos.

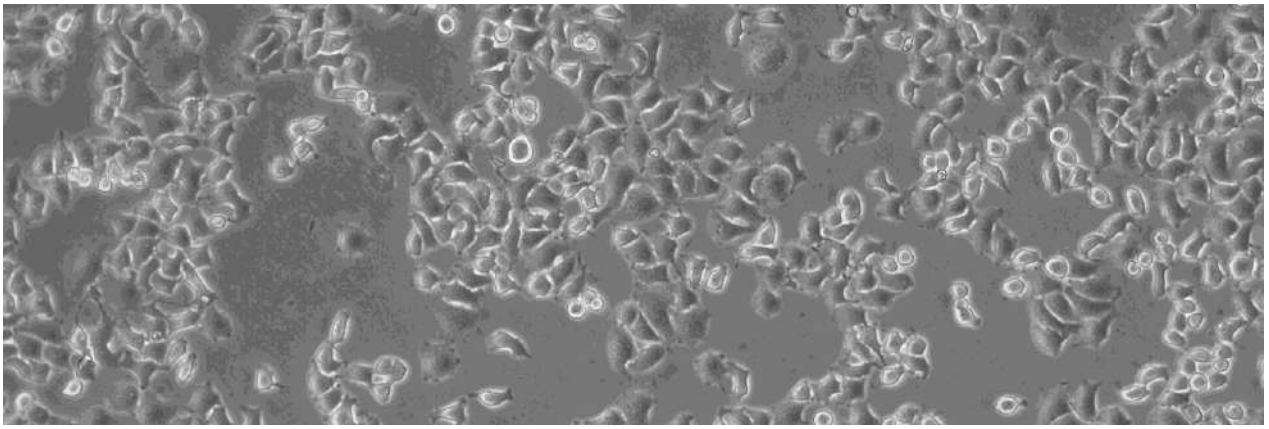


Figura 12: Exemplo de microscópia de campo claro. Fonte: https://www.leica-microsystems.com/, 2024.

As células foram inicialmente plaqueadas em placas de 24 poços com concentração de $6x10^5$ de células em 13,5 ml de meio completo de forma que em cada poço estivesse 450µl de volume final da solução meio + células em suspensão. Para isso, é preciso desgrudar as células com auxilio de tripsina, uma enzima digestiva, após isso, contar as células com auxílio da câmara de Neubauer para que assim fosse possível fazer o cálculo e chegar a quantidade de células por ml que deveriam ser pegas da garrafa de cultura.

Após 24h as células foram observadas para garantir de que cresceram por igual e não houve nenhum problema de contaminação e então o experimento é iniciado trocando o meio de cultura antigo e o substituindo por um novo em todos os poços. A seguir, foram adicionados o extrato MH1 nas concentrações de 10, 25, 50 e 100μg/ml, as frações MHF1 a 9 nas concentrações de 2,5 μg/ml e a fração MHF7 nos experimentos posteriores foi usado a 10, 25, 50 e 100 μg/ml, e após 48h as placas foram incubadas em uma estufa em atmosfera de 5% de CO_2 a 37ºC para cada um dos experimentos, as placas foram fotografadas de forma a comparar as alterações de suas morfologias entre si e em relaçao ao controle que estava apenas com as células e meio de cultura.

Nos experimentos com o uso de 3-MA, após 24h do plaqueamento foi feito o mesmo procedimento de troca de meio e então o inibidor adicionado 1h antes nos poços previamente estabelecidos. A placa voltou para a estufa e passado o tempo, todos os poços receberam as concentrações de MH1 em 200 μg/ml, P10 em 100 μg/ml e MHF1em 10 μg/ml, todas as concentrações que foram previamente estabelecidas como as melhores para extrato, fração e subfração de *M. Huberi*.

Após 48h de todos os experimentos, as placas foram fotografadas para analisar as mudanças da morfologia e assim foi utilizado o software CellProfiler um sistema automatizado de processamento de imagens para detectar e quantificar células vacuoladas sem a necessidade de corantes (CHIANG et al., 2018), com ele foi possível quantificar os vácuolos que apareceram após o tratamento.

Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3).

4.4 Imunofluorescencia

Para a detecção de proteínas envolvidas envolvidas na autofagia foi usado o ensaio de imunofluorescência. Essa técnica de Imunofluorescência se baseia na marcação de estruturas celulares por anticorpos específicos que estão ligados quimicamente a corantes fluorescentes (LI, W. et al., 2019), no caso desse estudo o anticorpo escolhido havia sido um que estaria presente na formação do vacúolo caso fosse autofágico, assim, estes anticorpos ligam-se diretamente ou indiretamente aos antígenos de nosso interesse. O corante fluorescente é submetido a uma fonte de luz de curto comprimento de onda, ele então absorve a energia dessa luz e então emite luz com um comprimento de onda superior ao que recebeu e assim o antígeno marcado por ser visualizado ao microscópio de fluorescência graças a sua luminosidade emitida

Dessa forma, sabemos que existem dois tipos de imunofluorescência, a direta

(imunofluorescencia primária) e indireta (imunofluorescencia secundária). Onde a imunofluorescência direta um anticorpo quimicamente ligado ao fluoróforo vai se ligar ao antigeno de interesse, enquanto que, na imunofluorescência indireta vou ter um anticorpo primário vai se ligar ao meu antigeno de interesse e enão é adicionado o anticorpo secundário que contém fluoróforo que ira se ligar com o primeiro anticorpo adicionado. Essa interação traz um brilho verde no microscopio de fluoresência LEICA 6000 usado, isso acontece graças aos lasers especificos ali presente que vão excitar o fluoroforo que assim emitirá a cor especifica indicando a presença do antigeno alvo do estudo.

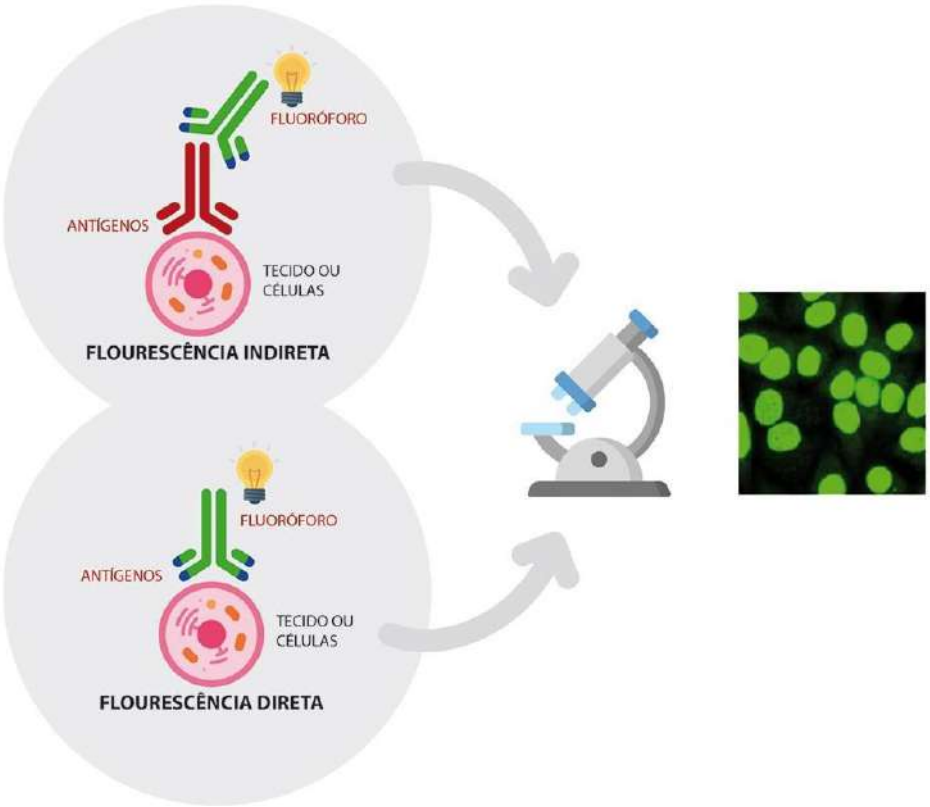


Figura 13: Representação esquemática do princípio geral da técnica de imunofluorescência. Fonte: Argos Patologia.

Nesse ensaio, usando os conceitos de Fluorescência Indireta, as células H460 foram semeadas em placas de 24 poços a $2x10^4$ células por poço e após 24h foi adicionado o tratamento com o extrato MH1 na concentração de 200 µg/ml com e sem a pré incubação do inibidor de autofagia 3-MA 1h antes.

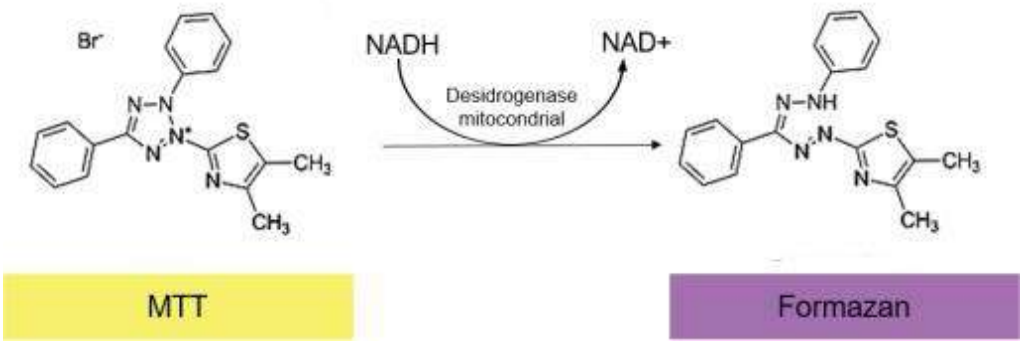
Em 48h após o tratamento, o sobrenadante foi retirado e as células foram fixadas com 200µl de Paraformaldeído 4% por 15 minutos, após isso, as células foram lavadas com 500 µl de PBS 1x seguida por uma permeabilização com 200µl de Triton por 30 minutos. Em seguida,

as células foram lavadas com 500 µl de PBS 1x novamente e então bloqueadas com 200µl de Solução de Albumina Bovina (BSA) 1% (Solução Bloqueio). Posteriormente, as células foram incubadas com 200µl de Anticorpo primário marcando para ATG12 por 1h na estufa em atmosfera de 5% de CO_2 a 37ºC. Após o tempo decorrido, as amostras foram lavadas novamente com 500 µl de PBS 1x e incubadas com 200 µl de anticorpo Secundário conjugado com Fluorocromo por 1h. Por fim, as células foram lavadas com 500 µl de PBS e levadas para análise no Microscópio Óptico de Fluorescência onde o resultado foi fotografado. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3).

4.5 Inibiçao da viabilidade por MTT

Com a finalidade de se analisar os efeitos dos tratamentos com extrato, fração e subfrações de *M. huberi* sobre a viabilidade celular, foi utilizado o método do MTT (3-*[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide*).

O MTT consiste em um ensaio colorimétrico que fornece a viabilidade celular com base na atividade mitocondrial, ele nada mais é do que um sal de cor amarelada, reduzido através de oxidorredutases dependentes de NAD(P)H intracelulares e principalmente as mitocondriais, conhecidas como desidrogenases mitocondriais, transformando-se em cristais de formazan, que por sua vez apresentam uma coloração violeta e solúvel em solventes como etanol, metanol e DMSO (MEIRELES, 2015; VAN MEERLOO et al., 2011; SURIN et al., 2017). Sendo assim, o quantitativo de formazan produzido é diretamente proporcional à viabilidade celular, logo, quanto maior for o número de cristais formados nessa redução, maior será a absorbância e assim, maior a viabilidade celular.



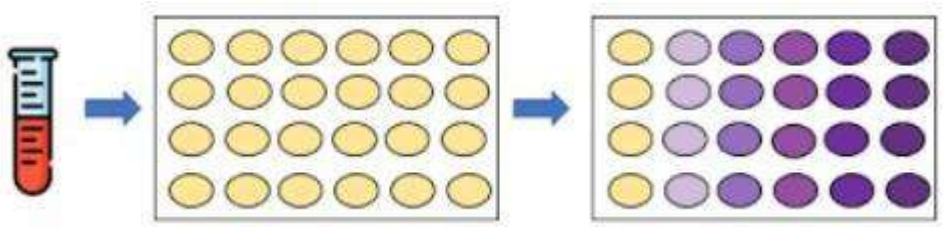


Figura 14: Reação de redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) a formazan (sal de coloração arroxeada e insolúvel em água). Fonte: MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME., D. M., 2018.; Acervo pessoal produzido através do Biorender.

Para este ensaio as células foram plaqueadas em placa de 96 poços, sob a concentração de $1x10^4$ células/poço, de forma que o volume total em cada poço variou de acordo com os poços de controle para os poços onde foi adicionado 20 µl do extrato e subfrações, com a finalidade de se obter um volume uniforme em todos os poços após a aplicação das drogas; sendo 180µl no controle, 180µl nos poços que receberiam os tratamentos em diferentes concentrações. Após o plaquemento, as células foram incubadas por 24h à 37oC para o estabelecimento das células bem como sua adesão ao fundo da placa, posteriormente foram aplicados os respectivos tratamentos.

Após a aplicação, o tempo de incubação à 37oC foi de 48h. Posterior ao tempo de incubação, foi aplicado 20µl/poço de MTT sob a concentração de 5mg/mL, diluído em PBS estéril 1X; após a aplicação do MTT para que a reação pudesse ocorrer, as células foram incubadas à 37oC por 4h ao abrigo da luz, visto a fotossensibilidade do MTT.

Passado o tempo de incubação, o sobrenadante foi descartado e posteriormente foi adicionado 150µl/poço de DMSO, ocorrendo homogeneização até completa dissolução dos cristais com cuidado para evitar a formação de bolhas que podem atrapalhar a leitura. Com isto, a absorbância foi lida por meio do leitor de microplacas à 570nm. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3).

4.6. Fragmentação de DNA por Citometria de fluxo

A fragmentação do DNA foi avaliada por análise do ciclo celular utilizando citometria de fluxo. A Citometria de Fluxo é uma técnica analítica poderosa que permite a medição simultânea de múltiplas características de células ou partículas individuais em uma amostra, baseada no emprego de laser óptico amplamente utilizado para contagem individual de células e

detecção de biomarcadores em proteínas. (SÁNCHEZ-TORRES et al., 2022). Ela permite a identificação e classificação de diferentes populações de células com base em seu tamanho, complexidade interna e expressão de moléculas específicas (PÉREZ LARA et al., 2018).

