

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU”**  
**DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER, ANTIFÚNGICA E**  
**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE GLICOALCALOIDES**  
**PURIFICADOS DE *Solanum lycocarpum***

**FLÁVIA REGINA BARBOSA**

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Bianca Waleria Bertoni

**RIBEIRÃO PRETO-SP**

**2015**

**UNIVERSIDADE DE RIBEIRÃO PRETO – UNAERP**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU”**  
**DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER, ANTIFÚNGICA E  
ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO DE GLICOALCALOIDES  
PURIFICADOS DE *Solanum lycocarpum***

Tese apresentada ao programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto  
(UNAERP) para obtenção do Título de Doutora em  
Biotecnologia aplicada à saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Bianca Waleria Bertoni

RIBEIRÃO PRETO-SP  
2015

Ficha catalográfica preparada pelo Centro de Processamento Técnico  
da Biblioteca Central da UNAERP

- Universidade de Ribeirão Preto -

Barbosa, Flávia Regina, 1986-  
B238a Avaliação da atividade anticâncer, antifúngica e estudo do  
mecanismo de ação de glicoalcaloides purificados de *Solanum  
lycocarpum* / Flávia Regina Barbosa. -- Ribeirão Preto, 2016.  
125 f.: il. color.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin.

Tese (doutorado) – Universidade de Ribeirão Preto, UNAERP,  
Biotecnologia. Ribeirão Preto, 2016.

1. *S. lycocarpum*. 2. Glicoalcaloides. 3. Atividade antitumoral.  
I. Título.

**FLÁVIA REGINA BARBOSA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICÂNCER, ANTIFÚNGICA E ESTUDO DO  
MECANISMO DE AÇÃO DE GLICOALCALOIDES PURIFICADORES DE  
*SOLANUM LYCOCARPUM***


Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da Universidade de  
Ribeirão Preto, para obtenção do título de Doutor em  
Biotecnologia.


Área de Concentração: Biotecnologia Aplicada à Saúde

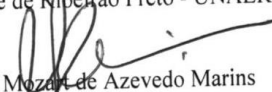
Data da defesa: 26 de novembro de 2015


Resultado: Aprovada

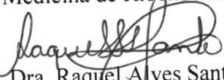
**BANCA EXAMINADORA**

  
Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin Saltoratto  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

  
Profa. Dra. Adriana Aparecida Lopes  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

  
Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins  
Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP

  
Profa. Dra. Elza Akie Sakamoto Lang  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP

  
Profa. Dra. Raquel Alves Santos  
Universidade de Franca - UNIFRAN

**RIBEIRÃO PRETO**  
2015

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente aos meus pais por todo incentivo e confiança depositada em mim.

À minha orientadora, Profa. Dra. Ana Lúcia, por todo ensinamento proporcionado, sem o qual não teria sido tão bem conduzida à conclusão deste projeto, que avançou exponencialmente da nossa proposta inicial. Além da grande amizade ao longo desses anos.

À Profa. Dra. Bianca Waleria Bertoni, pela coorientação e auxílio no desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Dr. Mozart, pelas discussões e conselhos que nortearam todo este nosso trabalho.

À competência, amizade e também toda a ajuda e a crítica construtiva de meus colegas de laboratório, dos membros das bancas de qualificação e defesa e de todas as pessoas que tiveram participação neste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro aos estudos.

E à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo investimento dado ao projeto de pesquisa.

## RESUMO

Estima-se que no ano de 2030, a incidência mundial de câncer será de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes por câncer. Clinicamente, uma das principais causas para o insucesso do tratamento do câncer é a inespecificidade e a resistência celular aos quimioterápicos utilizados na terapia atual. Outra doença de importância, são as infecções fúngicas. *Trichophyton rubrum* (*T.rubrum*) é o agente responsável por mais de 69,5% de todas as infecções fúngicas de tecidos queratinizados provocadas por dermatófitos. Atualmente ele tem se tornado um organismo que também provoca infecções profundas em pacientes imunodeprimidos. Nesse sentido, a bioprospecção de compostos de origem vegetal, que sejam mais seletivos a células tumorais e também a linhagens fúngicas, tornou-se atraente para área farmacológica. Os frutos da planta do cerrado *Solanum lycocarpum*, popularmente conhecida como Lobeira, possuem glicoalcaloides, como a solamargina (SM) e solasonina (SS), que possuem alto potencial terapêutico, devido sua ação antitumoral e atividade antifúngica. Sabendo disso, a SM e SS foram isoladas e avaliadas quanto a atividade anticâncer e antifúngica, além do estudo do mecanismo de ação de tais atividades. O presente estudo mostrou que a SM apresentou maior potencial citotóxico contra as linhagens de câncer de mama MCF-7 e glioblastoma U-343, através dos ensaios de MTT e liberação de LDH. Ademais, os dois glicoalcaloides demonstraram maior genotoxicidade pelo ensaio do cometa para células tumorais U-343 e MCF-7 comparados com a linhagem normal 3T3. Foi demonstrado por citometria de fluxo que a SM na linhagem MCF-7 induziu a apoptose e provocou o arraste na fase G1 do ciclo celular. Os experimentos de *PCR array* demonstraram que a SM induziu a apoptose por via intrínseca na linhagem MCF-7. Em relação a atividade antifúngica, foi observado que a SM e  $\alpha$ -solanina apresentaram pronunciada atividade contra as duas linhagens de *T. rubrum*, (CIM de 3,12  $\mu\text{g/mL}$ ). Já o glicoalcaloide SS apresentou valor de CIM de 12,5  $\mu\text{g/mL}$  frente à linhagem H6 e CIM de 6,25  $\mu\text{g/mL}$  para a linhagem mutante e a aglicona solasodina não apresentou atividade antifúngica. Esses resultados sugerem que os compostos SM e  $\alpha$ -solanina não são transportados pela bomba de efluxo, diferente da SS. Ademais, esses alcaloides reduziram o nível de ergosterol no fungo *T. rubrum*, porém não afetaram o número e nem o tamanho de colônias regeneradas em meio com pH 6,8 e pH 9,0, dado que sugere que esses compostos não atuam na membrana plasmática. Dessa forma, podemos concluir que a SM apresentou pronunciada atividade anticâncer contra linhagem MCF-7, além de apresentar atividade antifúngica contra *T.rubrum*.

**Palavras-chave:** Lobeira, Glicoalcaloides, atividade antimicrobiana e citotoxicidade celular.

## ABSTRACT

It is estimated that, by the year 2030, the worldwide incidence of cancer will be of 21.4 million of new cases and 13.2 millions of death from cancer. Clinically, one of the major causes of the cancer treatment failure is its non-specificity and its cell resistance to the conventional chemotherapy. The *Trichophyton rubrum* (*t.rubrum*) is the agent responsible for over 69.5% of all fungal infections of tissue keratinized epithelia caused by dermatophyte. Nowadays it has become an organism which also causes deep infections in immunosuppressive patients. In this sense, the bioprospecting of natural compounds has become attractive to the pharmaceutical sector. The fruits from a plant from the scrubland, the *Solanum lycocarpum*, well known as Lobeira, are rich in glycoalkaloids such as solamargine (SM) and solasonine (SS), of high therapeutic potential, due to their antitumor and antifungal activity. Therefore, the SM and SS were isolated and evaluated as for their anticancer and antifungal activity, besides their mechanism of action of such activities. The present study shows that SM presented a higher cytotoxic potential against the MCF-7 breast cancer line and U-343 glioblastoma, through the tests of MTT and LDH release. Moreover, the two glycoalkaloids showed higher genotoxicity by the Comet assay to the U-343 and MCF-7 tumor cells when compared to the normal 3T3 line. It was shown, by flow cytometry that the SM of the MCF-7 line induced apoptosis and caused the arrest of the G1 stage of the cell cycle. The experiments of PCR array have shown that the SM induced the apoptosis, by intrinsic pathway to the MCF-7. As for the antifungal activity, it was observed that the SM and the a-solanine presented an outstanding activity against the two *T. rubrum* (MIC of 3.12 ug/mL) lines. As for the glycoalkaloid SS, it has presented the MIC rate of 12.5 ug/mL to the H6 and CIM of 6.25 ug/mL for the mutant line. The solasodine aglicon has not presented any antifungal activity. These data suggest that the SM and a-solanine compounds are not carried by the efflux pump, different from the SS. Moreover, these alkaloids decreased the ergosterol level in the *T.rubrum* fungus, although they did not affect the number or size of the regenerated colonies in medium of pH 6.8 and pH 9.0, suggesting that these compounds do not act in the plasma membrane. Therefore we can conclude that the SM presented an enhanced anticancer activity against the MCF-7 line, besides the antifungal activity against the *T.rubrum*.

**Key-words:** Lobeira, glycoalkaloids, antimicrobial action and cell cytotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b>	Árvore (A); Flor (B) e Frutos (C e D); Conjunto (E) da espécie <i>S. lycocarpum</i> A. St. –Hil.....	19
<b>Figura 2-</b>	Estrutura química da solasonina.....	20
<b>Figura 3-</b>	Estrutura química da solamargina.....	20
<b>Figura 4-</b>	Estrutura química da solasodina.....	21
<b>Figura 5-</b>	Análise da porcentagem de células em apoptose.....	49
<b>Figura 6-</b>	Curva analítica de ergosterol (A) e espectro de absorção de ergosterol (B).....	57
<b>Figura 7-</b>	Perfil cromatográfico dos compostos submetidos á CLAE preparativo. (A) Solasonina (Tr= 9 min) e (B) Solamargina (Tr= 12 min).....	59
<b>Figura 8-</b>	Núcleo esteroidal e correlações observadas HMBC e acoplamentos observados em COSY.....	62
<b>Figura 9-</b>	Avaliação da citotoxicidade dos glicoalcaloides em 48 horas de incubação frente à linhagem U-343.....	64
<b>Figura 10-</b>	Avaliação da citotoxicidade dos glicoalcaloides em 48 horas de incubação frente à linhagem MCF-7.....	64
<b>Figura 11-</b>	Avaliação da citotoxicidade dos glicoalcaloides em 48 horas de incubação frente à linhagem 3T3.....	65
<b>Figura 12-</b>	Determinação do nível de LDH (%) liberada pelas linhagens celulares U343 e MCF-7 tratadas com os glicoalcaloides solamargina (SM) e solasonina (SS) na concentração do IC <sub>50</sub> por 48 horas.....	67
<b>Figura 13-</b>	Média de índice de danos ao DNA no ensaio Cometa para linhagem celular 3T3 tratada com glicoalcaloides por 6 horas.....	68
<b>Figura 14-</b>	Média de índice de danos ao DNA no ensaio Cometa para linhagem celular U-343 tratada com glicoalcaloides por 6 horas.....	68
<b>Figura 15-</b>	Média de índice de danos ao DNA no ensaio Cometa para linhagem celular MCF-7 tratada com glicoalcaloides por 6 horas.....	69
<b>Figura 16. A e B-</b>	Análise de células apoptóticas com Anexina V por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com os compostos solamargina e solasonina na concentração do IC <sub>50</sub> e IC <sub>25</sub> e como controle positivo usou a doxorrubicina na concentração do IC <sub>50</sub> .....	70
<b>Figura 17. A e B-</b>	Análise de células apoptóticas com Anexina V por citometria de fluxo. Células U-343 tratadas com os compostos solamargina e solasonina na concentração do IC <sub>50</sub> e IC <sub>25</sub> e como controle positivo usou a doxorrubicina na concentração do IC <sub>50</sub> .....	71
<b>Figura 18-</b>	Porcentagem de células da linhagem MCF-7 em cada fase do ciclo celular tratadas por 24 horas com os glicoalcaloides solamargina e solasonina nas concentrações das IC <sub>25</sub> e IC <sub>50</sub> .....	73



<b>Figura 19-</b>	Histogramas do Ciclo Celular.....	74
<b>Figura 20-</b>	Regeneração dos protoplastos da linhagem H6 do <i>T. rubrum</i> , em meio com pH 6.8.....	77
<b>Figura 21-</b>	Regeneração dos protoplastos da linhagem H6 do <i>T. rubrum</i> , em meio com pH 9,0.....	78

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b>	Glicoalcaloides testados nos ensaios.....	41
<b>Tabela 2-</b>	Classificação dos danos dos cometas e números correspondentes (Collins et al, 1995).....	47
<b>Tabela 3-</b>	Dados de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz; CD <sub>3</sub> OD, δ 1H (multiplicidade) e HMQC.....	61
<b>Tabela 4-</b>	Valores de IC <sub>25</sub> (µg/ml e µM) dos glicoalcaloides solamargina, solasonina e α-solanina nas linhagens celulares U-343, MCF-7 e 3T3 tratadas por 48 horas pelo teste MTT.....	65
<b>Tabela 5-</b>	Modulação da Expressão Gênica da linhagem celular MCF-7 por ação da solamargina e solasonina na IC <sub>50</sub> .....	75
<b>Tabela 6-</b>	Genes modulados pelos glicoalcaloides, suas funções quanto à indução de apoptose.....	76
<b>Tabela 7-</b>	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos produtos naturais (µg/mL) para o fungo <i>T. rubrum</i> linhagem selvagem (H6), mutante Δ <i>TruMDR2</i> .....	77
<b>Tabela 8-</b>	Representação da Atividade dos alcaloides sobre a Regeneração de Protoplastos (Redução % MEDIA) – Linhagem H6.....	78
<b>Tabela 9-</b>	Redução do nível de Ergosterol (%) para as linhagens de <i>T. rubrum</i> crescidas na presença de diferentes compostos naturais....	79

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FORMULAS

- ABC** – Transportadores do tipo ABC;
- AcOEt** – Acetato de etila;
- Abs** – Absorbância;
- APAF-1** – *Apoptotic protease activating factor 1*
- ATCC** – American Type Culture Collection;
- Bak** – *BCL2-antagonist/killer 1*
- Bax** – *BCL2-associated X*
- Bcl-2** – *B-cell lymphoma 2*
- Caspase** – Cisteína-aspartato-protease
- CCDC** – Cromatografia em Camada Delgada Comparativa;
- Cels** – Células;
- DMEM** – Dulbeccos modified Eagle's media;
- DMSO** - Dimetil-sulfóxido;
- DXR** – Doxorrubicina;
- IC** – Concentração inibitória
- INCA** – Instituto nacional de câncer José Alencar Gomes da Silva
- MDR** – Múltipla resistência a drogas;
- ml** – Mililitro;
- min** – Minuto;
- NAD** – Nicotinamida adenina dinucleotídeo
- N °** - Número;
- n** – variável;
- nm** – Nanômetro;
- pH** - Potencial hidrogeniônico;
- P&D** – Pesquisa e desenvolvimento
- q.s.p.** - Quantidade suficiente para;
- rpm** – Rotação por minuto;
- SBF** – Soro bovino fetal;
- SD** – Solasodina;
- SM** – Solamargina;

**SN**-  $\alpha$ -Solanina;

**SS** – Solasonina;

**v/v** – Volume/volume;

**%** - Porcentagem;

**°C** – Grau Celsius;

**$\mu$ L** – Microlitro;

**$\mu$ m** – Micrômetro.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....</b>	<b>18</b>
2.1 Família Solanaceae e o gênero <i>Solanum</i> .....	18
2.2 Glicoalcaloides das espécies de Solanaceae.....	19
2.3 Mecanismo de ação antifúngico e anticâncer dos glicoalcaloides.....	21
2.4 Atividade anticâncer.....	24
2.4.1 Câncer.....	24
2.4.2 Câncer de mama.....	25
2.4.3 Glioblastoma.....	27
2.4.4 Apoptose.....	28
2.4.5 Atividade citotóxica de glicoalcaloides.....	29
2.5 Atividade antifúngica.....	31
2.5.1 <i>T. rubrum</i> .....	31
2.5.2 Sequenciamento do Genoma de <i>T. rubrum</i> .....	32
2.5.3 Mecanismo de ação de drogas antifúngicas.....	33
2.5.4 Atividade antifúngica de glicoalcaloides.....	36
<b>3. HIPÓTESE.....</b>	<b>37</b>
<b>4. OBJETIVOS.....</b>	<b>38</b>
<b>4.1 OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>38</b>
<b>4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>38</b>
<b>5. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
5.1 Purificação dos glicoalcaloides de <i>S. lycocarpum</i> .....	39
5.2 Coleta dos frutos de <i>S. lycocarpum</i> e extração dos glicoalcaloides.....	39
5.3 Isolamento e análise dos glicoalcaloides.....	40
5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	40
5.3.2 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).....	40
5.3.3 Análise do extrato alcaloídico por CLAE.....	40
5.3.4 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos compostos isolados.....	40
5.4 Compostos testados nos ensaios biológicos.....	41
5.5 Atividade anticâncer.....	41
5.5.1 Cultura de células.....	41

5.5.1.1 Linhagens celulares.....	41
5.5.1.2 Cultivo e subcultivo.....	42
5.5.1.3 Condições gerais de cultivo e repique.....	42
5.5.1.4 Solução de Hanks'.....	42
5.5.1.5 Descongelamento das linhagens.....	42
5.5.1.6 Estoque.....	43
5.5.2 Ensaio de viabilidade celular.....	43
5.5.2.1 Ensaio com MTT.....	43
5.5.2.1.1 Análise estatística do MTT.....	44
5.5.2.2 Ensaio de LDH para avaliar integridade da membrana plasmática celular.....	44
5.5.2.2.1 Análise estatística do LDH.....	45
5.5.2.3 Ensaio de genotoxicidade pelo teste Cometa.....	46
5.5.2.3.1 Análise estatística do ensaio Cometa.....	47
5.5.3 Citometria de fluxo.....	48
5.5.3.1 Ensaio de apoptose com Anexina V-FITC/PI.....	48
5.5.3.1.1 Análise estatística do ensaio de apoptose com Anexina V-FITC/PI.....	49
5.5.3.2 Ensaio de ciclo celular.....	50
5.5.3.2.1 Análise estatística do ensaio de ciclo celular.....	51
5.5.4 <i>PCR array</i> quantitativo.....	51
5.5.4.1 Tratamento das células.....	51
5.5.4.2 Extração de RNA.....	52
5.5.4.3 Transcrição reversa.....	52
5.5.4.4 Ensaio de <i>PCR array</i> quantitativo.....	53
5.5.4.5 Análises da expressão gênica por <i>PCR array</i> .....	53
5.6 Atividade antifúngica.....	54
5.6.1 Avaliação antifúngica dos compostos naturais.....	54
5.6.1.1 Linhagens de <i>T. rubrum</i> .....	54
5.6.1.2 Cultivo das linhagens do fungo <i>T. rubrum</i> .....	54
5.6.1.3 Manutenção das linhagens do fungo <i>T. rubrum</i> .....	54
5.6.1.4 Determinação da concentração inibitória mínima.....	55
5.6.1.5 Teste de determinação da concentração fungicida mínima (CFM).....	55
5.6.1.6 Teste de regeneração de protoplastos.....	56
5.6.1.7 Determinação do nível de ergosterol.....	56

<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>59</b>
6.1 Extração e purificação dos extratos do fruto de <i>S. lycocarpum</i> .....	59
6.1.1 Desenvolvimento de fase móvel para Cromatografica em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	59
6.1.2 Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP).....	59
6.1.3 Análise do extrato alcaloidico por CLAE.....	59
6.1.4 Análise por Ressonância Magnética Nuclear dos compostos isolados.....	60
6.2 Atividade anticâncer.....	63
6.2.1 Determinação da atividade citotóxica e genotóxica dos glicoalcaloides.....	63
6.2.1.1 Ensaio com MTT- Citotoxicidade.....	63
6.2.1.2 Determinação do IC <sub>25</sub> e IC <sub>50</sub> .....	65
6.2.1.3 Avaliação da integridade da membrana plasmática celular pelo ensaio de LDH..	66
6.2.1.4 Genotoxicidade.....	67
6.3 Morte celular por apoptose e arraste do ciclo celular.....	69
6.3.1 Anexina V-FITC/PI.....	69
6.3.2 Ciclo celular por PI.....	72
6.4 Análise da expressão gênica por <i>PCR array</i> .....	75
6.5 Avaliação da atividade antifúngica dos glicoalcaloides e mecanismo de ação.....	76
6.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	76
6.5.2 Regeneração de protoplastos.....	77
6.5.3 Quantificação do nível de ergosterol.....	79
<b>7. DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
7.1 Purificação dos glicoalcaloides.....	80
7.2 Atividade anticâncer.....	81
7.3 Atividade antifúngica.....	89
<b>8. CONCLUSÃO.....</b>	<b>92</b>
<b>9. APÊNDICES.....</b>	<b>94</b>
<b>10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As pesquisas na área da oncologia, tem focado na busca por tratamentos mais eficazes através de drogas mais seletivas e menos agressivas, preferencialmente indutoras de eventos celulares e fisiológicos mais brandos. Substâncias naturais indutoras de apoptose cumprem os requisitos de antineoplásicos, bloqueando o ciclo celular e limitando a proliferação, porém, ainda requerem melhor entendimento quanto à especificidade e genotoxicidade (CUI et al., 2012). Este tipo de atividade já foi relatado para alguns glicoalcaloides presentes em plantas da espécie *Solanum* (XIE et al., 2015; LI et al., 2014). Já é de conhecimento científico e comercial, o uso de uma formulação conhecida como Curaderm BEC 5, contendo uma mistura de 33% de Solamargina, 33% de Solasonina, 33% de mono e diglicosídeos (BEC) (CHAM; DAUNTER; EVANS, 1991; CHAM 2007). Essa formulação tem sido comercializada na Austrália por aproximadamente 20 anos para o tratamento de tumores malignos de pele (PUNJABI et al., 2008; WU et al., 2011).

Em relação a atividade antifúngica, o contínuo aparecimento de patógenos resistentes aos fármacos disponíveis no mercado, torna a eficácia dos tratamentos limitada. Nesse sentido, há um grande interesse na pesquisa de novas moléculas vegetais com atividade antifúngica (ZHAO et al., 2011). O dermatófito *Trichophyton rubrum* é o agente causador mais frequente de dermatomicoses, sendo a causa de mais de 69,5% de todas as infecções provocadas por dermatofitos no mundo e inclusive no Brasil. Além disso, *T.rubrum* tem se tornado um agente oportunista invadindo órgãos internos em pacientes imunodeprimidos. Devido a proeminência e importância das dermatofitoses, há uma necessidade no desenvolvimento de novos agentes antifúngicos (WHITE et al., 2008), pois a maioria das drogas disponíveis atualmente apresentam efeitos colaterais indesejáveis, além de serem ineficazes contra linhagens de fungos reincidentes, o que leva ao rápido desenvolvimento da resistência (GUPTA; COOPER, 2008).

Considerando que, grande parte dos antitumorais e antifúngicos comercializados, é proveniente de produtos naturais, a procura por substâncias biologicamente ativas de origem vegetal tornou-se um nicho atraente no desenvolvimento de novos fármacos (BRANDÃO et al., 2010). Todavia, o grande desafio dos pesquisadores, na busca por novas moléculas com ação farmacológica para essas doenças, é o contínuo declínio em pesquisa e desenvolvimento (P&D), evidenciado pelas indústrias farmacêuticas. Como muitas outras empresas que atuam sob o panorama econômico atual, as indústrias farmacêuticas enfrentam grandes desafios num mercado extremamente competitivo, sendo pressionadas de forma agressiva por meio do uso



extensivo dos direitos monopólicos do período de patente, do processo de reestruturação empresarial, mediante fusões e aquisições, e do crescente rigor, proporcionado pelos órgãos regulatórios, que visam a valorização econômica ao invés dos interesses científicos. O incentivo em estudos na prospecção por novos fármacos de origens naturais advindos de diversas fontes como vegetais, marinhas e microbianas, têm se mostrado promissor, além disso uma alternativa diante dos obstáculos impostos por tais circunstâncias (CRAGG; NEWMAN, 2009). Dentre elas destacam-se os glicoalcaloides presentes em planta da espécie *Solanum*, sendo a solamargina e solasonina os que exibem atividades mais relevantes. Pesquisas tem atribuído o efeito quimiopreventivo à presença dos glicoalcaloides, solamargina e solasonina, no extrato glicoalcaloidico de *S. lycocarpum*, administrado em modelo animal com a finalidade de comprovar a atividade anti-carcinogênica dos glicoalcaloides (MUNARI et al., 2014). Ademais, esses compostos vêm incitando interesse pelo seu desempenho antineoplásico em virtude de ação indutora da via apoptótica (FRIEDMAN, M. 2015).

Portanto, neste estudo foi avaliado a atividade anticâncer e antifúngica de glicoalcaloides de *S.lycocarpum*. Para o estudo do mecanismo de ação anticâncer dos glicoalcaloides foram realizados ensaios de atividade apoptótica, ciclo celular por citometria de fluxo e ensaio do cometa em linhagem de câncer de mama MFC-7. Além disso, foram realizados experimentos de avaliação do conteúdo de ergosterol de *T.rubrum* tratados com glicoalcaloides.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Família Solanaceae e o gênero *Solanum*

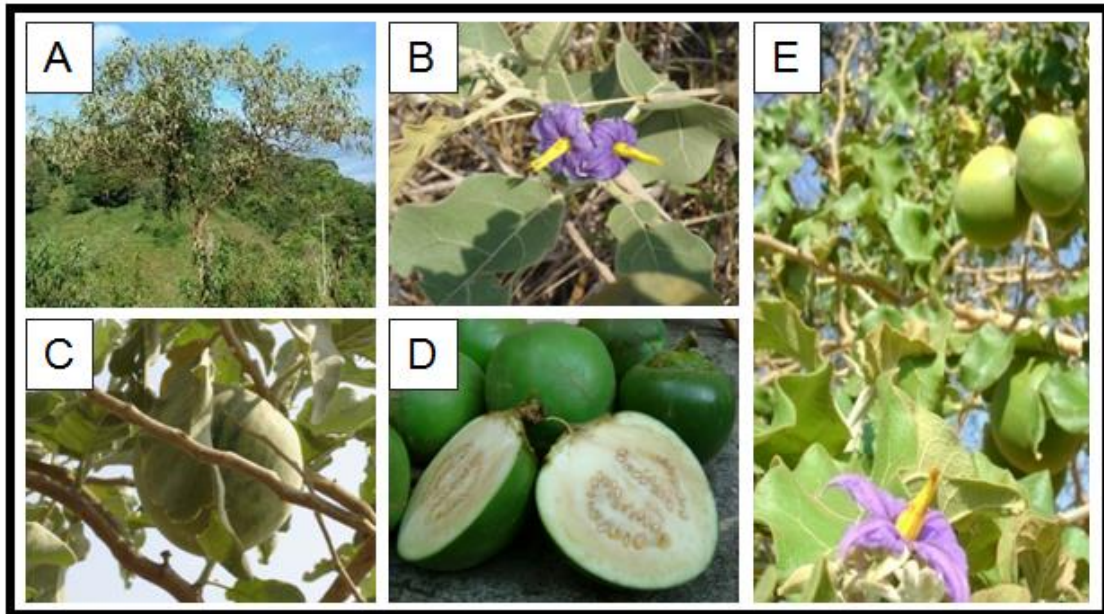
A família Solanaceae no Brasil está concentrada na região tropical, onde apresenta 32 gêneros e 350 espécies, sendo o gênero *Solanum* o maior e o mais complexo gênero da família Solanaceae, com cerca de 1500 espécies nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, tendo a América do Sul como centro de diversidade e distribuição (AGRA, 1999).

Estudos farmacológicos têm relatado importantes atividades biológicas para várias espécies do gênero *Solanum* tais como: atividade antiinflamatória (ANWIKAR; BHITRE, 2012), hipotensora (BAHGAT et al., 2008), atividade antiulcerogênica (*S. nigrum*), atividade hepatoprotetora (GUPTA et al., 2011), anti-viral (JAVED et al., 2011), antiurolítico (PATEL et al., 2012), anti-alérgicas (NIRMAL et al., 2012), antioxidante (MORAIS et al., 2015; DA COSTA et al., 2015), atividade antitumoral (XIE et al., 2015), antibactericida (MORAIS et al., 2015), antiparasitária (ABREU et al., 2013), gastroprotetora (ABREU et al., 2015) e atividade antifúngica (FEWELL et al., 1994).

Dentro desse gênero, encontra-se a espécie *Solanum lycocarpum* Auguste Saint-Hilarie (Solanaceae), popularmente conhecida como “lobeira” ou “fruta-do-lobo”, entre outras denominações. Acredita-se que, seu nome vulgar, se deve ao fato dos seus frutos constituírem 50% da dieta alimentar do Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (CORRÊA, 1984). Apresentando ação terapêutica contra o verme-gigante-dos-rins, que é muito frequente e geralmente fatal no lobo (OLIVEIRA et al., 2003). Foi inicialmente utilizada pelos índios Xavantes brasileiros, como agente hipoglicemiante e seus frutos são empregados na medicina popular no tratamento da obesidade, diabetes e na diminuição dos níveis de colesterol (SCHWARZ et al., 2005; 2007).

A *S. lycocarpum* é uma planta típica do cerrado brasileiro, possuindo uma ampla distribuição geográfica. A espécie é um arbusto de 2 a 4 metros de altura, possui muitos ramos, sendo revestidos de pelos densos estrelados, ramos cilíndricos, lenhosos e fistulosos de folhas simples e alternas (LORENZI; MATOS, 2002). Os frutos, são do tipo baga, globosas, com até 20 cm de diâmetro, contendo polpa carnosa, com 300 a 500 sementes, sendo usados popularmente para diminuição de níveis de glicose e colesterol (Figura 1) (SILVA et al., 1994). Sua frutificação é concentrada entre julho e janeiro, apesar de ser capaz de rebrotar após ser queimada, a lobeira pode ter seus frutos danificados pelo fogo, o que pode comprometer sua reprodução (BRIANI; GUIMARÃES JUNIOR, 2007).

**Figura 1.** Árvore (A); Flor (B) e Frutos (C e D); Conjunto (E) da espécie *S. lycocarpum* A.St.–Hil

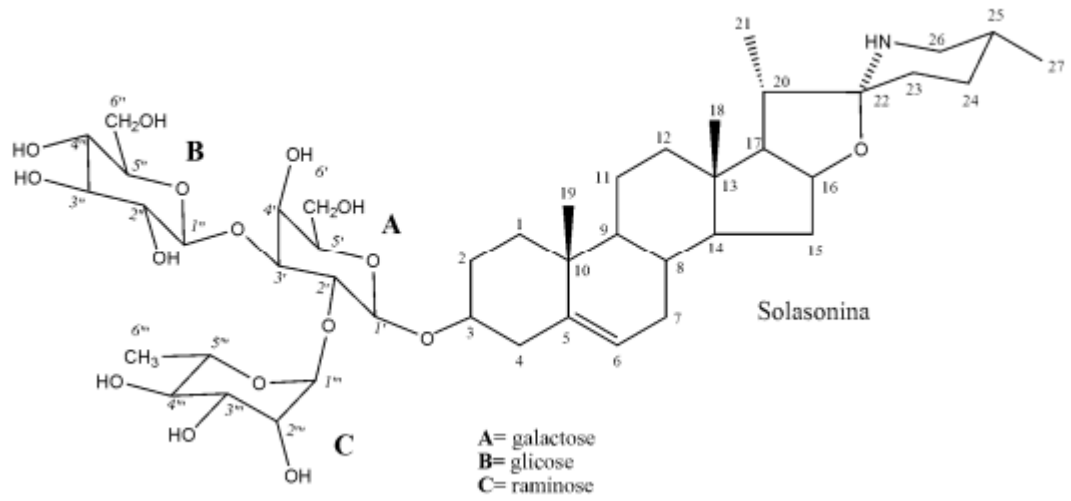


**Fonte:** Arquivo pessoal

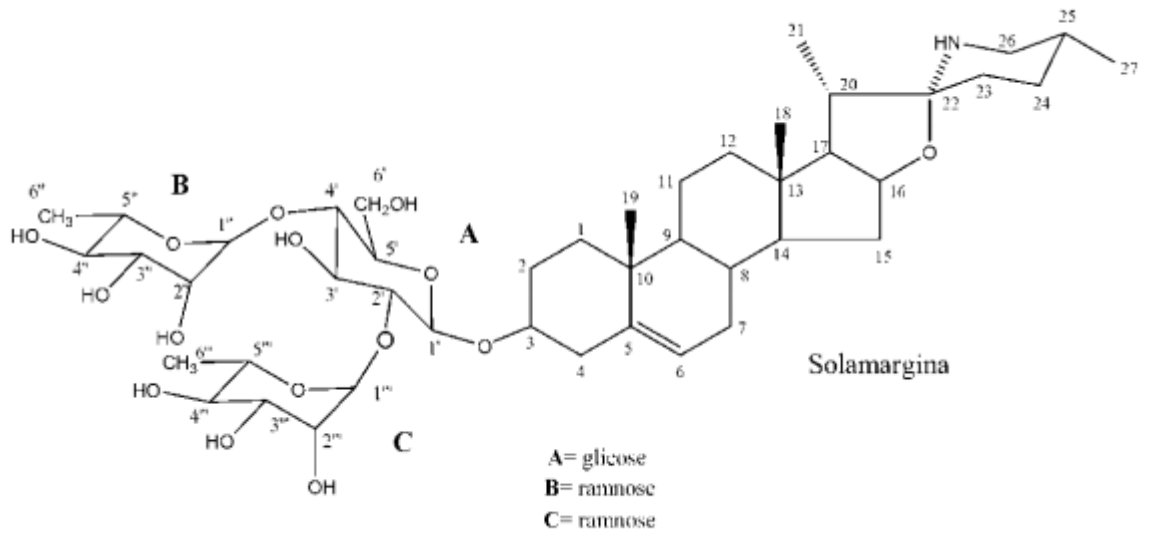
## 2.2 Glicoalcaloides das espécies de Solanaceae

Os metabólitos secundários solasonina (SS) e solamargina (SM) (Figura 2 e 3) são heterosídeos alcaloídicos (Glicoalcaloides) majoritariamente produzidos pelo fruto da espécie *S. lycocarpum*, sendo a solasodina (SD), a aglicona destes compostos (Figura 4) (BLANKEMEYER et al., 1998; SCHWARZ et al., 2007; SOARES-MOTA et al., 2010). Estruturalmente a SM e SS, apresentam em comum o núcleo central esteroidal SD, que possui 27 carbonos, um nitrogênio ligado ao carbono 22' e 26' do anel e geralmente apresentam ligações eterosídicas na hidroxila do carbono 3', bem como ligações duplas entre os carbonos 5' e 6' (SIMÕES et al., 2002). Dessa maneira, esses compostos diferenciam-se apenas pelos grupamentos de açúcares ligados ao seu núcleo esteroidal SD, sendo que a triose do composto SM é denominada chacotriose, a qual é constituída por duas unidades de ramnose na posição 2' e 4' do carbono ligado à D-glicose. Já a triose do composto SS é conhecida como solatriose, sendo composta por uma unidade de L- ramnose e uma D-glicose na posição 2' e 3' da D-galactose, respectivamente (FEWELL et al.; 1994; BLANKEMEYER et al., 1998).

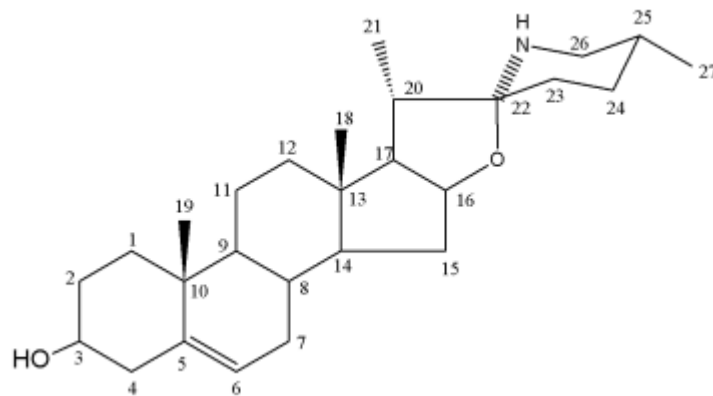
**Figura 2.** Estrutura química da solasonina.



**Figura 3.** Estrutura química da solamargina.



**Figura 4.** Estrutura química da solasodina.



A aglicona da solamargina e da solasonina, a solasodina (Figura 4), pode ser utilizada para a fabricação de medicamentos esteroidais, como os contraceptivos e anti-inflamatórios. Solasodina pode, por exemplo, fornecer o acetato de 16-deidropregnenolona a partir do qual forma-se o acetato de deidroepiandrosterona que é uma das principais fontes para produção de andrógeno (GOSWANI et al., 2003).