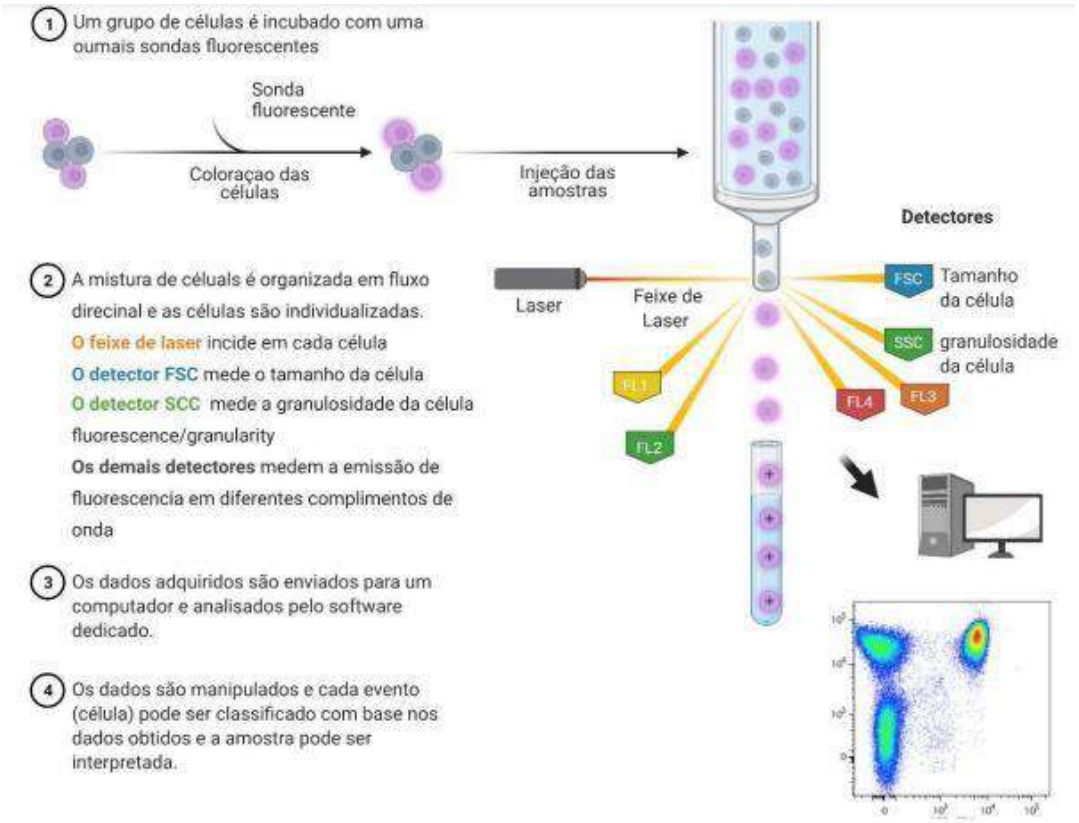


Figura 15: Representação esquemática da técnica de citometria de fluxo. FSC Criado com Biorender. Fonte: BUSTAMANTE, I. C., Filho; MOURA, A. A.; BUCCI, D., 2021.

Através de um feixe de laser incidente que faz a medição da dispersão e da fluorescência do feixe de laser refletido, ao incidir sobre a célula, o laser sofre desvio ou refração e assim, seus feixes secundários são captados por detectores independentes que farão mensurações individuais para a rápida identificação de células no instante que estas passam através do detector eletrônico em uma corrente líquida.

Após a separação individual celular, é feita então a análise, contagem, e qualificação das micropartículas suspensas em fluxo no meio líquido, assim, cada mensuração é convertida em dados que são veiculados a cada célula que está sendo avaliada (evento), realizando com rapidez a identificação de inúmeras características biológicas contidas nas células como: os ácidos nucleicos, receptores de superfície, epítopos de proteínas, a síntese de proteína e DNA fragmentado, ao mesmo tempo dentro de uma célula única. Essas informações são transmitidas a um software em um

computador acoplado ao aparelho, que irá permitir o manuseio, processamento, leitura e interpretação dos dados (GIVAN, 2001).

Após atingir confluência, as células semeadas ($2x10^4$ / poço) foram tratadas com variadas concentrações de *M. huberi* e incubadas por 48h. Primeiro, são previamente etiquetados microtubulos identificando qual tipo de amostra será inserida nele para posterior análise, em seguida, o meio da placa é guardado em seus respectivos microtubos para contar as células mortas.

Depois, as células da placa são tripsinizadas e adicionadas aos microtubos, estes são centrifugados em um pulso de dez segundos em 14800 RPM e o sobrenadante é ressuspendido em solução fluorescente hipotônica 1:10 de HFS (50 µg / ml de iodeto de propídio (PI) que vai marcar o DNA das células para a fluorescência e 0,1% de Triton X-100 para permeabilizar a membrana das células, em 0,1% de tampão citrato de sódio) por 1h, a 4°C no escuro. A análise foi realizada por citometria de fluxo (FL-2) e passado o tempo de encubação, foi possível ver a fluorescência de todos os DNA's e como os fragmentados são menores, eles vão possuir uma fluorescência menor e assim vão ser analisados no início do gráfico para que possam ser contabilizados. Todos os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3).

4.7. Analise estátistica.

A significância estatística dos resultados foi determinada por análise variância (*one-way* ANOVA), seguida do teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. As análises foram realizadas utilizando o software Graphpad Prisma 8.0.

5. RESULTADOS

5.1. Inibição de viabilidade em células tratadas com A7 (MH1)

Ainda não se sabe sobre os efeitos de *M. Huberi* como futura terapia alternativa ou coadjuvante para nenhum tipo de tratamento em câncer de pulmão de não pequenas células (H460), por isso, de forma a avaliar seu efeito na inibição da viabilidade celular, o ensaio de MTT foi conduzido inicialmente.

O efeito do extrato A7(MH1) sobre a viabilidade celular de H460 após 48h de incubação pode ser observado na figura 16, onde foram testadas as concentrações de 10, 25, 50 e 100µg/ml, além das respectivas porcentagens de DMSO contidas no extrato naquela

concentração. Observa-se a taxa de abasorbância dos cristais produzidos no MTT, indicando uma redução da viabilidade celular pelo extrato de maneira dependente da dose, destacando a concentração de 100µg/ml de A7 que promoveu a maior redução da viabilidade celular. Indicando desta forma, a ocorrência dos efeitos citotóxicos pelo extrato nas células de H460.

Os extratos foram previamente diluídos em DMSO dessa forma, ele foi adicionado para comparativo com controle, indicando que na sua presença não houve interferência nos resultados.

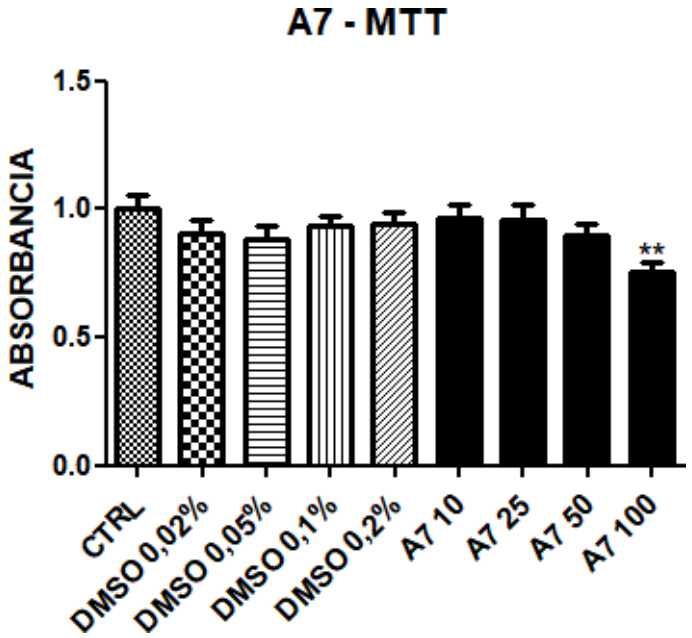


Figura 16: Inibição de viabilidade em células tratadas com A7 (MH1). Absorbância dos cristais de frmazam gerados pelas células tratadas com A7 nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/ml e também nas porcentagens de DMSO. Os resultados foram analisados e comparados em relação ao controle. Os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3).

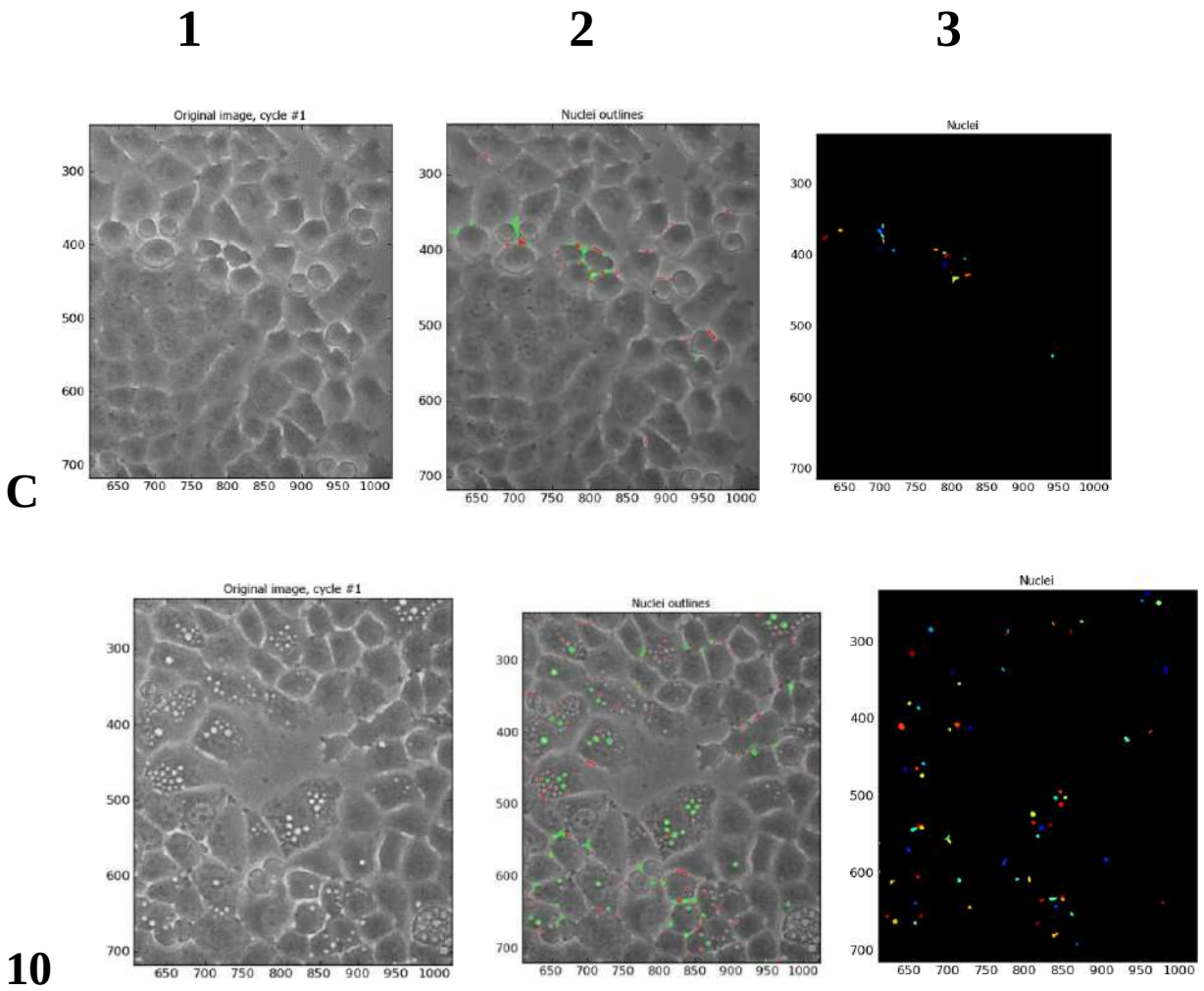
5.1. MH1 induziu extensa vacuolização de maneira dose dependente em células H460.

Mediante a observação inicial dos efeitos citotóxicos do extrato MH1, foi necessário avaliar como a morfologia da célula H460 se comportaria após a exposição do tratamento com o extrato e se haveria alguma mudança significativa que indicasse um caminho a seguir avaliando seus efeitos.

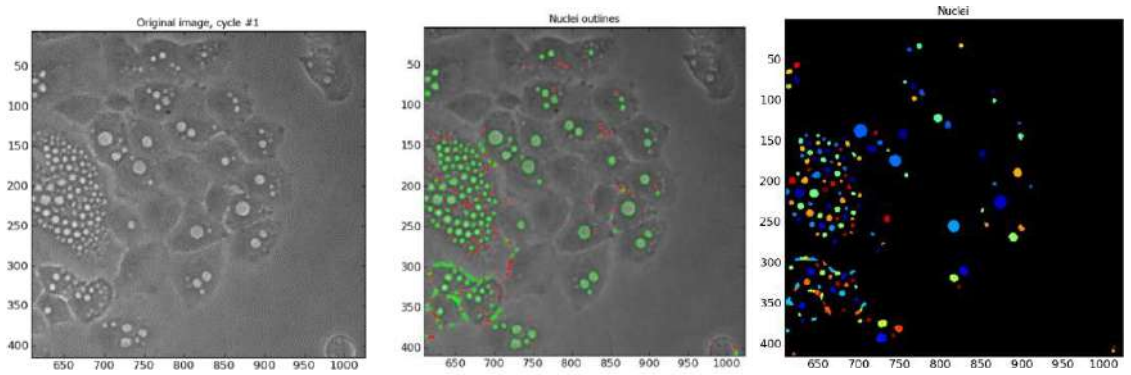
Para avaliar possíveis alterações morfologicas foi utilizado a microscoia de campo

claro para a analise morfológica de H460 e o resultado pode ser visto na figura 17. Foram usadas as mesmas concentrações do experimento anterior novamente por 48h para avaliar as mudanças que foram fotografadas e então analisadas no cellprofiler com parametros já seguidos no grupo de pesquisa para marcação de vacúolos. A coluna toda foi dividida em tres partes: sendo a numero 1 a coluna com a foto original da placa e a numero 3 sendo os vácuolos marcados pelo software e no meio, a coluna de numero 2 representa a união das imagens de 1 e 3 onde elas estão sobrepostas.

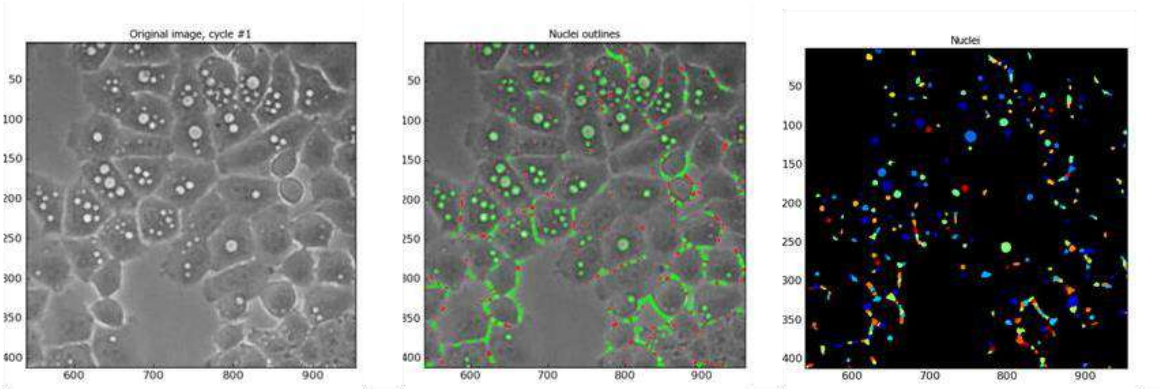
Foi possível perceber a formação de vácuolos de maneira extensa nas células que foram tratadas com MH1, além do fato de que essa formação de vácuolos acontecem de maneira dose dependente onde novamente a concentração de 100µg/ml se destaca como o melhor resultado obtido.



25


Original image, cycle #1
Nuclei outlines
Nuclei

50


Original image, cycle #1
Nuclei outlines
Nuclei

100

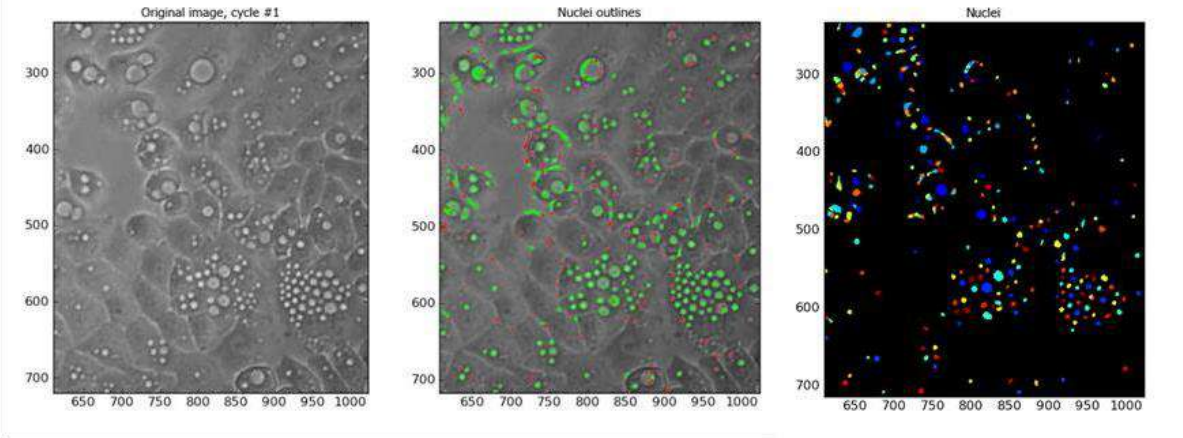

Original image, cycle #1
Nuclei outlines
Nuclei

Figura 17: MH1 induziu extensa vacuolização dependente da dose em células H460. As células foram tratadas com meio MH1 (10-100µg/mL) por 48h e análise morfológica foi realizada. As imagens foram analisadas utilizando o software Cell Profiler. Coluna 1 – Imagem original, Coluna 2 – Objetos detectados sobre a imagem original e Coluna 3 – Somente objetos detectados. Os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3).

5.1. MH1 induziu a expressão dos principais marcadores de autofagia.

A vacuolização poderia ter se dado por diversos motivos já reconhecidos na literatura, no livro Molecular Biology of the Cell, Alberts et al. como resostas ao estresse celular, hipoxia, depleção de ATP e até mesmo desbalanço no pH, além disso SHUBIN, A. V. et al. em 2016 descrevia inclusive vacuolização em células de mamíferos após exposição a patógenos bacterianos ou virais. Desse modo, se fez necessário investigar se haveria a possibilidade de estar sendo visto vacúolos autofágicos nas análises morfológicas.

Para avaliar essa hipótese, foi feito o experimento de imunofluorescência para identificar se o marcador ATG12 estava presente nos vacúolos formados após o tratamento. Assim, as células H460 foram novamente tratadas por 48h com extrato MH1, mas dessa vez o inibidor de autofagia 3-MA foi pré-incubado 1h antes do tratamento do extrato na concentração de 200µg/ml e na figura 18 é possível ver os resultados onde as imagens de cima são a fotografia tirada e as de baixo são um zoom do pequeno quadrado marcado na figura de cima. A esquerda começa com a coluna representando foto e aumento do controle, seguida por foto e aumento de MH1 em 200µg/ml e por fim MH1 em 200µg/ml colocado após 1h de pré incubação com 3-MA, o inibidor de autofagia.

Percebe-se que novamente ocorreu a formação dos vacúolos após o tempo de tratamento, isso ocorre tanto com e sem o inibidor, nas células com o uso do inibidor inclusive, é possivél ver uma expressão aumentada de ATG12 marcada pelos pontos verdes brilhantes ao redor dos vácuolos.

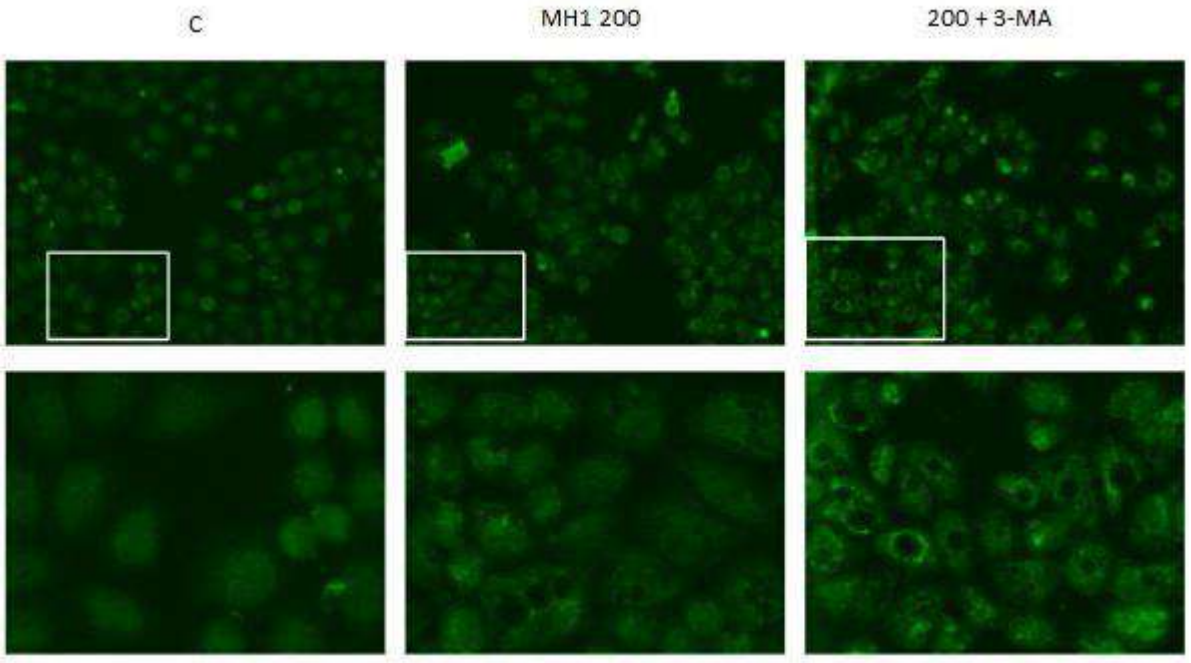


Figura 18: MH1 induziu a expressão dos principais marcadores de autofagia. Microscopia de fluorescência mostrando H460 tratado com o extrato MH1 (200µg/ml) por 48h com e sem o inibidor de autofagia 3-MA pré-incubado 1h antes do tratamento com o extrato e realizada a imunofluorescência com anticorpo anti-ATG12. Sob 3-MA, os pontos de fluorescência se concentram ao redor dos vacúolos. Os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3).

5.1.A fase hidroalcoólica do MH1 (P10) induziu forte vacualização no H460.

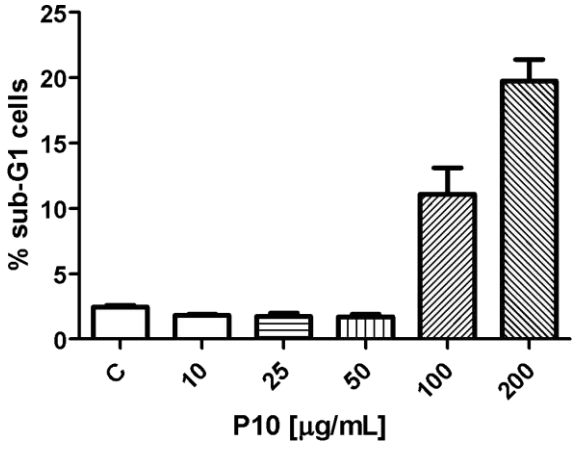
Uma fez identificada a melhor amostra do extrato ela passou por fracionamentos feito pelos colaboradores da UFPA, após isso, o grupo de pesquisa descobriu em ensaios anteriores que P10 possuiria o melhor efeito e assim foram seguidos os experimentos para avaliar sua atividade ainda nas células H460 no atual trabalho. Dessa vez, além da analise morfológica, foi utilizado o ensaio de fragmentação de DNA por citometria de fluxo para identificar a porcentagem da população em sub-G1 que marca o DNA fragmentado, uma característica clara da apoptose.

A figura 19 mostra o resultado obtido com os experimentos após 48h do tratamento

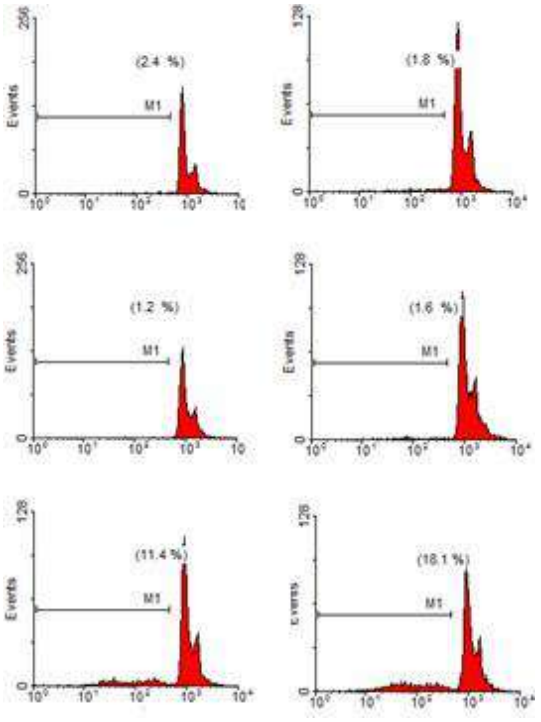
com P10 nas concentrações de 10-200µg/ml. Em A é possível ver o grafico mostrando a porcentagem da poulação de células em sub-G1, em B os histogramas representando dado obtido em A. Ao passar para a figura C, o resultado mostra a analise morfologica aós o tratamento e em D, a quantificação dos vacúolos observados e fotografados, a quantificação foi feita com ajuda do software Cellprofiler.

Os resultados mostraram um grande aumento na porcentagem da população de sub-G1, principalmente na concentração de 200µg/ml, indicando a morte das células, o que corrobora diretamente com os resultados vistos na Figura 19 – C, onde podemos ver que a vacuolização acontece de maneira dose dependente, marcando a concentração de 100µg/ml como a melhor e quando se olha a concentração de 200µg/ml, é possível ver que muitas células morreram, mostrando além de um espaço na placa, também há uma queda na quantificação dos vacúolos

A



B



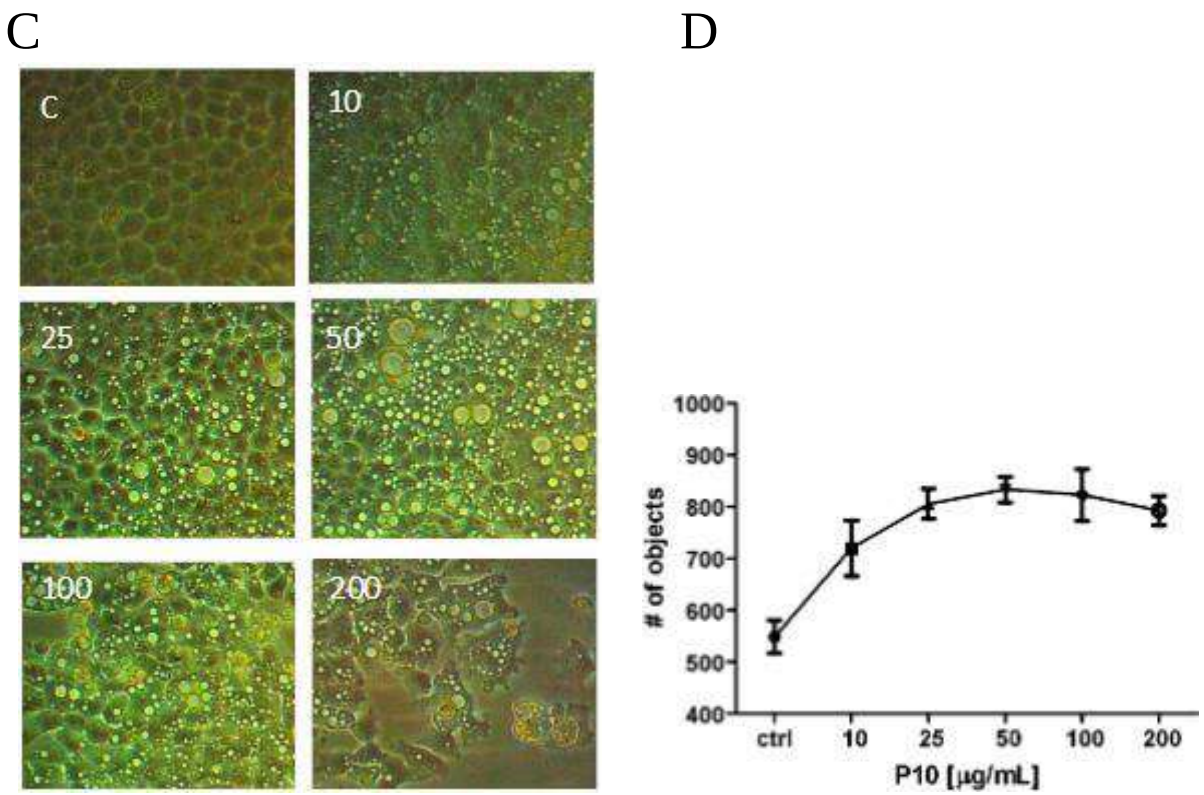


Figura 19: A fase hidroalcoólica do MH1 (P10) induziu forte vacualização no H460. A - População de células Sub-G1 tratadas com 10-200µg/mL de fração P10. **B** – Histogramas representativos dos dados apresentados em A. **C** – Microscopia de campo claro mostrando a vacualização dose-dependente induzida por P10 e **D** – Quantificação dos vacúolos observados nas fotografias utilizando cellprofiler. Os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3).