Todos os glicoalcaloides encontrados em espécies de *Solanum* possuem estrutura constituída por 27 carbonos e, a partir de diferenças estruturais observadas, foram divididos em 5 tipos: solanidinas, espirosolanos, solacongestidinas, solanocapsinas e jurbidinas (SCHWARZ et al., 2005; 2007).

Pesquisas revelam que a mistura de solasonina e solamargina, demonstrou efeito citotóxico sinérgico contra células tumorais (CHAM et al., 1991; CHAM, 2007). Além disso, foi relatado atividade antifúngica desses mesmos glicoalcaloides contra fungos dermatofitos e do ambiente (FEWELL et al., 1994).

### **2.3 Mecanismo de ação antifúngico e anticâncer dos glicoalcaloides**

Em geral, sabe-se que o potencial farmacológico dos glicoalcaloides depende da interação específica entre o glicoalcaloide-esterol, provocando a perda da integridade da membrana, o que resulta em alterações de permeabilidade e consequente morte celular (CIPOLLINI; LEVEY, 1997; PUNJABI et al., 2008).

Porém, essas alterações foram demonstradas com maior evidência em célula animal, ou seja, o glicoalcaloide interagindo com o colesterol levando a perda da integridade da

membrana celular, sendo a porção de açúcar dos glicoalcaloides de vital importância para o efeito de disruptura da membrana (KEUKENS et al., 1992, 1995).

Quanto a atividade antifúngica, não se conhece o mecanismo de ação dos alcaloides em dermatófitos, mas especula-se que os alcaloides devem atuar na via do ergosterol e não interagem diretamente no colesterol da membrana de célula animal como proposto pelo modelo de Keukens et al. (1995).

Com relação à atividade antitumoral da SM e SS, têm sido cogitadas várias hipóteses sobre o mecanismo de ação citotóxico dos glicoalcaloides SM e SS. Segundo Chang et al. (1998) e Cham (2007), a cadeia de açúcares, mais especialmente o carboidrato ramnose, presentes na SM e SS, natural em plantas mas não em células animais, se liga a sítios endógenos específicos presentes na membrana de células susceptíveis. Uma vez que a SM apresenta duas ramnoses e é mais ativa comparada com a SS, que apresenta apenas uma. Neste contexto, o processo se deve ao fato da aglicona solasodina penetrar na célula, provocando a morte celular por lise dos lisossomos e por ativar a via apoptótica, uma vez no interior do núcleo da célula (CHAM et al., 1991).

O carboidrato ramnose presente nos glicoalcaloides não é encontrado nas células de mamíferos e especula-se a respeito da presença de receptores específicos para a ramnose em células tumorais. Foi demonstrado que o carboidrato ramnose presente em uma solução constituída pelos glicoalcaloides solamargina e solasonina inibe os efeitos citotóxicos de tumores artificialmente induzidos em camundongos e que, a solasodina não é efetiva em inibir o crescimento das células cancerosas como os glicoalcaloides, já que esta não possui cadeia de açúcar (SCHWARZ et al., 2007).

Além disso, segundo Keukens et al. (1995), a ação terapêutica dos glicoalcaloides é devido a interação específica entre o glicoalcaloide-colesterol, provocando a perda da integridade da membrana, o que resulta em alterações de permeabilidade e provoca a morte celular. Sendo a porção de açúcar dos glicoalcaloides parte importante para que ocorra essa interação levando ao efeito de disruptura da membrana da célula animal.

Estudo realizados por Chang et al. (1998), onde a SM e SD, foram utilizadas para determinar o papel da porção carboidrato no mecanismo de apoptose. A cadeia lateral de C3, dos glicoalcaloides SM e SD contém 40Rha - Glc - 20Rha, 40Rha - Glc e H, respectivamente. Observou-se que a SM apresenta potente citotoxicidade contra células de hepatoma humano, atividade esta devido a porção de 20Rha presente neste glicoalcaloide, sendo esta porção a

responsável por desempenhar um papel crucial no desencadeamento da morte celular por apoptose.

A segunda hipótese sugere que os glicoalcaloides difundem-se dentro da célula tumoral, fazendo com que a expressão dos receptores de fator de necrose tumoral (TNFR) sejam ativados. Por conseguinte, os TNFR se conjungam com fatores de necrose tumoral (TNF), desencadeando uma cascata de reações que provocam a morte celular (PUNJABI et al., 2008). Assim sendo, vários estudos corroboram com a afirmação de que SM aumenta a expressão das proteínas apoptóticas TNFR, Fas, TRADD, FADD, Bax, citocromo c, caspase-8, -9 e -3, ao passo que inibe as proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 e Bcl-xL, sugerindo que a via extrínseca da apoptose, pode estar envolvida na morte celular induzida por SM (LIANG et al., 2004; LIU et al., 2013; SHIU et al., 2007; LIANG et al., 2008; WU et al., 2011; DING et al., 2012).

Em contra partida, estudo realizado por Sun et al., 2010; 2011, relataram que através dos ensaios de LDH, foi possível determinar a quantidade de conteúdo citoplasmático de células leucêmicas, liberado para o meio extracelular, quando estas foram submetidas ao tratamento com SM na concentração de 10  $\mu$ M. Este resultado sugere que a apoptose é iniciada pela perturbação da membrana plasmática. Além disso, relataram que a exposição das células de leucemia à SM na concentração de 10  $\mu$ M durante 30 minutos, induziu um aumento de sete vezes na concentração de cálcio intracelular, diminuindo a expressão de Bcl-2 e aumentando a expressão da atividade de Bax, caspase-3 e caspase-9. Estes resultados e o decréscimo observado no potencial da membrana e liberação de citocromo c, sugerem que uma via de morte lisossomal-mitocondrial induzida está envolvida na citotoxicidade (FRIEDMAN, M., 2015). No estudo realizado por Xie et al (2015), confirma a hipótese de que o glicoalcaloide SM induz morte por apoptose, promovendo a modulação de genes envolvidos na via intrínseca da apoptose, inibindo o gene anti-apoptótico (Bcl-2) e ativando proteínas associadas à apoptose (Bax, caspase-3 e caspase-9). Portanto, a modulação da proteína Bcl-2/Bax e vias de sinalização das caspases, promovida pela SM, está envolvido no processo de indução da apoptose em células de hepatoma

Por fim, a terceira hipótese foi constatada com o auxílio da técnica de citometria de fluxo, em que foi possível verificar que após o tratamento das células com SM houve uma drástica mudança da fase celular G<sub>2</sub>/M, correspondente a fase em que ocorre divisão celular, para a sub-G<sub>1</sub>, fase em que as células não se dividem e permanecem neste estágio até a morte

(CUI et al., 2012). Portanto, esta mudança da fase celular também é considerada outra via de apoptose (KUO et al., 2000; LUI et al., 2004; SHIU et al., 2007).

Dessa forma, nota-se que a apoptose se tornou um foco de interesse na oncologia, pois a alteração deste processo pode levar ao surgimento de malignidades (KUO et al., 2000; LIU et al., 2013).

## **2.4 Atividade anticâncer**

### **2.4.1 Câncer**

Apesar dos avanços na oncologia na tentativa de obter tratamentos mais eficazes e a cura, o câncer está entre as doenças de maior significância em termos de números de ocorrências (JEMAL et al., 2011). Estima-se que no ano de 2030, a incidência mundial será de 21,4 milhões de novos casos e 13,2 milhões de mortes por câncer. Sendo que, a maior prevalência dos casos, ocorre em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Somente no Brasil, mais de 576 mil novos casos de câncer foram estimados para o ano de 2015, dados estes que refletem a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2014).

A definição de câncer abrange mais de uma centena de enfermidades especialmente caracterizadas pela proliferação celular desordenada resultante de alterações nos mecanismos de controle do ciclo celular (STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009). O processo de desenvolvimento de um tecido tumoral é originário de células cancerosas, com capacidade metastática e angiogênica. De tal forma, as células tumorais, independentemente do tecido de origem, podem ser classificadas como benignas (tumor) e malignas (câncer). Três aspectos fundamentais que, propriamente, distinguem células cancerosa de tumoral são o ganho de massa e a divisão celular excessiva (*i*), típica, porém mais branda em tumores benignos; a indução à angiogênese (*ii*), com o surgimento de novos vasos sanguíneos a fim de suprir as células cancerosas com oxigênio conforme há expansão tumoral; e a formação de metástases (*iii*), a capacidade dos tumores malignos de se desprenderem da matriz extracelular, soltando-se do tecido e podendo colonizar outros tecidos (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 2012; ALBERTS et al., 2010).

O câncer pode se originar através de várias alterações relacionadas ao seu desenvolvimento, podendo estas serem causadas por fatores internos ou externos ao organismo, estando ambas inter-relacionadas. As alterações genéticas decorrentes a exposição aos fatores internos, tendem a ocasionar efeitos carcinogênicos (multiplicação e proliferação



celular desordenada), caso ocorram nos genes responsáveis por comandar processos celulares relacionados à indução e inibição de apoptose; fatores de crescimento (protooncogenes); genes supressores de tumor (antioncogenes), que controlam a proliferação natural das células; epigenéticas e do acúmulo seletivo de mutações espontâneas (LOPES et al., 2010). Além disso, alterações genéticas podem também ser originadas por exposição aos fatores externos como, a ação de agentes biológicos (oncovírus), químicos e físicos. Apesar da importância conferida à radiação ultravioleta natural e aos carcinógenos derivados da poluição ambiental e resíduos químicos, os casos de câncer são predominantemente mais associados ao estilo de vida, por hábitos relacionados a fatores alimentares, ao alcoolismo, tabagismo, obesidade e sedentarismo (LONGE, 2005).

Diante dessa situação, é de grande importância a busca por drogas antitumorais mais seletivas, atóxicas e eficazes. No entanto, uma das maiores barreiras para que a quimioterapia contra o câncer seja aplicada de forma efetiva é a múltipla resistência a drogas. Obstáculo gerado por diferentes mecanismos, tais como a apoptose reduzida; o efluxo mediado por transportadores ABC, que dificulta a manutenção intracelular de concentrações letais de drogas hidrofóbicas; e a baixa absorção de algumas drogas hidrossolúveis que necessitam de transportadores para adentrarem a célula (ULLAH et al., 2008).

Uma alternativa para tal limitação, é a valorização na pesquisa por atividades biológicas inexploradas de compostos conhecidos provenientes da biodiversidade, sobretudo os fitoquímicos (CARVALHO; SILVEIRA, 2010). Um exemplo clássico de drogas com ação antitumoral é o da síntese do taxol (paclitaxel), diterpenoide de *Taxus brevifolia*, que resulta em uma molécula de ação antimitótica (JENNEWEIN; CROTEAU, 2001). Outros casos de antineoplásicos derivados de vegetais são os alcaloides de vinca (*Catharanthus roseus*), vincristina e vimblastina (ISHIKAWA et al., 2009).

Deste modo, muitos metabólitos secundários vegetais que apresentam potencial citotóxico para células tumorais, tornaram-se um nicho atraente à farmacologia (CRAGG; NEWMAN, 2012).

#### **2.4.2 Câncer de mama**

O câncer de mama é a neoplasia mundialmente mais incidente entre as mulheres, com cerca de 1,67 milhões de casos novos anuais, em todo mundo, contribuindo para uma estimativa de 25% de todos os novos casos de câncer diagnosticados (FERLAY et al., 2015; TORRE et al., 2015). Além disso, embora seja considerado um câncer com bom prognóstico

se detectado precocemente, o câncer de mama continua sendo a principal causa de morte por câncer entre as mulheres (FERLAY et al., 2010).

Segundo o Instituto Nacional de Câncer, o câncer de mama é o segundo mais incidente no mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, sendo mais frequente em mulheres (INCA, 2014). As taxas de incidência variam entre as diferentes regiões do mundo, com as maiores taxas na Europa Ocidental (96/100 mil) e as menores taxas na África Central e na Ásia Oriental, no ano de 2012 (27/100 mil) (INCA, 2015).

O Brasil tem acompanhado as altas taxas de incidência e mortalidade de câncer de mama dos países desenvolvidos, porém as medidas necessárias à prevenção, ao diagnóstico e ao controle da doença não têm sofrido o mesmo crescimento. No ano de 2014, foram esperados 57.120 mil novos casos de câncer de mama, com um risco estimado de 56.09 mil casos a cada 100 mil mulheres, sendo o tipo de câncer mais frequente nas regiões Sul (71 casos/100 mil), Sudeste (71 casos/100 mil), Centro-Oeste (51 casos/100 mil) e Nordeste (37 casos/100 mil). Na região Norte, o câncer de mama é o segundo mais incidente (21 casos/100 mil) (INCA, 2015). Estima-se que cerca de 13.000 mil mulheres morreram de câncer de mama no Brasil no ano de 2010 (LEE et al., 2012). No período de 2009-2013, o SISMAMA (2015) (Sistema de Informação do Câncer de Mama), registrou mais de 12 milhões de mamografias em todo o país. Cerca de 1,4% destes casos indicaram um elevado risco de câncer, o que corresponde a cerca de 168.000 mil casos. Além disso, o envelhecimento da população tornou o câncer um grande problema de saúde pública (ELOMRANI et al., 2015). Mais de 50% dos pacientes com câncer de mama estão na faixa etária de 65 anos ou mais, e cerca de 30% apresentam mais de 70 anos de idade (BINDER-FOUCARD et al., 2013; YANCIK et al., 2004; JEMAL et al., 2004).

A não adesão ao tratamento, a existência de comorbidades que podem afetar a mortalidade, e o alto custo gerado com os benefícios para a população carente, são fatores que explicam por que a maioria das estratégias de triagem não incluem pacientes com mais de 70 anos de idade (ELOMRANI et al., 2015). O resultado é que o diagnóstico de câncer de mama muitas vezes é feito tardiamente, e cerca de 48% dos pacientes com mais de 65 anos de idade têm metástases no momento da diagnosis (RIES et al., 2009).

Além da idade, outros fatores que predispõe o câncer na mama são: fatores nutricionais, atividade física, duração da amamentação, histórico familiar, tabagismo, consumo de álcool, socioeconômico, menstruação precoce, menopausa tardia, obesidade, ausência de gravidez e reposição hormonal (ELOMRANI et al., 2015).

O câncer de mama é considerado um dos tipos de câncer mais temidos pelas mulheres, devido à sua alta frequência e efeitos psicológicos, tais como: alterações da sexualidade e da imagem corporal, medo de recidivas, ansiedade, dor e baixa autoestima (INCA, 2015).

Os principais sinais e sintomas de câncer de mama são nódulo na mama e/ou axila, dor mamária e alterações da pele que recobre a mama, como retrações com aspecto semelhante à casca de laranja. O câncer de mama localiza-se, principalmente, no quadrante superior externo, e em geral, as lesões são indolores, fixas e com bordas irregulares, acompanhadas de alterações da pele quando em estágio avançado (INCA, 2015).

Programas de prevenção primária evitam o aparecimento de doenças, o controle dessa doença se dá através da detecção precoce, na qual a lesão se restringe ao parênquima mamário, com um tamanho de no máximo três centímetros, permitindo o uso de recursos terapêuticos menos agressivos e maior possibilidade de cura. Os meios mais eficazes para a detecção precoce de câncer de mama são o exame clínico de mamas (ECM) e a mamografia, pois o autoexame de mamas (AEM) detecta a doença geralmente em estágio avançado, sendo responsável por cerca de 80% das descobertas de câncer de mama (BALOGUN; FORMENTI, 2015).

A mamografia é um exame radiológico, dos tecidos moles das mamas, mais usado em mulheres com 35 anos ou mais, que permite a identificação de alterações não perceptíveis ao ECM, não substituindo o mesmo. A ultrassonografia é o exame de escolha para mulheres com menos de 35 anos de idade, sendo também utilizado para mamas densas, nódulos palpáveis com/ sem mamografia negativa, processos inflamatórios e grávidas com sintomas mamários (SBC, 2015).

Pesquisas em agentes terapêuticos, a fim de melhorar o potencial citotóxico dos antitumorais, além dos ensaios clínicos em andamento, têm contribuído para a diminuição da taxa de mortalidade por câncer de mama, assim podendo proporcionar maiores benefícios para tal terapia (ANAMPA; MAKOWER; SPARANO et al., 2015).

### **2.4.3 Glioblastoma**

Glioblastoma (GBM) é o tipo mais comum e fatal de tumor cerebral primário, com cerca de 10.000 mil novos casos em adultos por ano nos Estados Unidos da América (OSTROM et al., 2014). É composto por 70% de todos os gliomas e é classificado como grau glioma IV (SEYMOUR et al., 2015). O tumor GBM cresce rapidamente e é heterogêneo, composto de célula glia transformadas (DAMODARAN et al., 2014). Apesar de apresentar

baixa incidência, sendo mais frequente em idosos com idade superior a 65 anos, o glioblastoma multiforme é um dos tipos de câncer mais agressivos, tendo o paciente sobrevida aproximada de 15 meses mesmo perante quimioterapia, radioterapia e intervenção cirúrgica. Como agravante, os números tendem a elevar com o envelhecimento populacional (PONTES et al., 2012).

A ausência de tratamentos eficazes para o GBM, a sua capacidade de invasão, bem como sua crescente incidência, têm gerado interesse, por parte dos pesquisadores, neste tumor e suas características malignas (DOBES et al., 2011).

Apesar dos recentes avanços no tratamento de tumores sólidos, os tratamentos para gliomas de grau IV permanecem paliativos. Excisões cirúrgicas mais agressivas, embora retire uma grande proporção do tumor, sempre deixa algum resíduo que se infiltra em tecido cerebral circundante, levando ao resurgimento do tumor (SEYMOUR et al., 2015). O GBM também exibe resistência à radioterapia e quimioterapia, e muitas vezes os tumores recorrentes são mais agressivos (DAMODARAN et al., 2014; ANDALOUSSI-SAGHIR et al., 2011). Estes resultados insatisfatórios enfatiza a necessidade urgente para a identificação de novos alvos terapêuticos.

Uma explicação para a grande falta de tratamentos eficazes é a má compreensão dos mecanismos moleculares e celulares que regulam o crescimento do tumor e sua recorrência (SEYMOUR et al., 2015).

#### **2.4.4 Apoptose**

A morte celular, foi definida recentemente, pelo comitê de nomenclatura em morte celular (NCCD) como, a perda permanente da função de barreira da membrana plasmática (*i*), a fragmentação celular em corpos apoptóticos (*ii*) e o engolfamento de uma célula por outra de atividade fagocítica (*iii*) (GALLUZZI et al., 2014). Assim, a perda irreversível da estrutura e funções vitais da célula, ocorrem por dois processos morfológicamente distintos: necrose ou apoptose.

A atividade necrótica é decorrente de uma injúria acidental, e desencadeia processos inflamatórios pela exposição do conteúdo citoplasmático ao meio externo. Neste caso, há permeabilidade da membrana celular, dilatação das organelas, dissociação dos ribossomos do retículo endoplasmático e condensação da cromatina, diferente da apoptose. Esta é comparada metaforicamente a um “suicídio programado” induzido por estímulos internos ou externos à célula (OUYANG et al., 2012). Por esta razão, o evento apoptótico pode ocorrer pelas vias:

extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial). A primeira é desencadeada pela ligação de moléculas específicas a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (TNF) e subsequente ativação da cascata de caspases (BUDIARDJO et al., 1999).

Já a segunda via, é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. Morfologicamente, a célula apoptótica é caracterizada pelo encolhimento, perda de adesão às células vizinhas e à matriz extracelular, externalização de fosfatidilserina, fragmentação nuclear, clivagem do DNA, prolongamento da membrana celular e, por fim, formação dos corpos apoptóticos (ALBERTS et al., 2010a; INDRAN et al., 2011). Os sinais que são transduzidos em resposta a estas injúrias, convergem principalmente para a mitocôndria (HENGARTNER et al., 2000). Inúmeros estudos sobre apoptose apontam a mitocôndria como o principal mediador desse tipo de morte. Essa organela integra os estímulos de morte celular, induzindo a permeabilização mitocondrial e conseqüente liberação de moléculas pró-apoptóticas nela presente (DESAGHER et al., 2000).

#### **2.4.5 Atividade citotóxica de glicoalcaloides**

Sabe-se que, mais de 50% das drogas em ensaios clínicos para atividade anticâncer são advindos de ativos naturais ou sintetizadas baseadas nas estruturas destes compostos bioativos (CRAGG; NEWMAN, 2000, 2009). Neste contexto, os glicoalcaloides presentes em plantas da espécie *Solanum* estão ganhando destaque por seu acentuado potencial antitumoral, sendo a SM e SS os com atividades mais promissoras para o desenvolvimento de fármacos anticancerígenos.

Há que se destacar que desde 1987, estudos *in vivo* com animais e humanos, sobre a atividade antitumoral de glicoalcaloides da espécie *Solanum*, têm sido relatados (CHAM; MORAES, 1987). Já é de conhecimento científico e comercial, que a algum tempo, foi desenvolvida uma formulação contendo uma mistura dos glicoalcaloides, conhecida como Curaderm BEC 5 (CHAM et al., 1991; CHAM, 2007), que tem sido comercializada na Austrália por aproximadamente 20 anos para o tratamento de tumores malignos de pele (PUNJABI et al., 2008; WU et al., 2011).

Nos estudos realizados por Souza-Esteves e colaboradores em 2002, observaram que uma mistura de alcaloides apresentaram atividade citotóxica frente a linhagem de leucemia humana K562. A mistura continha uma fração rica em glicoalcaloides SS, purificados a partir

dos tricoma de galhos jovens e frutos de *Solanum crinitum* Lam, além do alcaloide estereoidal SD, extraído das partes aéreas de *S. Jabrense* Agra & M.Nee.

Cham, 2007; 2008, relata em seus estudos, que os glicoalcaloides apresentam atividade antiproliferativa frente as linhagens de células tumorais, sendo a SM o glicoalcaloide que apresentou uma atividade antineoplásica mais pronunciada e toxicidades mais baixas do que vinblastina, cisplatina, doxorubicina e CPT. Em 2013, Munari et al, relataram que a SM exibiu maior efeito citotóxico comparado com quimioterapêuticos contra células de câncer de mama humano.

Além disso, a SM induziu morte celular pelo processo de apoptose em linhagens de câncer de mama. A apoptose foi caracterizada pela regulação da expressão dos receptores de morte da via extrínseca, tais como o receptor do fator de necrose tumoral I (TNFR - I), o receptor Fas (Fas), domínio de morte TNFR-I (TRADD) e domínio de morte Fas (FADD). Ademais, a SM aumentou a expressão de Bax e diminuiu a regulação da expressão de Bcl-2 e Bcl-xL. Esses efeitos resultaram na liberação de citocromo c e ativação de caspases 8, 9 e 3, indicando que SM desencadeou vias apoptóticas extrínsecas e intrínsecas em células de câncer de mama (SHIU et al., 2007).

Kuo et al., (2000), relataram a atividade citotóxica do glicoalcaloide SM, produzida por *S. Lycocarpum*, contra células cancerosas de hepatoma humano. A atividade citotóxica dos glicoalcoloides esta relacionada à indução do gene regulador da apoptose (TNFR-I e II). Além disso, a caracterização do mecanismo anti-cancerígeno de SM em células de hepatoma humano (Hep3B), foi demonstrada por alterações na morfologia celular, no conteúdo de DNA e na expressão de genes de células tratadas com SM. As células tratadas com SM, mostraram condensação da cromatina, fragmentação de DNA e um pico sub-G1, sugerindo que o SM induz a morte celular irreversível por apoptose.

Li et al., 2011, demonstraram que a SM reduz a viabilidade celular e induz a apoptose em células de osteossarcoma U2OS, aumentando a expressão do RNAm que codifica a proteína de p53 e Bax (uma proteína pró-apoptótica). A expressão de Bcl-2 (uma proteína anti-apoptótica) foi também reprimida.

Assim, o estudo da relação estrutura química versus atividade biológica dos glicoalcaloides de *Solanum*, é de grande interesse, podendo assim ser levada em conta no estudo de atividade citotóxica dos glicoalcaloides como a SM (SCHWARZ et al., 2007; CHAM et al., 1991; KEUKENS et al., 1995; CHANG et al., 1998).

## 2.5 Atividade antifúngica

### 2.5.1 *T. rubrum*

As micoses cutâneas estão entre as infecções fúngicas mais comuns, sendo causadas por fungos queratinofílicos que atingem tecidos queratinizados como a unha, pele e o cabelo (GUPTA; NAKRIEKO, 2015). Estes são chamados dermatófitos que compreendem cerca de 40 fungos pertencentes a três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. Podem ser caracterizados de acordo com o seu habitat como zoofílicos, antropofílicos ou geofílicos. As infecções causadas por esses dermatófitos são denominadas de *tineas* seguida do seu local de ocorrência, por exemplo, *tinea pedis*, *tinea unguium* e *tinea corporis*, para as infecções com ocorrência nos pés, nas unhas e no corpo respectivamente (ACHTERMAN; WHITE, 2012). Apesar de não serem potencialmente fatais ou incapacitantes são incômodas e recorrentes (PERES et al., 2010a), o fato da recorrência não está claro, é devido a uma nova aquisição ou reativação de uma infecção prévia (ACHTERMAN; WHITE, 2012). Há relatos sugerindo que a taxa hormonal entre homens e mulheres afetam a ocorrência das infecções e que o crescimento desses patógenos podem ser influenciado por alguns esteróis (DA SILVA et al., 2014; PAPINI et al., 2013; WU; SUN; CHANG, 2013).

As dermatofitoses afetam cerca de 30% da população mundial (WHITE et al., 2008). Dentre os dermatófito, o *T. rubrum* é o agente causador mais frequente de dermatofitoses superficiais tais como onicomicoses e *tinea pedis* (WU; SUN; CHANG, 2013), representando cerca de 80% de dermatomicoses que afetam tecidos queratinizados (GUPTA; NAKRIEKO, 2015), sendo o responsável por mais de 69,5% de todas as infecções provocadas por dermatófitos no mundo (CHEN; FRIEDLANDER, 2001), inclusive no Brasil, com ocorrência de 33,2% só no estado de São Paulo (GODOY-MARTINEZ et al., 2009).

Em geral estas infecções não causam risco de vida, mas em alguns casos têm ocorrido de forma invasiva, afetando um elevado número de pacientes imunocomprometidos como aqueles portadores de HIV, diabetes, cirrose e insuficiência renal crônica (DA SILVA et al., 2014). Em pacientes imunocomprometidos portadores de HIV e já diagnosticados com AIDS, na cidade de São Paulo a ocorrência deste fungo é de 70,6% e 94,7% respectivamente (DA SILVA et al., 2014). *T. rubrum*, que normalmente provoca micoses superficiais bem caracterizadas, vem causando infecções subcutâneas e profundas com quadros clínicos mais complexos como abscessos, granulomas e micetomas (DA SILVA et al., 2014; PAPINI et al., 2013; WU; SUN; CHANG, 2013).

Pesquisadores tendem a desenvolver novas abordagens terapêuticas, visando a diminuir as lesões causadas por tais infecções (BALTAZAR et al., 2015). Todavia, as drogas antifúngicas apresentam-se em menor número quando comparadas com as drogas antibacterianas. Esse fato se deve, principalmente, às semelhanças compartilhadas entre células fúngicas e de mamíferos, além do fato, das bactérias serem mais conhecidas, molecularmente, e que as infecções fúngicas foram mais evidenciadas a partir da década de 70 (GHANNOUM; RICE, 1999; MORETTI, 2007).

O uso indiscriminado de agentes antifúngicos ao longo das últimas décadas, tem selecionado linhagens de *T.rubrum* resistentes a varias drogas (RICHARDSON; WARNOCK, 2012). Assim, considerando o processo de multirresistência emergente, a atenção substancial tem sido focada em produtos naturais com propriedades antifúngicas, estimulando a busca de alternativas terapêuticas (GHANNOUM; RICE, 1999; THOMAS; KIM, 2011).

### 2.5.2 Sequenciamento do Genoma de *T.rubrum*

A prevalência das infecções provocadas por *T.rubrum*, torna-o um bom modelo para o estudo de fungos filamentosos patogênicos humanos (SIDAT et al., 2006; FACHIN et al., 2001). Além disso, este patógeno tem sido utilizado como modelo para vários estudos de expressão gênica, sendo um dos dermatófitos, cuja a sequências do genoma foi disponibilizado por pesquisadores de várias universidades (see the Broad Institute's Dermatophyte Comparative Database at <http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte-comparative/MultiHome.html>): (projeto Fungal genome Initiative do Broad Institute, <http://www.broad.mit.edu/>). As sequências do genoma de cinco espécies de dermatófitos com nichos ecológicos distintos já foram anotados sendo: *Trichophyton rubrum*, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton tonsurans* e *Trichophyton equinum* (MARTINEZ et al., 2012). Em seu estudo comparativo, Martinez et al. (2012) relatam que o genoma sequenciado dos dermatófitos é enriquecido com quatro famílias de genes que contribuem para a sua capacidade de causar a doença, em relação a outros fungos que causam infecções em humanos. Uma observação que espelha a análise original dos primeiros dois genomas de dermatófitos. Estes incluem (i) proteases secretadas, para degradar a pele, que supostamente atuam como fatores de virulência, (ii) quinases, incluindo pseudoquinases, que estão envolvidos na sinalização necessária para adaptar para o nicho da pele; (iii) metabólitos secundários, os compostos que atuam como toxinas, moduladores do sistema imunitário, ou sinais das interações entre fungos



e hospedeiro; e (iv) uma classe de proteínas (LysM) que parecem ligar-se a componentes da parede celular e carboidratos, evitando assim a resposta imune do hospedeiro à fungos (BURMESTER et al., 2011). A disponibilidade de tal informação tem permitido aos pesquisadores desenvolver hipóteses de como os dermatófitos causam as infecções, assim como as diferenças entre as espécies que tem se especializado a ambientes diferentes. Além disso, aliado as ferramentas de bioinformática, as técnicas de microbiologia e biologia molecular são essenciais para os estudos sobre a virulência, resistência e evolução dos dermatófitos, e auxiliam em diversos estudos sobre taxonomia, epidemiologia e processos metabólicos gerais, dando melhores condições para o surgimento de terapias mais eficientes (RIVERA et al., 2012). Dados estes, auxiliando em diversos estudos dando melhores condições para o surgimento de terapias mais eficientes.

### **2.5.3 Mecanismo de ação de drogas antifúngicas**

O estudo do mecanismo de ação dos antifúngicos, constitui uma estratégia importante para limitar o aparecimento de resistência aos agentes comercialmente disponíveis, assim como o desenvolvimento de compostos mais seguros e mais potentes no futuro (LOPES et al., 2013). A membrana celular e a parede celular de fungos são os alvos mais importantes para drogas antifúngicas. Estas barreiras físicas e químicas são responsáveis pela comunicação com o meio ambiente e, por conseguinte, tem um papel chave em processos metabólicos (HECTOR, 1993). O ergosterol é o esterol predominante nas membranas das células dos fungos, responsável por manter a integridade celular, a viabilidade, a função e crescimento normal.

A griseofulvina e o iodeto de potássio foram os primeiros compostos a serem utilizados como antifúngicos sistêmicos para micoses superficiais (GRAYBILL, 2000). Nos últimos 50 anos, diversas drogas antifúngicas foram introduzidas para o tratamento de infecções superficiais, e a escolha da terapia antifúngica mais adequada está atrelada com o diagnóstico do patógeno, o local e o estado da infecção, análise de possíveis interações medicamentosas e o quadro clínico apresentado pelo paciente (PALACIO, 2000).

O arsenal de antifúngicos permanece limitado, tendo como alvos principais, a síntese de ergosterol, parede celular e o DNA. Os antifúngicos dividem-se em antifúngicos sistêmicos (análogos de pirimidinas, polienos, equinocandinas e azóis), e tópicos (alilaminas e morfolinas) (MORETTI, 2007; VANDEPUTTI; FERRARI; COSTE, 2011).

Na classe dos polienos, a anfotericina ganhou evidência, ao lado de outros polienos, como a nistatina e natamicina, todos apresentam atividade antifúngica pronunciada e são produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* (SANGAMWAR; DESHPANDE; PEKAMWAR, 2008). Por 40 anos, a anfotericina foi considerada padrão ouro para o tratamento de infecções fúngicas devido ao seu amplo espectro de ação e, praticamente, inexistência de resistência (LEWIS, 2011). Essa droga atua sobre o ergosterol, que é o esterol da membrana fúngica, sua ligação interfere na integridade da membrana e provoca lesão osmótica (GRAYBILL, 2000; CAMPBELL; ANYANWU; MORAD, 2004). Anfotericina é responsável por significativos efeitos adversos, como nefrotoxicidade, danos ao fígado, tromboflebites, anemia hemolítica, para reverter sua toxicidade, pesquisas foram realizadas para produzir novas formulações, como as formulações lipídicas que já demonstraram promover menos danos, principalmente, referente a toxicidade para os rins; o seu uso já foi aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration). No entanto, essas formulações são muito mais caras do que a convencional, na ordem de 10 a 20 vezes mais (DISMUKES, 2000; GRAYBILL, 2000).

Os azóis são os antifúngicos mais usados na prática clínica e por isso são mais estudados no que diz respeito a padrões farmacológicos, modo de ação e resistência adquirida. São constituídos por duas classes: imidazóis (miconazol, cetoconazol) disponíveis a partir de 1960, e triazóis (fluconazol e itraconazol) desenvolvidos a partir da década de 80, em virtude dos severos efeitos adversos provocados pelos imidazóis. Seu mecanismo de ação é o bloqueio da síntese de ergosterol, seu alvo é citocromo P-450 (enzima lanosterol 14 $\alpha$  demetilase), codificada pelo gene ERG11 que converte lanosterol em ergosterol; sua inibição leva ao acúmulo de esteróis intermediários que são tóxicos para a célula (CAMPBELL; ANYANWU; MORAD, 2004; VANDEPUTTI; FERRARI; COSTE, 2011; NIWA, SHIRAGA, TAKAGI, 2005). Os azóis apresentam algumas limitações, como interações com drogas co-administradas que acarreta efeito adversos e o surgimento de linhagens fúngicas resistentes (GRAYBILL, 2000).

Numa considerada 2ª geração de triazóis, foram desenvolvidos o voriconazol, posaconazol e ravuconazol. Estudos com esses novos azóis, verificaram interações com outras drogas, casos de resistência cruzada, e que, posaconazol foi responsável por promover lesões neurológicas em cachorros; todos os três apresentam absorção irregular, havendo a necessidade de usar novas formulações. Porém, deve ser ressaltado, que o surgimento desses azóis trouxeram avanços, o voriconazol é uma droga efetiva para aspergilose e o posaconazol

é a primeira droga oral ativa contra zigomicose. (CHEN; SORRELL, 2007; GRAYBILL, 2000; MORETTI, 2007).

Uma outra classe de antifúngicos sistêmicos são pirimidinas, nos quais destaca-se a flucitosina, análogo à citosina do DNA, atua sobre enzimas presentes em fungos e ausentes em mamíferos, que convertem à 5- fluorouracil que inibe a síntese de DNA (CAMPBELL et al., 2004). Trata-se de um antifúngico que atua, principalmente, sobre leveduras, é administrado em combinação com outros antifúngicos, porque sua administração em monoterapia leva à resistência, além de efeitos adversos consideráveis serem associados ao seu uso por atacarem, também, a microbiota intestinal (DISMUKES, 2000; SANGAMWAR; DESHPANDE; PEKAMWAR, 2008).

Equinocandinas constituem a classe de antifúngicos disponível nos últimos 15 anos, sendo 3 aprovados pelo FDA e pela Agência Europeia de Produtos Medicinais: caspofungina em 2001, micafungina em 2005 e anidulafungina no ano de 2006 (CORTÉS; RUSSI, 2011; VANDEPUTTI; FERRARI; COSTE, 2011). São lipopeptídeos semi-sintéticos, que ocorrem, naturalmente em algumas espécies de fungo, como *Coleophoma empedri*, *Aspergillus nidulans*, *Glarea lozoyensis*. São inibidores não competitivos de  $\beta$ , 1-3, glucana sintase, cujo produto, o D-glucano é o polissacarídeo predominante na parede celular, a qual, por sua vez, é responsável por manter a integridade e rigidez da membrana, a ausência de glucana expõe a célula a estresse osmótico e outros tipos de estresse. Essa classe de droga antifúngica, caracteriza-se por apresentar um amplo espectro de atividade e efeitos adversos raros (CORTÉS; RUSSI, 2011). São fungicidas para maioria das espécies de *Candida*, mas apesar dos drásticos danos provocados na célula fúngica, apresenta ação fungistática para *Aspergillus*, com casos de recorrências e inefetivas para espécies de *Trichophyton*, *Fusarium* e para *Criptococcus neoformans* (VANDEPUTTI; FERRARI; COSTE, 2011; GRAYBILL, 2000).