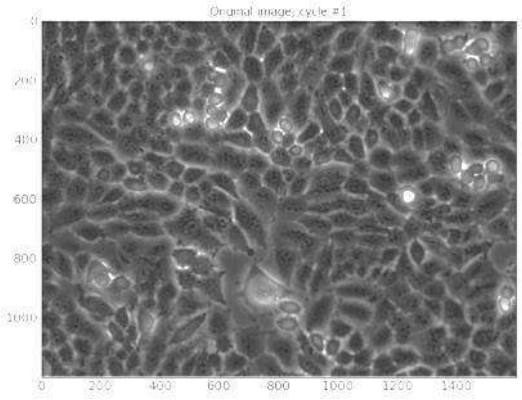
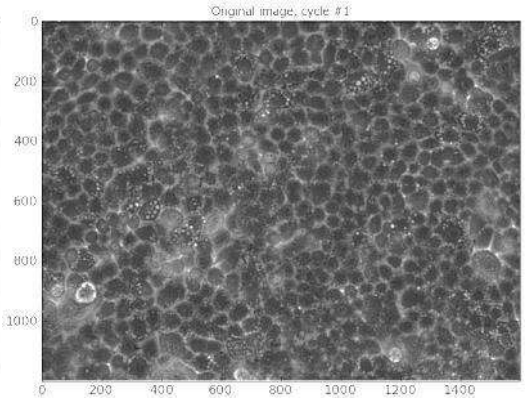
5.1.O subfracionamento de P10 rendeu extratos altamente ativos.

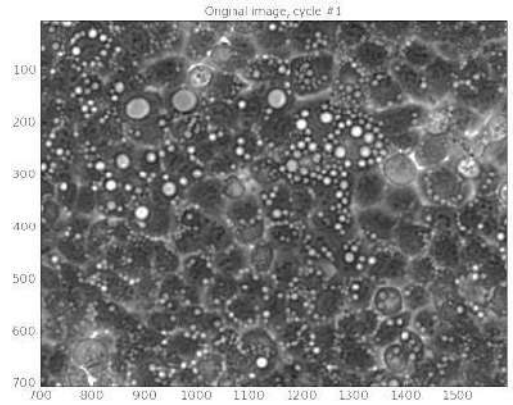
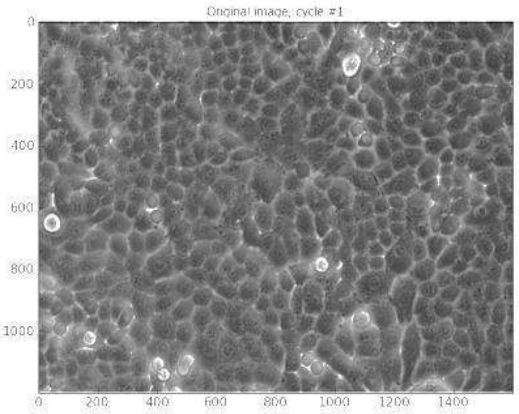
Com a fração P10 devidamente identificada, nossos colaboradores da UFPA fizeram um novo fracionamento dos extratos, gerando as subfrações nomeadas de MHF1 a MHF9.

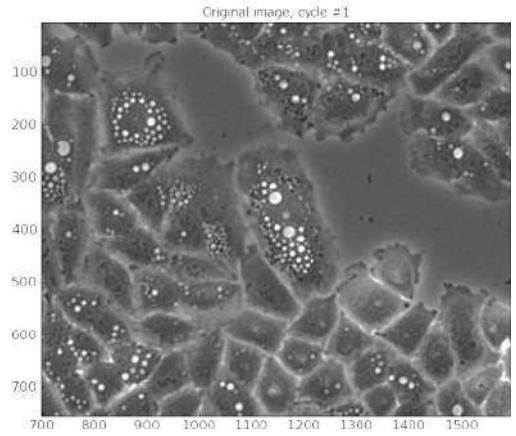
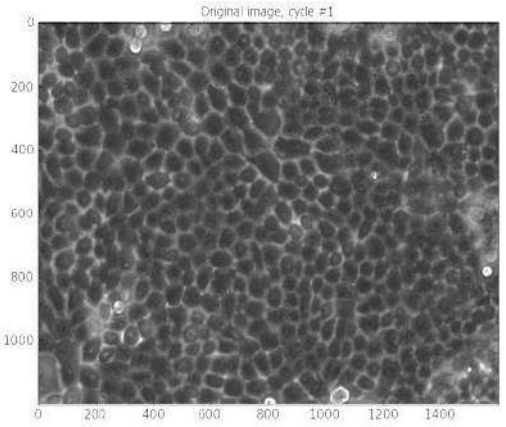
Como feito nos experimentos anteriores, o primeiro passo com as subfrações foi avaliar se havia uma diferença na morfologia de H460 ao receber o tratamento com 2,5µg/ml por 48h com cada uma das subfrações e assim comparar com as imagens do controle onde as células não receberam tratamento algum durante as mesmas 48h. Passado o tempo as células foram fotografadas no microscopio de campo claro para serem fotografadas e os vacúolos foram devidamente quantificados com apoio do cellprofile (Figura 20-A). Após isso, em B, é possivel ver o grafico mostrando a porcentagem de vacúolos encontrados após o tratamento.

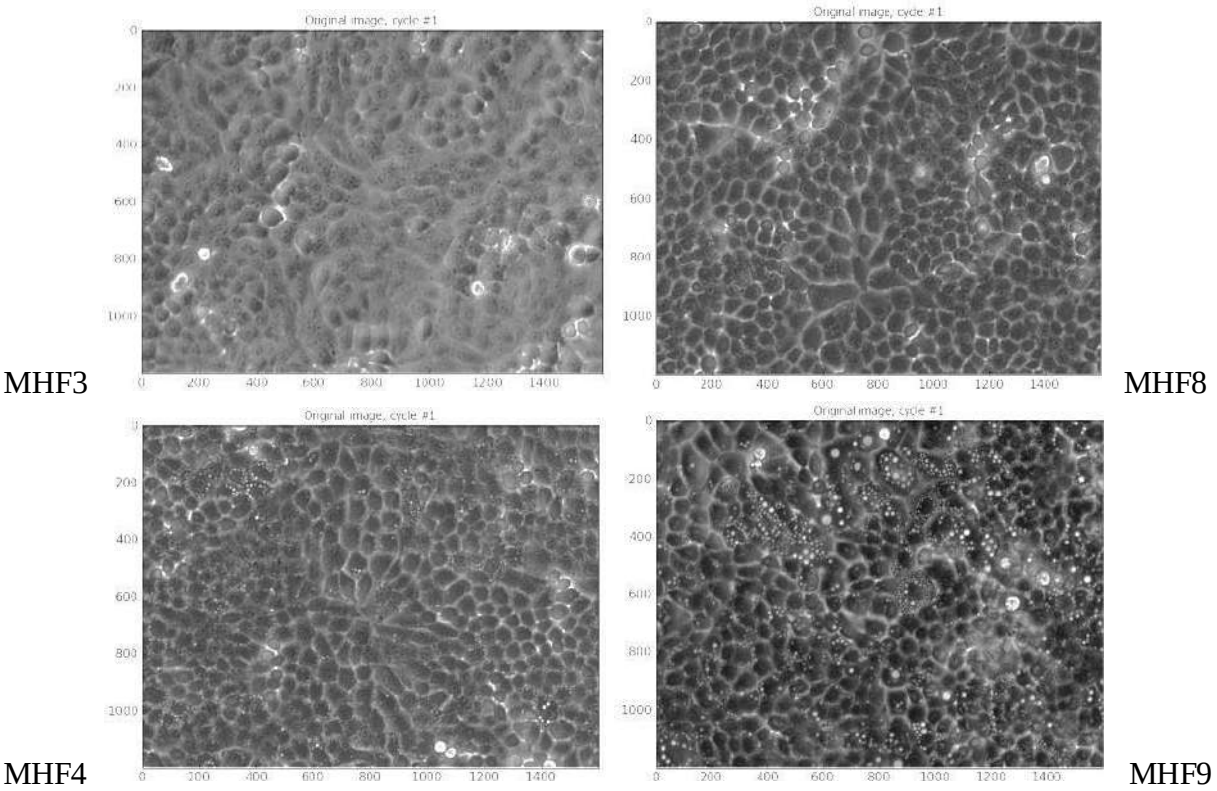
Os dados em B ilustram a visualização de uma grande expressão de vacúolos nas celulas com MHF1 que tiveram o melhor resultado entre todos e que exceto por MHF1 e MHF9 as alterações morfologicas são imperceptiveis ou pouco visiveis, dessa forma, MHF1 é selecionado para dar continuidade aos experimentos.

A

C   MHF5

MHF1   MHF6

MHF2   MHF7



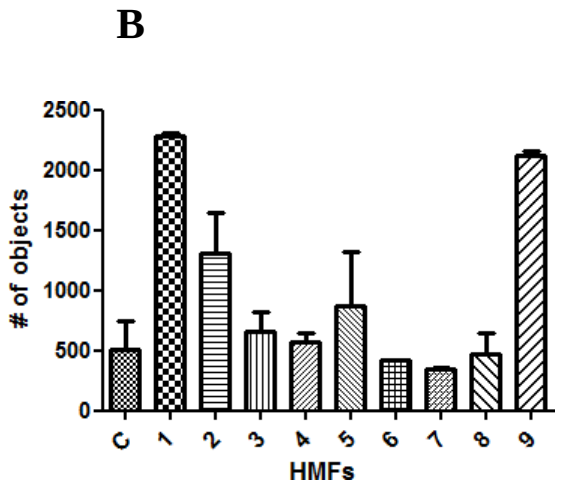


Figura 20: O subfracionamento de P10 rendeu extratos altamente ativos. A. As células foram tratadas com 2,5µg/mL de MHF1-9 e análises morfológicas foram realizadas e os vacúolos quantificados. **B.** Grafico com a porcentagem de objetos identificados pelo cell profile. O experimento foi feito em triplicata (n=3).

5.2. A autofagia induzida por 3MA aumentou a morte celular em H460.

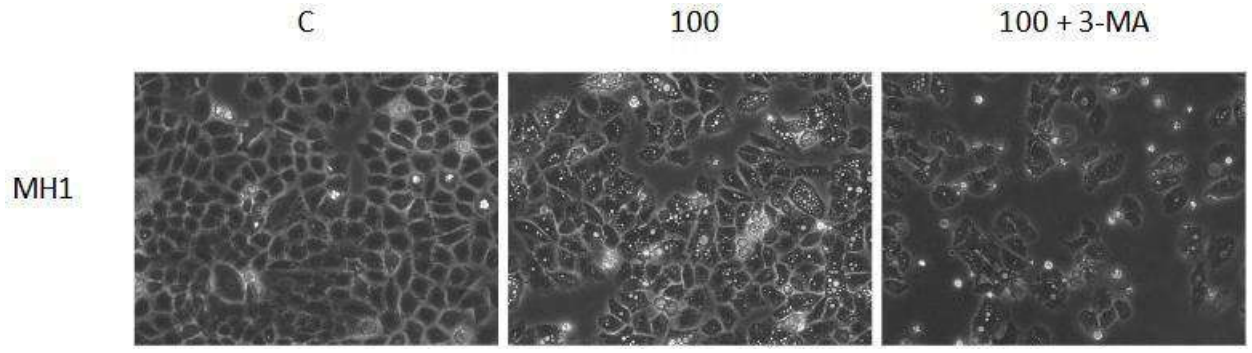
Com MHF1 estabelecido como o melhor para seguir os exerimentos, estava na hora de identificar o que eram os vacúolos vistos nos ensaios anteriores e para isso foi usado outra vez o auxilio da microscoia de campo claro ara registrar fotos das alterações morfologicas.

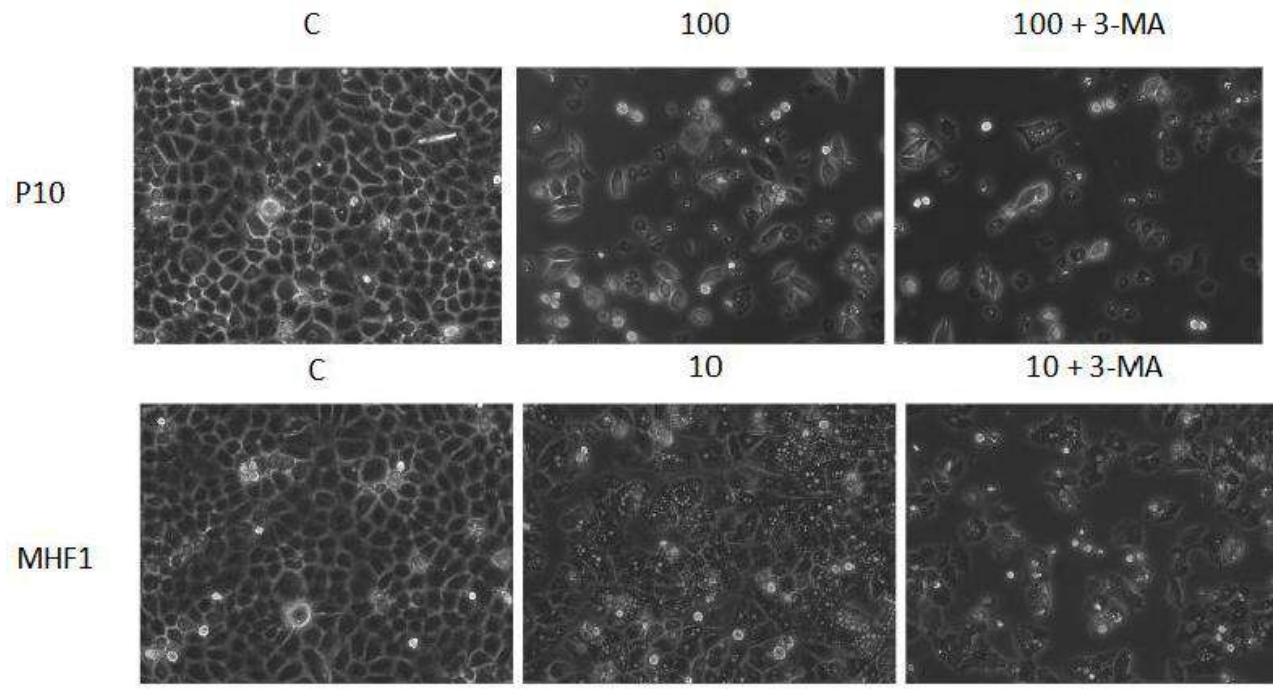
O exerimento seguiu utilizando as melhores concentrações de extrato, fração e subfração ja estabelecida, comparando o tratamento feito por 48h com o controle que passou as mesmas 48h apenas com meio de cultivo e com as células que uma hora antes do tratamento foram pré-incubadas com 30µl de 3-MA para inibir a autofagia. Na figura 21 A é possível ver na coluna da esquerda as imagens do controle, na do centro o tratamento de MH1/A7 com 100µg/ml, P100 µg/ml e MHF1 10 µg/ml e por fim nas imagens da coluna mais a direita estão as células que receberam o tratamento prévio com 3-MA e em seguida o tratamento nas mesmas concentrações das colunas no centro.