Outras drogas antifúngicas, como as alilaminas, para qual o destaque é a terbinafina, atuam sobre a síntese de ergosterol, inibindo o gene ERG1 (esqualeno epoxidase), com atividade fungicida, porém efeitos adversos significativos são referentes ao uso (PALACIO et al., 2000; ELEWSKI; TAVAKKOL, 2005). A griseofulvina é fungistática e apresenta uma baixa biodisponibilidade, requerendo tratamento por longos períodos, seu mecanismo de ação relaciona-se aos microtúbulos, ligando-se à eles e impedindo a divisão celular (CAMPBELL; ANYANWU; MORAD, 2004).

Os antifúngicos de uso tópico, também, incluem a classe das morfolinas, descobertas a partir da década de 70, que com exceção da amorolfina que é usada para tratar infecções de unhas, as demais são empregadas na agricultura; age sobre a biossíntese de ergosterol, em duas enzimas,  $\Delta 14$ -redutase e  $\Delta 4$ -,  $\Delta 8$ -isomerase (SANGAMWAR; DESHPANDE; PEKAMWAR, 2008). Outro antifúngico indicado para uso tópico é o ciclopirox, cujo modo de ação ainda é investigado, mas indícios apontam seu mecanismo de ação como quelante de cátions polivalentes, inibindo a atividade de enzimas metal-dependentes responsáveis por degradar peróxido dentro da célula (CAMPBELL; ANYANWU; MORAD, 2004).

#### **2.5.4 Atividade antifúngica de glicoalcaloides**

Pesquisas voltadas para o estudo das plantas medicinais estão sendo estimuladas devido ao grande interesse científico, principalmente da indústria farmacêutica, em criar novas drogas com atividade antifúngica e antibactericida.

Assim, dados na literatura tem confirmado o potencial antifúngico dos compostos SM e SS, demonstrando que tais compostos inibem o desenvolvimento do micélio nos fungos *Phoma medicaginis* e *Rhizoctonia solani* (FEWELL et al., 1994).

Além disso, esses compostos inibem o crescimento de leveduras *Candida albicans* e *C. parapsilosis* e fungos filamentosos como *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes*, demonstrando-se muito eficientes contra fungos patogênicos humanos (PINTO et al., 2011).

Outros compostos glicoalcaloides presentes em espécies de *Solanaceas* como: solanina, chaconina e a tomatina, também demonstraram atividade antifúngica promissora quanto a fitopatógenos como fungo *Cercospora brassicae* e *Alternaria porri*, sendo a tomatina, a com maior atividade antifúngica contra os microorganismo. Além do mais, uma mistura dos glicoalcaloides (solanina e chaconina), apresentou atividade sinérgica antifúngica significativa. A ação sinérgica entre solamargina e chaconina, solasonina e solanina presentes em *Solanum nigrum*, causa uma adição na inibição dos fungos (ZHAO et al., 2011).

Porém, não há estudos mais aprofundados sobre o potencial antifúngico dos glicoalcaloides presentes na espécie *S. lycocarpum* contra o fungo *Trichophyton rubrum*, assim sendo de grande importância do ponto de vista clínico.

### 3. HIPÓTESE

Os glicoalcaloides presentes na espécie *S. lycocarpum*, possuem ação citotóxica contra células tumorais de câncer de mama, através da ativação do mecanismo de morte celular por apoptose pela via intrínseca (mitocondrial). Além disso, apresentam ação antifúngica contra *T rubrum* através da redução do conteúdo de ergosterol.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade anticâncer em celular tumorais e a atividade antifúngica contra o fungo dermatófito *T. rubrum* de glicoalcaloides presentes na espécie *S. lycocarpum*, bem como compreender o mecanismo de ação.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Extrair e purificar os glicoalcaloides solamargina e solasonina dos frutos de *S. lycocarpum*.
2. Avaliar a citotoxicidade dos glicoalcaloides pelo ensaio de MTT nas linhagens tumorais MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano), U-343 MGa (glioblastoma multiforme humano) e em cultura de células 3T3 (fibroblasto murino normal). Selecionar o(s) glicoalcaloide(s) mais efetivo para estudos de mecanismos de ação.
3. Avaliar a ação dos glicoalcaloides sobre a membrana celular através do ensaio de LDH.
4. Analisar a genotoxicidade dos glicoalcaloides pelo ensaio cometa nas linhagens tumorais selecionadas.
5. Investigar o potencial pró-apoptótico e a ação no ciclo celular dos glicoalcaloides por citometria de fluxo.
6. Avaliar o efeito dos glicoalcaloides na modulação da expressão de genes das vias apoptóticas pela técnica de *PCR Array*.
7. Avaliar a atividade antifúngica dos compostos purificados contra linhagem mutante e selvagem de fungo dermatófito *T. rubrum* através da determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e pela determinação da concentração fungicida mínima (CFM).
8. Investigar o efeito dos glicoalcaloides na membrana plasmática do dermatófito *T. rubrum* através do ensaio de regeneração de protoplasto.
9. Quantificar o nível de ergosterol em células de *T. rubrum* tratadas com os glicoalcaloides.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 Purificação dos glicoalcaloides de *S. lycocarpum*

Sabendo-se que o processo de purificação de alcaloides de lobeira já havia sido padronizado no laboratório do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, fato conhecido através das suas publicações na literatura, foi realizado uma colaboração com este grupo de pesquisa. Assim, a purificação de alcaloides de lobeira prosseguiu no laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, com o auxílio da aluna de Doutorado Dra. Mariza de Abreu Miranda.

Desta forma, o isolamento dos glicoalcaloides solamargina e solasonina foi realizado por cromatografia *flash*, seguida por repurificação em CLAE preparativa e por CCDP. Para a confirmação da identidade dos compostos de interesse isolados, as amostras foram analisadas por espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

### 5.2 Coleta dos frutos de *S. lycocarpum* e extração dos glicoalcaloides

Os frutos foram coletados no horto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Em seguida, foram picados e submetidos à secagem em estufa de ar quente e circulante a 45°C. Após secagem, o material vegetal foi submetido à moagem em moinho de martelos. Uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) sob o número de registro SPFR: 11638, sendo identificada pelo Prof. Dr. Milton Groppo Júnior da FFCLRP-USP.

O processo de extração seletiva dos alcaloides do fruto de *S. lycocarpum* foi realizado no laboratório de farmacognosia da FCFRP-USP sob orientação do Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos. O processo foi realizado segundo metodologia de Henrique et al. (2004) e patente de KUO et al. (2000) com modificações.

Para tal processo, os frutos de *S. lycocarpum* foram secos, triturados e transferidos para um tanque de extração de 35 L de capacidade com sistema de agitação, sendo o material vegetal submetido a extração ácido-base. Para a extração aquosa ácida utilizou-se solução de ácido clorídrico 0,05 M até atingir o pH 2 e deixada em maceração pelo período de 24 horas. Em seguida, o material foi submetido à filtração e o filtrado obtido foi alcalinizado até pH 10, utilizando-se hidróxido de sódio 6,0 M. Após 24 horas houve formação de precipitado, o qual foi separado por decantação. O precipitado foi centrifugado e posteriormente seco em estufa à

45°C. O precipitado seco foi triturado em moinho de facas e suspenso em etanol, seguido de filtração. O filtrado, extrato alcaloídico, constituído majoritariamente dos glicoalcaloides, foi concentrado em rotaevaporador a vácuo e liofilizado.

### **5.3 Isolamento e análise dos glicoalcaloides**

#### **5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)**

Para as CCDC utilizou-se como adsorvente sílica gel 60 GF<sub>254</sub> (*Merck*) (art 107730). As placas utilizadas apresentavam espessura de 0,25 mm. A fase móvel utilizada para eluição foi AcOEt: MeOH: H<sub>2</sub>O: NH<sub>4</sub>OH (63: 40: 2: 0,5) e revelada com Dragendorff (revelador específico para alcaloide).

#### **5.3.2 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP)**

A cromatografia em camada delgada preparativa foi realizada segundo Tiozzi et al. (2014) com algumas modificações. O extrato alcaloídico (20 mg), solubilizado em metanol foi aplicado em uma placa preparativa com adsorvente sílica gel 60 PF<sub>254</sub> (*Merck*) (art 107730). As placas utilizadas apresentavam espessura de 0,5 mm.

A eluição foi realizada com a fase móvel desenvolvida para CCDC, AcOEt: MeOH: H<sub>2</sub>O: NH<sub>4</sub>OH (63: 40: 2: 0,5). O experimento foi realizado em temperaturas, aproximadas, de 20°C (sala climatizada). Após a eluição as placas foram secas e posteriormente reveladas com vapor de iodo e as bordas com anisaldeído.

O processo foi repetido por inúmeras vezes. A extração dos compostos da sílica foi realizada pela adição de MeOH: AcOEt (9:1) e sonicator por 10 minutos.

#### **5.3.3 Análise do extrato alcaloídico por CLAE**

Para a análise do extrato e dos glicoalcaloides por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizou-se as seguintes condições analíticas de acordo com o trabalho realizado por Tiozzi et al. (2014), modo isocrático de eluição utilizando fase móvel constituída de ACN: tampão fosfato 0,01M (35:65); vazão de 1 mL/min; 20 µL de injeção e tempo de eluição de 20 min. A coluna empregada foi a Zorbax SB-C18 (Agilent), com dimensões de 4,6 x 250 mm e partículas de 5 µm. O comprimento de onda utilizado foi de 200 nm.



### 5.3.4 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) dos compostos isolados

Os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro Bruker – Avance DRX 400, operando a 500 MHz para obtenção do espectro de hidrogênio (<sup>1</sup>H), COSY, HMBC e HMQC. Utilizou-se MeOH-d<sub>6</sub> (Merck) para solubilização dos compostos isolados. Os dados foram obtidos no Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – USP.

### 5.4 Compostos testados nos ensaios biológicos

Foram testados os glicoalcaloides purificados de *S. lycocarpum solamargina* (SM), solasonina (SS) e solasodina (SD), além da  $\alpha$ -solanina (SN) adquirida pela *Sigma-Aldrich*. O controle positivo utilizado nos ensaios antifúngicos foi a anfotericina B. Para os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade foram utilizados como controle positivo a doxorubicina (DXR). Os compostos naturais e os controles foram diluídos em DMSO, que foi utilizado como controle do solvente, de modo que a concentração final máxima não excedesse 0,5% (Tabela 1).

**Tabela 1.** Glicoalcaloides testados nos ensaios

Glicoalcaloides	Fórmula linear	Peso Molecular (Da)	Sigma
<i>Solamargina</i>	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>16</sub>	884,05	-
<i>Solasonina</i>	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>15</sub>	868,06	-
<i>Solasodina (aglicona)</i>	C <sub>27</sub> H <sub>43</sub> NO <sub>2</sub>	414,33	-
$\alpha$ -solanina	C <sub>45</sub> H <sub>73</sub> NO <sub>15</sub>	868,06	157589

## 5.5 Atividade anticâncer

### 5.5.1 Cultura de células

#### 5.5.1.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas células de fibroblastos de camundongo (3T3) e de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7), gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Enilza Espreáfico (Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-SP) e a linhagem U-343 MGa (glioblastoma multiforme humano) cedidas pela Profa. Dra. Elza Tiemi Sakamoto-Hojo (Departamento de Genética da FMRP-USP).

### **5.5.1.2 Cultivo e subcultivo**

Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meio DMEM em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> a 75 cm<sup>2</sup>, na concentração inicial de 2,5x10<sup>4</sup> células/cm<sup>2</sup>. O meio de cultura foi suplementado com soro fetal bovino (SFB) a 10%. Para evitar contaminações microbianas, foram utilizados os antibióticos penicilina, estreptomicina e canamicina, todos a 1 µg/mL. Além disso, eventualmente, foram utilizados ampicilina (1 µg/mL), ciprofloxacina (0,25 µg/mL) e anfotericina (0,5 µg/mL).

### **5.5.1.3 Condições gerais de cultivo e repique**

As referidas linhagens celulares foram alimentadas com meio de cultura (DMEM) e incubadas em estufa em condições padrões (5% de CO<sub>2</sub> à 37°C), de 3 a 5 dias, com eventual substituição de meio e/ou aplicação de antibióticos. Com a formação de uma monocamada aderente, as células foram destacadas das garrafas diante de lavagem por solução Hank's seguida da aplicação de tripsina, e incubação em estufa por 3 a 5 minutos. Foram realizados repiques para multiplicação e estoque das linhagens.

### **5.5.1.4 Solução de Hanks'**

Para o preparo da solução de Hanks', foram preparadas duas soluções separadamente.

Para a primeira solução, foram pesados em balança analítica 0,4g de KCl, 0,06g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,04g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,35g de NaHCO<sub>3</sub> e 8g de NaCl. Em seguida, foram dissolvidos em 500 ml de água deionizada.

Para o preparo da segunda solução, foi necessário pesar em balança analítica 1g de Dextrose anidra que foi dissolvida em 500 ml de água deionizada. A seguir, as soluções foram autoclavadas por 15 minutos separadamente para não acidificar a dextrose.

Após o resfriamento, as duas soluções foram reunidas em um único frasco em ambiente estéril. O frasco foi incubado em estufa a 37°C por 24 horas como teste esterilidade da solução, e após o período de incubação foi armazenada a 4°C.

### **5.5.1.5 Descongelamento das linhagens**

Os criotubos das linhagens foram descongelados à temperatura ambiente, de modo a não provocar estresse. Posteriormente, o conteúdo dos criotubos foi transferido a tubos de centrífuga de 15 mL esterilizados e o volume foi completado para 10 mL com o meio de

cultura DMEM sem SFB. A seguir, os tubos de 15 mL foram centrifugados a 800 x g, por 10 minutos, para sedimentação celular. Após a remoção do meio, cada sedimentado foi ressuspensão em uma garrafa de 25 cm<sup>2</sup> ou 75 cm<sup>2</sup> e, nestas, foram acrescentados volumes de 5 a 15 mL do meio de cultura. Tal procedimento foi cumprido com o objetivo de descartar resíduos do DMSO presentes inicialmente no estoque.

#### **5.5.1.6 Estoque**

Para o estoque, as células foram tripsinizadas e transferidas para tubos de centrífuga de 15 mL estéril, com posterior centrifugação a 800 x g, por 5 minutos. Após descartar a tripsina, cada sedimentado celular foi ressuspensão, em banho de gelo, em 900 µL de SFB ainda em tubo de centrífuga, e adicionado a criotubos para que, depois, fosse acrescentado de 100 µL do agente crioprotetor, DMSO. Em seguida, os estoques foram armazenados à -20°C durante uma hora, mantidos no congelador à -80°C por 24 horas, e finalmente transferidos para o botijão de nitrogênio líquido -196 °C.

### **5.5.2 Ensaios de viabilidade celular**

#### **5.5.2.1 Ensaio com MTT**

Para os ensaios de citotoxicidade foi empregado o teste colorimétrico do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT) que se baseia na atividade metabólica mitocondrial da enzima succinato desidrogenase que reduz os sais de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan (HANSEN; NIELSEN; BERG, 1989).

Após o período de cultivo nas condições anteriormente descritas, as células foram destacadas das garrafas utilizando tripsina e a seguir foram contadas em hematímetro no microscópio invertido com contraste de fase (Labomed) para a utilização de uma concentração de  $2,5 \times 10^4$  células/poço em placas de 96 poços.

As células foram cultivadas em meio DMEM e foram mantidas na estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas para adesão nas placas de ELISA. A seguir o meio de cultura foi removido e adicionado meio fresco. Os glicoalcaloides (Tabela 1) foram dissolvidos em DMSO 0,5% em triplicata no volume de 200 µL\poço. Foram realizados experimentos-piloto testando apenas quatro concentrações dos glicoalcaloides (57, 28, 11 e 6 µM) para estimar quais seriam as mais adequadas para padronização da triagem. Na mesma placa e em triplicata também foram realizados os controles do experimento. O meio de cultura DMEM contendo 10% de SFB e

DMSO à 0,5% foi usado como controle do solvente. O meio de cultura DMEM com SFB na concentração de 10% representou o controle celular. Além disso, a substância doxorrubicina (DXR) à 1,38  $\mu\text{M}$  foi utilizada como controle positivo de citotoxicidade. Logo as placas foram incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  durante 48 horas.

Após o tratamento de 48 horas, o meio de cultura foi retirado e foram acrescentados em cada poço, 200  $\mu\text{L}$  de meio fresco e mais 20  $\mu\text{L}$  de MTT na concentração de 5 mg/mL previamente dissolvido em solução de Hanks'. As placas foram incubadas na estufa por 4 horas e a seguir foram centrifugadas (1800 x g, por 5 minutos) até que os cristais de formazan sedimentassem. Em seguida, o sobrenadante foi removido e 200  $\mu\text{L}$  de DMSO concentrado foram aplicados em cada poço para a dissolução do produto (formazan). A placa foi submetida a ambientação, novamente em estufa, por 30 minutos a 1 hora. Após o período, a absorbância das placas foi lida em espectrofotômetro de ELISA (Thermo-Plate TP reader) no comprimento de onda de 550 nm, para avaliação da viabilidade celular. Os ensaios foram realizados no mínimo em três experimentos independentes.

#### **5.5.2.1.1 Análise estatística do MTT**

A citotoxicidade foi calculada, conforme Szliszka et al. (2010), pela fórmula: “Porcentagem de citotoxicidade =  $[1 - (\text{absorbância do poço experimental}/\text{absorbância do poço controle negativo})] \times 100$ ”. Dos resultados obtidos, foram feitas análises de variância (ANOVA) por teste de média *Scott-Knott* ( $p=0,05$ ), para cada linhagem, considerando todos os tratamentos, inclusive os controles. Também foram determinadas as concentrações inibitórias de 50% do desenvolvimento celular ( $\text{IC}_{50}$ ), além de outras concentrações abaixo e acima do  $\text{IC}_{50}$  dos tratamentos para cada tipo celular através do gráfico gerado pelas médias estimadas da análise de regressão linear e quadrática ( $R^2=1$ ). Toda análise foi realizada pelo *software* Sisvar.

#### **5.5.2.2 Ensaio de LDH para avaliar integridade da membrana plasmática celular**

A LDH é uma enzima citoplasmática estável em células viáveis, um aumento de LDH no meio de cultura indica dano na membrana celular. Deste modo, a técnica é baseada na redução de NAD, cofator na conversão de lactato a piruvato pela LDH, sendo o NADH resultante transformado em um sal de tetrazólio, composto que denota atividade da LDH colorimetricamente. Assim a atividade enzimática é quantificada a fim de fornecer um valor

respectivo à liberação de LDH no sobrenadante consequente de danos e/ou permeabilização da membrana (LEGRAND et al., 1992).

O efeito dos glicoalcaloides solamargina e solasonina na membrana celular foi avaliado através do método da enzima citoplasmática lactato desidrogenase (LDH), pelo kit TOX7 (Sigma-Aldrich), de acordo com o protocolo do fabricante. Para o teste de LDH, inicialmente as linhagens celulares MCF-7 e U-343 foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de  $3 \times 10^4$  células/poço e incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> por 24 horas. A seguir, os glicoalcaloides foram adicionados nas células na concentração do IC<sub>50</sub> respectivo para cada linhagem celular. Sendo 13,30 µM de solamargina e 14,57 µM de solasonina para linhagem MCF-7 e para a linhagem U-343 foi utilizada concentração de 12,94 µM de solamargina e 13,68 µM de solasonina. Além disso, as células foram tratadas com o controle negativo (meio de cultura com 10% de SFB), controle positivo (Triton X-100 à 1%) e todos os ensaios foram incubados por 48 horas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37C°.

Depois dos tratamentos, as placas foram centrifugadas à 250 x g por 5 minutos a fim de sedimentar as células e assim, foram recolhidos 50 µL do sobrenadante de cada amostra e transferidos a novas placas. Nestas, foram adicionados 100 µL/poço de uma mistura contendo três reagentes do kit TOX7 no mesmo volume: solução de substratos, preparação de cofatores e solução corante. As placas foram cobertas com material opaco para proteger da incidência direta de luz e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. A reação foi finalizada pela adição de 20 µL de HCl 1N em cada poço. Em seguida, foram determinadas as absorbâncias dos ensaios por meio de leitor universal de microplacas (ELx 800 UV Bio-Tek instruments, Inc.) a 490 nm.

#### **5.5.2.2.1 Análise estatística do LDH**

Dos valores de absorbância foram feitas médias, as quais foram utilizadas para o cálculo da equação: “Porcentagem de LDH liberado = [(média de absorbância de poços teste - média de controle negativo) / (média de controle positivo - média de controle negativo)] x 100”, segundo Grosse et al. (2013). Cada experimento foi realizado ao menos duas vezes, em triplicata de poços. As porcentagens de liberação de LDH, dos tratamentos, calculadas para as linhagens MCF-7 e U-343, com as duas drogas, foram submetidas à análise de variância pelo teste de *Scott-Knott*, com nível de significância de 0,05.

### 5.5.2.3 Ensaio de genotoxicidade pelo teste Cometa

Os desenhos experimentais do estudo do cometa foram direcionados para avaliar a genotoxicidade dos glicoalcaloides solamargina e solasonina frente a três tipos celulares: as linhagens tumorais U-343 e MCF-7 e a linhagem normal 3T3. A partir do teste do cometa, ou eletroforese em gel de célula única, é possível detectar danos ao DNA, tanto quebras simples quanto de dupla fita, provocados por agentes químicos, por exemplo (COLLINS et al., 2004, 2008). Este método foi empregado seguindo o protocolo adaptado de Collins et al., (1995) e Olive; Banáth (2006).

Primeiramente, as linhagens na concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/poço foram incubadas nas placas de 24 poços com meio de cultura DMEM (1 mL/poço), e incubadas por 24 horas. Depois deste período, o meio foi descartado, e as células, aderidas aos poços, foram submetidas a tratamentos de 6 horas com os glicoalcaloides nas concentrações do  $IC_{50}$  estimada no ensaio com MTT e mais três concentrações abaixo do  $IC_{50}$ . Sendo, (12,94  $\mu$ M; 6,47  $\mu$ M; 3,23  $\mu$ M e 1,62  $\mu$ M de solamargina e 13,68  $\mu$ M; 6,84  $\mu$ M; 3,02  $\mu$ M e 1,05  $\mu$ M de solasonina) para linhagem U-343, (13,30  $\mu$ M; 6,65  $\mu$ M; 3,32  $\mu$ M e 1,7  $\mu$ M de solamargina e 14,57  $\mu$ M; 7,3  $\mu$ M; 3,64  $\mu$ M e 1,8  $\mu$ M de solasonina) para linhagem MCF-7 e (13,48  $\mu$ M; 6,74  $\mu$ M; 3,37  $\mu$ M e 1,68  $\mu$ M de solamargina) e (19,75  $\mu$ M; 9,87  $\mu$ M; 4,94  $\mu$ M e 2,5  $\mu$ M de solasonina) para linhagem 3T3. Além disso, foi utilizado o meio DMEM com 10% de SFB, como controle celular, o controle do solvente (DMSO à 0,5% no meio DMEM) e controle positivo de genotoxicidade (doxorubicina à 1,38  $\mu$ M).

Posteriormente, as células foram removidas das placas com o auxílio de micropipetas e tripsina, e cada tratamento foi transferido a um microtubo de 1,5 mL. Em seguida, os tubos foram centrifugados à 800 x g, por 5 minutos, para obtenção de sedimentados celulares, os quais foram ressuspensos com 200  $\mu$ L de gel de agarose de baixo ponto de fusão à 0,5% e aplicados em lâminas previamente cobertas por gel de agarose à 1,5%. A seguir, as lâminas foram incubadas em geladeira até a solidificação e, então, imergidas em tampão de lise (1% de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise) por 20 minutos.

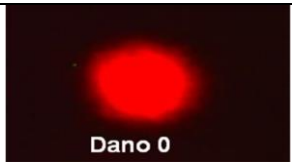



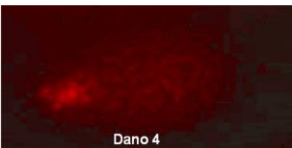
Após o período de lise das membranas celulares, foi realizada uma eletroforese (25 V e 300 mA) em tampão de pH alcalino  $\geq 13$  (5 mL de solução de EDTA à 200 mM em pH 10, mais 30 mL de solução de NaOH 40%, e água destilada q.s.p 1 L), por 20 minutos. Na sequência, as lâminas foram tratadas com solução de neutralização (Tris 0,4M; pH 7,5), por 15 minutos. Depois de as lâminas secarem à temperatura ambiente, a fixação foi efetivada com etanol absoluto durante 3 minutos e, por fim, para a coloração, foram adicionados 50  $\mu$ L

de solução de brometo de etídio à 20 µg/mL. Em seguida, as lâminas foram submetidas ao microscópio de luz invertida com fluorescência para a leitura e classificação dos cometas.

### 5.5.2.3.1 Análise estatística do ensaio Cometa

Conforme Collins et al. (1995) e Cavalcanti et al. (2008), o índice de danos ao DNA (ID) foi determinado através da observação no microscópio de fluorescência e classificação visual dos nucleoides em cinco categorias (Tabela 2), e foi calculado pela seguinte fórmula: “ID = (0 x n0) + (1 x n1) + (2 x n2) + (3 x n3) + (4 x n4)”. Onde “n” significa o número de células da respectiva classe, com base na tabela 2. Foram efetivados três experimentos individuais e cada tratamento foi feito em duplicata e, nestes, foram contadas 100 células.

**Tabela 2.** Classificação dos danos dos cometas e números correspondentes (Collins et al, 1995)

Número Atribuído	Nível de Danos	Classificação	Morfologia celular
0	Sem danos	Sem danos, sem cauda de cometa	 Dano 0
1	Baixo	Cauda inferior ao diâmetro do nucleóide	 Dano 1
2	Médio	Cauda com 1-2 vezes diâmetro do nucleóide	 Dano 2
3	Alto	Cauda maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide	 Dano 3
4	Dano total	Somente cometas, sem nucleóide	 Dano 4

### 5.5.3 Citometria de fluxo

Para os ensaios de apoptose e ciclo celular, foi utilizado o Citômetro de fluxo (Becton Dickinson (BD) Biosciences, FACSCanto II) do Hemocentro FMRP-USP, sob a supervisão da pesquisadora técnica Patrícia Vianna Bonini Palma. Os kits de citometria de fluxo da BD Biosciences foram utilizados nos dois métodos aqui empregados. Os experimentos de citometria para verificar morte por apoptose foram realizados com as células MCF-7 e U-343. Já para o ensaio de ciclo celular, apenas as células da linhagem MCF-7 foram avaliadas. Para os dois experimentos de citometria de fluxo as células foram cultivadas por no máximo três repiques.

#### 5.5.3.1 Ensaio de apoptose por Anexina V-FITC/PI

Para os experimentos de avaliação de indução de apoptose pelos glicoalcaloides, foi empregada a técnica de citometria de fluxo baseada na categorização celular conforme fluorescência ativada (FACS). Para tal, foi utilizado o Kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Pharmigen™).

Foi analisada a indução de apoptose das linhagens U-343 e MCF-7 com diferentes concentrações de glicoalcaloides, seguindo-se o protocolo descrito pelo fabricante do kit. A classificação em morte apoptótica por meio desta técnica se baseia na ligação da anexina conjugada a um fluoróforo (FITC) à proteína marcadora de apoptose fosfatidilserina e na propriedade intercalante de pares de base do iodeto de propídio (PI). Na análise, a contagem e classificação celular é efetivada pelo citômetro, o qual emite feixe de luz sob a suspensão celular em fluxo. Cada célula, por sua vez, dispersa a luz de uma forma e os fluoróforos ligados a estas são excitados (FITC e PI). Tais dados relativos à fluorescência são captados por detectores do equipamento e então processados em valores de porcentagem de células com e sem fluoróforos (OREGON STATE UNIVERSITY, 2013).

Primeiramente, as linhagens tumorais U-343 e MCF-7 na concentração de  $2 \times 10^5$  células/poço foram cultivadas em placas de 6 poços com o meio de cultura DMEM 10% de SFB (1 mL/poço), e incubadas em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> à 37°C por 24 horas. Depois deste período, o meio foi descartado, e as células, aderidas aos poços, foram submetidas a tratamentos de 24 horas com o glicoalcaloide solamargina nas concentrações de 1,50 µM e 12,94 µM (IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub>) e solasonina nas concentrações de 4,42 µM e 13,68 µM (IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub>) para a linhagem celular U-343. Para a linhagem MCF-7 foram utilizadas concentrações de 1,63 µM e 13,30 µM (IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub>) do glicoalcaloide solamargina e 3,92 µM



e 14,57  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$ ) de solasonina, com o controle celular (meio DMEM 10% de SFB) e o positivo (doxorubicina à 1,38  $\mu\text{M}$ ).

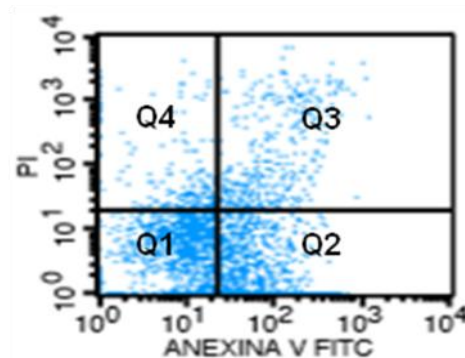
As etapas seguintes foram realizadas em bancada à temperatura ambiente.

Após 24 horas de tratamento o meio de cultivo foi transferido para em tubo de 15 ml após, as células foram lavadas com solução de Hanks' e tripsinizadas, o sobrenadante foi transferido para o mesmo tudo e em seguida foram centrifugados à 1000 rpm, por 5 minutos, à 5°C. Posteriormente, foi descartado o sobrenadante e as células foram lavadas e ressuspendidas em solução de PBS gelado e novamente foram centrifugadas à 1000 rpm, por 5 minutos, à 8°C. As células foram ressuspendidas em 300mL de Tampão de ligação 1X e o conteúdo foi transferido para um tubo de citometria e foram mantidos em banho de gelo. O branco da amostra foi ressuspendido em 300  $\mu\text{L}$  de PBS. Em seguida, no momento da leitura no citômetro de fluxo, foi adicionado 5  $\mu\text{L}$  de PI 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 5  $\mu\text{L}$  de Anexina V em cada tubo com exceção do branco.

#### 5.5.3.1.1 Análise estatística do ensaio de apoptose com Anexina V-FITC/PI

Conforme Ji et al. (2013), o quadrante 1 demonstra a relação anexina V-FITC (-) / PI(-) que indica as células viáveis, no quadrante 2 demonstra a relação anexina V-FITC (+) / PI (-) que indica as células na fase precoce de apoptose (apoptose inicial), nos quadrantes 3 e 4 demonstra a relação anexina V-FITC (+) / PI (+). O quadrante 3 indica que as células estão no final das fases de apoptose (apoptose tardia) e o quadrante 4 indica que as células estão em processo de necrose. Estes parâmetros estão demonstrados na figura 5. As porcentagens de células presente em cada quadrante para cada tratamento, calculadas para as linhagens MCF-7 e U-343, foram submetidas à análise estatística pelo teste de *Scott-Knott*, com nível de significância de 0,05.

**Figura 5.** Análise da porcentagem de células em apoptose



**Fonte:** Arquivo pessoal

### 5.5.3.2 Ensaio de ciclo celular

Como no ensaio de apoptose, a linhagem MCF-7 foi plaqueada em placas de 24 poços à  $2 \times 10^5$  células/poço e incubada durante 24 horas. Posteriormente, as células receberam tratamento dos glicoalcaloides nas concentrações de 1,63  $\mu\text{M}$  e 13,30  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$ ) do glicoalcaloide solamargina e 3,92  $\mu\text{M}$  e 14,57  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$ ) de solasonina. O meio de cultura DMEM com 10% de SFB foi utilizado como controle negativo. O tratamento foi por um período de 24 horas. E então, seguiram-se os procedimentos para a análise de ciclo celular. O ensaio foi realizado em triplicata.

Primeiramente, o sobrenadante de cada poço foi coletado e a seguir as células foram lavadas com Hanks' por duas vezes e seguir tripsinizada. Estes volumes foram transferidos para tubos de 15 mL, os quais foram centrifugados à  $400 \times g$  por 5 minutos. Após a centrifugação, os sobrenadantes foram delicadamente descartados de modo a restar 50  $\mu\text{L}$  para não agredir o sedimentado celular. A seguir, foi aplicado 1 mL de Hanks' no qual as células foram suspensas com auxílio de agitador de tubos em baixa velocidade e, então, os tubos foram mais uma vez centrifugados nas condições anteriormente descritas. Depois, o sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em mais 1 mL de Hanks' e novamente centrifugadas a  $400 \times g$  por 5 minutos. Após esta segunda lavagem, o sobrenadante foi completamente decantado e seguiu-se a coloração com PI pelo kit *CycleTEST™ DNA reagent* (BD).

Em cada tubo, foram aplicados 250  $\mu\text{L}$  de solução A e as células foram suspensas sem agitador, batendo levemente com a mão no fundo do tubo, e esperaram-se 10 minutos de reação à temperatura ambiente. A solução A contém tripsina em um tampão detergente de espermina tetrahidrocloreto para digestão da membrana celular e citoesqueleto. Após a reação, foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de solução B, sem descartar a solução A. As soluções foram misturadas sem auxílio de agitador como relatado anteriormente, e foram aguardados 10 minutos de reação à temperatura ambiente. A solução B contém inibidor de tripsina, ribonuclease A e espermina tetrahidrocloreto para inibir o tampão de tripsina e digerir o RNA. Depois dos 10 minutos reagindo, foram acrescentados 200  $\mu\text{L}$  de solução C nos tubos, os quais foram incubados por 10 minutos na temperatura de  $2 - 8^\circ\text{C}$  no escuro. A solução C é um tampão de espermina tetrahidrocloreto com iodeto de propídio para ligação do PI ao DNA. Após a última etapa de coloração, as amostras foram mantidas em tubos de citometria no gelo, protegidas de luz e lidas no citômetro dentro de menos de 2 horas.

### 5.5.3.2.1 Análise estatística do ensaio de ciclo celular

O ensaio foi realizado em triplicata para cada tratamento. A leitura foi realizada utilizando-se de um Citômetro de fluxo (Becton Dickinson (BD), FACSCanto II), do Hemocentro da USP de Ribeirão Preto sobre a supervisão da pesquisadora técnica Patrícia Vianna Bonini Palma. A estatística aplicada foi a análise de variância ( $p < 0,05$  vs. Controle negativo), a qual foi realizada individualmente para cada fase do ciclo celular (G1, S, G2/M).

### 5.5.4 PCR array quantitativo

A RT-qPCR foi aplicada para a análise da modulação da expressão de genes envolvidos na indução de apoptose desencadeados pelos glicoalcaloides, na linhagem MCF-7. O *RNasy Mini-Kit* (Qiagen) e a *RNase-free DNase* (Qiagen) foram usados na etapa de extração de RNA. A conversão do RNA extraído em cDNA foi feita com o *RT<sup>2</sup> First Strand Kit* e a preparação da reação com o *RT<sup>2</sup> SYBR<sup>®</sup> Green ROX<sup>™</sup> qPCR Mastermix*. O *PCR array* se baseia em uma placa de 96 poços contendo um arranjo com 84 genes de regulação positiva e negativa da apoptose, caspases, receptores de domínio de morte, peptídeos relacionados a danos ao DNA e a sinais extracelulares, proteínas antiapoptóticas e outras relacionadas. Foi utilizado o kit *RT<sup>2</sup> Profiler<sup>™</sup> PCR Array* (Qiagen) de formato “A”, contendo os iniciadores liofilizados relativos aos genes envolvidos na via de indução de apoptose humana.

#### 5.5.4.1 Tratamento das células

Com o intuito de obter uma análise mais aprofundada sobre o mecanismo de ação apoptótico dos glicoalcaloides, foi estudada a expressão gênica pela técnica de *PCR array* frente aos compostos naturais mais efetivos. Primeiramente, a linhagem celular MCF-7 na concentração de  $2,5 \times 10^6$  células/garrafa, foi cultivada por, geralmente, dois a três repiques.

Em seguida, as células foram tripsinizadas e transferidas a garrafas de  $25 \text{ cm}^2$  (Corning) na concentração de  $2,5 \times 10^6$  células/garrafa. Depois de mantidas 24 horas em meio de cultura nas garrafas, as células receberam tratamento de solamargina e solasonina nas  $IC_{50}$  do MTT (Tabela 5) e de controle negativo (DMEM com 10% de SFB) em experimentos de 6 horas e 24 horas.

Após a incubação pelos períodos de tempo descritos, iniciou-se a extração de RNA.

#### 5.5.4.2 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada com o kit RNeasy® Mini (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Para tal, foi feita tripsinização e a transferência das células de cada garrafa para tubos de 15 mL que, em seguida, foram centrifugados por 5 minutos 800 x g. O sedimentado de cada amostra foi ressuspensão numa solução com 350 µL de tampão *RLT* (lise celular) e 3,5 µL de β-mercaptoetanol e, então, os tubos foram agitados vigorosamente. A seguir, foi acrescentado 350 µL de etanol 70% ao lisado e o volume total da amostra foi transferido à coluna *RNeasy Mini Spin* com tubo coletor de 2 mL. Os tubos foram centrifugados a 8000 x g por 15 segundos. Após descarte do eluído, as colunas foram tratadas com 350 µL de tampão *RWI* (lavagem) e centrifugadas a 8000 x g por 15 segundos. Novamente, o líquido foi descartado e seguiu-se uma digestão enzimática na coluna (15 minutos à temperatura ambiente) com uma solução de 10 µL *DNase I* com 70 µL de tampão *RDD*. A etapa com o tampão de lavagem (*RWI*) foi repetida e, posteriormente ao descarte do eluído, foi adicionado 500 µL de tampão *RPE* na coluna. Em seguida, o tubo foi centrifugado nas mesmas condições anteriores. Este passo foi repetido, porém com centrifugação de 2 minutos a 8000 x g. Depois, o tubo coletor de 2 mL foi trocado por um de 1,5 mL, no qual se eluiu o RNA com 30 µL de água, centrifugando-se a 8000 x g por 1 minuto. Para verificar a integridade dos RNAs extraídos, as amostras foram quantificadas no nanofotômetro P360 (Implen), analisadas pelo bioanalisador 2100 (Agilent) e, por fim, cada tubo foi armazenado à -80°C.

#### 5.5.4.3 Transcrição reversa

Primeiramente, foi preparado um “*mix* para eliminação do DNA genômico” com 0,5 µg de RNA, 2 µL de tampão *GE* e 10 µL de água, por reação. Tal mistura foi incubada a 42°C por 5 minutos e, depois, imediatamente armazenada em gelo. Em seguida, para cada uma destas amostras foi feito um “*mix* de transcrição reversa” com 4 µL de tampão *5X BC3*, 1 µL de *controle P2*, 2 µL de *RE3 transcriptase mix* e 3 µL de água, totalizando um volume final de 10 µL, o qual foi misturado ao “*mix* para eliminação de DNA genômico”. A seguir, esta solução foi incubada a 42°C por 15 minutos e 95°C por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 91 µL de água a esta solução contendo cDNA.

#### 5.5.4.4 Ensaio de *PCR array* quantitativo

Para o estudo da modulação de genes envolvidos da via apoptótica, foram utilizadas placas de *PCR array* RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array Human Apoptosis (PAHS-012Z) (Qiagen®), seguindo instruções do fabricante. Essa placa contém 84 genes principais das vias intrínsecas e extrínsecas de apoptose, além de conter controles positivos e negativos de amplificação e normalizadores de reação.

A reação foi realizada com o Kit RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX qPCR Mastermix (Qiagen®). Para tal, uma mistura de 1350 µL de 2X RT<sup>2</sup> SYBR Green ROX FAST Mastermix, 102 µL da reação de síntese de cDNA e 1248 µL de água foi preparada e homogeneizada para cada amostra. Em seguida, esta solução foi transferida à placa de 96 poços RT<sup>2</sup> Profiler™ PCR Array (apoptose humana) com 25 µL/poço através de uma micropipeta multicanal.

Assim, as placas foram submetidas ao termociclador Mx3005P® (Agilent Stratagene) e, através do *software* MxPro, foi executado o programa de SYBR® Green com curva de dissociação, usando ROX como parâmetro de fluorescência passiva, nas seguintes condições:

1º Ciclo	95°C	10 minutos	} 40 ciclos
2º Ciclo	95°C	15 segundos	
3º Ciclo	60°C	1 minuto	
4º Ciclo	95°C por 1 minuto; 55°C por 30 segundos; e 95°C por 30 segundos		

No último conjunto de ciclos, a fluorescência foi medida a cada variação de 0,5°C para coleta de dados da curva de dissociação.

#### 5.5.4.5 Análises da expressão gênica por *PCR array*

Para todas as placas utilizadas no ensaio, os valores estabelecidos como maiores que 35 ou *No C<sub>T</sub>* foram considerados negativos. Para que o nível de contaminação por DNA genômico fosse desprezível a fim de não interferir nos resultados, o controle negativo observado devia apresentar C<sub>T</sub> maior que 35 ou *No C<sub>T</sub>*. Por precaução, também foi calculado o ΔC<sub>T</sub> da média dos três controles de transcrição reversa subtraída pela média dos três controles positivos de PCR. Este ΔC<sub>T</sub> deveria ser menor ou igual a 5 para que não fosse considerada inibição de transcrição reversa. E ainda, para um maior controle, a média dos valores de C<sub>T</sub> dos controles positivos de PCR deveria ser 20±2.

Após os procedimentos iniciais de controle de qualidade, a análise de expressão gênica foi realizada com o *freeware online* RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array Data Analysis v. 3.5 (Qiagen), usando β-actina como normalizador. Os valores de C<sub>T</sub> dos 84 genes de interesse das placas

experimentais foram comparados aos da placa de controle negativo para estabelecimento do  $\Delta\Delta C_T$  e *fold-change*. Para uma interpretação mais condizente com a resposta biológica, os números de *fold-change* foram transformados em *fold-regulation*. Desta forma, os genes caracterizados como “induzidos” (*fold-change* > 1) possuem, como *fold-regulation*, o mesmo valor de *fold-change*; por outro lado, os genes “reprimidos” (*fold-change* < 1) tiveram os valores de *fold-change* convertidos em seus inversos negativos para *fold-regulation*.

## **5.6 Atividade antifúngica**

### **5.6.1 Avaliação antifúngica dos compostos naturais**

#### **5.6.1.1 Linhagens de *T. rubrum***

Foi selecionado para os testes de atividade antifúngica dos compostos o fungo *T. rubrum* por ser um fungo causador de micoses de pele, pêlo e unha, e ultimamente muitos trabalhos citam o aparecimento deste em casos de pacientes imunodeprimidos com frequência. Foram utilizadas duas linhagens, o isolado clínico H6 (depositado no ATCC e que recebeu a denominação MYA-3108) e a linhagem mutante denominada  $\Delta$ TruMDR2 que apresenta o gene *AtrD* rompido que codifica um transportador do tipo ABC (FACHIN, 2001a) de *T. rubrum*.

#### **5.6.1.2 Cultivo das linhagens do fungo *T. rubrum***

O cultivo das linhagens foi realizado segundo os métodos previamente descritos (FACHIN et al., 1996; 2001b). A linhagem  $\Delta$ TruMDR2 é um transformante da linhagem H6 com o gene *TruMDR2* rompido. Esse gene codifica um transportador do tipo ABC, envolvido na múltipla resistência à droga, cuja disrupção foi realizada através da deleção de um fragmento de 135 pbs do gene *TruMDR2* e pela inserção do gene de resistência à higromicina (*hygB<sup>r</sup>*), desenvolvido e comprovado por Fachin et al. (2006). O cultivo das linhagens foi realizado em meio Sabouraud, incubado por 7 dias a 28°C, conforme Fachin et al. (1996).

#### **5.6.1.3 Manutenção das linhagens do fungo *T. rubrum***

Para repiques periódicos, o isolados ATCC MYA-3108 (linhagem selvagem H6) foi inoculado em placas de petri contendo meio ágar Sabouraud, a linhagem  $\Delta$ TruMDR2 foi mantida em meio ágar Sabouraud acrescida de 400 µg/ml de higromicina e mantidas em estufa a 28°C por um período de 7 dias.

#### **5.6.1.4 Determinação da concentração inibitória mínima**

O ensaio foi realizado através de uma adaptação do protocolo M-38-P, 2002 do National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002 (NCCLS). A formação de conídios foi induzida pelo crescimento das linhagens selvagem (H6) e mutante  $\Delta$ TruMDR2 em placas de meio Sabouraud a 28°C por cerca de 15 dias.

Após o período de crescimento, o micélio foi colhido com o auxílio de uma espátula estéril e colocado em 5 mL solução salina 0,9%, misturado para a liberação dos conídios, seguido de uma filtração em funil com lã de vidro. O filtrado resultante foi transferido para um tubo estéril, sendo sua densidade óptica determinada entre 0,125 nm – 0,155nm de absorvância, o que corresponde a 70-72% de transmitância, em um comprimento de onda de 530 nm. Essa suspensão foi diluída 1:50 em meio RPMI-1640 (LGC). Os testes foram realizados em triplicata em placas contendo 96 poços fundo em “U”. As concentrações dos compostos naturais testadas foram de 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, 1,56 µg/mL, 0,78 µg/mL, 0,39 µg/mL, 0,19 µg/mL, 0,097 µg/mL e 0,048 µg/mL. Os testes de susceptibilidade foram realizados em três experimentos independentes. Controle negativo de crescimento (meio RPMI-1640 e inóculo) e testes de esterilidade (meio RPMI-1640) foram incluídos para cada ensaio, e para cada linhagem, da mesma forma, foi realizado controle do solvente utilizado (DMSO e meio RPMI-1640). As placas foram incubadas a 28°C e examinadas após 7 dias. A CIM (concentração inibitória mínima que inibe o crescimento macroscópico do fungo) foi determinada após decorridos os 7 dias de incubação. Como controle positivo, foi utilizado a anfotericina - B.

#### **5.6.1.5 Teste de determinação da concentração fungicida mínima (CFM)**

Foi realizado o teste de determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos naturais a fim de verificar os resultados obtidos na CIM. Para tal, o meio de cultura das concentrações que apresentaram inibição do fungo para cada composto foi estriado em placas de petri contendo meio sólido Sabouraud. Em seguida as placas foram incubadas a 28°C e examinadas após 7 dias para verificar se os compostos naturais apresentam propriedade fungicida ou fungistática para o fungo *T. rubrum* nas concentrações do CIM e acima do CIM.

#### 5.6.1.6 Teste de regeneração de protoplastos

Esse teste foi realizado de acordo com Fachin et al. (2006) e para tanto, foram utilizadas 2 placas de fungo crescidas por 7 dias. Essas placas foram inoculadas em 100 mL de meio Sabouraud líquido e submetidas a uma forte agitação (200 rpm) por 12-16 h à 28°C. Em seguida, a cultura foi filtrada em funil de buchmer sobre condições esteréis e a seguir o micélio foi transferido para outro erlenmyer com 30 mL de solução lítica contendo 600 mg/mL de Glucanex (lisoenzymes) (Sigma Aldrich®) e foi, novamente, incubado a 28°C em agitação lenta (120 rpm) até que se obtivessem os protoplastos; o tempo para a formação dos protoplastos foi em torno de 5 h e, a partir de 4 h, foram feitas lâminas preparadas com 100 µL da solução de protoplasto para monitorar o aparecimento dos mesmos. Uma vez obtidos os protoplastos, estes foram filtrados em lã de vidro esteril e centrifugados (Baby®, mod. 206) por 10 min a 4000 rpm. Em seguida, os protoplastos foram ressuspensos em 1 mL de tampão Tris-HCl e contados em hematímetro. A concentração obtida foi diluída para uma concentração final de  $10^4$  protoplastos/mL.

O meio de regeneração foi o MMS (Meio Mínimo com Sacarose) e, na composição “Bottom Ágar” no pH de 6,8 e também foi testado no pH 9,0, foram adicionadas as drogas em uma concentração de 2x CIM, CIM e  $\frac{1}{2}$  CIM. Enquanto aguardava-se a solidificação das placas de “Bottom Ágar” com as drogas, o meio MMS “Top Ágar” foi incubado a 50°C e, em seguida, 100 µL dos protoplastos foram adicionados em 4 mL de meio MMS “Top Ágar” previamente aquecido, sendo esta mistura de protoplastos + “Top Ágar”, subsequentemente, vertida sobre as placas recém preparadas de “Bottom Ágar”. As placas foram incubadas por 7 dias a 28°C. As drogas utilizadas foram: solamargina,  $\alpha$ - solanina, solasonina e anfotericina-B, esta última foi utilizada como controle positivo. Não foi realizado teste de regeneração de protoplasto para o composto solasodina pois este não apresentou atividade antifúngica. O controle negativo foi constituído do meio sem adição de drogas. O experimento foi realizado em triplicata para as linhagens selvagem H6.

#### 5.6.1.7 Determinação do nível de ergosterol

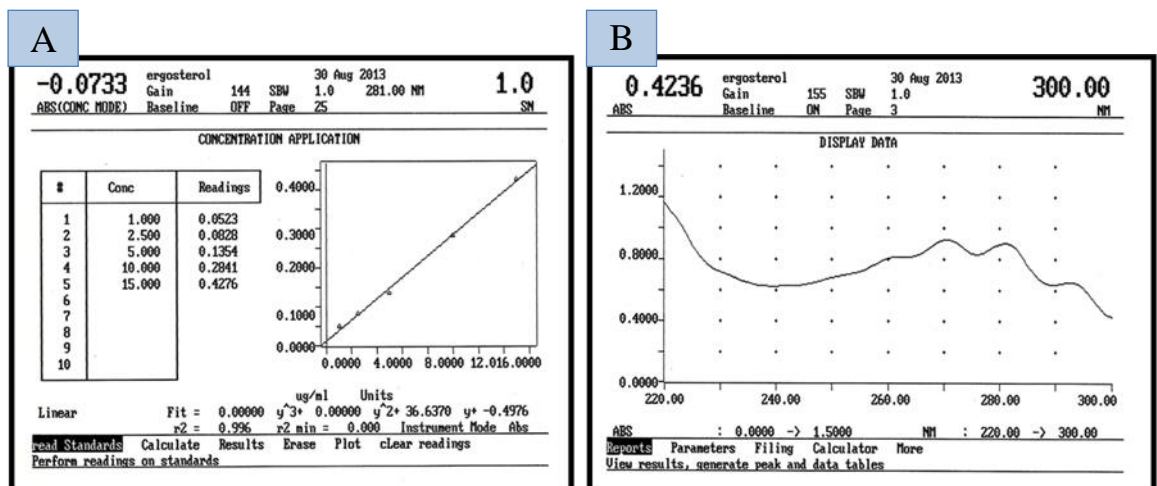
Após a obtenção da CIM dos compostos naturais, o micélio da linhagem H6 cultivado em placa Sabouraud por cerca de 7 dias, foi inoculado em 50 mL de meio Sabouraud líquido e mantido a 28°C, com agitação de 200 rpm, por um período de 24 h. Em seguida, o micélio foi filtrado em funil de Büchner, em condições estéreis, sendo esse micélio, posteriormente, transferido para 20 mL de meio Sabouraud acrescido das drogas testadas na concentração da



CIM. O controle negativo constituiu-se do meio livre de drogas. O micélio transferido para esse novos meios foi incubado por 48 horas, nas mesmas condições descritas acima.

A extração do ergosterol foi conduzida de acordo com metodologia previamente descrita por Arthington-Skaggs et al. (1999) com algumas modificações. Após o período de incubação do micélio com as drogas, procedeu-se uma filtração em funil de Büchner e houve a transferência do micélio seco para frascos de 50 mL. Em seguida, foi adicionado ao micélio 30 mL de água ultra pura e centrifugados por 10 minutos à 5000 rpm. A água foi descartada e o pellet foi submetido à extração. Para extrair os esteróis foram adicionadas 3 mL de uma solução de hidróxido de potássio 25%, com subsequente incubação por 1 h a 85°C. Após a incubação, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente por cerca de 20 minutos e, posteriormente, acrescentaram-se 3 mL de n-heptano (Synth<sup>®</sup>) e 1 mL de água ultra pura, seguidos por uma agitação vigorosa por 3 min. A fase orgânica (heptano) foi transferida para um novo frasco de 2 mL, e as amostras foram preparadas para análise em etanol absoluto, em uma concentração de 20% (200 µL dos esteróis extraídos em 800 µL de etanol). As amostras foram levadas à um espectrofotômetro de absorção molecular para a realização da varredura de comprimento de onda entre 220nm-300nm. A presença de ergosterol e de sua substância intermediária dehidroergosterol (DHE) resultou em um espectro de absorção característico de 4 picos (Figura 6- A e B).

**Figura 6.** Curva analítica de ergosterol (A) e espectro de absorção de ergosterol (B).



Para determinar a concentração de ergosterol, foi preparada uma curva analítica de ergosterol (Sigma Aldrich<sup>®</sup>), com 5 padrões (1 µg/mL, 2,5 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e 15

$\mu\text{g/mL}$ ) representado na Figura 6- A. A partir da curva, foi obtida a equação da reta, a qual foi utilizada para a determinação da concentração das amostras.

De acordo com Arthington-Skaggs et al. (1999), o ergosterol e seu composto intermediário (DHE) apresentam máximos de absorção no comprimento de onda de 281,5 nm, enquanto, somente, o DHE apresenta máximo de absorção no comprimento de onda de 230 nm. Levando isso em consideração, o valor de absorbância em 281,5nm foi subtraído do valor de absorbância obtido em 230nm, exclusivo da substância intermediária. Após isso, o valor resultante foi usado na equação da reta, anteriormente mencionada.

Equação da Reta:

$$y = 0,0272x + 0,0143$$

Na qual: y consistia do valor resultante da diferença entre absorbância obtida em 281 nm e aquela obtida em 230 nm é x, o valor que representa a concentração de ergosterol na amostra em questão.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Extração e purificação dos extratos do fruto de *S. lycocarpum*.

#### 6.1.1 Desenvolvimento de fase móvel para Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC)

A eluição da CCDC com fase móvel AcEOT: MeOH: H<sub>2</sub>O: NH<sub>4</sub>OH (63:40:2:0,5) v possibilitou maior resolução das substâncias, inclusive de outros compostos minoritários. Neste experimento foram determinados os Rfs da solamargina (0,625) e da solasonina (0,407).

#### 6.1.2 Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP)

Após eluição das placas e revelação com vapores de iodo os Rfs obtidos para solasonina e solamargina foram, 0,385 e 0,576, respectivamente.

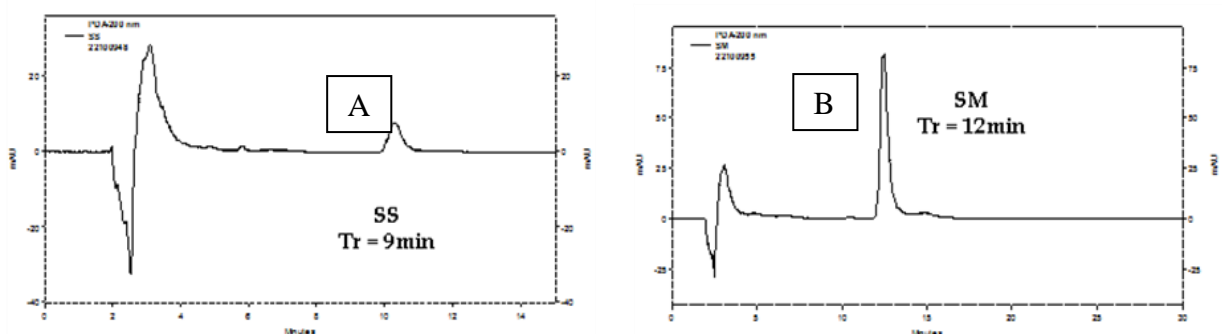
O rendimento a partir de 15 mg do extrato alcalóidico aplicado na placa foi de 9,3% (1,4 mg) para solamargina e de 15% (2,25 mg) para a solasonina.

Após obter os compostos de interesse majoritários foram purificadas por CLAE preparativa.

#### 6.1.3 Análise do extrato alcalóidico por CLAE

O método analítico utilizado em CLAE permitiu a separação dos dois glicoalcaloides de interesse: solamargina e solasonina, como pode ser observado na injeção do extrato alcalóidico contendo majoritariamente os dois glicoalcaloides (Figura 7).

**Figura 7.** Perfil cromatográfico dos compostos submetidos á CLAE preparativo. (A) Solasonina (Tr= 9 min) e (B) Solamargina (Tr= 12 min).



**Fonte:** Mariza de Abreu Miranda (FCFRP-USP) (2013).

#### 6.1.4 Análise por ressonância magnética nuclear dos compostos isolados

A caracterização dos compostos isolados foi realizada através da aquisição dos espectros de RMN mono e bidimensionais. As análises foram realizadas pela aluna de doutorado M.S Mariza de Abreu Miranda no laboratório de farmacognosia da FCFRP-USP, quando esta estava realizando mestrado estudando os mesmos glicocalcoides extraídos de *S. lycocarpum* estudados no presente trabalho, assim os dados obtidos além da discussão realizada, foram aproveitados neste trabalho. Assim, os espectros de RMN bidimensionais, HMQC, HMBC e COSY, mostram as correlações entre hidrogênios e carbonos ligados diretamente, hidrogênios e carbonos distantes em até três ligações, e hidrogênios acoplado com hidrogênios vizinhos, respectivamente (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007). Desta forma, as estruturas puderam ter sua identidade confirmada com base em informações obtidas por essa técnica.

Os espectros de RMN de hidrogênio obtidos para a solasonina (SS) e solamargina (SM) encontram-se nos apêndices 1 e 6, respectivamente. Os apêndices 5 e 10 representam os mapas de contorno HMQC, da SS e SM, respectivamente.

Os dados da tabela 3 mostram os valores obtidos neste trabalho para os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono do núcleo esteroidal dos compostos isolados. Estes dados encontraram-se de acordo com os descritos na literatura (PURI, WONG, 2003; ZHAH, et al., 2007) para a RMN de hidrogênio e para os espectros bidimensionais.

**Tabela 3.** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $\delta$   $^1\text{H}$  (multiplicidade) e HMQC

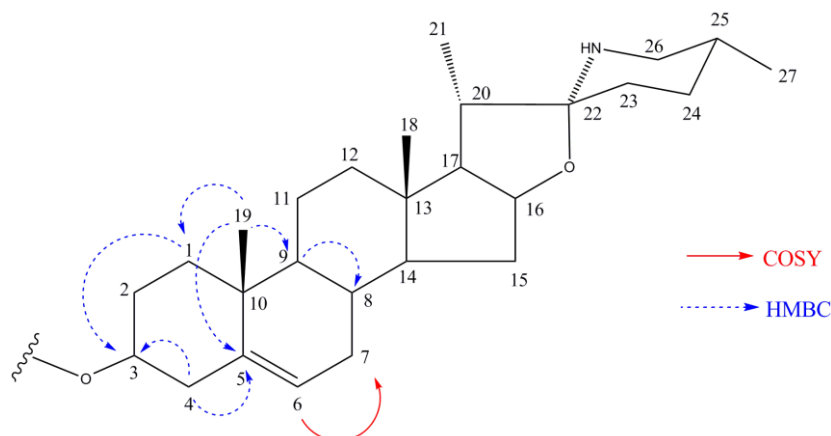
<i>Posição dos átomos</i>	$\delta$ $^1\text{H}$ obtidos	$\delta$ $^1\text{H}$ literatura <sup>a, b</sup>	$\delta$ $^{13}\text{C}/\text{HMQC}$ obtidos
1	1,09; 1,88 (q)	1,00; 1,80 <sup>b</sup>	38,64
2	1,49; 1,79 (m)	1,40; 1,78 <sup>b</sup>	32,41
3	3,38 (m)	3,52 (m) <sup>a</sup> ; 3,42 <sup>b</sup>	72,52
4	2,21; 2,16 (t)	2,16; 2,24 <sup>b</sup>	43,02
5	-	-	142,54
6	5,32 (dd)	5,35 (dd) <sup>a</sup> ; 5,32 <sup>b</sup>	122,33
7	1,59; 1,69 (q)	1,48; 1,57 <sup>b</sup>	34,52
8	1,61 (m)	1,58 <sup>b</sup>	30,85
9	0,98 (q)	0,90 <sup>b</sup>	51,53
10	-	-	36,57
11	1,57; 1,58 (m)	1,48; 1,51 <sup>b</sup>	22,14
12	1,78; 1,22 (q)	1,68; 1,10 <sup>b</sup>	41,07
13	-	-	40,45
14	1,17 (q)	1,02 <sup>b</sup>	57,87
15	1,32; 2,01 (q)	1,25; 1,95 <sup>b</sup>	33,30
16	4,34 (q)	4,38 (q) <sup>a</sup> ; 4,20 <sup>b</sup>	80,87
17	1,84 (t)	1,65 <sup>b</sup>	64,02
18	0,82 (s)	0,81 (s) <sup>a</sup> ; 0,75 <sup>b</sup>	16,97
19	1,02 (s)	1,03 (s) <sup>a</sup> ; 0,95 <sup>b</sup>	20,00
20	1,97 (m)	1,81 <sup>b</sup>	42,87
21	0,94 (d)	1,01 (d) <sup>a</sup> ; 0,88 <sup>b</sup>	15,52
22	-	-	98,25
23	1,65 (t)	1,56 <sup>b</sup>	32,93
24	1,30; 1,41(m)	1,35; 1,55 <sup>b</sup>	30,43
25	1,48 (m)	1,48 <sup>b</sup>	31,34
26	2,56; 2,65 (t)	2,68 (m) <sup>a</sup> ; 2,54; 2,58 <sup>b</sup>	48,00
27	0,85 (d)	0,86 (d) <sup>a</sup> ; 0,80 <sup>b</sup>	19,76

$\delta$  (ppm), s (singleto), t (triplete), d (dubleto), dd (duplo dubleto), q (quarteto), m (multiplete) <sup>a</sup>  
ZHAH et al, 2007, <sup>b</sup> PURI; WONG, 2003

Fonte: Mariza de Abreu Miranda, 2013

O núcleo esteroidal dos compostos isolados possui quatro metilas. Estas estão ligadas aos carbonos C-13, 10, 20 e 25. As metilas 18 e 19 estão ligadas a carbonos quaternários, ou seja, elas não apresentam hidrogênios vizinhos capazes de produzirem desdobramentos e são identificadas no espectro de RMN de hidrogênios por singletos, em  $\delta$  0,82 e  $\delta$  1,02, respectivamente. Porém, as metilas 21 e 27 estão ligadas a carbonos terciários possuindo um hidrogênio vizinho que desdobra em sinais de dubletos em  $\delta$  0,94 e  $\delta$  0,85 ppm, respectivamente. Na figura 8, ilustra-se o núcleo esteroidal dos heterosídeos alcaloídicos com suas correlações  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  e acoplamentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

**Figura 8.** Núcleo esteroidal e correlações observadas HMBC e acoplamentos observados em COSY.



**Fonte:** Mariza de Abreu Miranda, 2013

Não foi possível discernir entre os sinais das cadeias de açúcares presentes na solasonina e solamargina no espectro de hidrogênio, uma vez que houve sobreposição desses. Pela expansão dos espectros de hidrogênio nas regiões de  $\delta$  3,4 a 4,6 ppm para a solasonina (Apêndice 2) e solamargina (Apêndice 7) observam-se sinais dos açúcares ligados

Com intuito de se observar diferenças entre os açúcares dos heretosídeos alcaloídicos, SS e SM, também foram obtidos os mapas de contorno de COSY (Apêndice 3 e 8) e de HMBC (Apêndice 4 e 9), respectivamente. No entanto, os dados fornecidos por essas análises não foram suficientes para a diferenciação das cadeias de açúcares correspondente a cada heterosídeo devido a sobreposição de sinais.

## 6.2 Atividade anticâncer

### 6.2.1 Determinação da atividade citotóxica e genotóxica dos glicoalcaloides

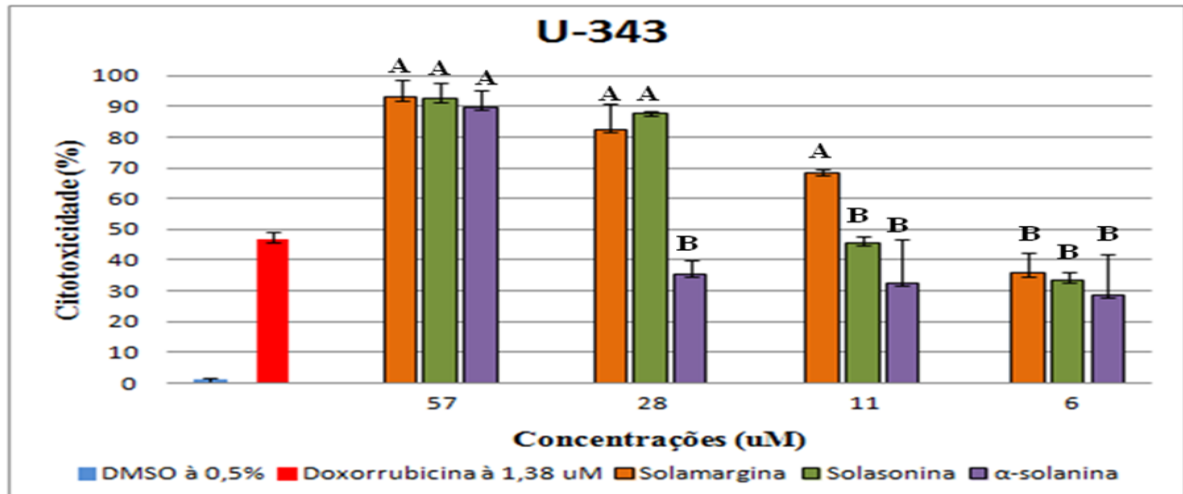
#### 6.2.1.1 Ensaio com MTT- Citotoxicidade

Inicialmente foi realizado uma triagem da atividade citotóxica dos glicoalcaloides por 48 horas utilizando várias linhagens tumorais. As linhagens tumorais de câncer de mama (MCF-7) e astrocitoma cerebral (U-343) foram as que apresentaram melhores resultados. Além disso, devido a sua incidência e agressividade foram utilizadas nos próximos ensaios para caracterização dos mecanismos de ação e avaliação de genotoxicidade. Nas figuras 9, 10 e 11, estão expostos os percentuais de citotoxicidade do controle do solvente (DMSO à 0,5%) e positivo (doxorrubicina à 1,38  $\mu\text{M}$ ) contra as linhagens tumorais MCF-7, U-343 e a linhagem normal 3T3, além do porcentagem de morte celular das linhagens nas diferentes concentrações dos glicoalcaloides. Em relação aos controles, a doxorrubicina apresentou maior citotoxicidade para a linhagem 3T3 (63,12%  $\pm$  1,25), já a linhagem MCF-7 apresentou menor susceptibilidade ao controle positivo (39,68%  $\pm$  9,08). Para a linhagem U-343 a doxorrubicina apresentou citotoxicidade no valor de 46,75%  $\pm$  2,45. Quanto ao controle do solvente, a concentração do solvente utilizada não apresentou citotoxicidade significativa nas linhagens testadas. As taxas de citotoxicidade celular do controle do solvente variaram entre 1,35%  $\pm$  0,21 á 1,19%  $\pm$  0,023 para as linhagens U-343 e MCF-7 respectivamente. Para a linhagem 3T3 o solvente apresentou valor de citotoxicidade de 1,27%  $\pm$  0,8.

A solamargina na concentração de 57 $\mu\text{M}$  foi muito efetiva contra as linhagens tumorais U-343 (astrocitoma cerebral) e MCF-7 (câncer de mama) com valores de citotoxicidade de 92,88%  $\pm$  5,51 e 92,31%  $\pm$  5,66 respectivamente. Além disso, a solamargina foi o glicoalcaloide que apresentou maior citotoxicidade para a linhagem normal 3T3 (90,66%  $\pm$  4,72) na maior concentração testada comparando com os resultados obtidos pelos outros glicoalcaloides. A solasonina (57  $\mu\text{M}$ ) foi efetiva contra as linhagens U-343 (92,55%  $\pm$  5,12) e MCF-7 (89,15%  $\pm$  4,44) e apresentou menor citotoxicidade para a linhagem normal (68,45%  $\pm$  3,45). O glicoalcaloide comercial  $\alpha$ -solanina também apresentou citotoxicidade contra as linhagens testadas, sendo mais citotóxico para a linhagem tumoral MCF-7 na maior concentração testada (57  $\mu\text{M}$ ) apresentando valor de citotoxicidade de 93,223%  $\pm$  1,145, porém apresentou menor citotoxicidade para a linhagem normal 3T3 (65,65%  $\pm$  5,19) comparando com os resultados obtidos pelos outros glicoalcaloides. Concluindo, a solamargina foi mais citotóxica para todas as linhagens. A  $\alpha$ -solanina é mais citotóxica para

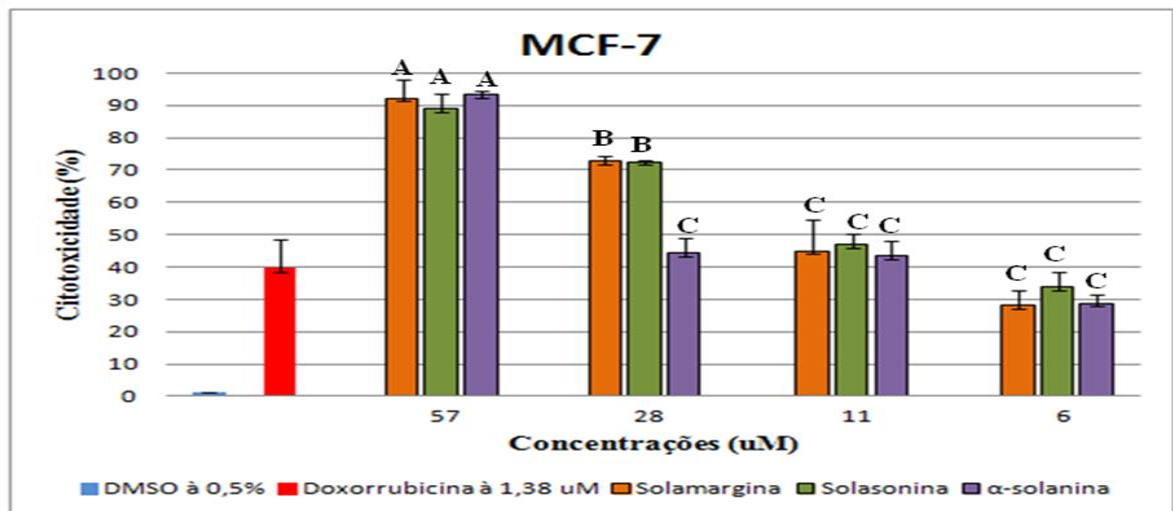
linhagem MCF-7 e menos citotóxica para linhagem 3T3. A solasonina apresentou valores de citotoxicidade próximos aos valores obtidos pela solamargina.

**Figura 9.** Avaliação da citotoxicidade dos glicoalcaloides em 48 horas de incubação frente à linhagem U-343.



\*Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p=0,05$ )

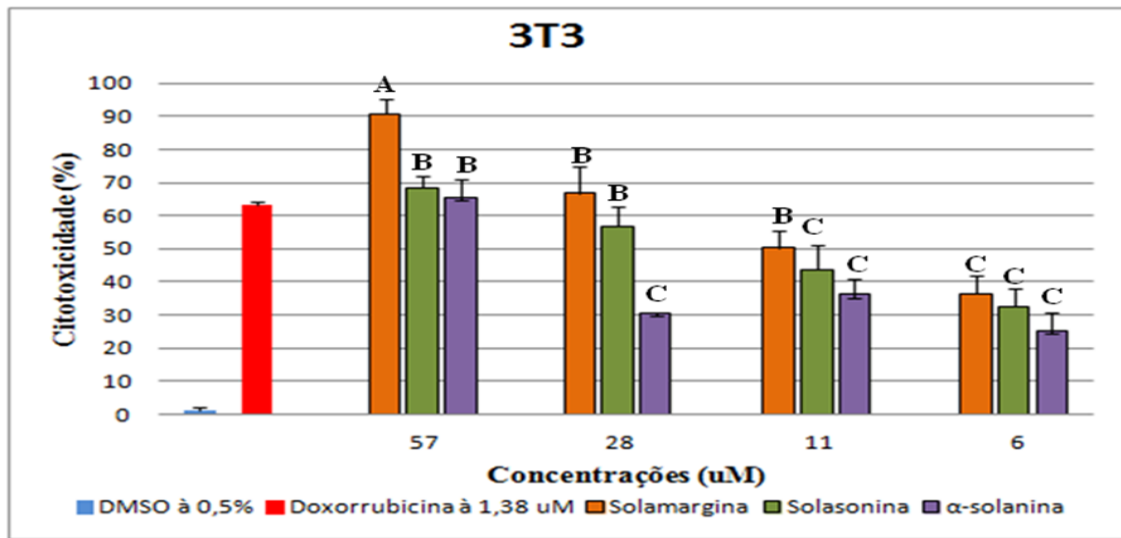
**Figura 10.** Avaliação da citotoxicidade dos glicoalcaloides em 48 horas de incubação frente à linhagem MCF-7.