Decorrida as 48h as células foram fotografadas no microscópio de campo claro e então os vácuolos foram analisados e quantificados com o auxilio do cellprofiler. Nessa ocasião foi possível notar a presença dos vacúolos como já visto anteriormente mas também um aparente aumento na morte das células quando submetidas a *M. huberi* junto com a 3-MA, se fazendo necessário um olhar maior para esse efeito observado nas fotografias.

De forma a elucidar o que era visto, na Figura 21 B o mesmo tipo de tratamento foi aplicado para o ensaio de citometria de fluxo para estimar a porcentagem da população de sub-G1 e assim confirmar o que havia sido visto. Após as 48h do experimento as células foram passadas no citometro de fluxo e o grafico da figura foi gerado. Foi constatado que o uso de 3-MA não só inibiu a formação de vacúolos autofágicos como também aumentou a morte celular que se mostrou significativa para a fração P10 e subfração MHF1.

A





B

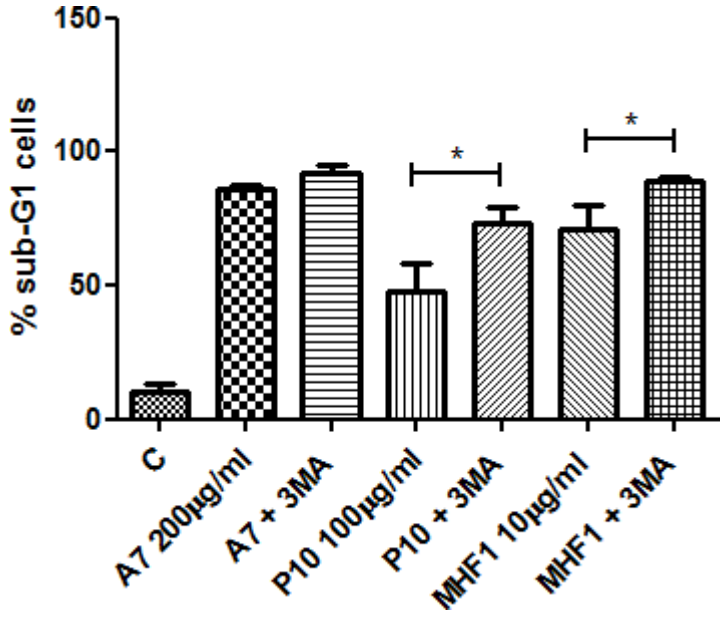


Figura 21: A Inibição de extratos e frações de *M. huberi* autofagia induzida por 3MA aumentou a morte celular em H460. A- Microscopia de campo claro mostrando a vacuolização induzida por A7 – MH1- (200µg/ml), P10 (100µg/ml) e MHF1 (10µg/ml) com e sem 1h de pré-incubação com o inibidor de autofagia 3-MA. **B-** População sub-G1 de células tratadas com A7 – MH1 - (200µg/ml), P10 (100µg/ml) e MHF1 (10µg/ml) com e sem 1h de pré-incubação com 3-MA. Os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3).

5.3. Subfração MHF7 induz vacuolização de maneira dose dependente.

Durante os experimentos com extrato, fração e subfração para caracterizar sua atividade, MHF7, uma das subfrações testadas anteriormente e descritas na pesquisa como sem a atividade que buscavamos, na verdade trouxe uma surpresa. Em meio aos processo de analises dos extratos pelos parceiros da UFPA foi identificado que MHF7 poderia ter algo diferente em sua composição que se destacava em relação as demais subfrações e talvez fosse necessário uma atenção nos experimentos para descobrir que possíveis efeitos ela teria.

MHF7 passa então pelo mesmo processo que as outras amostras para terem suas atividades avaliadas: a análise morfológica. H460 foi plaqueada e após 24h MHF7 foi administrada nas concetrações de 10 a 100 µg/ml, o exerimento permanece na incubadora por 48h e então é retirado para ser fotografado. Na figura 22 é possível notar que dessa vez MHF7 mostrou uma grande expressão de vacúolos e estes se apresentaram de maneira dose dependente.

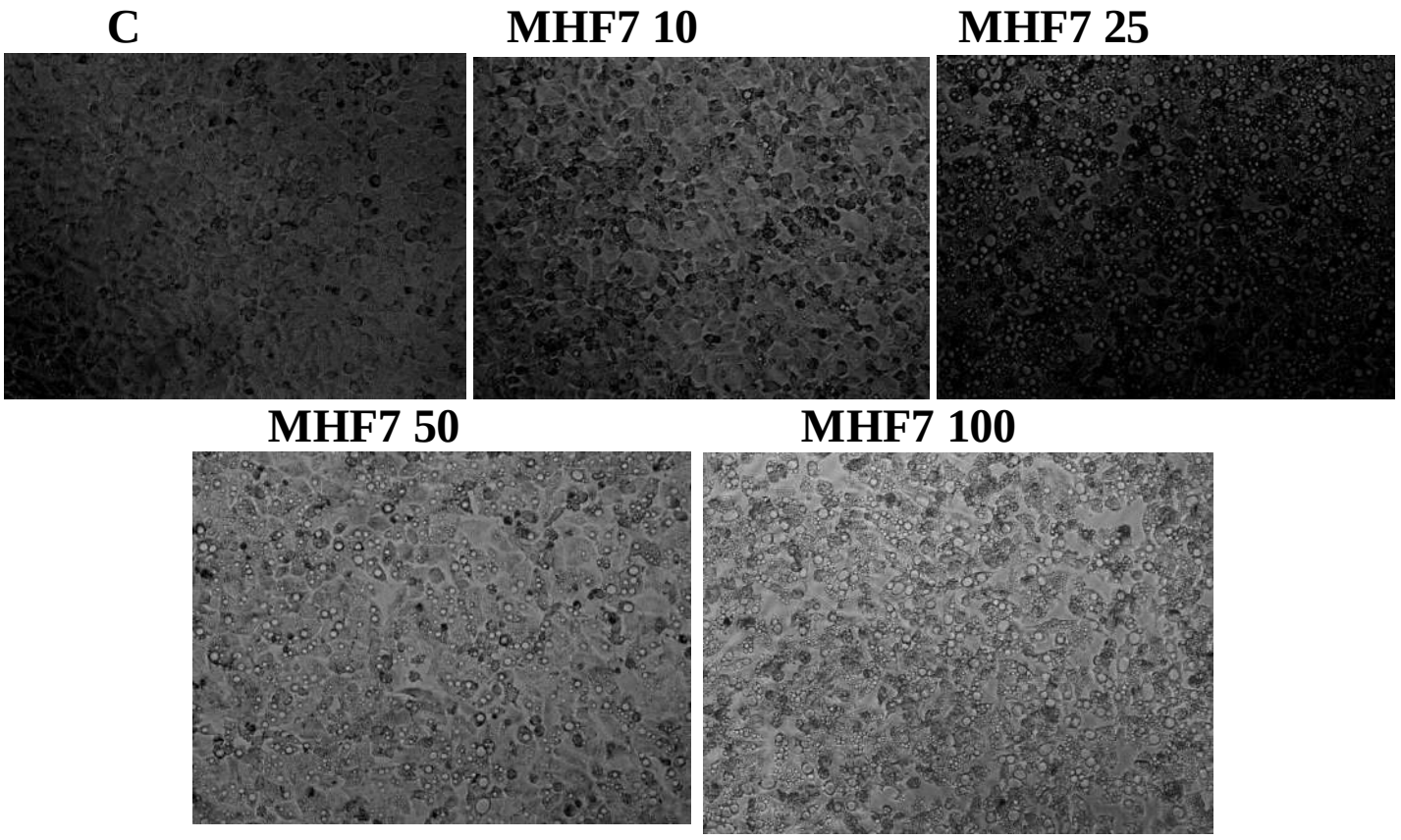


Figura 22: Subfração MHF7 induz vacuolização de maneira dose dependente. As células foram tratadas por 48h com a subfração MHF7 nas concentrações de (10-100µg/ml) e as analises morfológicas foram registradas. Os experimentos foram conduzidos em trilicata (n=3).

5.4. Inibição de viabilidade em células tratadas com MHF7

Uma vez observado os vacúolos, a tecnica de MTT foi utilizada para observar a viabilidade das células H460 após 48h de tratamento. Na figura 23 estão os graficos mostrando a absorbancia lida pelo equipamento passado o temo com a subfração MHF7, comparando-as com controle onde houve aenas o tratamento com meio comleto de costume e com aquelas células tratadas com DMSO nas respectivas concentrações em que estão presente nas subfrações diluídas, de forma a garantir que o DMSO não tem interferencia nos dados sobre a inibição de viabilidade.

Foi possível notar que assim como nos testes com o extrato de *M. huberi* (Figura 16), MHF7 mostrou uma diminuição na absorbância, ou seja, uma inibição da viabilidade, de maneira dose deendente, com especial destaque para a concentração de 100µg/ml cujo resultado teve maios significancia estatistica, indicando a melhor concentração para seguir adiante em futuros experimentos.

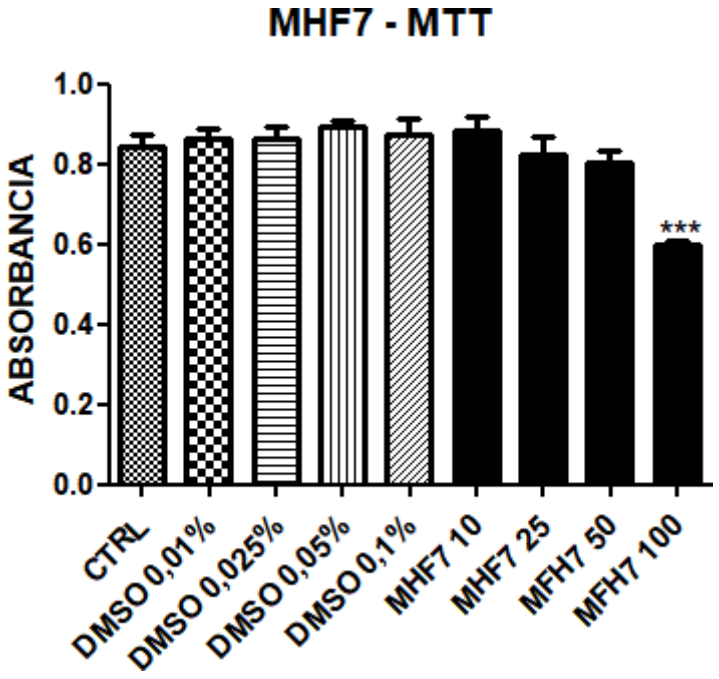


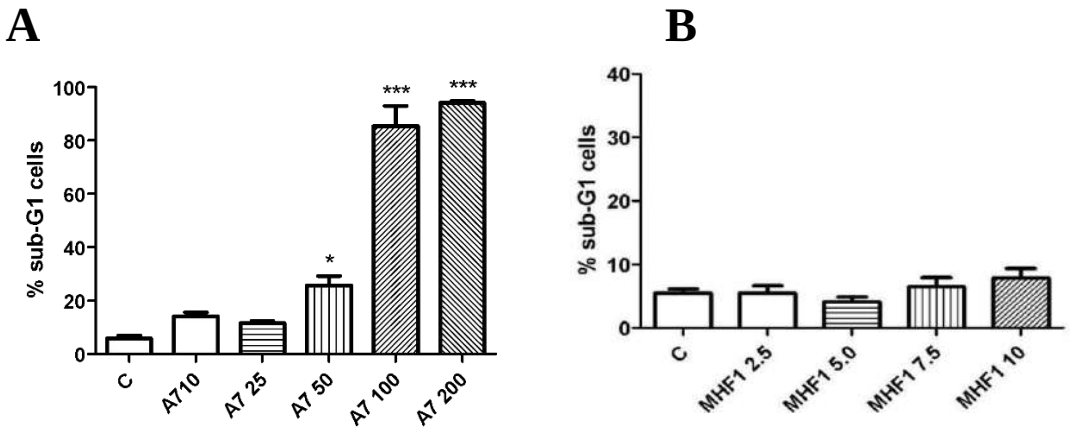
Figura 23: Inibição de viabilidade em células tratadas com MHF7. Absorbância do tratamento das concentrações de MHF7 nas concentrações de 10, 25, 50 e 100 µg/ml e também nas porcentagens de DMSO, os resultados foram analisados e comparados em relação ao controle. Os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3).

5.5. Extratos e subfrações induzem fragmentação de DNA em H460.

Afim de verificar se extrato e subfrações possuiam o mesmo comportamento, MHF7 foi submetida ao ensaio de fragmentação de DNA de forma a comparar seu resultado com o que já se sabia sobre MHF1 e o extrato MH1.

Para avaliar a indução da fragmentação de DNA em células H460, as placas foram preparadas e após 24h as concentrações estudadas foram administradas onde permaneceram incubadas por 48h, foram utilizados MH1/A7 de 10-200 µg/ml, MHF1 em 2,5;5;7,5 e 10 µg/ml e finalmente ara MHF7, 10-100 µg/ml, após os exerimentos os resultados deram origem aos graficos A, B e C que reresentam os resultados das amostras respectivamente.

No primeiro gráfico dos resultados é possível ver um significativo aumento na população de sub-G1 no tratamento de A7 feito em 100 e 200µg/ml, 200 era a concentração já usada em experimentos anteriores e que havia se mostrado forte demais nas células. No segundo gráfico, o tratamento de MHF1 com a porcentagem de sub-G1 sendo analisada, nota-se que a morte parece até maior em 10µg/ml que era a concentração usada em outros experimentos, mas esse resultado não tem uma diferença significativa além de ter uma morte aparentemente maior em 2,5µg/ml em relação a 5µg/ml. Por fim, no último gráfico com MHF7 podemos ver que a população de sub-G1 foi maior em 100µg/ml e este pode ser considerado um bom valor para seguir com os experimentos com MHF7 já que essa foi a concentração mais significativa.



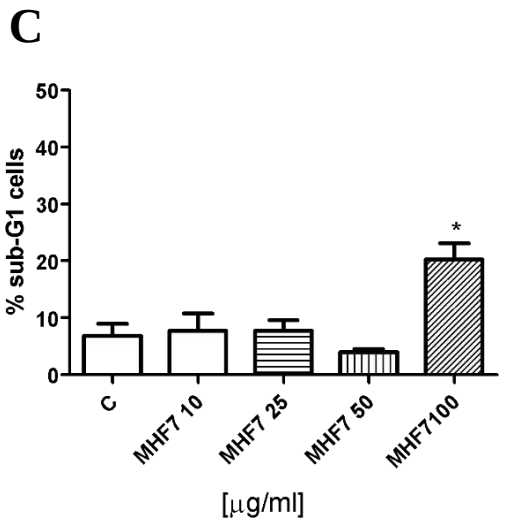


Figura 24: Extratos e subfrações induzem fragmentação de DNA em H460. A - População de células Sub-G1 tratadas com 10-200μg/mL do extrato A7(MH1) após 48h de tratamento. **B** – População de células Sub-G1 tratadas com 2,5; 5; 7,5; 10 μg /mL do extrato da subfração MHF1 após 48h de tratamento. **C** – População de células Sub-G1 tratadas com 10-100 μg /mL do extrato da subfração MHF7 após 48h de tratamento. Os experimentos foram conduzidos em triplicata (n=3), *p<0,05, ***0,001.

Incluir as estruturas da do A7 (te passo depois. Vai adiantando a correção.

6. DISCUSSÃO

O uso de compostos naturais é considerado uma grande fonte de substâncias antitumorais e muitos deles já são utilizados na prática clínica. O sucesso da utilização desses compostos deve-se a sua potencialidade terapêutica por ter alta eficiência e baixa toxicidade (QIU et al., 2017). Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os extratos e frações da planta amazônica *Manilkara huberi*, possuem uma atividade relevante sobre as células da linhagem de câncer de pulmão de não pequenas células (H460), com um destaque para a indução de autofagia e apoptose. Tais mecanismos são amplamente reconhecidos na literatura como cruciais para o controle do câncer, graças a sua capacidade de eliminar células tumorais e modular vias metabólicas relacionadas à progressão tumoral (POLEWSKA, 2012; GALLUZZI et al., 2018) e embora o potencial medicinal de *M. huberi* seja pouco explorado e ainda não seja possível encontrar trabalhos na literatura sobre elas que não envolvam áreas da botânica e formas de preservação, este estudo marca um avanço importante na investigação de plantas nativas brasileiras com propriedades antitumorais de forma a explorar melhor a flora do nosso país como respaldo para a maior proteção da nossa floresta.

No presente estudo, a análise morfológica por microscopia de campo claro demonstrou alterações significativas nas células tratadas com as subfrações derivadas do extrato MH1, especialmente P10 e MHF7. A formação de vacúolos autofágicos de maneira dose-dependente indica que esses compostos desempenham um papel ativo na indução de autofagia, processo este que, dependendo do seu contexto, pode atuar como protetor ou indutor de morte celular (CORTEZ DA SILVA et al., 2020; MURATI et al., 2022). Além disso, a inibição da autofagia com 3-metiladenina (3MA) levou a um aumento na apoptose, evidenciando uma interação entre os dois mecanismos vistos.

Ao olhar para os experimentos de imunofluorescência, eles confirmaram a expressão aumentada de marcadores de autofagia, como ATG12, após o tratamento com MH1. Esses achados reforçam o papel das vias clássicas de autofagia, mediadas por proteínas como Beclina-1 e LC3-II, no efeito antitumoral de *M. huberi* (MEHRPOUR et al., 2012; MACHO-GONZÁLEZ; SÁNCHEZ-MUNIZ, 2023).

Os ensaios de fragmentação de DNA realizados por citometria de fluxo por sua vez, indicaram um aumento significativo na população de células em sub-G1, consistente com o esperado para apoptose. A análise de viabilidade celular pelo ensaio de MTT apontou uma redução significativa na viabilidade celular, especialmente em concentrações mais elevadas das subfrações, atribuídas à presença de metabólitos secundários, como saponinas triterpênicas (ALVES, 2013).

Embora não existam estudos específicos sobre *M. huberi* relacionados ao câncer, trabalhos com espécies relacionadas, como *Manilkara zapota*, destacam o potencial de seus compostos bioativos, incluindo saponinas e polifenóis, em modular vias de autofagia e apoptose em modelos de câncer (ALVAREZ-MEYTHALER, J. G. et al. 2020; DAS, S. et al.,2021) e segundo o trabalho dos parceiros na UFPA as saponinas triterpenicas seriam os compostos que agora passam por processo de identificação na UNIRIO. A literatura sugere que muitos fitocompostos, incluindo curcumina, resveratrol e epigalocatequina, atuam de forma semelhante ao induzir a apoptose e regular a autofagia em células tumorais, corroborando a relevância de investigar *M. huberi* como fonte de terapias anticâncer (ALVAREZ-MEYTHALER, J. G. et al., 2020; GALLUZZI et al., 2018).

Os achados deste estudo destacam a relevância da biodiversidade brasileira para a descoberta de novos agentes terapêuticos. A modulação de vias de autofagia e apoptose por compostos naturais, como os derivados de *M. huberi*, oferece perspectivas promissoras para o desenvolvimento de terapias adjuvantes no tratamento de cânceres resistentes a drogas convencionais (ALVAREZ-MEYTHALER, J. G. et al. 2020; DAS, S. et al., 2021). Além disso, a subfração MHF7, com resultados recentemente destacados, pode ser explorada como uma nova fonte de compostos bioativos.

Apesar dos resultados promissores, este estudo possui limitações. A ausência de dados específicos sobre *M. huberi* na literatura limita comparações diretas, entretanto, abre portas para estudos pioneiros de caracterização sobre ela. Além disso, estudos futuros devem incluir análises mais detalhadas sobre a composição química de suas subfrações e investigações in vivo para validar a eficácia observada in vitro. A baixa biodisponibilidade de fitocompostos também é um desafio conhecido e pode requerer estratégias como sistemas de liberação baseados em nanotecnologia (ALVAREZ-MEYTHALER, J. G. et al. 2020).

Outro grande desafio que se esbarra quando se fala de grandes taxas de autofagia é o fato de que ela pode tanto prevenir o início do tumor suprimindo danos crônicos e instabilidade genômica, mas também suporta o crescimento do tumor mantendo funções metabólicas (SILVA et al., 2020) há casos como por exemplo no câncer de mama, onde a autofagia está associada à resistência ao tratamento, particularmente ao tamoxifeno (Valdez-Pardo & López-de la Mora, 2017). No entanto, o impacto da autofagia nos resultados do tratamento do câncer depende do tipo específico de célula cancerosa e da terapia usada, por isso é tão importante determinar se a autofagia contribui para a eficácia ou resistência do tratamento, sendo algo crucial para o desenvolvimento de estratégias anticâncer eficazes (POLEWSKA, 2012) e graças a esse papel controversio da autofagia no câncer, se faz necessário olhar outros espaços em que a autofagia poderia ser uma resposta bem vinda para tratamento.

Diante esses questionamentos sobre o papel da autofagia, pode-se observar na literatura que a autofagia desempenha um papel crucial na sobrevivência e função neuronal, atuando como um mecanismo homeostático para controle de qualidade de proteínas e reciclagem de resíduos celulares (LARSEN & SULZER, 2002; LEE, 2012). Embora a autofagia basal seja geralmente neuroprotetora, sua desregulação pode contribuir para doenças neurodegenerativas, como Alzheimer, Huntington e Parkinson (LEE, 2012). A atividade autofágica em neurônios é particularmente importante devido à sua natureza pós-mitótica e altas demandas de energia (BUTTON et al., 2015). No entanto, a relação entre autofagia e morte celular neuronal é complexa. Alguns estudos sugerem que a autofagia excessiva pode levar à morte neuronal, particularmente em organismos envelhecidos (TAKÁCS-VELLAI et al., 2006). Por outro lado, outros argumentam que a autofagia promove principalmente a sobrevivência neuronal durante o estresse e tem como alvo proteínas propensas a agregados associadas à neurodegeneração (BUTTON et al., 2015). Compreender o equilíbrio entre processos autofágicos protetores e potencialmente prejudiciais nos neurônios é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para distúrbios neurodegenerativos (BUTTON et

al., 2015; LEE, 2012), por isso, ter em *mãos M. huberi* com um potencial autofagico tão grande poderia ser um ótimo precursor para novas perguntas e respostas caso o objeto de estudos fosse trocado de câncer de pulmão para um modelo de Alzheimer, por exemplo.

7. CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que os extratos da planta amazônica *Manilkara huberi* possuem potencial significativo para induzir autofagia e apoptose em células de câncer de pulmão de não pequenas células (H460). Os resultados apontaram que MH1, P10 e MHF7 são capazes de modular vias intracelulares críticas, com destaque para a formação de vacúolos autofágicos e o aumento da população de células em sub-G1, indicativos de apoptose. Adicionalmente, a inibição da autofagia com 3-metiladenina reforçou o papel da apoptose além de aumentar a expressão de ATG12, proteína importante na maturação de vacúolos autofágicos, sugerindo uma interação dinâmica entre esses dois processos. Apesar da limitada literatura sobre o potencial medicinal de *M. huberi*, os achados contribuem para a exploração de compostos naturais como agentes terapêuticos promissores no tratamento de câncer, especialmente em casos resistentes a terapias convencionais. Estudos futuros devem focar na caracterização detalhada dos compostos ativos e na validação desses efeitos *in vivo*, abrindo novos caminhos para terapias adjuvantes e menos tóxicas.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Caracterizar melhor os efeitos de autofagia visto na análise morfológica dos extratos de MHF7 a fim de comprová-lo através de outras técnicas.

- Inserir protocolos western blotting ajustando o necessário para a análise das proteínas responsáveis pela formação dos vacúolos autofágicos vistos como ATG12 e LC3 para complementar esses estudos.

- Iniciar o tratamento dos extratos em células de neuroblastoma para avaliar a redução de morte neural com o potencial autofágico descoberto em nossos extratos e subfrações.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-ISHAQ, RK, OVERY, AJ E BÜSSELBERG, D. (2020). FITOQUÍMICOS E CÂNCER GASTROINTESTINAL: MECANISMOS CELULARES E EFEITOS PARA ALTERAR A PROGRESSÃO DO CÂNCER. **Biomoléculas** , 10 (1), 105- 135.

ALVAREZ-MEYTHALER, J. G. et al. AUTOPHAGY TAKES CENTER STAGE AS A POSSIBLE CANCER HALLMARK. **Frontiers in oncology**, v. 10, p. 586069, 2020.

ALVES, A. BIODIVERSIDADE E FITOTERÁPICOS: UMA ABORDAGEM SOBRE O POTENCIAL TERAPÊUTICO DAS PLANTAS BRASILEIRAS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, 2013.

ALVES, L. F. (2013). PRODUÇÃO DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL: HISTÓRIA, PROBLEMAS E PERSPECTIVAS. **Revista virtual de química**, 5(3), 450-513.

ALCÁNTARA COLIN, J. et al. CHEMODRUG RESISTANCE: CANCER'S FIGHT FOR SURVIVAL. **Nova**, v. 21, n. 41, 2023.

AMERICAN CANCER SOCIETY, 2022; AMERICAN LUNG ASSOCIATION, 2022; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2022; U.S. FOOD AND DRUG, 2022). AMERICAN CANCER SOCIETY. HOW MUCH DOES IT COST YOU? Disponível em: https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/cancer-control/pt/booklets. 2022

ATCC. NCI-H460 [H460] . Disponível em: <https://www.atcc.org/products/htb-177?matchtype=&network=x&device=c&adposition=&keyword=&gad_source=1&gclid=Cj0KCQjwm5e5BhCWARIsANwm06iOr2QY7IGltAa4qYFYAOqUA8c4uNuLII71ZiVbbXUcJtmHJ BokjnsaAhM_EALw_wcB>.2024.

AZEVEDO, V. C. R. et al. GENETIC STRUCTURE AND MATING SYSTEM OF MANILKARA HUBERI (DUCKE) A. CHEV., A HEAVILY LOGGED AMAZONIAN TIMBER SPECIES. **The journal of heredity**, v. 98, n. 7, p. 646–654, 2007.

BRAY, F., FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., SIEGEL, R. L., TORRE, L. A., & JEMAL,

A. (2018). GLOBAL CANCER STATISTICS 2018: GLOBOCAN ESTIMATES OF INCIDENCE AND MORTALITY WORLDWIDE FOR CANCERS IN 185 COUNTRIES. CA: **A cancer journal for clinicians**, 68(6), 394–424

BELIZÁRIO, José Ernesto. O PRÓXIMO DESAFIO: REVERTER O CÂNCER. **Ciência Hoje**, v. 31, p. 51–57, 2002.

BERNAS, Tytus; DOBRUCKI, Jurek. MITOCHONDRIAL AND NONMITOCHONDRIAL REDUCTION OF MTT: INTERACTION OF MTT WITH TMRE, JC-1, AND NAO MITOCHONDRIAL FLUORESCENTE PROBES. **Cytometry**, v. 47, n. 4, p. 236–242, 2002.

BERTRAM, J. S. (2000). THE MOLECULAR BIOLOGY OF CANCER. **Molecular aspects of medicine**, 21(6), 167-223.

BHATIA, S., PEREIRA, K., MOHAN, P., NARAYANAN, G., WANGPAICHITR, M., & SAVARAJ, N. (2016). RADIOFREQUENCY ABLATION IN PRIMARY NON-SMALL CELL LUNG CANCER: WHAT A RADIOLOGIST NEEDS TO KNOW. **The indian journal of radiology & imaging**, 26(1), 81.

BUSTAMANTE, I. C., Filho; MOURA, A. A.; BUCCI, D. CITOMETRIA DE FLUXO EM ANDROLOGIA: DA PESQUISA BÁSICA PARA A ROTINA CLÍNICA. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 45, n. 4, p. 620–624, 2021.