\*Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p=0,05$ ).



**Figura 11.** Avaliação da citotoxicidade dos glicoalcaloides em 48 horas de incubação frente à linhagem 3T3.



\*Letras diferentes representam diferenças estatísticas (p=0,05).

#### 6.2.1.2 Determinação do IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub>

A partir das diferentes concentrações testadas foi realizado o cálculo da equação da reta para determinar as concentrações inibitórias de 25% e 50% de viabilidade celular (IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub>) promovida pelos glicoalcaloides testados contra as linhagens tumorais U-343 e MCF-7 e a linhagem normal 3T3. Os resultados obtidos estão representados na tabela 4.

**Tabela 4.** Valores de IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub> (µg/ml e µM) dos glicoalcaloides solamargina, solasonina e α-solanina nas linhagens celulares U-343, MCF-7 e 3T3 tratadas por 48 horas pelo teste MTT.

Concentração inibitória Linhagens\ Glicoalcaloides	Tratamento por 48 Horas											
	IC <sub>25</sub>						IC <sub>50</sub>					
	U-343		MCF-7		3T3		U-343		MCF-7		3T3	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
<b>Solamargina</b>	1,33	1,50	1,44	1,63	1,32	1,52	11,44	12,94	11,76	13,30	11,92	13,48
<b>Solasonina</b>	3,84	4,42	3,41	3,92	2,39	2,70	12,10	13,68	12,89	14,57	17,46	19,75
<b>α-Solanina</b>	21,57	24,84	20,56	23,68	33,12	38,15	36,73	42,31	44,47	51,23	43,22	49,79

É possível verificar que a solamargina e solasonina foram os glicoalcaloides com maior potencial citotóxico para a linhagem tumoral U-343 obtendo valores de IC<sub>25</sub> de 1,50 µM para

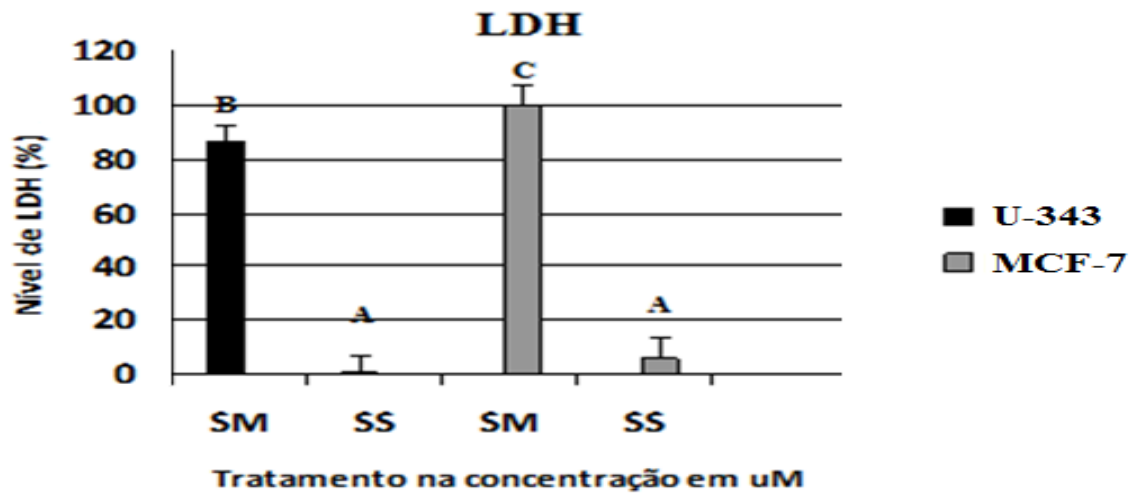
a solamargina e 4,42  $\mu\text{M}$  para a solasonina e  $\text{IC}_{50}$  de 12,94  $\mu\text{M}$  para a solamargina e 13,68  $\mu\text{M}$  para a solasonina, respectivamente. Além disso, estes glicoalcaloides também mostraram-se ativos contra a linhagem de carcinoma de mama (MCF-7), a solamargina apresentou valores de  $\text{IC}_{25}$  de 1,63  $\mu\text{M}$  e  $\text{IC}_{50}$  de 13,30  $\mu\text{M}$ , já a solasonina apresentou valores de  $\text{IC}_{25}$  de 3,92  $\mu\text{M}$  e  $\text{IC}_{50}$  de 14,57  $\mu\text{M}$ . Para célula de fibroblasto (3T3) o glicoalcaloide solamargina apresentou valor de  $\text{IC}_{25}$  de 1,52  $\mu\text{M}$  e  $\text{IC}_{50}$  de 13,48  $\mu\text{M}$ , já a solasonina apresentou valores de  $\text{IC}_{25}$  de 2,70  $\mu\text{M}$  e  $\text{IC}_{50}$  de 19,75  $\mu\text{M}$ . A  $\alpha$ -solanina apresentou menor potencial citotóxico com valores de  $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$  mais elevados para todas as linhagens testadas, comparando com os valores apresentados pelos outros glicoalcaloides, sendo para MCF-7 valor de  $\text{IC}_{50}$  de 51,23  $\mu\text{M}$  e 3T3 com  $\text{IC}_{50}$  de 49,79  $\mu\text{M}$  comparado com U-343 com  $\text{IC}_{50}$  de 42,31  $\mu\text{M}$ . Assim, pelos valores obtidos de  $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$  de cada glicoalcaloide para as diferentes linhagens, é possível observar que a solamargina é o glicoalcaloide que apresentou melhores resultados de citotoxicidade para as linhagens tumorais, necessitando de uma concentração menor para obter morte de 50% de células, comparando com a  $\alpha$ -solanina que necessitou de maior concentração para obter morte de 50% de células. Porém a solamargina se mostrou mais citotóxica para célula normal.

### **6.2.1.3 Avaliação da integridade da membrana plasmática celular pelo ensaio de LDH**

Para avaliação do efeito citotóxico dos glicoalcaloides pelos testes de LDH de 48 horas, foram utilizadas as concentrações molares do  $\text{IC}_{50}$  estimadas pelos ensaio MTT para as linhagens celulares U-343 (12,94  $\mu\text{M}$  de solamargina e 13,68  $\mu\text{M}$  de solasonina) e MCF-7 (13,30  $\mu\text{M}$  de solamargina e 14,57  $\mu\text{M}$  de solasonina). Tal ensaio analisa a perda da integridade da membrana celular, fenômeno típico de necrose e dos últimos estágios da apoptose. O ensaio de LDH é descrito por alguns autores como mais sensível para análise de danos celulares do que o de MTT (YAACOB et al., 2010).

Os valores de liberação de LDH na figura 12, mostram que a solamargina é o glicoalcaloide que apresentou maior citotoxicidade para as células tumorais testadas (U-343 e MCF-7), por apresentar maior porcentagem de liberação de LDH para o citoplasma.

**Figura 12.** Determinação do nível de LDH (%) liberada pelas linhagens celulares U343 e MCF-7 tratadas com os glicoalcaloides solamargina (SM) e solasonina (SS) na concentração do IC<sub>50</sub> por 48 horas.

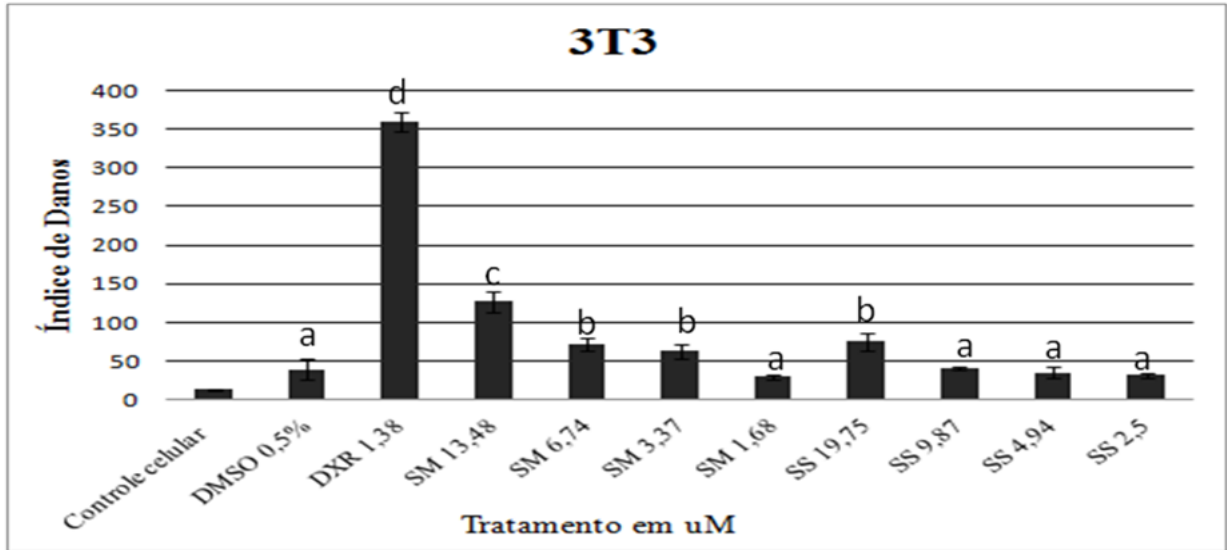


\*Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p=0,05$ )

#### 6.2.1.4 Genotoxicidade

O ensaio cometa, sob as condições antes relatadas, foi realizado para as linhagens de glioblastoma humano, U-343 MGa, adenocarcinoma mamário, MCF-7, e fibroblasto murino, 3T3, com solamargina e solasonina nas concentrações do IC<sub>50</sub> estimada no ensaio com MTT (Tabela 4) e mais três concentrações abaixo do IC<sub>50</sub>. Estas foram as concentrações escolhidas, pois o excesso de citotoxicidade interferiria no ensaio, ao causar genotoxicidade elevada. Os resultados do teste do cometa mostraram que os índices de danos observados, variaram entre 0 a 400 (Tabela 2) e estão dispostos nas figuras 13, 14 e 15.

**Figura 13.** Média de índice de danos ao DNA no ensaio Cometa para linhagem celular 3T3 tratada com glicoalcaloides por 6 horas.



\*Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p=0,05$ ).

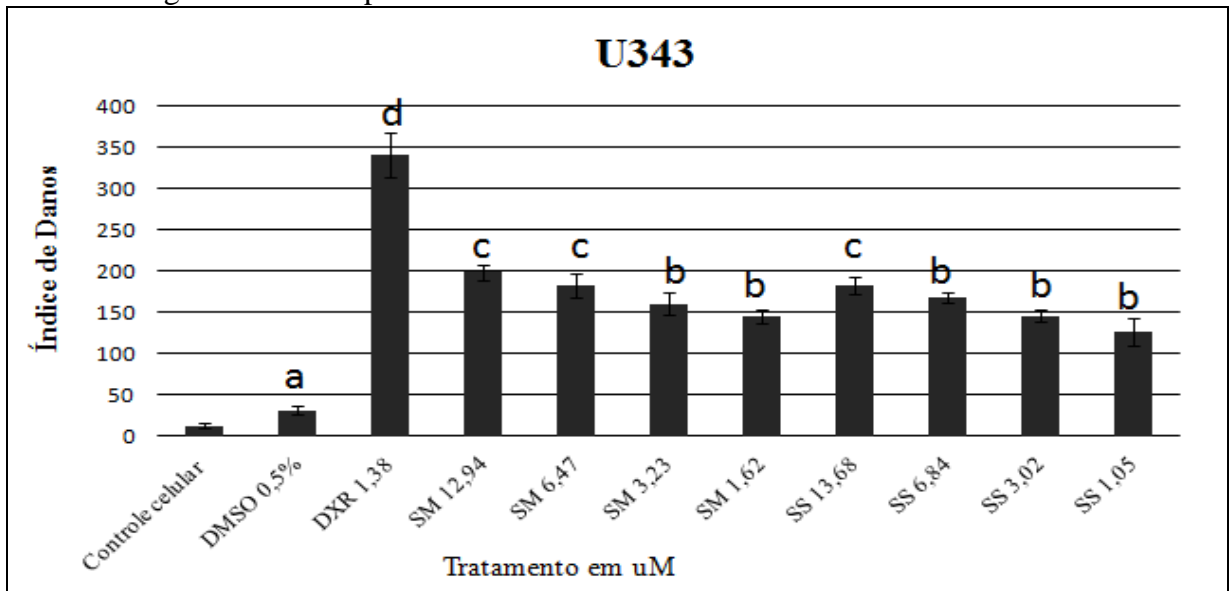
DMSO= Dimetilsulfóxido

DXR= Doxorubicina

SM= Solamargina

SS= Solasonina

**Figura 14.** Média de índice de danos ao DNA no ensaio Cometa para linhagem celular U-343 tratada com glicoalcaloides por 6 horas.



\*Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p=0,05$ ).

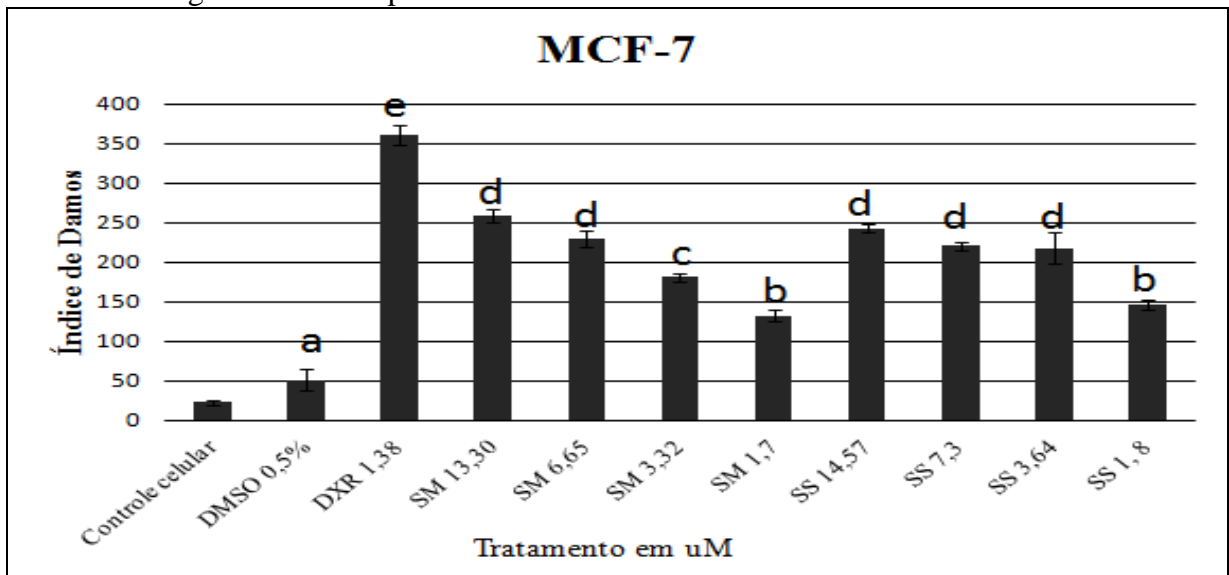
DMSO= Dimetilsulfóxido

DXR= Doxorubicina

SM= Solamargina

SS= Solasonina

**Figura 15.** Média de índice de danos ao DNA no ensaio Cometa para linhagem celular MCF-7 tratada com glicoalcaloides por 6 horas.



\*Letras diferentes representam diferenças estatísticas ( $p=0,05$ ).

DMSO= Dimetilsulfóxido

DXR= Doxorrubicina

SM= Solamargina

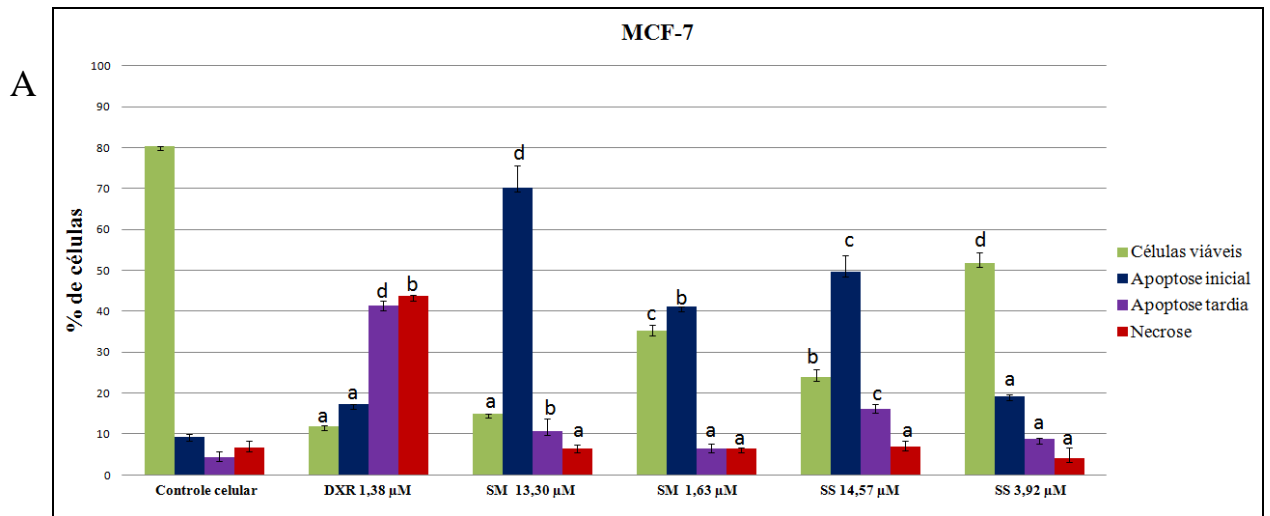
SS= Solasonina

### 6.3 Morte celular por apoptose e arraste do ciclo celular

#### 6.3.1 Anexina V-FITC/PI

As figuras 16 A e B e 17 A e B, demonstram os resultados obtidos no experimento de apoptose no tratamento de 24 horas com o glicoalcaloide solamargina nas concentrações de 1,50  $\mu\text{M}$  e 12,94  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$ ) e solasonina nas concentrações de 4,42  $\mu\text{M}$  e 13,68  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$ ) para a linhagem celular U-343. Para a linhagem MCF-7 foram utilizadas concentrações de 1,63  $\mu\text{M}$  e 13,30  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$ ) do glicoalcaloide solamargina e 3,92  $\mu\text{M}$  e 14,57  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{25}$  e  $\text{IC}_{50}$ ) de solasonina, com o controle celular (meio DMEM com 10% de SFB) e o positivo (doxorrubicina à 1,38  $\mu\text{M}$ ).

**Figura 16. A e B.** Análise de células apoptóticas com Anexina V por citometria de fluxo. Células MCF-7 tratadas com os compostos solamargina e solasonina na concentração do IC<sub>50</sub> e IC<sub>25</sub> e como controle positivo usou a doxorrubicina na concentração do IC<sub>50</sub>.

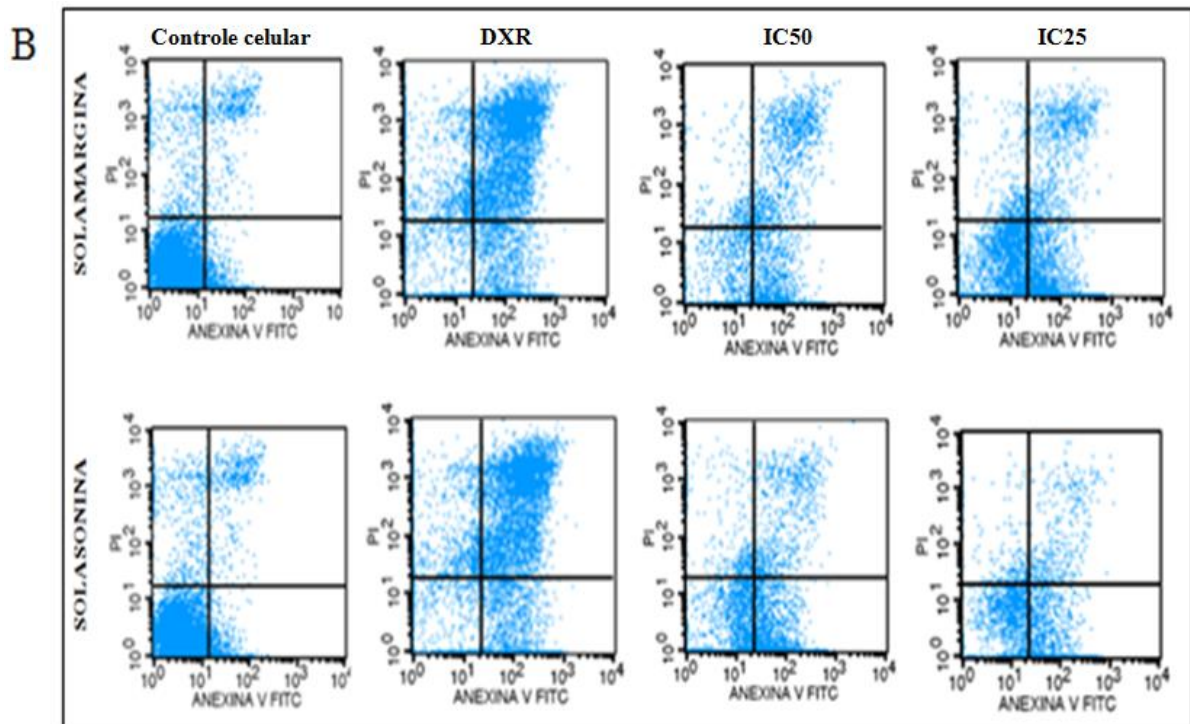


\*Letras diferentes representam diferenças estatísticas em relação ao controle negativo ( $p=0,05$  vs. controle).

DXR= Doxorrubicina

SM= Solamargina

SS= Solasonina





Os resultados obtidos das análises revelaram que as drogas SM na concentração de 13,30  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ), 1,63  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{25}$ ) e SS na concentração de 14,57  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ), induziram a linhagem celular MCF-7 á apoptose inicial ( $70,153\% \pm 5,5$ ), ( $41,038 \pm 0,102$ ) e ( $49,543\% \pm 4,1625$ ) respectivamente, sendo que a proporção de células marcadas com anexina V foi mais elevada quando exposta ao glicoalcaloide SM na concentração do  $\text{IC}_{50}$  indicando maior percentual de células em apoptose inicial. Além disso, a SM na concentração de 13,30  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) induziu mais a apoptose inicial em células da linhagem MCF-7 em relação a U-343.

Para a linhagem U-343, nos tratamentos com os glicoalcaloides nas diferentes concentrações, apresentou mais células viáveis e entrando em apoptose inicial.

O controle positivo doxorubicina (DXR) na concentração de 1,38  $\mu\text{M}$ , induziu a apoptose tardia nas células MCF-7 ( $41,305\% \pm 1,22$ ) e também na linhagem U-343 ( $60,725\% \pm 2,0153$ ). A doxorubicina induziu apoptose nas células MCF-7 á ( $43,685 \pm 0,2$ ) comparada aos outros tratamentos utilizados e comparando com a U-343 ( $15,925\% \pm 1,096$ ).

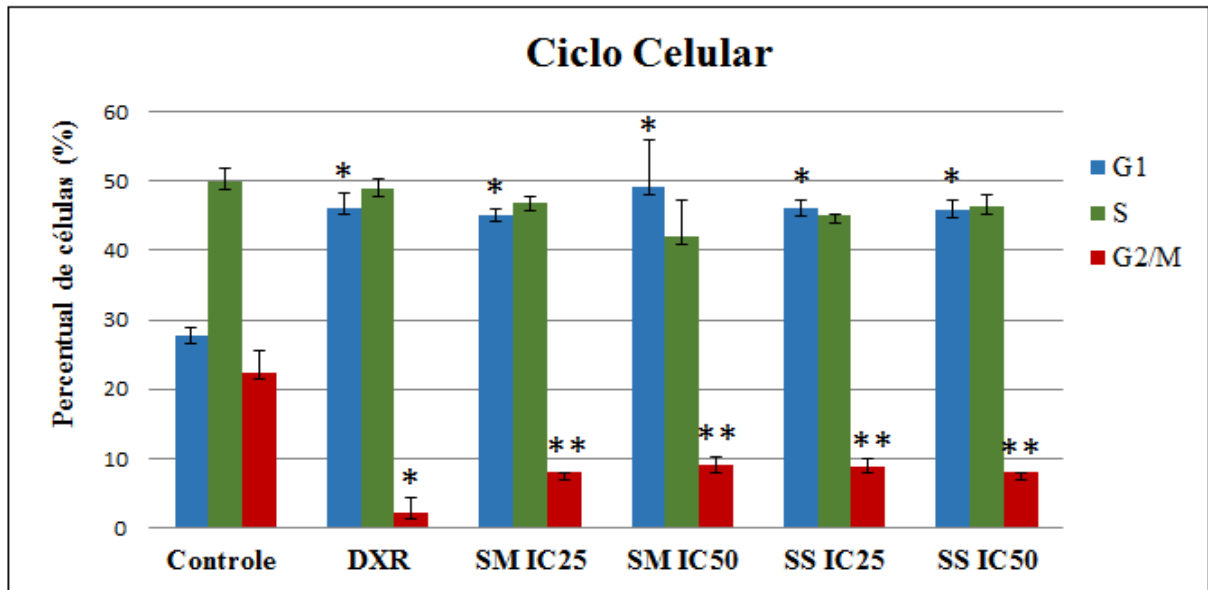
Como esperado, o controle celular (meio DMEM com 10% de SFB), indicou a viabilidade celular para as linhagens testadas, MCF-7 ( $80,345\% \pm 0,0778$ ) e para U-343 ( $85,2\% \pm 7,35$ ).

### **6.3.2 Ciclo celular por PI**

Na figura 18, estão expressos os resultados referentes aos ensaios de citometria de fluxo que demonstraram que os glicoalcaloides solamargina e solasonina influenciam no ciclo celular, podendo ser observado uma maior quantidade de células na fase  $G_1$  do ciclo. Para esta avaliação, todos os valores foram relacionados ao controle celular e apontaram atividade antiproliferativa.



**Figura 18.** Porcentagem de células da linhagem MCF-7 em cada fase do ciclo celular tratadas por 24 horas com os glicoalcaloides solamargina e solasonina nas concentrações das IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub>.



Asteriscos representam diferenças estatísticas em relação ao controle negativo ( $p < 0,05$  vs. controle). Quantidades iguais de asteriscos numa mesma fase do ciclo celular representam equivalência estatística. Cada fase foi tratada por análise de variância individualmente.

DXR= Doxorubicina

SM= Solamargina

SS= Solasonina

IC<sub>25</sub>= Concentração que inibe 25% das células

IC<sub>50</sub>= Concentração que inibe 50% das células

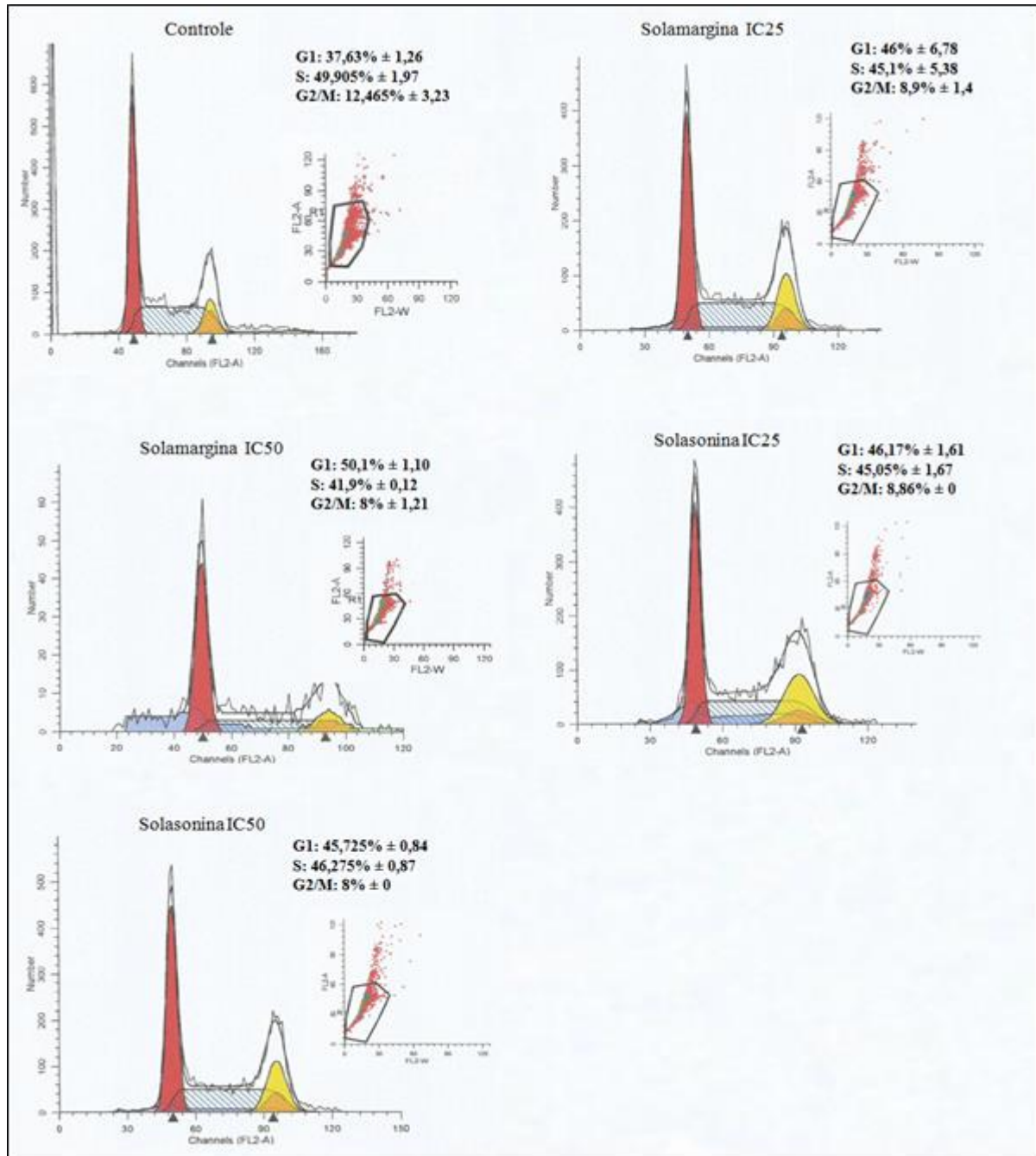
A figura 18 mostra os dados referentes às análises de variância, enquanto a figura 19 apresenta os histogramas contendo as médias de porcentagem de células em cada fase do ciclo, das duplicatas.

Em G1, a análise apontou diferenças estatísticas em relação ao controle negativo (27,63%  $\pm$  2,2), maior para a IC<sub>50</sub> da solamargina (49,1%  $\pm$  6,78), e respectivamente para solasonina (IC<sub>25</sub>: 46,07%  $\pm$  1,1; e IC<sub>50</sub>: 45,72%  $\pm$  1,61) e para a IC<sub>25</sub> da solamargina (45,18%  $\pm$  0,85). Os valores apresentados pelo tratamento com os glicoalcaloides, demonstraram-se similares ao do controle positivo doxorubicina (IC<sub>50</sub>: 46,09%  $\pm$  1,26).

Na fase de síntese de DNA, os dados estatísticos em comparação ao controle negativo (49,90%  $\pm$  1,56) foi maior para a IC<sub>50</sub> da solamargina (41,91%  $\pm$  5,38), seguido da IC<sub>25</sub> da solasonina (45,06%  $\pm$  0,2), e depois para a IC<sub>50</sub> da solasonina (46,27%  $\pm$  1,61), a IC<sub>25</sub> da solamargina (46,82 %  $\pm$  0,84) e por fim o controle positivo doxorubicina (48,855%  $\pm$  1,97). No que se refere ao volume de células na fase G2/M, o controle negativo (22,465%  $\pm$  2,04) apresentou mais quantidade de células comparado com os tratamentos com os glicoalcaloides, solamargina (IC<sub>50</sub>: 8,99%  $\pm$  1,4; e IC<sub>25</sub>: 8,00%  $\pm$  0), solasonina (IC<sub>50</sub>: 8,00%  $\pm$  0; e IC<sub>25</sub>:

8,86%  $\pm$  1,2) e principalmente ao tratamento com o controle positivo doxorrubicina (IC<sub>50</sub>: 2,285%  $\pm$  3,23).

**Figura 19.** Histogramas do Ciclo Celular



Cada histograma corresponde a uma amostra de cada tratamento com as médias das replicatas do mesmo.

#### 6.4 Análise da expressão gênica por *PCR array*

**Tabela 5.** Modulação da Expressão Gênica da linhagem celular MCF-7 tratada com solamargina e solasonina na IC<sub>50</sub>.

Gene	6 horas		24 horas	
	Solamargina	Solasonina	Solamargina	Solasonina
AIFM1	-1,1487	-1,2311	-1,7171	-1,6133
AKT1	-1,2397	-1,5263	-4,0278	-3,1167
APAF1	-1,8277	-2,1735	<b>+1,8661</b>	<b>+1,6358</b>
BAG1	-3,3173	-4,3169	0	0
BAK1	-23,7524	-30,91	0	0
BAX	-1,4044	<b>-1,3755</b>	<b>+1,0353</b>	<b>+1,2658</b>
Bcl-2	<b>+2,0994</b>	<b>+2,3457</b>	-63,5579	-72,5046
BFAR	0	-1,2311	<b>+1,1408</b>	-1,4044
BIRC3	<b>+2,9079</b>	<b>+1,0644</b>	<b>+1,5476</b>	-3,6808
BNIP3	0	0	0	-5,063
BRAF	<b>+1,4241</b>	-1,2746	<b>+1,1728</b>	-1,5801
CASP2	0	0	<b>+1,3379</b>	0
IGF1R	<b>+1,2658</b>	-1,2483	<b>+1,257</b>	-1,021
XIAP	0	0	<b>+1,1329</b>	0

\*Valores negativos são referentes à repressão, e valores positivos à indução. O número zero (0) indica que não houve modulação do gene.

A tabela 5 mostra os valores de *fold-regulation* relativos aos experimentos de modulação de genes da linhagem MCF-7, envolvidos na via apoptótica humana submetida ao tratamento de IC<sub>50</sub> dos glicoalcaloides (Tabela 4), por 6 e 24 horas. Dos 84 genes analisados, houve a modulação de 14. Dentre estes, os antiapoptóticos AKT1, BAG1, Bcl-2, BFAR, BIRC3, BNIP3, BRAF, IGF1R e XIAP, e os pró-apoptóticos AIFM1, APAF1, BAX, BAK1 e CASP2. Os demais genes da *PCR Array* apresentaram C<sub>T</sub> igual ou maior que o *cut-off* de 35 ciclos, tanto no controle negativo como nos tratamentos e, portanto, foram considerados não modulados e não foram utilizados para a análise de expressão gênica. A tabela 6 apresenta os genes descritos com suas respectivas funções, segundo o banco de dados do NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2014, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

**Tabela 6.** Genes modulados pelos glicoalcaloides, suas funções quanto à indução de apoptose

<b>Gene</b>	<b>Função</b>	<b>Mecanismo</b>
AIFM1	Pró	Condensação cromossômica; liberação de citocromo C
AKT1	Anti	Mantém o nível de proteínas pró-sobrevivência e regula apenas as BH3
APAF1	Pró	Formação do apoptossomo e consequente ativação de caspase 9
BAG1	Anti	Liga-se à proteína Bcl-2 e aumenta a ação antiapoptótica
BAK1	Pró	BH efetora: perda do potencial mitocondrial; interação com a p53
BAX	Pró	BH efetora: liberação de citocromo C e DIABLO pela mitocôndria
Bcl-2	Anti	BH pró-sobrevivência: proteção da integridade mitocondrial membranar
BFAR	Anti	Inibição da caspase 8 em sua forma ativada
BIRC3	Anti	IAP: inibe apoptose por TNF- $\alpha$ ; regula sinalização de NF- $\kappa$ B
BNIP3	Anti	Codifica uma proteína mitocondrial que contém um domínio BH3 e atua como um factor pró-apoptótico.
BRAF	Anti	Protooncogene das vias de sinalização da divisão e diferenciação celular
CASP2	Pró	Induz apoptose, regulador positivo de apoptose e sinalizador extracelular
IGF1R	Anti	Fator de crescimento superexpresso em tumores malignos
XIAP	Anti	IAP: Ligação aos fatores TRAF1 e TRAF2 e às caspases 3, 7 e 9

IAPs= inibidores de apoptose por mecanismos diversos; BH= *Bcl-2 homology domains*

## 6.5 Avaliação da atividade antifúngica dos glicoalcaloides e mecanismo de ação

### 6.5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Na tabela 7 é apresentada a CIM dos compostos naturais e de acordo com esses resultados foram eleitas a solamargina e  $\alpha$ -solanina como as drogas mais efetivas.

**Tabela 7.** Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos produtos naturais ( $\mu\text{g/mL}$ ) para o fungo *T. rubrum* linhagem selvagem (H6) e mutante  $\Delta\text{TruMDR2}$

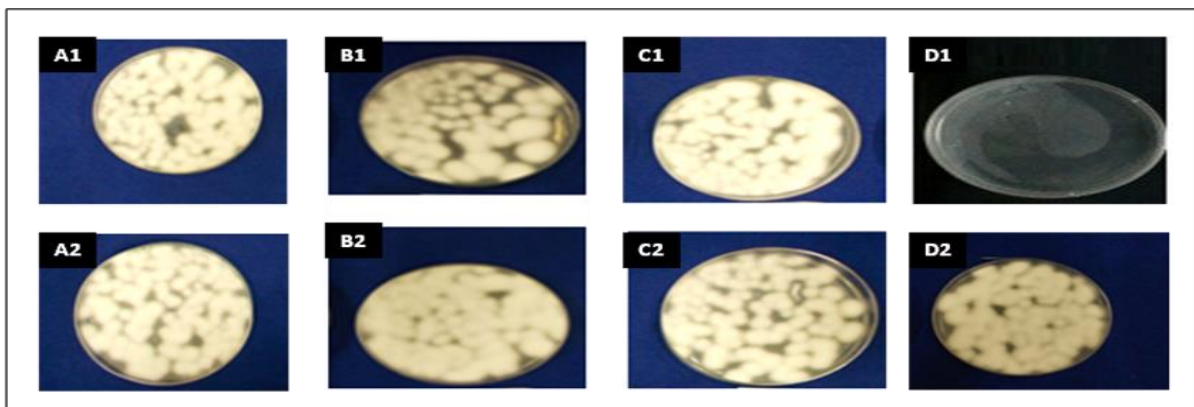
Compostos	Linhagem H6		Linhagem $\Delta\text{TruMDR2}$	
	CIM	CFM	CIM	CFM
Solamargina (SM)	3,12 (3,597)	Fungicida	3,12 (3,597)	Fungicida
Solasonina (SS)	12,5 (14, 13)	Fungicida	6,5 (7,34)	Fungicida
Solasodina (SD)	>25	ND	>25	ND
$\alpha$ - Solanina (SN)	3,12 (3,594)	Fungicida	3,12 (3,594)	Fungicida
Anfotericina -B	0,39	Fungicida	0,39	Fungicida

Entre parênteses estão os valores dos compostos SM, SS e SN expressos em  $\mu\text{M}$ .

### 6.5.2 Regeneração de protoplastos

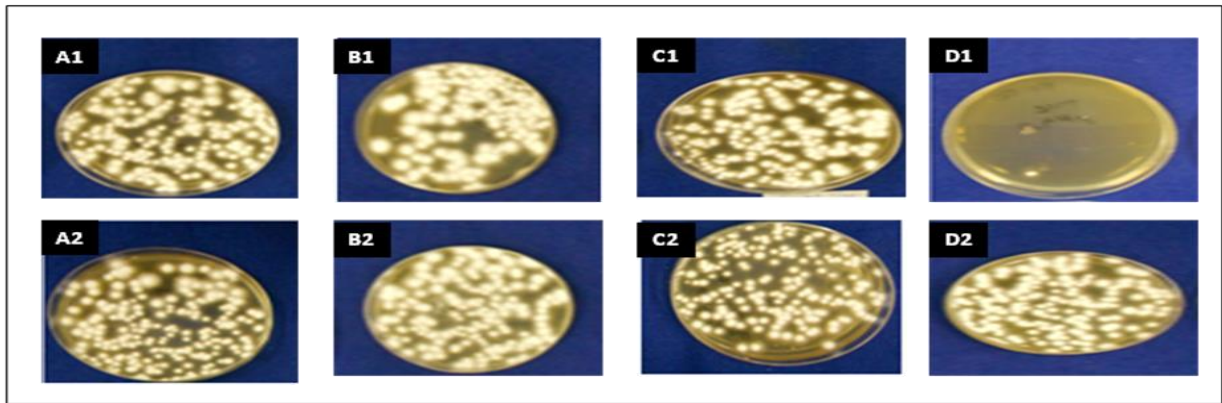
Deste modo, foi realizado teste de regeneração de protoplasto com o intuito de estudar o mecanismo de ação antifúngico dos glicoalcaloides e foi utilizado anfotericina-B como controle positivo. A anfotericina-B tem com mecanismo de ação a formação de poros artificiais ao longo da membrana celular do microrganismo, alterando a permeabilidade seletiva à cátions e levando à morte celular (COHEN, 1997).

**Figura 20.** Regeneração dos protoplastos da linhagem H6 do *T. rubrum*, em meio com pH 6.8



A1= Solamargina (SM) 3,125  $\mu\text{g/mL}$ ; A2= Solamargina (SM) 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ; B1= $\alpha$ -Solanina (SN) 3,125  $\mu\text{g/mL}$ ; B2=  $\alpha$ -Solanina (SN) 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ; C1= Solasonina (SS) 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ; C2= Solasonina (SS) 25  $\mu\text{g/mL}$ ; D1= Anfotericina-B (ANF-B) 0,39  $\mu\text{g/mL}$  (controle positivo); D2= Controle negativo (DMSO 3%).

**Figura 21.** Regeneração dos protoplastos da linhagem H6 do *T. rubrum*, em meio com pH 9.0.



A1= Solamargina (SM) 3,125  $\mu\text{g/mL}$ ; A2= Solamargina (SM) 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ; B1= $\alpha$ -Solana (SN) 3,125  $\mu\text{g/mL}$ ; B2=  $\alpha$ -Solana (SN) 6,25  $\mu\text{g/mL}$ ; C1= Solasonina (SS) 12,5  $\mu\text{g/mL}$ ; C2= Solasonina (SS) 25  $\mu\text{g/mL}$ ; D1= Anfotericina-B (ANF-B) 0,39  $\mu\text{g/mL}$  (controle positivo); D2= Controle negativo (DMSO 3%).

**Tabela 8.** Representação da Atividade dos alcaloides sobre a Regeneração de Protoplastos (Redução % MEDIA) – Linhagem H6.

Compostos	Meio em pH=6,8	Meio em pH=9,0
CIM da SM	83%	148,7%
CIM da SS	84,5%	165,5%
CIM da SN	75%	146,6%
2 x CIM da SM	107,7%	158,3%
2 x CIM da SS	72,7%	167%
2 x CIM da SN	76%	110,7%
Controle negativo	110,7%	186,7%
Anfotericina-B (controle positivo)	0%	0%

SM: solamargina; SN:  $\alpha$ -solanina (Sigma ®); SS: solasonina; SD: solasodina; ANF- B: anfotericina B

### 6.5.3 Quantificação do nível de ergosterol

A alfa-solanina e solamargina reduziram o conteúdo de ergosterol. A solasonina apresentou maior atividade inibitória no conteúdo de ergosterol que o controle anfotericina-B (Tabela 9). A anfotericina- B é um fármaco antifúngico de segunda geração, que age sobre a biossíntese de ergosterol, um importante componente de membrana (DOGRA; SAXENA, 1996). Deste modo, através desses dados é possível sugerir que os glicoalcaloides interferem na via da biossíntese de ergosterol.

**Tabela 9.** Redução do nível de Ergosterol (%) para as linhagens de *T. rubrum* crescidas na presença de diferentes compostos naturais

Concentração/ composto	Linhagens H6
CIM da Solamargina	45,29 ± 4,63
CIM da Solasonina	76,77 ± 4,37
CIM da $\alpha$ -Solanina	35,69 ± 4,02
CIM Anfotericina-B	65,66 ± 2,69

## 7. DISCUSSÃO

### 7.1 Purificação dos glicoalcaloides

Segundo Tiozzi et al, (2012), os frutos secos de *S. lycocarpum* contêm cerca de 1% de glicoalcaloides. Em seus estudos, foi realizado a padronização do método de extração de glicoalcaloides através da extração ácido-base seletiva. Este método possibilitou concentrar os glicoalcaloides numa fração precipitada usando ácido clorídrico e água. Para enriquecer o teor de alcaloides, foi necessário submeter a fração de alcaloides à digestão com etanol. Munari e colaboradores em 2014, conseguiram através deste mesmo processo, obter extrato com teor de glicoalcaloides que variam de 80 a 90%, de um modo muito reprodutível. Portanto, foi possível desenvolver um método analítico validado e simples para a extração de glicoalcaloides, além de ser reprodutível e de baixo custo. Sendo assim, este processo permite a produção dos glicoalcaloides a uma escala industrial para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos (TIOZZI et al., 2012; MUNARI et al., 2014).

Segundo Abreu et al, (2013), foi possível isolar estes glicoalcaloides de *S. lycocarpum* através do processo descrito por Tiozzi et al, (2012). Além disso, foi possível a identificação dos compostos através da técnica de espectrometria de massa e espectro de RMN. Dados estes obtidos por Abreu et al, (2013) em seus estudos, foram aproveitados no presente trabalho.

Deste modo, sabe-se que hidrogênio vizinhos à carbonos quirais são diastereotópicos, resultando em diferentes deslocamentos químicos no espectro de RMN de hidrogênios (PAVIA, LAMPAMAN, KRIZ, 2001). Este efeito foi observado nos estudos realizados por Abreu et al. (2013), nos hidrogênios ligados aos carbonos C-1, C-2, C-4, C-7, C-11, C-12, C-15, C-23, C-24 e C26. Além disso, observando os deslocamentos encontrados, nota-se que o H-16 da SS e SM, possui um maior deslocamento químico ( $\delta$  4,34), isto ocorre porque o carbono encontra-se ligado a um oxigênio, heteroátomo mais eletronegativo que o carbono, resultando em maior desblindamento deste hidrogênio. O mesmo efeito também foi observado para o H-3 ( $\delta$  3,38). O H-16 apresenta-se no espectro de RMN-<sup>1</sup>H como um quarteto, pois possui três hidrogênios vizinhos, sendo dois ligados ao C-15 e um ao C-17. O H-3 apresenta-se como multipletto, devido ao acoplamento com os hidrogênios dos carbonos 2 e 4. Em todos os compostos isolados observou-se para o H-6 o deslocamento químico de 5,32 ppm. Esse valor de deslocamento deve-se ao fato de que no C-6 haver uma ligação dupla com o C-5 ocasionando o efeito anisotrópico que aumenta



a desblindamento e, conseqüentemente, o deslocamento químico. Os alcalóides em questão são do tipo espirosolano, tendo um anel tetrahidrofurano e um anel piperidínico ligado em espiro, fornecendo perfil de RMN  $^1\text{H}$  característico. O multiplete com deslocamento químico em campo baixo,  $\delta$  4,34 ppm corresponde ao hidrogênio metílico geminal (H-16). Em relação às análises de HMQC, observou-se nos mapas de contorno que o deslocamento do C-22 foi maior que o C-26 nos três compostos, pois além destes carbonos estarem ligados ao nitrogênio, o C-22 liga-se também a um segundo heteroátomo (oxigênio), aumentando ainda mais seu desblindamento. Os carbonos C-10, C-13 e C-22 são carbonos quaternários, não possuindo átomos de hidrogênio ligados a eles. A ligação dupla presente entre os C-5 e C-6 foi identificada pelos altos valores de deslocamento nos mapas de contornos,  $\delta$  122,33 e  $\delta$  142,54 ppm respectivamente.

## 7.2 Atividade anticâncer

Apesar da baixa incidência, o glioblastoma é considerado um dos tipos de câncer mais agressivos, com sobrevida aproximada de 15 meses mesmo fazendo uso de tratamentos convencionais (PONTES et al., 2012). Além disso, segundo o Instituto Nacional de Câncer, o câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente no mundo, com aproximadamente 92 mil mortes no continente americano em 2012, e estimativa de 57.120 mil novos casos em 2014, somente no Brasil (INCA, 2014). Devido à relevância na área da oncologia clínica destes dois tipos de câncer, além da resposta ao tratamento com os diferentes glicoalcaloides, as linhagens U-343 e MCF-7 foram selecionadas para ensaios seguintes de citotoxicidade e genotoxicidade.

Os resultados de citotoxicidade obtidos para as linhagens de células tumorais U-343 e MCF-7 foram maiores e mais significativos comparado com os resultados relatados por Munari, et al., 2013. Em que relatam o estudo da atividade antiproliferativa das células tumorais MCF-7, B16, HT29, HeLa, U-343, HepG2 pelo ensaio XTT, e demonstram que a solamargina apresentou atividade citotóxica mais pronunciada para célula HepG2 comparado com as outras linhagens celular testadas. No presente trabalho, a solamargina demonstrou  $\text{IC}_{50}$  de 12,94  $\mu\text{M}$  e solasonina  $\text{IC}_{50}$  13,68  $\mu\text{M}$  para a linhagem U-343. Para a linhagem MCF-7 a solamargina apresentou  $\text{IC}_{50}$  13,30  $\mu\text{M}$  e solasonina 14,57  $\mu\text{M}$ . Estes resultados mostram que o glicoalcaloides apresentaram atividade anticâncer para dois tipos celulares distintos. Em outro estudo, verificaram que três derivados do glicosídeo solasodina, exibiram forte citotoxicidade contra quatro linhagens celulares tumorais,

sugerindo que esses compostos podem apresentar potente atividade quimioterápica (CUI et al., 2012).

A melhor atividade citotóxica apresentada pela solamargina pode ser devida a porção de açúcar (ramnose) contido nesse glicoalcaloide. Dessa forma, a ramnose pode ter vital importância para a ação terapêutica, pois há descrição na literatura que ocorre interação do glicoalcaloide com o colesterol da membrana plasmática, provocando a perda da integridade da membrana, o que resulta em alterações de permeabilidade e consequentemente provoca a morte celular (SCHWARZ et al., 2005; 2007, KEUKENS et al., 1992; 1995).

Além disso, uma das maiores causas de falhas nos tratamentos convencionais contra o câncer é a múltipla resistência a drogas (MRD). Obstáculo gerado por diferentes mecanismos, tais como o efluxo mediado por transportadores ABC, que dificultam a manutenção intracelular de concentrações letais de drogas hidrofóbicas; a baixa absorção de algumas drogas hidrossolúveis que necessitam de transportadores para adentrarem a célula e o desequilíbrio homeostático (ULLAH, 2008). Esta última disfunção é fruto de eventos que desregulam o ciclo celular normal. Ou seja, determinados tumores são desenvolvidos a partir de células com morte programada reduzida e replicação normal, enquanto outros são gerados pela divisão celular acentuada, mesmo que tais células não tenham a apoptose diminuída (ALBERTS et al., 2010b). Assim, os tumores de maior malignidade são os dotados de ambas as características anti-omeostáticas descritas

A resistência a múltiplas drogas (MDR) está muitas vezes associada com a expressão de P-glicoproteína (P-gp), que transporta o fármaco através de uma bomba de efluxo para o meio extracelular, conferindo assim resistência a drogas para células tumorais (ZUPKÓ et al., 2014). Estudos realizados por Zupkó e colaboradores (2014), confirmaram que a solamargina apresenta atividade citotóxica contra várias linhagens celulares que apresentam fenotipo MDR.

No ensaio de LDH houve diferenças expressivas entre os percentuais de LDH liberado pelas duas drogas testadas. A solamargina foi o glicoalcaloide que apresentou maior porcentagem de liberação de LDH para o citoplasma da célula. Já a solasonina apresentou valores muito baixos de liberação de LDH, não induzindo danos expressivos na membrana na concentração utilizada. Este fato pode ser devido a presença de duas porções de açúcar (ramnose) contido no glicoalcaloide solamargina. Já a solasonina apresenta apenas uma porção de ramnose. Dessa forma, a ramnose pode ter vital importância para a

ação terapêutica, pois sabe-se que ocorre interação do glicoalcaloide com o colesterol da membrana plasmática, provocando a perda da integridade da membrana, o que resulta em alterações de permeabilidade e consequentemente provoca a morte celular (SCHWARZ et al., 2005; 2007, KEUKENS et al., 1992; 1995). Além disso, em um estudo realizado por Sun et al. (2010) foi verificado que a SM é uma toxina de ação mais rápida, pois rompe a membrana celular causando a morte celular.

Em relação a atividade genotóxica dos glicoalcaloides, os resultados revelaram que o índice de dano foi menor para a linhagem 3T3 quando comparado com as células tumorais, mostrando que os glicoalcaloides são mais genotóxicos para células tumorais. Além disso, os compostos apresentaram níveis de danos mais moderados comparados ao tratamento com o controle positivo que apresentou acentuada genotoxicidade para as três linhagens testadas mesmo em baixa concentração (1,38  $\mu\text{M}$ ). O controle celular e o negativo, com reduzido índice de danos, indicaram a viabilidade celular para as linhagens testadas. Levando em consideração que o DNA mitocondrial assim como os fragmentos produzidos durante a apoptose sejam muito pequenos e, portanto, impossíveis de detecção pelo ensaio cometa, não há ainda uma relação bem estabelecida entre a genotoxicidade medida neste ensaio e a resposta biológica direta destes danos, uma vez que informações mais precisas como quebras localizadas das fitas e danos específicos a bases não podem ser determinadas (OLIVE; BANÁTH, 2006; COLLINS, 2008). Embora a indução de genotoxicidade esteja fortemente relacionada à mutagênese e à ação carcinogênica, altos índices de danos ao DNA também estão relacionados com a incapacidade da célula repará-los, levando-a à apoptose (ALBERTS et al., 2010; CAVALCANTI et al., 2008).

Sabe-se que a apoptose se tornou um foco de interesse na oncologia, pois a alteração deste processo pode levar ao surgimento de malignidades (KUO et al., 2000; LI et al., 2014; LIANG et al., 2004). Sabendo da relevante atividade citotóxica dos glicoalcaloides presentes na espécie *S. lycocarpum*, foi de grande interesse avaliar a atividade apoptótica da solamargina e solasonina, frente as linhagens de glioblastoma humano, U-343 MGa e adenocarcinoma mamário, MCF-7 (Figuras 16 e 17, A e B). Estes dados confirmam a hipótese de que a cadeia de açúcares ramnoses são responsáveis pela atividade antitumoral pronunciada da SM, já que esta apresenta duas porções desta cadeia em sua estrutura química. Um dos mecanismos de ação citotóxico desse composto é a indução à apoptose (CHANG et al., 1998; KUO et al., 2000). Além disso, pesquisas de Chang et al 1998, revelam que a porção de 20Rha da SM pode desempenhar um papel crucial no

desencadeamento da morte celular por apoptose. É relatado que o carboidrato ramnose presente nos glicoalcaloides não é encontrado nas células de mamíferos e especula-se a respeito da presença de receptores específicos para a ramnose em células tumorais (SCHWARZ et al., 2005).

Foi observado que os glicoalcaloides apresentam capacidade de influenciar no ciclo celular, pois o perfil do ciclo para os compostos apresentou diferença significativa do controle negativo, e está muito próximo do controle positivo (doxorubicina). Além disso, os tratamentos com os glicoalcaloides SM e SS nas doses de IC<sub>25</sub> e IC<sub>50</sub>, apresentam praticamente o mesmo efeito sob o ciclo celular, o que sugere que os glicoalcaloides não são dose dependentes.

Ademais, os glicoalcaloides conduzem ao acúmulo de células da linhagem MCF-7, na fase G1 do ciclo celular, apresentando uma diminuição significativa de células na fase G2/M. Indicando que há um arraste de células em G1 e poucas conseguiram se dividir. É importante lembrar que nesta fase do ciclo temos um ponto importante de checkpoint. O que pode justificar o fato das células pararem nesta fase ou demorarem mais tempo nesta fase, pois pode ter detectado um problema, que esteja dificultando a transição na fase de síntese das célula para a fase de divisão. Este fato pode ser devido a danos no DNA causados pelos glicoalcaloides como é demonstrado no ensaio Cometa. Com isso, o DNA não passa por sistema de reparo e as células não conseguem se dividir levando-as a morte por apoptose. Pois já foi confirmado pelo ensaio com anexina que os glicoalcaloides proporcionam morte celular por apoptose. As células usadas como controle negativo (sem tratamentos) prosseguiram o ciclo celular normalmente, apresentando maior porcentagem de células na fase S comparado com a porcentagem de células que passaram pelos outros tratamentos nesta mesma fase.

Através da análise dos dados de expressão, sugere-se que a via apoptótica desencadeada pelos tratamentos com os glicoalcaloides solamargina e solasonina, seja a intrínseca (mitocondrial). Uma vez que foi observado a indução de genes característicos desta via, tais como o da proteína adaptadora APAF1 (protease associada à apoptose 1) em 6 horas de tratamento com as duas drogas e o da proteína BAX (*Bcl-2 associated X protein*) no tratamento com solamargina 6 e 24 horas. Além disso, no período de 24 horas de tratamento com os dois glicoalcaloides, houve a maior evidência de indução de apoptose por via intrínseca devido a elevada repressão do gene da Bcl-2.

Um grande número de genes tem sido identificado como capazes de influenciar o

processo da apoptose. Entre eles destaca-se a família das proteínas Bcl-2, que desempenha papel crítico na regulação da apoptose em determinadas condições fisiológicas ou patológicas da célula. Pelo menos 15 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos. Algumas dessas proteínas, como Bcl-2 e Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1 e A1 são antiapoptóticas, enquanto outras, tais como a BAX, Bad e Bid são pró-apoptóticas (PATEL et al., 1998).

Muitos membros dessa família residem na membrana externa da mitocôndria, na membrana nuclear e no retículo endoplasmático. Na mitocôndria, distribuem-se principalmente, nos locais de contato entre a membrana interna e externa (JELÍNEK et al., 2013; KIM et al., 2013).

Conforme inicialmente observado pelo ensaio de citometria de fluxo e, posteriormente, confirmado pela expressão gênica por ensaio de *PCR array*, a indução de genes pró-apoptóticos (BAX e APAF1), pertencentes à família da proteína Bcl-2, em conjunto com a inibição do próprio gene pró-sobrevivência Bcl-2, são suficientes para sugerir que a indução de apoptose ocorre por via intrínseca, uma vez que a ativação dessa via é decorrente da interação entre tais proteína (CZABOTAR et al., 2014, TAIT; GREEN, 2010). Entretanto, além da modulação dos genes cruciais da via apoptótica intrínseca descritos (BAX, APAF1 e Bcl-2), houve modulação de caspase-2, que também contribui para o processo de apoptose.

Basicamente, o processo de morte celular por apoptose, ocorre quando o citocromo C (componente da cadeia transportadora de elétrons), uma proteína da mitocôndria localizada entre a membrana externa e a interna da organela, é externalizado no citosol à medida em que há perda de potencial mitocondrial através da aglomeração de BAX ou BAK1 na membrana externa. Esta homooligomerização de proteínas pró-apoptóticas efetoras na membrana externa é estimulada pela perda da Bcl-2 na superfície da mitocôndria, devido aos sinais apoptóticos (MITCHELL et al., 2006). Conseqüentemente, o citocromo C se liga à APAF1, alterando a conformação desta protease a heptâmero. Então, a APAF1, como adaptadora, expõe seus domínios CARD (*Caspase recruitment domains*) e recruta várias pró-caspases- 9. Com a formação deste complexo, o apoptossomo, as pró-caspases 3 e 7 são ativadas por “proximidade induzida” e iniciam a cascata das caspases iniciadoras e efetoras para clivagem do citoesqueleto e matriz extracelular, e fragmentação do DNA (ALBERTS et al., 2010a, MARIÑO et al., 2014). A caspase-3 pode amplificar a cascata de proteólise pela ativação da caspase-8 e pela clivagem da proteína anti-apoptótica Bcl-2

que, normalmente, garante a integridade da membrana mitocondrial (KAPLOWITZ et al., 2000, PATEL et al., 1998).

Para a manutenção da integridade celular é necessário que os componentes pró-apoptóticos, presentes no interior da mitocôndria, não sejam liberados para o citosol. Existe na membrana mitocondrial interna uma estrutura protéica chamada poro de transição de permeabilidade mitocondrial ("mitochondrial permeability transition pore", MPTP), que se mantém habitualmente fechado, assegurando a sobrevivência celular. Seu fechamento é facilitado pelo magnésio intracelular, pelo potencial elevado da membrana mitocôndria, pela expressão das proteínas Bcl-2 e Bcl-XL, pela maior expressão da superóxido dismutase mitocondrial, rica em manganês, que atua como removedora de radicais superóxido, e pela translocação nuclear do fator nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) (ZONG et al., 2006). Fato este, pode ter ocorrido no tratamentos por 6 horas com as duas substâncias, já que houve a indução do gene pró-sobrevivência (Bcl-2) em conjunto com a repressão de genes Bcl-2 pró-apoptóticos (BAX e APAF1), fazendo com que o processo de apoptose seja dificultado. Tal fenômeno de indução de Bcl-2 e inibição de BAX e APAF1, está supostamente relacionado a um mecanismo de defesa oncológico para evitar a morte celular durante as primeiras horas de exposição às drogas (ZONG et al., 2006). Além disso, foi observado no mesmo período de tratamento, para ambas as substâncias, grande inibição de outro gene efetor essencial a apoptose, o BAK1. No entanto, o mesmo não foi modulado em um tempo maior de exposição a droga (24 horas).

Ademais, o gene pró-apoptótico AIFM1 e o oncogene AKT1 foram negativamente modulados pelas substâncias, principalmente o gene AKT1 foi mais reprimido em 24 horas de tratamento. Os genes antiapoptóticos IGF1R, BIRC3, BFAR e BRAF foram induzidos pela solamargina (6 e 24 horas) e reprimidos pela solasonina principalmente no tratamento de 24 horas, somente o BIRC3 (proteína cIAP2), foi expresso neste período.

Por outro lado, o inibidor de caspase XIAP e CASP2 (caspase-2) foram induzidos somente pela solamargina no período de tratamento de 24 horas. Entretanto, esses genes não foram modulados pelo tratamento com solasonina em nenhum dos dois tempos de tratamento. Esse dado sugere uma resposta celular diferencial entre o tratamento com os dois tipos de alcaloides.

Analisando a tabela 6, podemos observar uma melhor modulação dos principais genes descritos (BAX, APAF1 e Bcl-2) para o tratamento de 24 horas com a solamargina. Dessa forma, podemos sugerir que o citocromo c foi liberado da mitocôndria em

consequência da repressão de Bcl-2 e da indução de genes como o da BAX, CASP2, BIRC3 e APAF1 (XIONG et al., 2014). Somado a isto, o aumento de *fold regulation* da APAF1 também aponta para a presença de apoptose dependente de caspases.

A apoptose pode ser ativada por várias vias de estímulos, desde externos, através de receptores específicos na superfície celular chamados receptores da morte ou por estímulos internos de estresse intracelular, tais como lesão do DNA, perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas. Essas diferentes vias culminam com a ativação de proteases conhecidas como caspases, que são fundamentais no processo de morte celular. As caspases, pertencem à família das cisteínas proteases, (possuem uma cisteína no sítio ativo), que têm a capacidade de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (NICHOLSON et al., 1997). Pelo menos 14 membros dessa família já foram identificados nos mamíferos sendo que seis (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10) estão envolvidos no processo de inflamação e apoptose. As caspases -1, -4, -5, -11, -12, -13, -14 estão envolvidas na maturação de citocinas (DENAULT et al., 2002). As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolipídios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos (BOATRRIGHT et al., 2003).

Sabe-se que na linhagem celular MCF-7, a morte celular é independente da caspase 3. Como discutido por Janicke et al. (2009), a falta desta enzima na referida linhagem celular é devida a uma deleção de 47 pares de base no éxon 3 do gene, o que ocasiona um *splicing* em que este éxon é ignorado e um *stop códon* é introduzido em uma posição prematura do mRNA, impossibilitando a sua tradução.

As caspases são sintetizadas como precursores inativos denominados zimogênios (HENGARTNER et al., 2000). Uma vez ativada, através de sinal de morte celular, a maioria das caspases tem a habilidade de catalizar a ativação de múltiplos outros membros dessa família, resultando em amplificação da cascata proteolítica. Essas enzimas podem interagir com receptores de membrana ou moléculas adaptadoras que contenham domínios de morte (BOATRRIGHT et al., 2003), pois esses domínios também existem nas caspases e a presença deles permite essa interação (NICHOLSON et al., 1997).

As caspases podem ser classificadas de acordo com seu pró-domínio e seu papel na apoptose. Caspases iniciadoras possuem pró-domínios longos, envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, responsáveis pela clivagem de substratos (RUPNARAIN et al., 2004).

Entre os diversos substratos das caspases, pode-se citar a MDM-2 (murine double minute), uma proteína que se liga à p53, mantendo-a no citoplasma. Ao ser clivada pelas caspases, essa proteína libera a p53 que se transloca para o núcleo, ativando a transcrição de genes pró-apoptóticos como o BAX (SCHULER et al., 2003).

Ademais, os sinais de danos ao DNA da via intrínseca podem primeiramente levar à ativação de caspase-2, que também pode clivar Bid e levar a translocação do gene Bcl-2, membro da família citoplasmática Bax para a mitocôndria, acelerando assim a apoptose (GUO et al., 2002, LASSUS et al., 2002). Além disso, a liberação do citocromo C para o citoplasma é um evento comum após a despolarização mitocondrial, e vários estudos tem relatado que a ativação de caspase-2 está relacionada com esse mecanismo (KIM et al., 2013).

Além disso, o inibidor de caspase XIAP, também foi modulados positivamente pela solamargina no período de tratamento de 24 horas. IAPs são uma classe de proteínas, predominantemente conhecidos pela ação de inibir as caspases e de sinalização imune (LI et al., 2013). De todos os IAP, o XIAP de mamífero é o único que funciona como um inibidor direto da caspase, já os IAPs: DIAP1, DIAP2, cIAP1 e cIAP2, são ineficazes na inibição *in vitro* das caspases (OBEROI-KHANUJA et al., 2013). Dos genes descritos como IAPs (BIRC2, BIRC3 e XIAP), o único que codifica uma proteína capaz de inibir diretamente as caspases 3, 7 e 9 é o XIAP (GYRD-HANSEN; MEIER, 2010). Contudo, dos três, a maior indução exercida pelos tratamentos, foi a do BIRC3 (proteína cIAP2), cuja função é inibir a sinalização pró-apoptótica do fator TNF- $\alpha$ , além de regular as vias pró-sobrevivência de NF $\kappa$ B (fator de transcrição de genes antiapoptóticos, interleucinas e fatores de crescimento). IAPs são diferencialmente expressos em células tumorais e têm sido alvo de vários terapêutica para a inibição do câncer. A expressão elevada de IAPs em certos tipos de tumor, tem sido correlacionada com a sobrevivência do tumor e resistência à quimioterapia. Assim, uma variedade de anti-tumorais, especialmente inibidores de pequenas moléculas contra IAPs (compostos IAP antagonista (IAC), estão sendo testados clinicamente. A super expressão de XIAP, inibe de forma eficiente a ativação da caspase e assim, a apoptose não estimulada pelas vias de apoptose intrínseca e extrínseca (WILKINSON et al., 2004). Por outro lado, as células que não possuem XIAP são sensibilizados morte por apoptose (GYRD-HANSEN; MEIER, 2010). As células cancerosas podem se propagar em condições adversas, como a limitação de nutrientes, a hipóxia, a desregulamentação oncogene, danos ao DNA e aberrações cromossômicas,



circunstâncias que desencadeiam a ativação de caspase e apoptose em células normais. As IAPs parecem ter um papel crucial na manutenção de tumores e resistência a tratamentos de quimioterapia, embora a expressão de IAP em si própria não é claramente o único fator determinante que aumenta o limiar apoptótico. XIAP pode ligar diretamente e inibir a caspase-3, caspase -7 e caspase -9. Resíduos na região ligante entre o domínio de XIAP ligam BIR1 e BIR2 para o bolso sítio ativo da caspase -3 e caspase -7 (GYRD-HANSEN; MEIER, 2010).

Em outro trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa em que se analisou a modulação de expressão gênica por *PCR array* da linhagem MCF-7 submetidas ao tratamento com o flavonoide chalcona foi observado maior modulação de genes relacionados à via mitocondrial, mas não foi detectada indução de expressão de caspases quando tratados com esse composto. Porém no presente trabalho quando as células MCF-7 foram tratadas com glicoalcaloides foi observado a indução de caspase-2. Além disso, tanto nos estudos com chalconas, quanto nos com glicoalcaloides foi observado, repressão de Bcl-2 e indução de genes pró-apoptóticos, indicando apoptose por via mitocondrial.

Relacionando os experimentos de citotoxicidade, genotoxicidade, citometria de fluxo e expressão gênica com a linhagem MCF-7, especula-se que a solamargina e a solasonina são citotóxicas e provocam danos relevantes no DNA, dois fatores que podem estar relacionados com seu efeito de arraste do ciclo celular em G1, externalização de fosfatidilserina, indução de genes pró-apoptóticos e repressão de Bcl-2, o que sugeriu morte celular por apoptose por via intrínseca.

### **7.3 Atividade antifúngica**

Em relação a atividade antifúngica dos compostos testados, é possível notar, que os compostos solamargina e  $\alpha$ -solanina apresentaram atividade antifúngica muito mais pronunciada que a solasonina. Além disso, foi obtido o mesmo CIM para a linhagem H6 e mutante de *T. rubrum* com o gene que codifica um transportador ABC deletado, demonstrando que esses compostos não são transportados pela a bomba de efluxo. A solasonina apresentou o dobro do valor de CIM para a linhagem H6 comparado com a linhagem mutante, indicando assim que este composto é transportado pela bomba de efluxo. Esses resultados corroboram com os relatados por PINTO et al. (2011) confirmando tal atividade contra diversos fungos filamentosos e leveduriformes. Além disso, foi realizado o teste de determinação da concentração fungicida mínima (CFM) dos

compostos naturais. Estes resultados mostram que os alcaloides solamargina e  $\alpha$ -solanina são os compostos que apresentaram melhores resultados antifúngicos para o fungo *T. rubrum*, sendo interessante estudos do mecanismo de ação antifúngico destes alcaloides, além da relação estrutura atividade. É sabido que os antifúngicos de uso comum apresentam um número limitado de alvos celulares, como o ergosterol e as enzimas envolvidas na sua síntese, a síntese de ácidos nucleicos e da parede celular e a formação de microtúbulos.

O teste de regeneração de protoplasto é um método para verificar se o composto testado atua na membrana celular, deste modo sendo utilizado para estudar mecanismo de ação antifúngica. Este método consiste na degradação da parede celular do fungo ou seja deixando-o desprovido de parede celular para saber se os compostos naturais agem na membrana celular do fungo.

Os resultados indicaram que os glicoalcaloides solamargina, solasonina e  $\alpha$ -solanina supostamente não atuam na membrana da linhagem selvagem de *T. rubrum*, pois não reduziram o número de colônias regeneradas na linhagem e também não causou redução no tamanho das colônias comparado com o controle negativo. Já o controle positivo utilizado (anfotericina-B) apresentou inibição total de protoplasto. Estes dados, confirmam os dados na literatura que descrevem a anfotericina como sendo uma droga tendo como alvo antifúngico a membrana celular, interferindo na síntese do ergosterol, um importante componente de membrana (DOGRA; SAXENA, 1996) (Figura 20; 21 e Tabela 8).