BOGLIOLO, L. PATOLOGIA GERAL. 2. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1998.

BORNER, Christoph. THE BCL-2 PROTEIN FAMILY: SENSORS AND CHECKPOINTS FOR LIFE-OR-DEATH DECISIONS. **Molecular immunology**, v. 39, n. 11, p. 615–647, 2003.

BROSE, M. S., VOLPE, P., FELDMAN, M., KUMAR, M., RISHI, I., GERRERO, R., ... & WEBER, B. L. (2002). BRAF AND RAS MUTATIONS IN HUMAN LUNG CANCER AND MELANOMA. **Cancer research**, 62(23), 6997-7000.

BROWN, JR; THORNTON, JL. PERCIVALL POTT (1714-1788) AND CHIMNEY SWEEPERS' CANCER OF THE SCROTUM. **British journal of industrial medicine**, v. 14, n.

1, p. 68–70, 1957.

BUTTON, R. W.; LUO, S.; RUBINSZTEIN, D. C. AUTOPHAGIC ACTIVITY IN NEURONAL CELL DEATH. **Neuroscience bulletin**, v. 31, n. 4, p. 382–394, 2015.

CAIN, Kelvin; BRATTON, Shawn B; COHEN, Gerald M. THE APAF-1 APOPTOSOME: A LARGE CASPASE-ACTIVATING COMPLEX. **Biochimie**, v. 84, n. 2, p. 203–214, 2002.

Câncer de Pulmão: cigarro é responsável por 90% dos casos. Disponível em:*https://imeb.com.br/cancer-de-pulmao-cigarro-e-responsavel-por-90-dos-casos/*. 2018.

Câncer de pulmão. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tipos/pulmao>. 2023.

Carney, DN, Gazdar, AF , & Minna, JD (1982). O USO DE SISTEMAS EXPERIMENTAIS NA PESQUISA TERAPÊUTICA DO CÂNCER DE PULMÃO DE PEQUENAS CÉLULAS. **Pathobiology annual** , 12 , 115-136.

CASTRO, T. DA C.; CARVALHO, J. O. P. DE. DINÂMICA DA POPULAÇÃO DE *MANILKARA HUBERI* (DUCKE) A. CHEV. DURANTE 26 ANOS APÓS A EXPLORAÇÃO FLORESTAL EM UMA ÁREA DE TERRA FIRME NA AMAZÔNIA BRASILEIRA. **Ciencia Florestal**, v. 24, n. 1, p. 161–169, 2014.

CHEN, L., LIU, S., & TAO, Y. (2020). REGULATING TUMOR SUPPRESSOR GENES: POST-TRANSLATIONAL MODIFICATIONS. SIGNAL TRANSDUCTION AND TARGETED THERAPY, 5(1), 1-25. 39 D'ARCY, M. S. (2019). CELL DEATH: A REVIEW OF THE MAJOR FORMS OF APOPTOSIS, NECROSIS AND AUTOPHAGY. **Cell biology international**, 43(6), 582-592.

CHIANG, P.-J. et al. AUTOMATED BRIGHT FIELD SEGMENTATION OF CELLS AND VACUOLES USING IMAGE PROCESSING TECHNIQUE: **Cytometry. Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology**, v. 93, n. 10, p. 1004–1018, 2018.

CORTEZ DA SILVA, E. et al. THE DUAL ROLE OF AUTOPHAGY IN CANCER

DEVELOPMENT AND THERAPY. **Cancer Research Journal**, 2020.

DAI, C., & GU, W. (2010). P53 POST-TRANSLATIONAL MODIFICATION: DEREGULATED IN TUMORIGENESIS. TRENDS IN MOLECULAR MEDICINE, 16(11), 528-536. DE GROOT, P. M., WU, C. C., CARTER, B. W., & MUNDEN, R. F. (2018). **THE EPIDEMIOLOGY OF LUNG CANCER. TRANSLATIONAL LUNG CANCER RESEARCH**, 7(3), 220-233.

DANTAS, Élida LR; SÁ, Fernando HL; CARVALHO, Sionara MF; ARRUDA, Anderson P; RIBEIRO, Evelane M; RIBEIRO, Erlane M. GENÉTICA DO CÂNCER HERIDITÁRIO. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, p. 263–269, 2009.

DAS, S. et al. MECHANISM OF INTERACTION BETWEEN AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN CANCER. Apoptosis. 2021 Oct;26(9-10):512-533. doi: 10.1007/s10495-021-01687-9. Epub 2021 Sep 12. PMID: 34510317.

DE GROOT, P. M., WU, C. C., CARTER, B. W., & MUNDEN, R. F. (2018). THE EPIDEMIOLOGY OF LUNG CANCER. **Translational lung cancer research**, 7(3), 220-233.

Díaz, L., Óscar Leonel Ortiz Cala, César Orlando Bretón Pinto, Álvaro Iván Gómez Lizcano and Viviana Matilde Mesa Cornejo. “El ciclo celular.” (2010).

DIONISIO, L. F. S. Efeitos a médio prazo da exploração seletiva no crescimento, mortalidade e recrutamento de Manilkara huberi (Ducke) A. Chev. em uma floresta mazônica. **Scientia forestalis**, v. 48, n. 125, 2020.

DOLL, R., & HILL, A. B. (1954). THE MORTALITY OF DOCTORS IN RELATION TO THEIR SMOKING HABITS. **British medical journal**, 1(4877), 1451-1455.

DUARTE, R. L. DE M.; PASCHOAL, M. E. M. **Jornal brasileiro de pneumologia: publicacao oficial da Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisilogia**, v. 32, n. 1, p. 56–65, 2006.

DYSON N. J. (2016). RB1: A PROTOTYPE TUMOR SUPPRESSOR AND AN ENIGMA. **Genes & development**, 30(13), 1492–1502.

ELMORE, Susan. APOPTOSIS: A REVIEW OF PROGRAMMED CELL DEATH. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., ... & BRAY, F. (2015). CANCER INCIDENCE AND MORTALITY WORLDWIDE: SOURCES, METHODS, AND MAJOR PATTERNS IN GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, 136(5), E359- E386

FENG, F., WANG, B., SUN, X., ZHU, Y., TANG, H., NAN, G., ... & ZHANG, Z. (2017). METUZUMAB ENHANCED CHEMOSENSITIVITY AND APOPTOSIS IN NON-SMALL CELL LUNG CARCINOMA. **Cancer biology & therapy**, 18(1), 51-62.

FERLAY, J., SOERJOMATARAM, I., DIKSHIT, R., ESER, S., MATHERS, C., REBELO, M., ... & BRAY, F. (2015). CANCER INCIDENCE AND MORTALITY WORLDWIDE: SOURCES, METHODS, AND MAJOR PATTERNS IN GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, 136(5), E359-E386.

Finn, K., Lowndes, N. and Grenon, M. (2011). EUKARYOTIC DNA DAMAGE CHECKPOINT ACTIVATION IN RESPONSE TO DOUBLE-STRAND BREAKS. **Cellular and Molecular Life Sciences**: 1-27.

Fluorescência Direta. Disponível em: <https://www.argospatologia.com.br/fluorescencia-direta/>. 2024.

FRENZEL, Anna; GRESPI, Francesca; CHMELEWSKIJ, Waldemar; et al. BCL2 FAMILY PROTEINS IN CARCINOGENESIS AND THE TREATMENT OF CANCER. **Apoptosis: an international jornal on programmed cell death**, v. 14, n. 4, p. 584–596, 2009.

GALLUZZI, L; VITALE, I; ABRAMS, JM; et al. MOLECULAR DEFINITIONS OF CELL DEATH SUBROUTINES: RECOMMENDATIONS OF THE NOMENCLATURE COMMITTEE ON CELL DEATH (2012). **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

GALLUZZI, Lorenzo; VITALE, Ilio; AARONSON, Stuart A; et al. MOLECULAR MECHANISMS OF CELL DEATH: RECOMMENDATIONS OF THE NOMENCLATURE COMMITTEE ON CELL DEATH (2018). **Cell death and differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018.

GIVAN AL. Chapter 2 Principles of flow cytometry: An overview. In: (Ed.) Cytometry, 63. 2001, p.19-50. Herzenberg LA, Parks D, Sahaf B, Perez O, Roederer M e Herzenberg LA. The history and future of the fluorescence activated cell sorter and flow cytometry: a view from Stanford. Clin Chem, 48. p.1819-27, 2002.

GROSSA, P. SHOW DA QUÍMICA. Disponível em: <https://www2.uepg.br/pet-quimica/wp-content/uploads/sites/42/2020/02/Apostila-Show-da-Qu%C3%ADmica.pdf>. 2018

GROSSI, F., LOPREVITE, M., CHIARAMONDIA, M., CEPPA, P., PERA, C., RATTO, G. B., & ARDIZZONI, A. (2003). PROGNOSTIC SIGNIFICANCE OF K-RAS, P53, BCL-2, PCNA, CD34 IN RADICALLY RESECTED NON-SMALL CELL LUNG CANCERS. **European journal of cancer**, 39(9), 1242-1250.

Guo, Yanxiang & White, Eileen. (2017). AUTOPHAGY, METABOLISM, AND CANCER. COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY. 81. 030981. 10.1101/sqb.2016.81.030981.

GUO, Y. J., PAN, W. W., LIU, S. B., SHEN, Z. F., XU, Y., & HU, L. L. (2020). ERK/MAPK SIGNALLING PATHWAY AND TUMORIGENESIS. **Experimental and therapeutic medicine**, 19(3), 1997–2007.

Harnett MM, Pineda MA, Latré de Laté P, Eason RJ, Besteiro S, Harnett W, Langsley G. De Christian de Duve a Yoshinori Ohsumi: Mais para autofagia do que apenas jantar em casa. **Biomed J.** 2017;40(1):9-22. doi: 10.1016/j.bj.2016.12.004.

HENGARTNER, MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770–776, 2000.

HOSPITAL SANTA MÔNICA. **Tudo o que você precisa saber sobre tabagismo**

passivo! Disponível em: <https://hospitalsantamonica.com.br/tudo-o-que-voce-precisa-saber-sobre-tabagismo-passivo-2/>. Acesso em: 11 nov. 2024.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. O que é câncer? Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>.1996-2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Ministério da Saúde. Secretaria-Executiva da Comissão Nacional para Implementação da Convenção-Quadro para Controle do Tabaco. Convenção-Quadro para Controle do Tabaco: texto oficial. Coordenação de elaboração Tânia Maria Cavalcante. 2. reimpr. Rio de Janeiro: INCA, 2015.

INCA. Tipos de Câncer; Câncer de pulmão. Disponível em:*https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pulmao*.2018.

JAEGER, P. A., & WYSS-CORAY, T. (2010). BECLIN 1 COMPLEX IN AUTOPHAGY AND ALZHEIMER DISEASE. **Archives of neurology**, 67(10), 1181-1184.

JANSSEN, William J; BARTHEL, Lea; MULDROW, Alaina; et al. Fas determines differential fates of resident and recruited macrophages during resolution of acute lung injury. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 184, n. 5, p. 547–560, 2011.

JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E., & FORMAN, D. (2011). GLOBAL CANCER STATISTICS. CA: **a cancer journal for clinicians**, 61(2), 69-90.

JORDE, LB; CAREY, JC; BAMSHAD, MJ; WHITE, RL. Genética Médica. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

KARINE DA COSTA DUARTE, M.; GOLDFARB DE OLIVEIRA, J. SEGURANÇA E EFICÁCIA DO USO DE FITOTERÁPICOS UTILIZADOS NA PRÁTICA CLÍNICA: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Revista interdisciplinar em saúde**, v. 11, n. Unico, p. 481–499, 2024.

KERR, JF; WYLLIE, AH; CURRIE, AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239– 257, 1972.

Kerr JS, Adriaanse BA, Greig NH, et al. Mitophagy and Alzheimer's disease: cellular and molecular mechanisms. **Trends Neurosci** 2017; 40: 151-66. doi: 10.1016/j.tins.2017.01.002.

KROEMER, G; GALLUZZI, L; VANDENABEELE, P; et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

LAAN, S. N. J. et al. Automated segmentation and quantitative analysis of organelle morphology, localization and content using CellProfiler. PloS one, v. 18, n. 6, p. e0278009, 2023.

Lagunas Cruz, M. del C., Valle Mendiola, A., & Soto Cruz, I. (2015). CICLO CELULAR: MECANISMOS REGULADORES. ***Encostas. Revista especializada em ciências da saúde*** , *17* (2). Recuperado de https://www.revistas.unam.mx/index.php/vertientes/article/view/51694

LARSEN, K. E.; SULZER, D. Autophagy in neurons: a review. **Histology and histopathology**, v. 17, n. 3, p. 897–908, 2002.

LEE, J.-A. Neuronal autophagy: a housekeeper or a fighter in neuronal cell survival? **Experimental neurobiology**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2012.

LEMJABBAR-ALAOUI, H., HASSAN, O. U., YANG, Y. W., & BUCHANAN, P. (2015). LUNG CANCER: BIOLOGY AND TREATMENT OPTIONS. BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA (BBA)-**reviews on cancer**, 1856(2), 189-210.

LI, W. et al. Immunofluorescence staining protocols for major autophagy proteins including LC3, P62, and ULK1 in mammalian cells in response to normoxia and hypoxia. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 1854, p. 175–185, 2019.

LIMA, J. A; FILHO, A. G. CARACTERÍSTICAS ECOLÓGICAS E SILVICULTURAIS DE MAPARAJUBA (*Manilkara paraensis Standl.*) E MAÇARANDUBA (*Manilkara huberi*

(Ducke) Standl.) EM UMA FLORESTA PRIMÁRIA DE TERRA FIRME DO AMAPÁ. Comunicado Técnico. EMBRAPA. Nº 4, p. 1-6. Dezembro de 2000.

LIU, G., PEI, F., YANG, F., LI, L., AMIN, A. D., LIU, S., ... & CHO, W. C. (2017). ROLE OF AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN NON-SMALL-CELL LUNG CANCER. **International journal of molecular sciences**, 18(2).

LUCENA, J. A. S., GUEDES, J. P. (2020) USO DE FITOTERÁPICOS NA PREVENÇÃO E NO TRATAMENTO DA HIPERTENSÃO ARTERIAL SISTÊMICA. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**. V10. P(15-22).

MACHO-GONZÁLEZ, A.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F. J. AUTOFAGIA UN SISTEMA CELULAR DE LIMPIEZA CLAVE PARA LA SALUD. UNA VISITA AL PREMIO NOBEL DE FISIOLOGÍA O MEDICINA DE 2016. **Journal of negative & no positive results**, v. 8, n. 1, p. 417–439, 2023.