Segundo Fewell et al., (1994), os glicoalcaloides perdem a atividade antifúngica quando em meio com pH entre 5 a 8, assim foram realizados novos ensaios de regeneração de protoplastos em meio com pH 9,0 para verificar se o pH influencia na regeneração dos protoplastos. Os resultados apresentados na figura 20; 21 e tabela 8, indicaram que não houve redução no número de colônias regeneradas comparado com o controle, mas o tamanho das colônias foi menor em pH 9,0. Levando em consideração que no estudo de Fewell et al., (1994), os alcaloides foram testados contra fungos do ambiente (*Phoma medicaginis* e *Rhizoctonia solani*) e no presente estudo estão sendo ensaiados com dermatófitos, podendo explicar a diferença de inibição dos alcalóides em *T. rubrum*.

Sabe-se que os antifúngicos de uso comum apresentam um número limitado de alvos celulares, como o ergosterol e as enzimas envolvidas na sua síntese, a síntese de ácidos nucleicos e da parede celular e a formação de microtúbulos.

A literatura tem demonstrado que um dos principais modos de ação antifúngico de

glicoalcalóides é através da alteração da integridade da membrana celular através da ligação com os grupos 3 beta-hidróxi esteróis, causando um aumento da permeabilidade da membrana, formação de poros e consequente rompimento e perda da integridade celular (KEUKENS *et al.*, 1995).

Outros mecanismos de ação são relatados para os dois importantes glicoalcalóides oriundos da batata como a  $\alpha$ -Solanina e chacoquina, que possuem atividade antifúngica através da inibição da germinação, inibição da extensão e espessura das hifas (FEWELL; RODDICK, 1997). Da mesma forma, BEAMAN-MBAYA e MUHAMMED (1976) verificaram que o extrato rico em glicoalcalóides provocava distorção das hifas e inibição quase total da esporulação. Dados que sugerem que estes compostos possam atuar inibindo a biossíntese de compostos essenciais, ou podem até mesmo agir como antimetabólitos (FEWELL; RODDICK, 1997).

Em um trabalho desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa, foi verificado que em experimentos de regeneração de protoplastos, a quercetina não reduziu o número de colônias regeneradas na linhagem selvagem do fungo *T. rubrum* denominada H6, mas causou redução no tamanho das colônias e, na linhagem mutante  $\Delta$ TruMDR2 provocou redução no tamanho das colônias regeneradas. Em contraste, a trans-chalcona na concentração de  $\frac{1}{2}$  CIM interferiu significativamente na regeneração dos protoplastos nas duas linhagens, o que é um indício que este composto atua na membrana celular (BITENCOURT *et al.*, 2013).

Além disso, outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa avaliou a resposta na expressão de genes de *Trichophyton rubrum* durante o co-cultivado em queratinócitos humanos exposto ao glicoalcalóide comercial  $\alpha$ -solanina, extraído da batata. Foi observado que a  $\alpha$ -solanina, reprimiu os genes envolvidos na síntese de ergosterol (ERG1 e ERG11), além de reprimir o gene MEP4 que codificam metaloprotease, e o gene TruMDR2 envolvido na resistência a múltiplas drogas. Estes resultados contribuem para uma melhor compreensão das interações fungo-hospedeiro e para a descoberta de novos alvos antifúngicos (KOMOTO *et al.*, 2015).

## 8. CONCLUSÃO

A extração ácido-base nos frutos de *S. lycocarpum* foi eficiente e demonstrou-se seletiva para os compostos de interesse os quais, após cromatografia de camada delgada preparativa, seguido de cromatografia preparativa em CLAE, foi possível isolar e obter os compostos SS e SM;

Os ensaios de citotoxicidade demonstraram que a solamargina é mais citotóxica para as linhagens tumorais (U-343 e MCF-7) e menos citotóxica para linhagem sadia (3T3);

Além disso, através do ensaio de LDH, a solamargina interagiu com a membrana causando dano a membrana celular nas duas linhagens tumorais, já a solasonina não apresentou esse efeito;

Em relação à genotoxicidade, os glicoalcaloides SM e SS demonstraram maior genotoxicidade para células tumorais U-343 e MCF-7 que para a linhagem normal 3T3;

A solamargina induziu a apoptose em 80% das células da linhagem MCF7 e 52% da linhagem U-343;

Os glicoalcaloides induzem genes pró-apoptóticos da via intrínseca, mitocondrial em células da linhagem MCF-7;

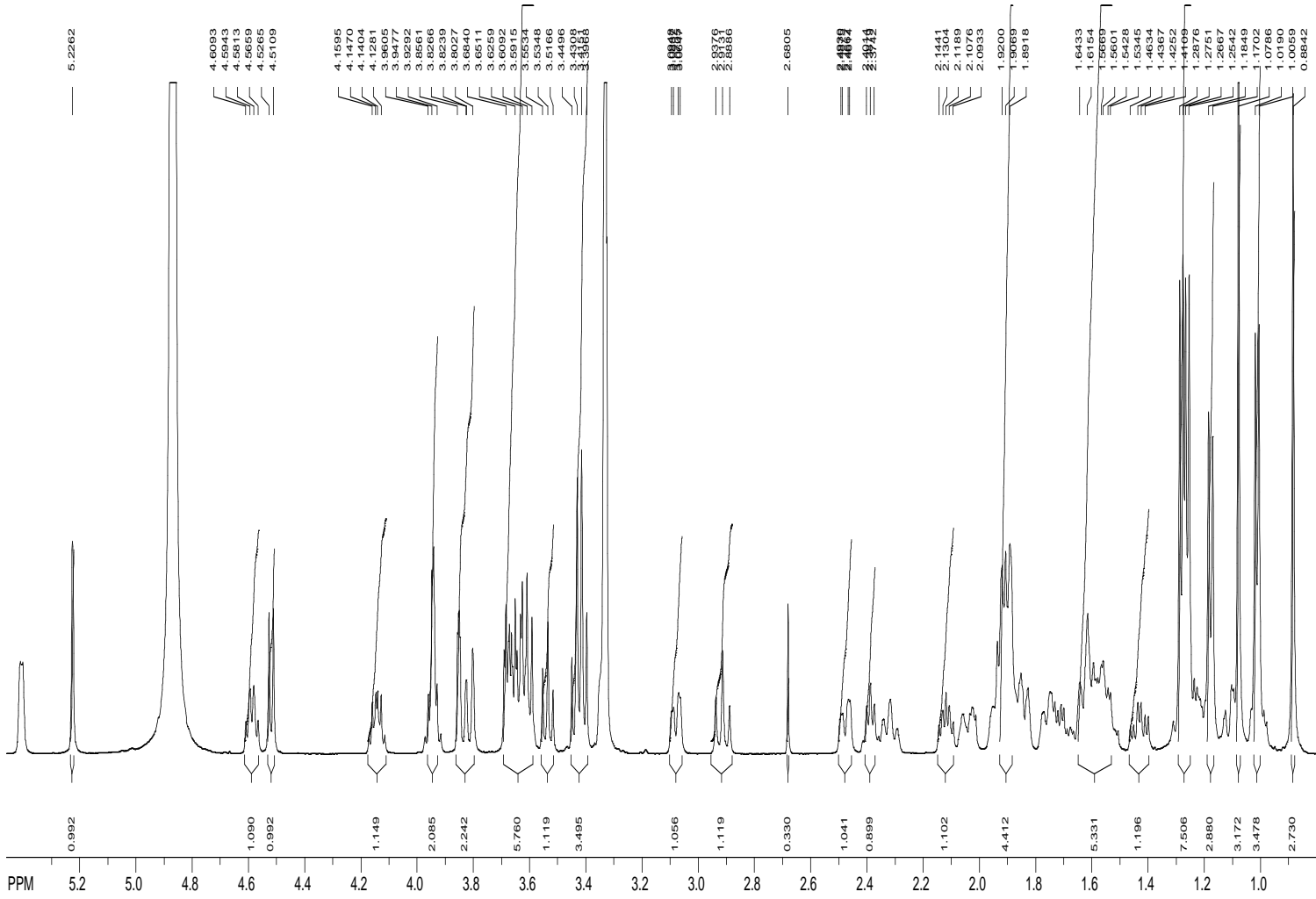
Os glicoalcaloides proporcionam arraste na fase G1 do ciclo celular em células da linhagem MCF-7;

O extrato alcaloídico, SM, SS e SN apresentaram atividade antifúngica contra os fungos dermatófitos H6 e mutante, sendo que SM e SN foram as substância com maior atividade. Por outro lado, SD, a aglicona, não apresentou atividade para os fungo testadas, o que destaca a importância das cadeias de açúcares para atividade antifúngica destes compostos;

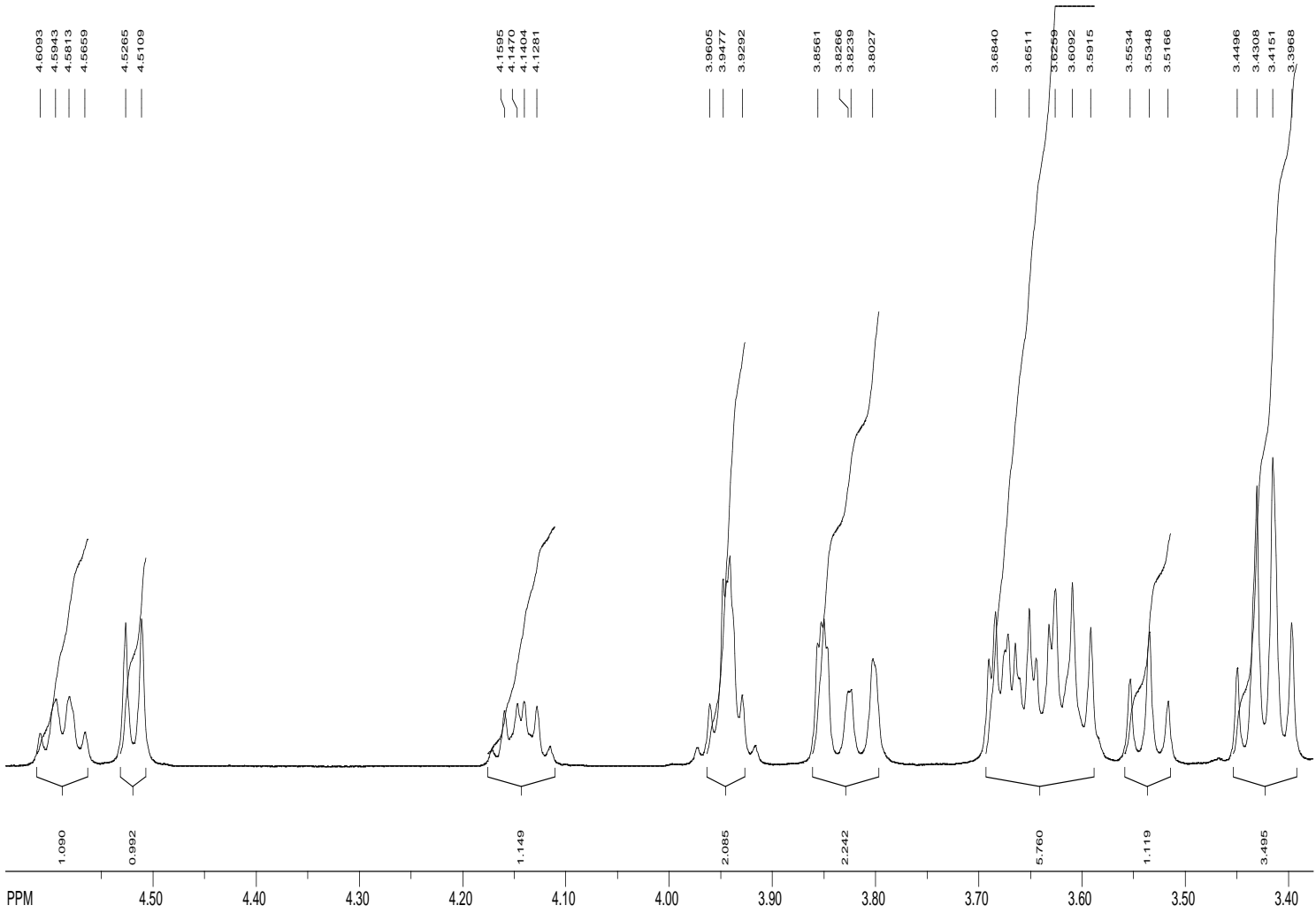
Para os ensaios de protoplastos foi possível verificar que os glicoalcaloides solamargina, solasonina e  $\alpha$ -solanina supostamente não atuam na membrana da linhagem selvagem de *T. rubrum*;

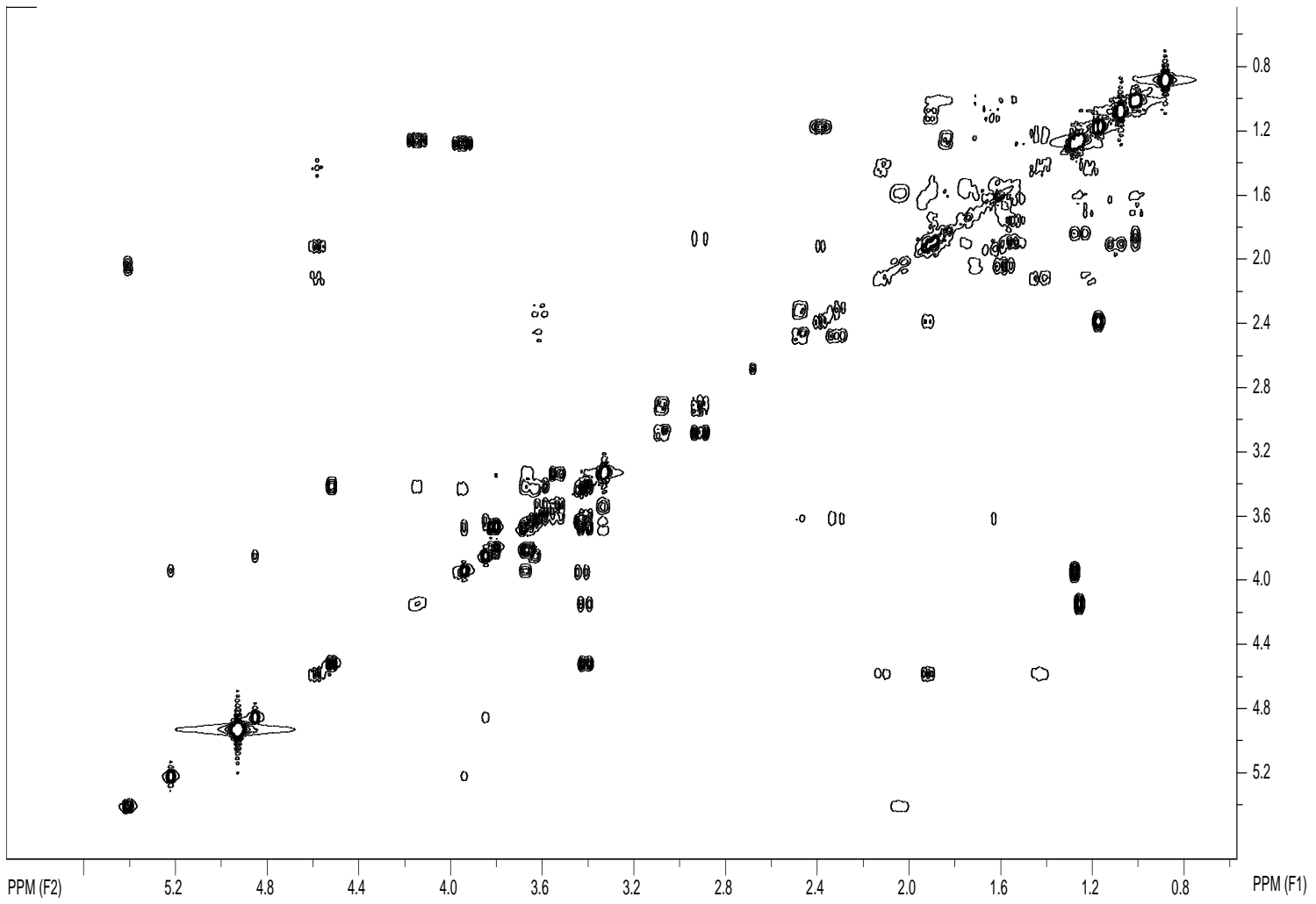
Para os ensaios de redução de ergosterol foi possível afirmar que os glicoalcaloides  $\alpha$ -solanina e solamargina apresentaram maior redução no nível de ergosterol comparado com a solasonina. Demonstrando que os glicoalcaloides interferem na via da biossíntese de ergosterol.

## 9. APÊNDICES

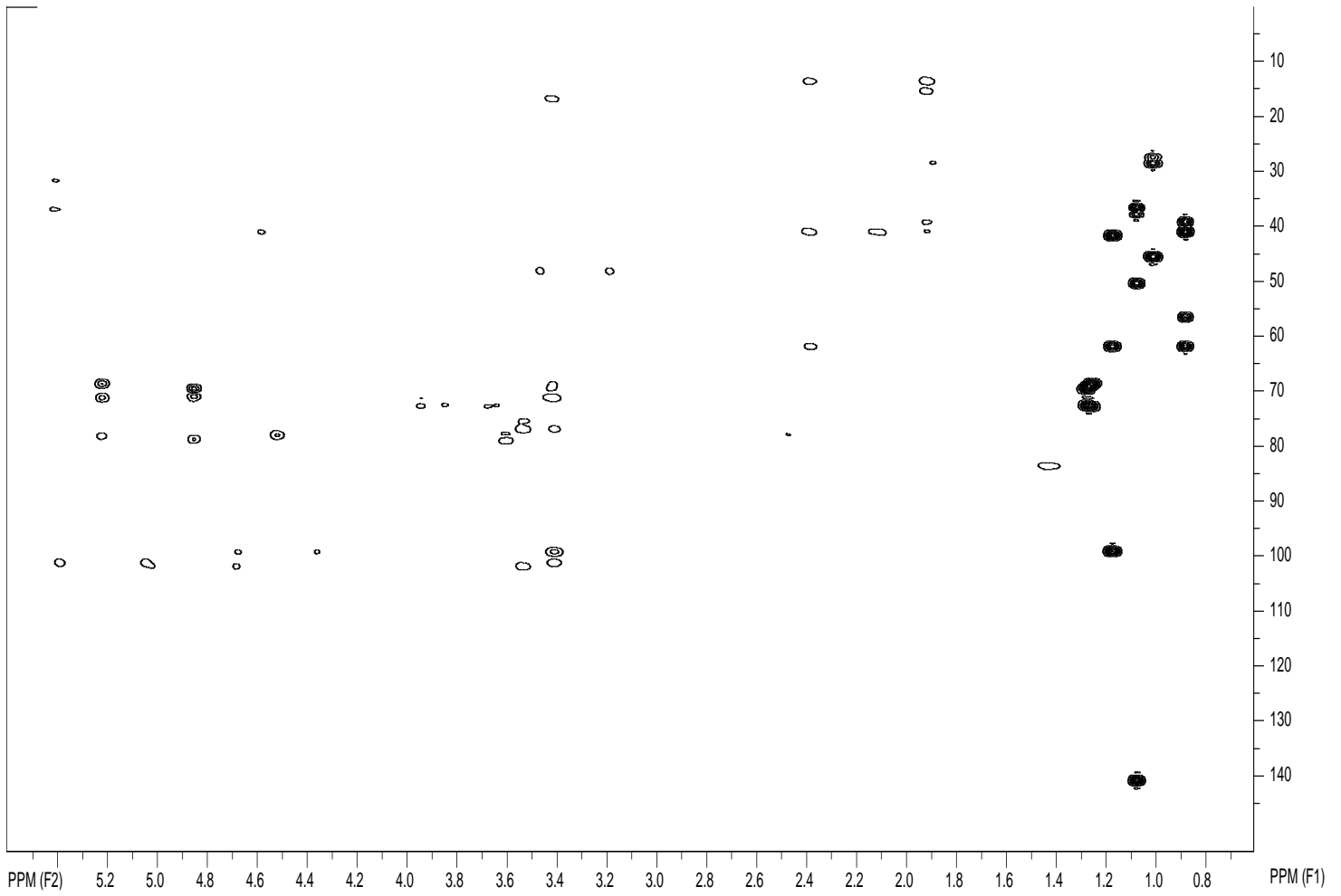
Apêndice 1. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) da solasonina

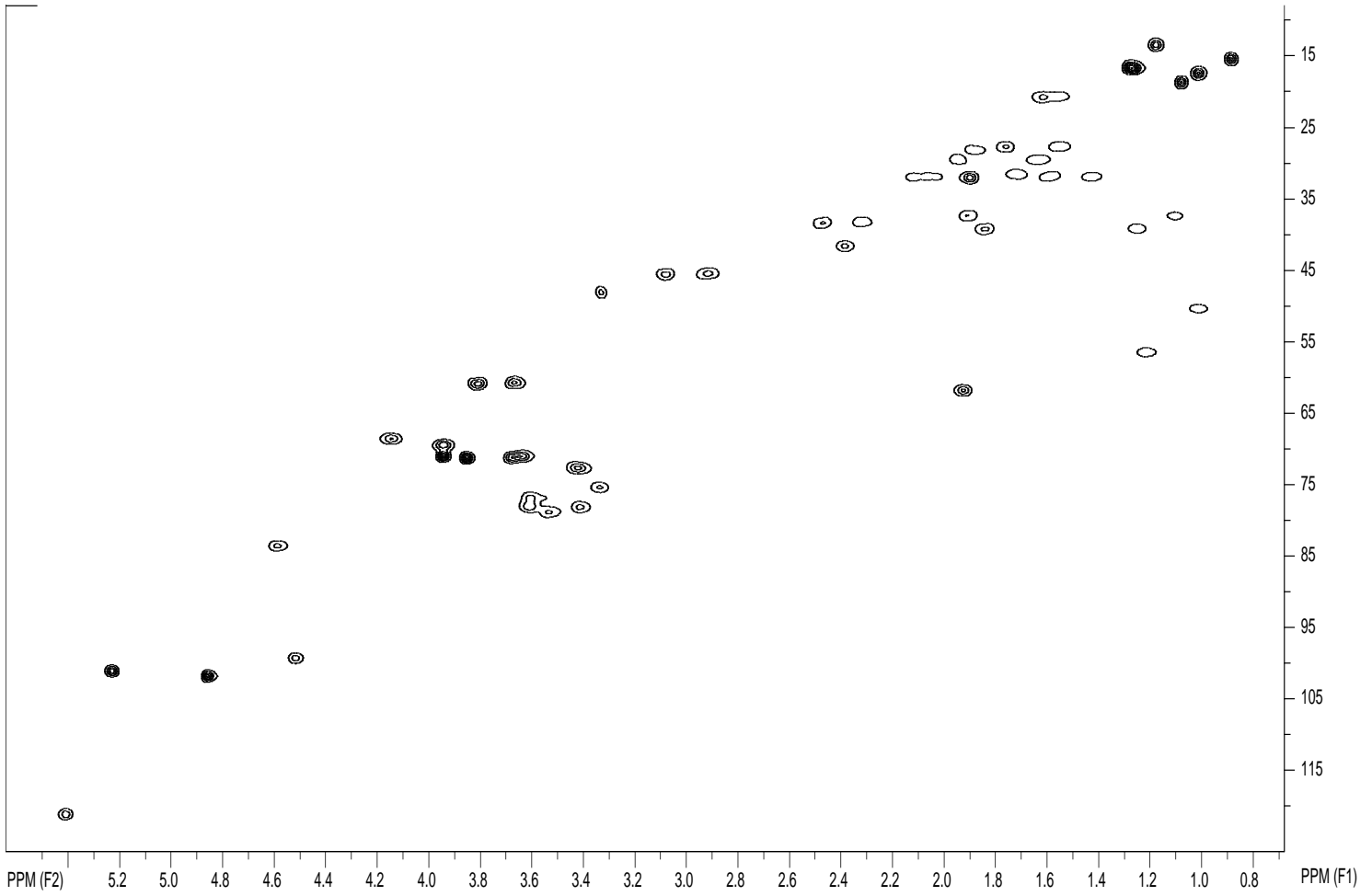
**Apêndice 2.** Expansão da região correspondente aos açúcares do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) da solasonina



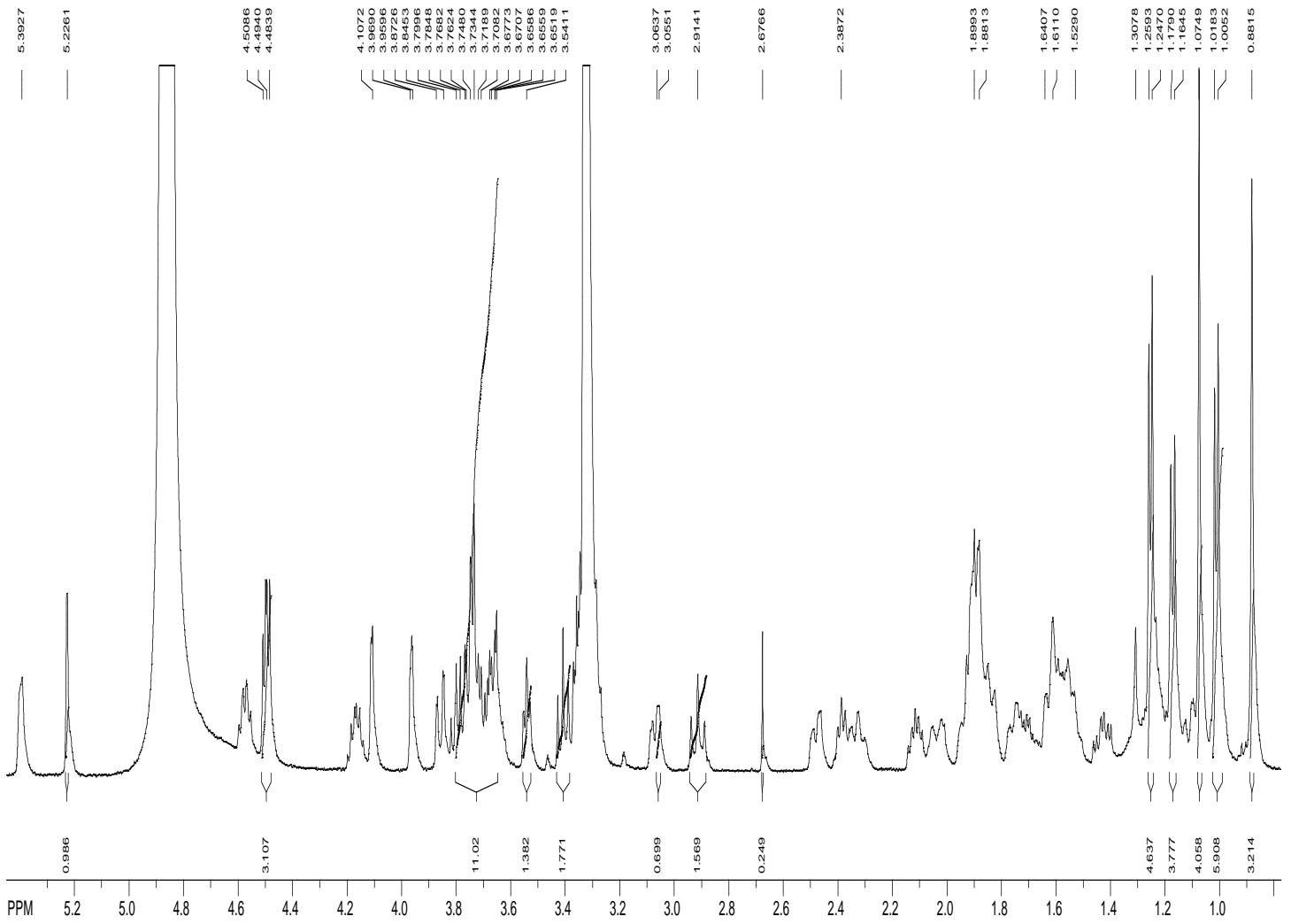
**Apêndice 3.** Mapa de contorno de COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) da solasonina



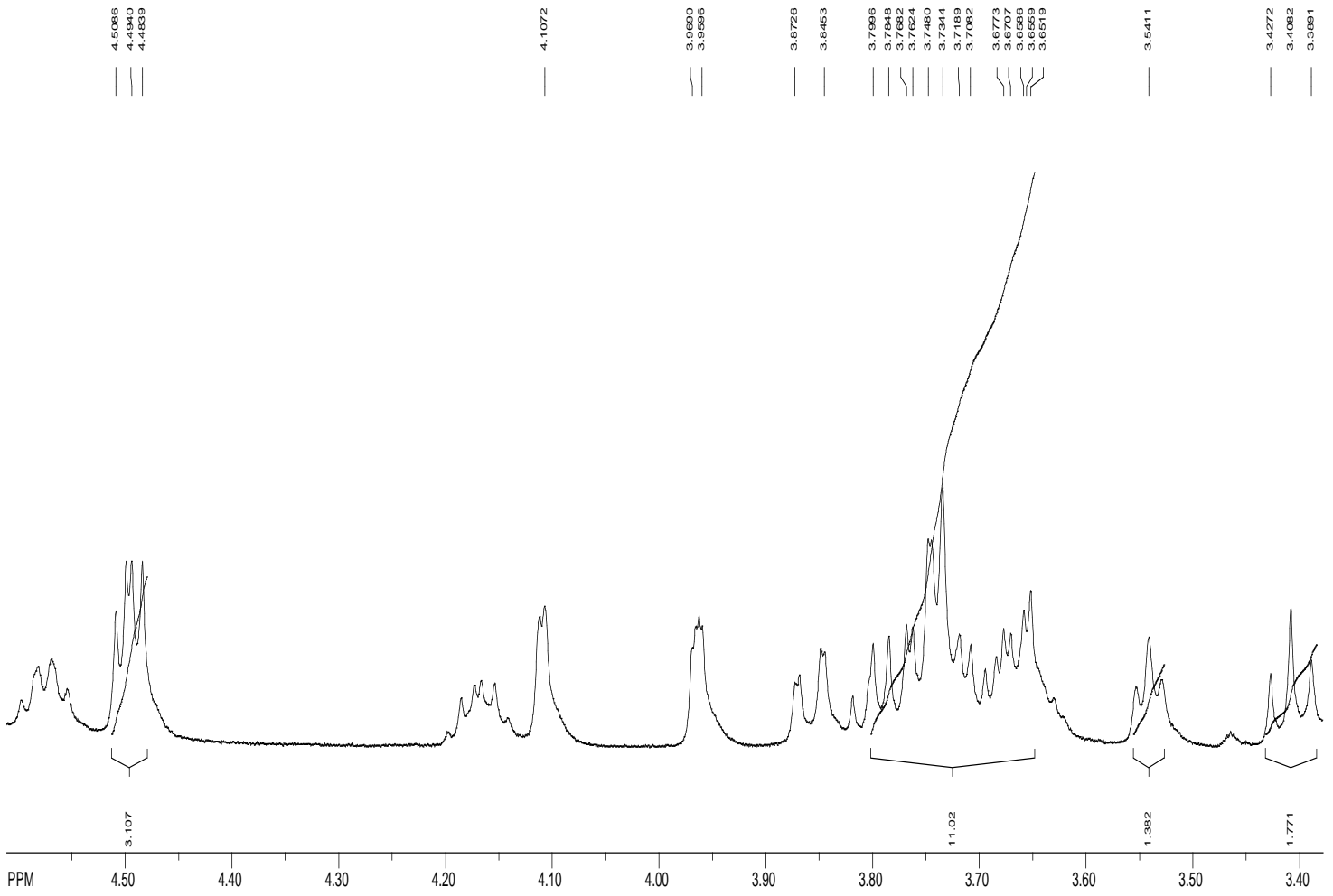
**Apêndice 4.** Mapa de contorno de HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) da solasonina

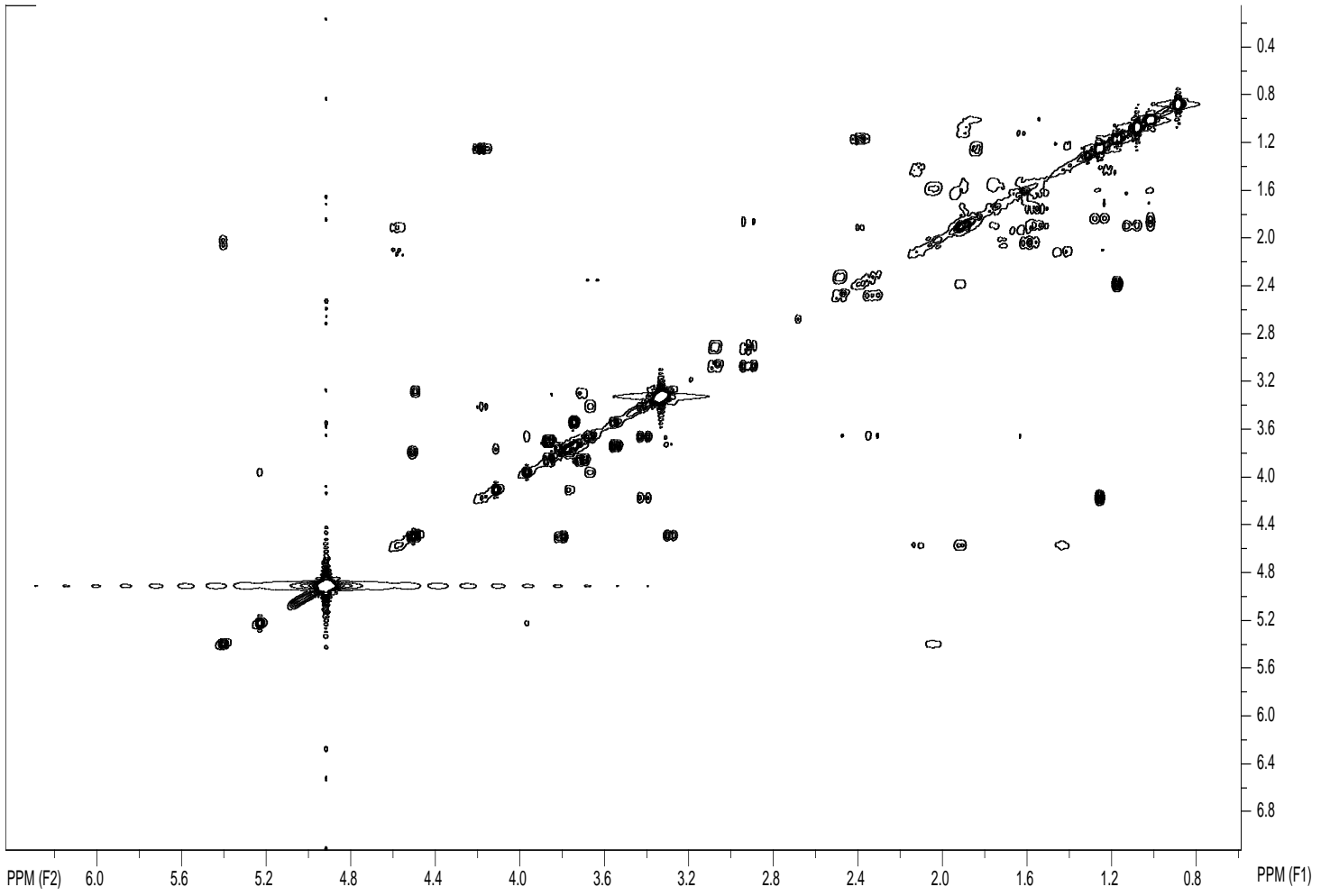
**Apêndice 5.** Mapa de contorno de HMQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) da solasonina

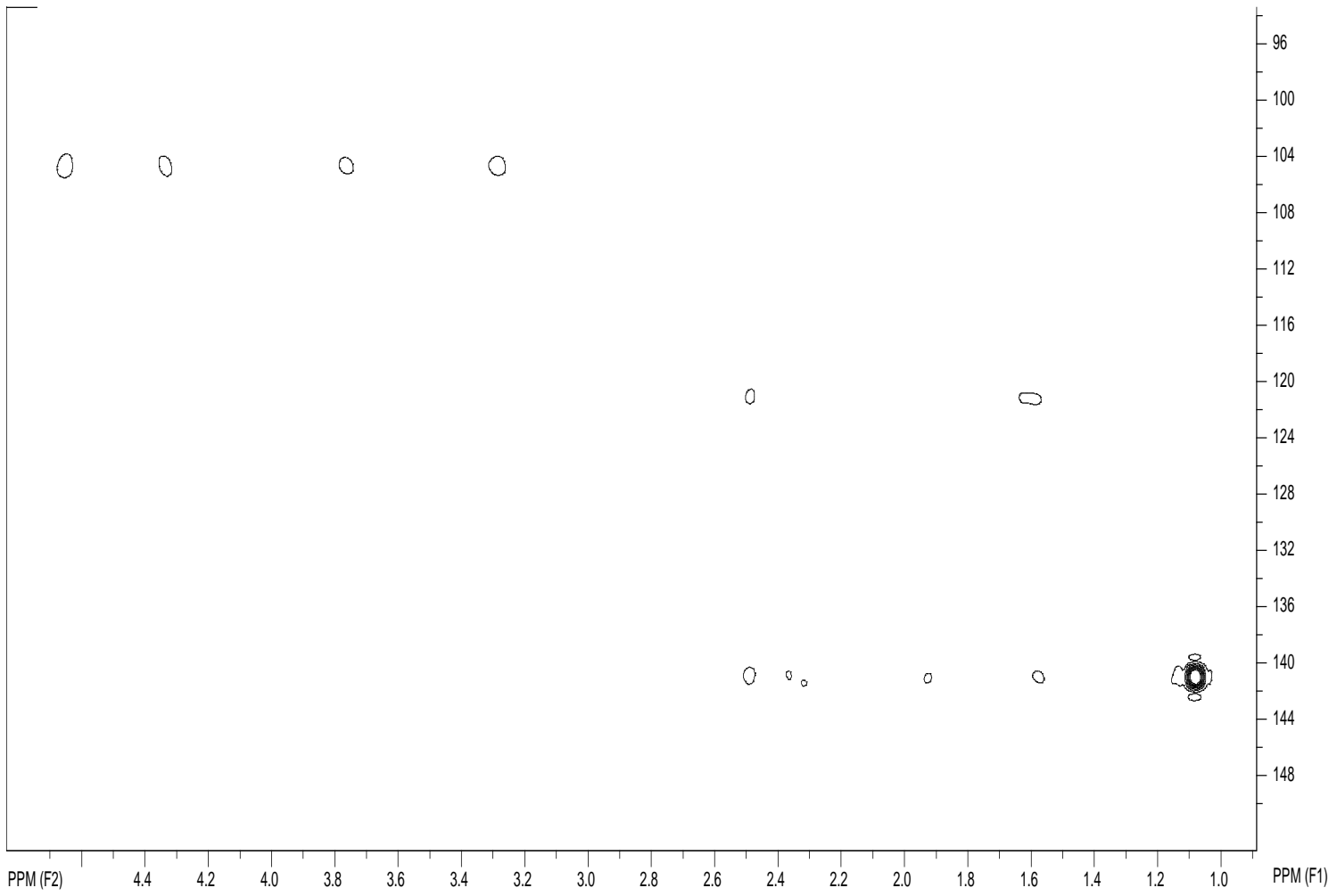
**Apêndice 6.** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) da solamargina.