MAGALHÃES, W. L. E.; THÁ, E. L.; LEME., D. M. Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA. **Versão digital: Embrapa**, 2018.

MANUTENÇÃO de linhagens de células animais. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Manual da qualidade**. Rio de Janeiro: INCQS/Fiocruz, 2008.

MALZYNER, Artur. Câncer tem influência heriditária em 5 a 10% dos casos. Disponível em: <https://www.minhavida.com.br/saude/materias/17677-cancer-tem-influencia-hereditaria-em-5-a-10-dos-casos> 2018.

MCLLWAIN, David R; BERGER, Thorsten; MAK, Tak W. CASPASE FUNCTIONS IN CELL DEATH AND DISEASE. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 4, p. 1-29, 2013.

Mehrpour M, Esclatine A, Beau I, Codogno P. OVERVIEW OF MACROAUTOPHAGY REGULATION IN MAMMALIAN CELLS. **Cell Res.** 2010;20(7):748-762. doi: 10.1038/cr.2010.82.

MEHRPOUR, M. et al. Autophagy in cancer: regulation and therapeutic potential. **Molecular Cell Biology,** 2012.

MEIRELES, Cinthia Gabriel. AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DA METFORMINA EM LINHAGENS CELULARES DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA E DE FEOCROMOCITOMA. Brasília, 2015.

MEIRELLES, R.H.S. Tabagismo e DPOC- dependência e doença- fato consumado. Revista Pulmão RJ, Rio de Janeiro, v.18, p.13, 2009. STAVOE, A. K. H.; HOLZBAUR, E. L. F. Autophagy in Neurons. Annual Review of Cell and Developmental Biology, v. 35, n. 1, p. 477–500, 6 out. 2019.

MEZA-JUNCO, JUDITH & MONTANO-LOZA, ALDO & AGUAYO, ALVARO. (2006). MOLECULAR BASES OF CANCER. **Journal of clinical research. Rev. Invest. Clín.,** CIUDAD DE MÉXICO, 58. 56-70.

MICROSCOPES AND IMAGING SYSTEMS. Disponível em: <https://www.leica-microsystems.com/>. 2024.

MILTON-LASKIBAR, I.; AGUIRRE, L.; PORTILLO, M. P. AUTOFAGIA ETA HAREN ERREGULAZIOA OSASUNEAN ETA GAIXOTASUNEAN. Ekaia, n. 34, p. 157–170, 2018.

Montalvo, Patricio Esteban Moscoso. “EL CICLO CELULAR, SUS MECANISMOS DE REGULACIÓN Y REPARACIÓN, INDISPENSABLES PARA EL MANTENIMIENTO DE LA VIDA.” (2020).

MONTES, L. R.; IRIONDO NAGORE, M.; ETXANIZ, A. LIPIDO-PROTEINA ELKARREKINTZAK AUTOFAGIAN. Ekaia, n. 46, p. 227–238, 2023.

MURATI, T. et al. Molekularni mehanizmi i morfološka obilježja autofagije. Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam, v. 17, n. 3–4, p. 65–71, 2022.

MURATI, M. et al. THE ROLE OF AUTOPHAGY IN CANCER PREVENTION AND THERAPY. **Frontiers in Oncology**, 2022.

PAREDES LARIO, A. et al. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RELACIONADAS CON RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS Y RESISTENCIA A LA QUIMIOTERAPIA EN EL CÁNCER DE PULMÓN. **Archivos de bronconeumologia**, v. 43, n. 9, p. 479–484, 2007.

PEREIRA, J. M. A. et al. FITOTERÁPICOS NO TRATAMENTO E CONTROLE DA OBESIDADE: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA. **RECIMA21 - Revista Científica Multidisciplinar - ISSN 2675-6218**, v. 3, n. 1, p. e311066, 2022.

PÉREZ ATILANO, Y. et al. CICLO CELULAR: UNA MIRADA HACIA LA REPRODUCCIÓN DE LAS CÉLULAS. **Uno Sapiens Boletín Científico de la Escuela Preparatoria** No. 1, v. 7, n. 13, p. 30–32, 2024.

PÉREZ LARA, J. C. et al. FUNDAMENTOS DE CITOMETRÍA DE FLUJO: SU APLICACIÓN DIAGNÓSTICA EN LA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA Y CLÍNICA. **Revista Médica de la Universidad Veracruzana**, v. 18, n. 2, p. 41–52, 2018.

POLEWSKA, A. AUTOPHAGY AND CANCER: FROM MECHANISMS TO THERAPIES. **BioMed Research International**, 2012.

Polewska, Joanna. “Autofagia - mechanizm molekularny, apoptoza i nowotwory Autophagy - molecular mechanism, apoptosis and cancer.” Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej 66 (2012): 921-936.

RAFAEL APARICIO SANCHIS JOSÉ RAMÓN MURGUÍA IBÁÑEZ. NUEVAS FUNCIONES DE GCN2P EN RESPUESTA A ESTRÉS ÁCIDO Y GENOTÓXICO. In: [s.l: s.n.]. 2014.

Rajawat, Yogendra & Zoe, Hilioti & Bossis, Yannis. (2009). AGING: CENTRAL ROLE FOR AUTOPHAGY AND THE LYSOSOMAL DEGRADATIVE SYSTEM. **Ageing research reviews.** 8. 199-213. 10.1016/j.arr.2009.05.001.

Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, et al. INHIBITION OF MTOR INDUCES AUTOPHAGY AND REDUCES TOXICITY OF POLYGLUTAMINE EXPANSIONS IN FLY AND MOUSE MODELS OF HUNTINGTON DISEASE. **Nat Genet** 2004; 36: 585-595. doi: 10.1038/ng1362.

Reggiori F, Ungermann C. AUTOPHAGOSOME MATURATION AND FUSION. **J Mol Biol** 2017; 429: 486-496. doi: 10.1016/j.jmb.2017.01.002

RIBEIRO, L. H. L. ANÁLISE DOS PROGRAMAS DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE (SUS) SOB A PERSPECTIVA TERRITORIAL. **Ciencia & saude coletiva**, v. 24, n. 5, p. 1733–1742, 2019.

RIELY, G. J., MARKS, J., & PAO, W. (2009). KRAS MUTATIONS IN NON–SMALL CELL LUNG CANCER. **Proceedings of the american thoracic society**, 6(2), 201-205

ROHATGI, R. A., & SHAW, L. M. (2016). AN AUTOPHAGY-INDEPENDENT FUNCTION OF BECLIN 1 IN CANCER. **Molecular & cellular oncology**, 3(1), E1030539. RUPPELT, B. M., PEREIRA, E. F., GONÇALVES, L. C., & PE

SÁNCHEZ-TORRES, L. E.; ESPINOSA-BONILLA, A.; DIOSDADO-VARGAS, F. LA CITOMETRÍA DE FLUJO, UN UNIVERSO DE POSIBILIDADES EN EL ÁMBITO VETERINARIO. Revisión. **Revista mexicana de ciencias pecuarias**, v. 13, n. 3, p. 763–786, 2022.

SHUBIN, A. V. et al. CYTOPLASMIC VACUOLIZATION IN CELL DEATH AND SURVIVAL. **Oncotarget**, v. 7, n. 34, p. 55863–55889, 2016.

SILVA DE SOUZA RODRIGUES, F.; MOROSINI POLIDORI, M. Enfrentamento e Resiliência de Pacientes em Tratamento Quimioterápico e seus Familiares. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 619–627, 2012.

SILVA, G. C. DA et al. AUTOFAGIA E CÂNCER: UMA REVISÃO DA LITERATURA. Research, **Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e584997493, 2020.

SPIVACK, S. D., FASCO, M. J., WALKER, V. E., & KAMINSKY, L. S. (2008). THE MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF LUNG CANCER. **Critical reviews in toxicology**, 27(4), 319-365.

SOLANO-GÁLVEZ, S. G. et al. APOPTOSIS: ACTIVATION AND INHIBITION IN HEALTH

AND DISEASE. **Medical sciences (Basel, Switzerland)**, v. 6, n. 3, p. 54, 2018.

STEELS, E., PAESMANS, M., BERGHMANS, T., BRANLE, F., LEMAITRE, F., MASCAUX, C., ... & SCULIER, J. P. (2001). ROLE OF P53 AS A PROGNOSTIC FACTOR FOR SURVIVAL IN LUNG CANCER: A SYSTEMATIC REVIEW OF THE LITERATURE WITH A META-ANALYSIS. **European respiratory journal**, 18(4), 705-719.

SURIN, AM; SHARIPOV, RR; KRASIL'NIKOVA, IA; et al. DISRUPTION OF FUNCTIONAL ACTIVITY OF MITOCHONDRIA DURING MTT ASSAY OF VIABILITY OF CULTURED NEURONS. Biochemistry. Biokhimiia, v. 82, n. 6, p. 737–749, 2017.

SUVÁ, Mario L; RIGGI, Nicolo; BERNSTEIN, Bradley E. EPIGENETIC REPROGRAMMING IN CANCER. Science (New York, N.Y.), v. 339, n. 6127, p. 1567–1570, 2013.

Tabaco. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/tabaco>. 2024.

Tabagismo passivo. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/tabagismo/tabagismo-passivo>. 2018.

TAKÁCS-VELLAI, K.; BAYCI, A.; VELLAI, T. AUTOPHAGY IN NEURONAL CELL LOSS: A ROAD TO DEATH. BIOESSAYS: NEWS AND REVIEWS IN MOLECULAR, CELLULAR, AND DEVELOPMENTAL BIOLOGY, v. 28, n. 11, p. 1126–1131, 2006.

TAO, S., WANG, S., MOGHADDAM, S. J., OOI, A., CHAPMAN, E., WONG, P. K., & ZHANG, D. D. (2014). ONCOGENIC KRAS CONFERS CHEMORESISTANCE BY UPREGULATING NRF2. **Cancer research**, 74(24), 7430-7441.

THU, K. L., VUCIC, E. A., CHARI, R., ZHANG, W., LOCKWOOD, W. W., ENGLISH, J. C., ... & LAM, W. L. (2012). LUNG ADENOCARCINOMA OF NEVER SMOKERS AND SMOKERS HARBOR DIFFERENTIAL REGIONS OF GENETIC ALTERATION AND EXHIBIT DIFFERENT LEVELS OF GENOMIC INSTABILITY. **Plos one**, 7(3), E33003.

VAN MEERLOO, Johan; KASPERS, Gertjan JL; CLOOS, Jacqueline. CELL SENSITIVITY ASSAYS: THE MTT ASSAY. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 731, p. 237–

245, 2011.

VAN OPDENBOSCH, N., & LAMKANFI, M. (2019). CASPASES IN CELL DEATH, INFLAMMATION, AND DISEASE. **Immunity**, 50(6), 1352-1364.

VILLALOBOS, P., & WISTUBA, I. I. (2017). LUNG CANCER BIOMARKERS. **Hematology/oncology clinics**, 31(1), 13-29.

VOKES, M. S.; CARPENTER, A. E. USING CELLPROFILER FOR AUTOMATIC IDENTIFICATION AND MEASUREMENT OF BIOLOGICAL OBJECTS IN IMAGES. et al [Current protocols in molecular biology], v. Chapter 14, n. 1, p. Unit 14.17, 2008

WALCZAK, Henning. DEATH RECEPTOR-LIGAND SYSTEMS IN CANCER, CELL DEATH, AND INFLAMMATION. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 5, p. a008698, 2013.

WALENSKY, Loren D. FROM MITOCHONDRIAL BIOLOGY TO MAGIC BULLET: NAVITOCLAX DISARMS BCL-2 IN CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. **Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 30, n. 5, p. 554–557, 2012.

WARD, L. S. (2002). ENTENDENDO O PROCESSO MOLECULAR DA TUMORIGÊNESE. **Arquivos brasileiros de endocrinologia & metabologia**, 46, 351-360.

WARREN, G. W., & CUMMINGS, K. M. (2013). TOBACCO AND LUNG CANCER: RISKS, TRENDS, AND OUTCOMES IN PATIENTS WITH CANCER. **American society of clinical oncology educational book**, 33(1), 359-364.

WONG, Rebecca S Y. APOPTOSIS IN CANCER: FROM PATHOGENESIS TO TREATMENT. **Journal of experimental & clinical cancer research**: CR, v. 30, p. 87, 2011.

Wrighton KH. AUTOPHAGY: ESCRTING PROTEINS FOR MICROAUTOPHAGY. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2011;12(3):136-137. doi: 10.1038/nrm3075.

XIAO, H. Q., TIAN, R. H., ZHANG, Z. H., DU, K. Q., & NI, Y. M. (2016). EFFICACY OF PEMETREXED PLUS PLATINUM DOUBLET CHEMOTHERAPY AS FIRST-LINE TREATMENT FOR ADVANCED NONSQUAMOUS NON-SMALL-CELL-LUNG CANCER: A SYSTEMATIC REVIEW AND META-ANALYSIS. **Oncotargets and therapy**, 9, 1471-1476.

XUE, X. et al. A ATIVAÇÃO AUTOFÁGICA ATENUA A NEUROTOXICIDADE DOS ANESTÉSICOS LOCAIS AO DIMINUIR A ATIVIDADE DA CASPASE-3 EM RATOS. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 70, n. 6, p. 627–634, nov. 2020.

YUNES, R. A., PEDROSA, R. C., & CECHINEL FILHO, V. (2001). FÁRMACOS E FITOTERÁPICOS: A NECESSIDADE DO DESENVOLVIMENTO DA INDÚSTRIA DE FITOTERÁPICOS E FITOFÁRMACOS NO BRASIL. **Química nova**, 24(1), 147-152

YU N, XIONG Y, WANG C. BU-ZHONG-YI-QI DECOCTION, THE WATER EXTRACT OF CHINESE TRADITIONAL HERBAL MEDICINE, ENHANCES CISPLATIN CYTOTOXICITY IN A549/DDP CELLS THROUGH INDUCTION OF APOPTOSIS AND AUTOPHAGY. **Biomed research international**. 2017.

YU, X., ZHENG, H., CHAN, M. T., & WU, W. K. (2017). MODULATION OF CHEMORESPONSIVENESS TO PLATINUM-BASED AGENTS BY MICRORNAS IN CANCER. **American journal of cancer research**, 7(9), 1769-1778.

ZHAO, H., BI, T., QU, Z., JIANG, J., CUI, S., & WANG, Y. (2014). EXPRESSION OF MIR-224-5P IS ASSOCIATED WITH THE ORIGINAL CISPLATIN RESISTANCE OF OVARIAN PAPILLARY SEROUS CARCINOMA. **Oncology reports**, 32(3), 1003-1012.