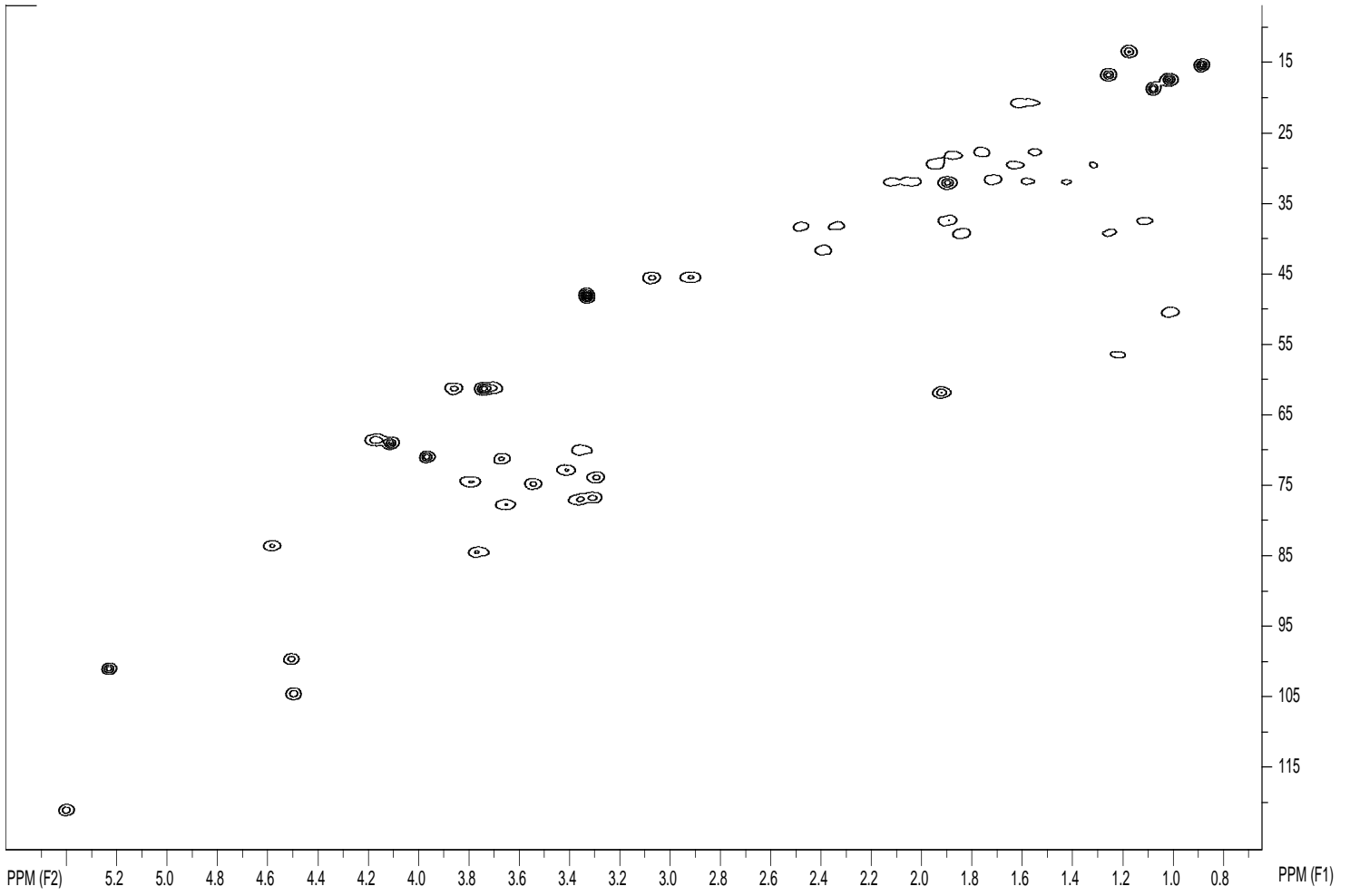


**Apêndice 7.** Expansão da região correspondente aos açúcares do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) da solamargina.



**Apêndice 8.** Mapa de contorno de COSY ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) da solamargina

**Apêndice 9.** Mapa de contorno de HMBC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) da solamargina

**Apêndice 10.** Mapa de contorno de HMQC ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500MHz) da solamargina

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU, M. M.; LEMOS, M.; ALVES, C. K.; RODENBURG, D.; DEWEY, M. J.; RADWAN, M.M.; FURTADO, N. A.; KENUPP, B. J. Gastroprotective activity of the hydroethanolic extract and isolated compounds from the leaves of *Solanum cernuum* Vell. **J Ethnopharmacol**, 06.047, 2015.
2. ABREU, M. M.; TIOSSI, R.F.; DA SILVA, M.R.; RODRIGUES, K.C.; KUEHN, C.C.; RODRIGUES, L.G O.; ALBUQUERQUE, S.; MCCHESENEY, J.D.; LEZAMA-DAVILA, C.M.; ISAAC-MARQUEZ, A.P.; KENUPP, J. B. In vitro leishmanicidal and cytotoxic activities of the glycoalkaloids from *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) fruits. **Chem Biodivers**,10(4):642-8, 2013.
3. ACHTERMAN, R. R.; WHITE, T. C. A foot in the door for dermatophyte research. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 3, p. e1002564, 2012.
4. ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, February 26; 26(9): 1324–1337, 2007.
5. AGRA, M. F. New Species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. **Novon**, b.9. v.292, 1999.
6. ALBERTS, Bruce et al. Apoptose. In: ALBERTS, Bruce et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. [S.l]: Artmed, 2010. Cap. 18. p. 1115-1129. Traduzido por Ana Letícia de Souza Vanz et al.
7. ALBERTS, Bruce et al. Câncer. In: ALBERTS, Bruce et al. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. [S.l]: Artmed, 2010. Cap. 20. p. 1205-1268. Traduzido por Ana Letícia de Souza Vanz et al.
8. AMIR, M.; KUMAR, S. Possible Industrial applications of genus *Solanum* in twenty first century: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**, v. 63, n. 2, p 116-124, 2004.



9. ANAMPA, J.; MAKOWER, D.; SPARANO, J. A. Progress in adjuvante chemotherapy for breast câncer: na overview. **BMC Medicine**, 13:195, 2015.
10. ANDALOUSSI-SAGHIR, K.; OUKABLI, M.; EL MARJANY, M.; SIFAT, H.; HADADI, K.; MANSOURI, H. Secondary gliosarcoma after the treatment of primary glioblastoma multiforme. **N Am J Med Sci**, 3:527–30, 2011.
11. ANWIKAR, S.; BHITRE, M. Study of synergistic anti-inflammatory activity of *Solanum xanthocarpum* Schrad and Wendl and *Cassia fistula* Linn. **Int J Ayurved**, Res 3: 167–171, 2012.
12. ARTHINGTON-SKAGGS, B.A.; JRADI, H.; DESAI, T.; MORRISON, C.J. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. **J Clin Microbiol**, 37(10):3332–3337, 1999.
13. BALOGUN, O. D.; FORMENTI, S. C. Locally advanced breast cancer- strategies for developing nations. **Frontiers in Oncology**, v.5, 89, 2015.
14. BAHGAT, A.; ABDEL-AZIZ, H.; RAAFAT, M.; MAHIDY, A.; EL-KIHATIB, A. S.; et al. *Solanum indicum* ssp. *distichum* extract is effective against L-NAME-induced hypertension in rats. **Fundam Clin Pharmacol**, 6: 693–699, 2008.
15. BALTAZAR, L.M.; RAY, A.; SANTOS, D. A.; CISALPINO, P. S.; FRIEDMAN, A. J.; NOSANCHUK, J. D. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 202, 2015.
16. BERG, J.W.; HUTTER, R.V. Breast cancer. **Cancer**, 75(S1):257–269, 1995.
17. BINDER-FOUCARD, F.; BOSSARD, N.; DELAFOSSE, P.; BELOT, A.; WORONOFF, A.S.; REMONTET, L. Incidence and mortality of cancer in France during the period 1980–2012: solid tumors. **J Epidemiol Publ Health**, 62(2):95–108, 2013.
18. BOATRRIGHT, K.M.; SALVESEN, G.S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol**, 15:725-31, 2003.

19. BORGER, S. M.; DEGREEF, H.; CAUWENBERGH, G. Fungal infections of the skin: infection process and antimycotic therapy. **Curr Drug Targets**, v. 6, p. 849–862, 2005.
20. BLANKEMEYER, J. T.; MCWILLIAMS, M. L.; RAYBURN, J. R.; WEISSENBERG, M.; FRIEDMAN, M. Developmental Toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food and Chemical Toxicology**, v.3, n.5, p. 383-389, 1998.
21. BRANDÃO, Hugo N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000600026&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000600026&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 28 Abr. 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000600026>.
22. BRIANI, D. C.; GUIMARÃES JUNIOR, P. Predação das sementes e frutos de *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) danos em roedores, no Brasil Central. **Acta oecologica**, v. 31, p. 8-12, 2007.
23. BURMESTER, A, et al. Comparative and functional genomics provide insights into the pathogenicity of dermatophytic fungi. **Genome Biol**, 2011.
24. CAMBUIM, I.I. et al. Clinical and mycological evaluation of onychomycosis among Brazilian HIV/AIDS patients. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 1, p. 40-42, 2011.
25. CANCERRESEARCH, U. K. Age-standardised mortality rates, females, UK, 1971–2012. Online: <http://www.cancerresearchuk.org/cancerinfo/cancerstats/types/breast/mortality/uk-breast-cancer-mortality-statistics%23trends>. Acessado: 02.03.2015
26. CARDOSO, F.; HARBECK, N.; FALLOWFIELD, L.; KYRIAKIDES, S.; SENKUS, E.; ESMO GUIDELINES WORKING GROUP. Locally recurrent or metastatic breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, 23 Suppl 7:vii11–vii19, 2012.

27. CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. C. U. *Biologia celular e molecular*. 9. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan S.a**, Cap. 16, p. 292-301, 2012.
28. CAVALCANTI, B.C.; JÚNIOR, H.V.; SELEGHIM, M.H.; BERLINCK, R.G.; CUNHA, G.M.; MORAES, M.O.; PESSOA, C. Cytotoxic and genotoxic effects of tambjamine D, an alkaloid isolated from the nudibranch *Tambja eliora*, on Chinese hamster lung fibroblasts. **Chem Biol Interact**, 2008.
29. CHAM, B. E. Solasodine rhamnosyl glycosides specifically bind câncer cell receptors and induce apoptosis and necrosis. Treatment for skin cancer and hope for internal cancers. **Res J Biol Sci**, 2:503–514, 2007.
30. CHAM, B. E. Cancer intralesion chemotherapy with solasodine rhamnosyl glycosides. **Res J Biol Sci**, 3:1008–1017, 2008.
31. CHAM, B. E.; DAUNTER, B.; EVANS, R. A. Topical treatment of malignant and premalignant skin lesions by very low concentrations of standard mixture (BEC) of solasodina glycosides. **Cancer Letters**, v. 59, p. 183-192, 1991.
32. CHAM, B. E.; GILLIVER, M.; WILSON, L. Antitumor effects of glycoalkaloids isolated from *Solanum sodomaeum*. **Planta Médica**, v. 53, p. 34-36, 1987.
33. CHAM, B. E.; MEARES, H. M. Glycoalkaloids from *Solanum sodomaeum* are effective in the treatment of skin cancer in man. **Cancer Letters**, v. 36, p. 111-118, 1987.
34. CHAN, M.M.Y. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochemical Pharmacology**, 63, 99–104, 2002.
35. CHANG, L. C.; TSAI, T. R.; WANG, J. J.; LIN, C. N.; KUO, K.W. The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, 242: 21–25, 1998.
36. CHEN, B. K.; FRIEDLANDER, S. F. Tinea capitis update: a continuing conflict with an old adversary. **Curr Opin Pediatr**, v. 13, n. 4, p. 331-335, 2001.

37. CIPOLLINI, M. L.; LEVEY, D. J. Why are some fruits toxic? Glycoalkaloids in Solanum and fruit choice by vertebrates. **Ecology**, v. 78, n.3, p. 782-798, 1997.
38. COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochem J**, 326:1-16, 1997.
39. COLLINS, A.R.; MA, A.G.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutat. Res**, [S.l], v. 336, p.69-77, 1995.
40. COLLINS, A. R. Comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-61, 2004.
41. COLLINS, A. R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, [S.l], v. 23, n. 3, p.143-151, 17 fev, 2008.
42. CORRÊA, M.P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Brasília: Ministério da Agricultura/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.6, 1984.
43. COSTA, T. T. et al. The etiology and epidemiology of dermatophytoses in Goiania. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Goiania, v. 32, n. 4, p.367-371, 1999.
44. CRAGG, G. M.; NEWMAN, D.J. “BIODIVERSIDADE”: UM COMPONENTE ESSENCIAL NA DESCOBERTA DE FÁRMACOS. In: YUNES, Rosendo Augusto; CECHINEL FILHO, Valdir. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 2. ed. Itajaí: Univali, Cap. 3, p. 50-79. Tradução de: Prof<sup>a</sup> Dra. Christiane Meyre da Silva Bittencourt, 2009.
45. CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opin Invest Drugs**, 9:1-15, 2000.
46. CUI, C.Z.; WEN, X.S.; CUI, M.; GAO, J.; SUN, B.; LOU, H.X. Synthesis of solasodine glycoside derivatives and evaluation of their cytotoxic effects on human cancer cells. **Drug Discov Ther**, 2012.

47. CZABOTAR, P. E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.l.], v. 15, p.49-63, Jan, 2014.
48. DA COSTA, G. A.; MORAIS, M. G.; SALDANHA, A. A.; ASSIS SILVA, I. C.; ALEIXO, Á. A.; FERREIRA, J.M.; SOARES, A.C.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; LIMA, L.A. Antioxidant, Antibacterial, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Potential of the Leaves of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (Solanaceae). **Evid Based Complement Alternat Med**, 2015:315987, 2015.
49. DAMODARAN, O.; VAN HEERDEN, J.; NOWAK, A.K.; BYNEVELT, M.; MCDONALD, K.; MARSH, J. Clinical management and survival outcomes of gliosarcomas in the era of multimodality therapy. **J Clin Neurosci**, 21:478–81, 2014.
50. DA SILVA, B.C.M.; PAULA, C.R.; AULERETA, M.E. Dermatophytosis and immunovirological status of HIV-infected and AIDS patients from Sao Paulo city, Brazil, **Mycoses**, vol.57, no.6, pp. 371–376, 2014.
51. DENAULT, J.B.; SALVESEN, G.S. Caspases: keys in the ignition of cell death. **Chem Rev**, 102:4489-50, 2002.
52. DESAGHER, S.; MARTINO, J.C. Mitochondrial as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol**, 10:369-76, 2000.
53. DIAB, S.G.; ELLEDGE, R.M.; CLARK, G.M. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, 92: 550–556, 2000.
54. DING, X.; ZHU, F.S.; LI, M.; GAO, S.G. Induction of apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells by solamargine from *Solanum nigrum* L. **J Ethnopharmacol**, 2012.
55. DOBES, M.; KHURANA, V.G.; SHADBOLT, B.; JAIN, S.; SMITH, S.F.; SMEE, R. Increasing incidence of glioblastoma multiforme and meningioma, and decreasing incidence of Schwannoma (2000-2008): findings of a multicenter Australian study. **Surg Neurol Int**, 2:176, 2011.

56. DOGRA, J.; SAXENA, V.N. Itraconazole and leishmaniasis: a randomized double-blind trial in cutaneous disease. **International Journal of Parasitology**, v. 26, n. 12, p. 1413-1315, 1996.
57. DRAKE, L.A.; DINEHART, S.M.; FARMER, E.R.; GOLTZ, R.W.; GRAHAM, G.F.; HARDINSKY, M.K.; LEWIS, C.W.; PARISER, D.M.; SKOUGE, J.W.; WEBSTER, S.B.; WHITAKER, D.C.; BUTLER, B.; LOWERY, B.J.; ELEWSKI, B.E.; ELGART, M.L.; JACOBS, P.H.; LESHER, J.L. JR.; SCHER, R.K. Guidelines of care for superficial mycotic infections of the skin: *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea faciei*, *tinea manuum*, and *tinea pedis*. **Journal of American Dermatology**, v. 34, p.282-286, fev, 1996.
58. ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, 2007.
59. FACHIN, A.L.; FERREIRA, N.M.; MACCHERONI J.R, W.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. Role of the ABC transporter *TruMDR2* in terbinafine, 4-nitroquinoline- N-oxide (4NQO) and ethidium bromide resistance in *Trichophyton rubrum*. **Journal of Medical Microbiology**, 55(Pt 8):1093-1099, 2006.
60. FACHIN, A.L. Contel, E.P., MARTINEZ-ROSSI, N.M., Effect of sub-MICs of antimycotics on expression of intracellular esterase of *Trichophyton rubrum*. **Med Mycol**, 39(1):129-33, 2001b.
61. FACHIN, A.L. Clonagem e caracterização do gene *atrD*, que codifica um transportador do tipo ABC (ATP-Binding Cassette) envolvido na resistência à múltiplas drogas no dermatófito *Trichophyton rubrum*. **Tese de Doutorado** FMRP-USP 123p, 2001a.
62. FACHIN, A.L.; MAFFEI, C. M. L.; MARTINEZ-ROSSI, N.M. *In vitro* susceptibility of *Trichophyton rubrum* isolates to griseofulvin and tioconazole. Induction and isolation of a resistant mutant to both antimycotic drugs. **Mycopathologia**, 135: 141-143, 1996.
63. FERLAY, J.; SHIN, H.R.; BRAY, F.; FORMAN, D.; MATHERS, C.; PARKIN, D.M. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC

CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 01/Nov/2011.

64. FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R., et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, 136: E359-386, 2015.
65. FEWELL, A.M.; RODDICK, J.G.; WEISSENBERG, M. Interactions between the glycoalkaloids solasonine and solamargine in relation to inhibition of fungal growth. **Phytochemistry**, Nov;37(4):1007-11, 1994.
66. FRIEDMAN, M. Chemistry and Anticarcinogenic Mechanisms of Glycoalkaloids Produced by Eggplants, Potatoes, and Tomatoes. **J. Agric. Food Chem**, 2015.
67. GALLUZZI, L. et al. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, [S.l], p.1-16, 19 set, 2014.
68. GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: Mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clin Microbiol Rev**, 12: 501–517, 1999.
69. GODOY-MARTINEZ, P.; NUNES, F.G.; TOMIMORI-YAMASHITA, J., URRUTIA, M.; ZAROR, L.; SILVA, V.; FISCHMAN, O. Onychomycosis in Sao Paulo, Brazil. **Mycopathologia**, v. 168, n. 3, p. 111-116, 2009.
70. GOSWANI, A.; KOTOKY, R.; RASTOGI, R.C.; GHOSH, A. C. A one-pot efficient process for 16-dehydropregnenolone acetate. **Organic Process Reserch and Developmente**, v.7, p. 306-308, 2003.
71. GROSSE, S.; EVJE, L.; SYVERSEN, T. Silver nanoparticle-induced cytotoxicity in rat brain endothelial cell culture. **Toxicology in Vitro**, [S.l], v. 27, p.305-313, 2013.
72. GUO, Y. S. M.; SRINIVASULA, A.; DRUILHE, T.; FERNANDES-ALNEMRI, E. S.; ALNEMRI. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. **J. Biol. Chem**, 277:13430–13437, 2002.

73. GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**.166(5-6):353-67. Epub 2008 May 14. Review. 2008.
74. GUPTA, A. K.; NAKRIEKO, K.A. *Trichophyton rubrum* DNA strain switching increases in patients with onychomycosis failing antifungal treatments. **British Journal of Dermatology**, vol.172, no.1, pp.74–80, 2015.
75. GUPTA, R.K.; HUSSAIN, T.; PANIGRAHI, G.; DAS, A.; SINGH, G. N.; et al. Hepatoprotective effect of *Solanum xanthocarpum* fruit extract against CCl<sub>4</sub> induced acute liver toxicity in experimental animals. **Asian Pac J Trop Med**, 12: 964–968, 2011.
76. GYRD-HANSEN, M. E.; MEIER, P. IAPs: from caspase inhibitors to modulators of NF- $\kappa$ B, inflammation and cancer. **Nature Reviews/Cancer**, v. 10. August, 2010.
77. HANSEN, M.B.; NIELSEN, S.E.; BERG, K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **Journal of Immunological Methods**, [S.l], v. 119, n. 2, p.203-210, 1989.
78. HECTOR, R.F. Compounds active against cell walls of medically important fungi. **Clin Microbiol Rev**, v 6, p 1–2, 1993.
79. HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, 407:770-76, 2000.
80. HENRIQUE, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H.; Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: Simões, C. M. O., SchenkeL, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C., Meniz, L. A., Petrovick, P. R., **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 5<sup>a</sup> ed, cap. 12, p. 13-25. 2004.
81. <http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>. Acesso em: Set, 2014.



82. INCA. **Tipos de Câncer:** Mama. 2014. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>. Acesso em: 12 abril, 2014.
83. INDRAN, I.R.; TUFO, G.; PERVAIZ, S.; BRENNER, C. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica Et Biophysica Acta**, [S.l], n. 1807, p.735-745, 2011.
84. JACOB, Tiago R. et al. Rpb2 is a reliable reference gene for quantitative gene expression analysis in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **Medical Mycology Month**, p.1-10, 2011.
85. JANICKE, R. U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. **Breast Cancer Res Treat**, 117:219–221, 2009.
86. JAVED, T.; ASHFAG, U. A.; RIAZ, S.; REHMAN, S.; REAZUDDIN, S. In-vitro antiviral activity of Solanum nigrum against Hepatitis C Virus. **Virology**, 19: 8–26, 2011.
87. JELÍNEK, M.; BALUSIKOVA, K.; KOPPEROVA, D.; NEMCOVÁ-FURSTOVA, SRAMEK, J.; FEDLEROVÁ, J.; ZANARDI, I.; OJIMA, I.; KOVÁR, J. Caspase -2 is involved in cell death inductions by taxanes in breast cancer cells. **Cancer Cell International**, 13:42, 2013.
88. JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M.M.; FERLAY, J.; WARD, F. D. Global cancer statistics. **Cancer J Clin**, 61:69-90, 2011.
89. JEMAL, A.; CLEGG, L.X.; WARD, E., et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2001, with a special feature regarding survival. **Cancer**, 101(1):3–27, 2004.
90. JI, T .; LIN, C.; KRILL, L.S.; ESKANDER, R.; GUO, Y.; ZI, X.; HOANG, B.H. Flavokawain B, a kava chalcone, inhibits growth of human osteosarcoma cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 55, p.1-11, 2013.

91. KAPLOWITZ, N. Cell death at the millennium. Implications for liver diseases. **Clin Liver Dis**, 4:1-23, 2000.
92. KEUKENS, E.A.J.; DE VRIJE, T.; VAN DEN, B, C.; DE WAARD, P.; PLASMAN, H.H.; THIEL, F.; CHUPIN, V.; JONGEN, W.M.F.; DE KRUIJFF, B. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochimica et Biophysica Acta – BBA**. Amsterdam, v.1240, n.2, p. 216-228, 1995.
93. KEUKENS, E.A.; DE VRIJE, T.; FABRIE, C.H.; DEMEL, R.A.; JONGEN, W.M.; DE KRUIJFF, B. Dual specificity of sterol-mediated glycoalkaloid induced membrane disruption. **Biochim Biophys Acta**, Oct 5;1110 (2):127-36, 1992.
94. KIM, P.Y.; RAHMANTO, A. S.; TAN, O. D.; NORRIS, M.; HABER, M.; MARSHALL, G. M.; CHEUNG, B. B. TRIM 16 overexpression induces apoptosis through activation of caspase-2 in cancer cells. **Apoptosis**, 18:639–651, 2013.
95. KOMOTO, T. T.; BITENCOURT, T. A.; SILVA, G.; BELEBONI, R. O.; MARINS, M.; FACHIN, A. L. Gene Expression Response of *Trichophyton rubrum* during Coculture on Keratinocytes Exposed to Antifungal Agents. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2015:180-535, 2015.
96. KUMAR, P.; SHARMA, B.; BAKSHI, N. Biological activity of alkaloids from *Solanum dulcamara* L. **Natural Product Research**, v.23(8), p.719-723, 2009.
97. KUO, K.W.; HSU, S.H.; LI, Y.P.; LIN, W.L.; LIU, L.F.; CHANG, L.C.; LIN, C.C.; LIN, C.N.; SHEU, H.M. Anticancer activity evaluation of the *Solanum glycoalkaloid* solamargine. Triggering apoptosis in human hepatoma cells. **Biochem Pharmacol**, 60:1865–1873 30, 2000.
98. KYUNG JIN LEE, M.D.; YOUNG BOK LEE, M.D.; JUN YOUNG LEE, M.D.; BAIK KEE CHO, M.D.; JONG SOO CHOI, M.D.; HYUN JEONG PARK, M.D. Proximal Subungual Onychomycosis in a Patient with Classic Kaposi Sarcoma Caused by *Trichophyton rubrum*. **Ann Dermatol**, v. 23, n. 1, p. 11-15, 2011.

99. LASSUS, P.; OPITZ-ARAYA, X.; LAZEBNIK, Y. Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. **Science**, 297:1352–1354, 2002.
100. LEGRAND, C.; BOUR, J.M.; JACOB, C.; CAPIAUMONT, J.; MARTIAL, A.; MARC, A.; WUDTKE, M.; KRETZMER, G.; DEMANGEL, C.; DUVAL, D. et al., Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the number of dead cells in the medium of cultured eukaryotic cells as marker. **J. Biotechnol**, [S.l], v. 25, n. 2, p. 231-243, 1992.
101. LEE, K.J., et. al. Proximal Subungual Onychomycosis in a Patient with Classic Kaposi Sarcoma Caused by *Trichophyton rubrum*. **Ann Dermatol. Suppl**, v. 1:S11-5, 2011.
102. LI, Y.; LI, D.; YUAN, S.; WANG, Z.; TANG, F.; NIE, R.; WENG, J.; MA, L.; TANG, B.O. Embelin-induced MCF-7 breast cancer cell apoptosis and blockade of MCF-7 cells in the G2/M phase via the mitochondrial pathway. **Oncology letters**, 5: 1005-1009, 2013.
103. LI, H.; ZHANG, Y.; STROSE, A.; TEDESCO, D.; GUROVA, K.; SELIVANOVA, G.; Integrated high-throughput analysis identifies Sp1 as a crucial determinant of p53-mediated apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, 21, 1493–1502, 2014.
104. LI, X.; ZHAO, Y.; WU, W.K.K.; LIU, S.; CUI, M.; LOU, H. Solamargine induces apoptosis associated with p53 transcription- dependent and transcription-independent pathways in human osteosarcoma U2OS cells. **Life Sci**, 88:314–321, 2011.
105. LIANG, C.H.; LIU, L.F.; SHIU, L.Y.; HUANG, Y.S.; CHANG, L.C.; KUO, K.W. Action of solamargine on TNFs and cisplatin-resistant human lung cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, Sep 24;322 (3):751-8, 2004.
106. LIANG, C.H.; SHIU, L.Y.; CHANG, L.C.; SHEU, H.M.; TSAI, E.M.; KUO, K.W. Solamargine enhances HER2 expression and increases the susceptibility of human lung cancer H661 and H69 cells to trastuzumab and epirubicin. **Chem. Res. Toxicol**, 21, 393–399, 2008.
107. LIU, R.H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **Journal of Food Science**, [S.l], v. 78, p.A18-A25, 2013.

108. LONGE, J. L. Causes of Cancer. In: LONGE, Jacqueline L. (Ed.). The Gale Encyclopedia of Cancer: A Guide to Cancer and Its Treatments. 2. ed. [S.l]: **Thomson Gale**, Cap. Volume 1: A-K, p. 192, 2005.
109. LOPES, A. A.; OLIVEIRA, A. M.; PRADO, C.B.C. Principais genes que participam da formação de tumores. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Campina Grande, v. 2, n. 2, p.1-7, 2010.
110. LOPES, G.; PINTO, E.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P. Antifungal Activity of Phlorotannins against Dermatophytes and Yeasts: Approaches to the Mechanism of Action and Influence on *Candida albicans* Virulence Factor. **PLOS ONE**, v 8. ed 8, 2013.
111. LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odesa: Instituto Plantarum.2002. 512p.
112. MARMOT, M.G.; ALTMAN, D.G.; CAMERON, D.A, et al. The benefits and harms of breast cancer screening: an independent review. **Br J Cancer**. 108(11):2205–2240, 2013.
113. MARIÑO, GUILLERMO. et al. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.l], v. 15, p.81-94, Fev, 2014.
114. MARTINEZ, D. A. et al. Comparative Genome Analysis of *Trichophyton rubrum* and Related Dermatophytes Reveals Candidate Genes Involved in Infection. **mBio**, v.3, September/October, 2012.
115. MIRANDA, M. A; MAGALHÃES; L, G; TIOSSI, R. F. J; KUEHN, C. C; OLIVEIRA, L. G. R; RODRIGUES, V; MCCHESENEY, J. D; BASTOS, J. K. Evaluation of the schistosomicidal activity of the steroidal alkaloids from *Solanum lycocarpum* fruits. **Parasitol Res** 111:257–262, 2012.
116. MITCHELL, R. N. et al. Adaptações celulares, lesão celular e morte celular. In: Robbins & Cotran: fundamentos de patologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p.3-28, 2006.

117. MORAIS, M.G.; DA COSTA, G.A.; ALEIXO, Á. A.; DE OLIVEIRA, G.T.; ALVES, L.F.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SIQUEIRA FERREIRA, J. M.; LIMA, L.A. Antioxidant, antibacterial and cytotoxic potential of the ripe fruits of *Solanum lycocarpum* A. St. Hil. (Solanaceae). **Nat Prod Res**, 29(5):480-3, 2015.
118. MUNARI, C. C.; DE OLIVEIRA, P. F.; LEANDRO, L. F.; PIMENTA, L. M.; FERREIRA, N. H.; DA COSTA, J. C.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C. In vivo assessment of genotoxic, antigenotoxic and anticarcinogenic activities of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloidic extract. **PLoS One**, Nov 18;9(11):e111999.doi: 10.1371/journal.pone.0111999, 2014.
119. MUNARI, C. C.; DE OLIVEIRA, P. F.; CAMPOS, J. C. L.; MARTINS, S. P. L.; DA COSTA, J. C.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Antiproliferative activity of *Solanum lycocarpum* alkaloidic extract and their constituents, solamargine and solasonine, in tumor cell lines. **Natural Resource Letter**, doi 10.1007/s11418-013-0757-0, 2013.
120. MUSTACCHI, G.; DE LAURENTIIS, M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. **Drug Design, Development and Therapy**, 9 4303–4318, 2015.
121. NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. GenBank. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>. Acesso em: Set. 2014.
122. NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium-forming filamentous fungi. Proposed standard. NCCLS document M38-A. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pa, 2002.
123. NICHOLSON, D.W. Thornberry, N.A. Caspases: killer proteases. **Trends Biochem Sci**. 22:299-306, 1997.
124. NIRMAL, S. A.; PATEL, A. P.; BHAWAR, S.B.; PATTAN, S.R. Antihistaminic and antiallergic actions of extracts of *Solanum nigrum* berries: possible role in the treatment of asthma. **J Ethnopharmacol** 142: 91–97, 2012.

125. OBEROI-KHANUJA, T.K.; MURALI, A.; RAJALINGAM, K. IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration IAPs on the move: role of inhibitors of apoptosis proteins in cell migration. Review. **Cell Death and Disease**. 2013.
126. OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nat Protoc**.1(1):23-9, 2006.
127. OLIVEIRA, A.C.P.; ENDRINGER, D.C.; ARAÚJO, R.J.P.; BRANDÃO, M.G.L.; COELHO, M.M. The starch from *Solanum lycocarpum* St. Hill. Fruit is not a hypoglycemic agent. **Brazilian J Med Biol Res** 36:525–30, 2003.
128. OREGON STATE UNIVERSITY. Flow Cytometry: How Does It Work? 2013. Disponível em: <[http://www.unsolvedmysteries.oregonstate.edu/flow\\_06](http://www.unsolvedmysteries.oregonstate.edu/flow_06)>. Acesso em: 25, jul, 2014.
129. OSTROM, Q.T.; GITTLEMAN, H.; LIAO, P.; ROUS, E. C.; CHEN, Y.; DOWLING, J. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. **Neuro Oncol**, 2014.
130. OUYANG, L .; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F.T.; ZHOU, T.T.; LIU, B.; BAO, J.K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif**, [S.l], v. 45,p.487–98, 2012.
131. PAPINI, M.; CICOLETTI, M.; FABRIZI, V.; LANDUCCI, P. Skin and nail mycoses in patients with diabetic foot. **G Ital Dermatol Venereol**, v. 148, n. 6, p. 603-608, 2013.
132. PATEL, T.; GORES, G. J. Apoptosis in liver transplantation: a mechanism contributing to immune modulation, preservation injury, neoplasia, and viral disease. **Liver Transplant Surg** 4:42-50, 1998.
133. PATEL, P.; PATEL, M.; SARALAI, M.; GANDHI, T. Antiuro lithiatic effects of *Solanum xanthocarpum* fruit extract on ethylene-glycol-induced nephrolithiasis in rats. **J Young Pharm** 3: 164–170, 2012.

134. PERES, N.T.A.; MARANHÃO, F. C. A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatophytes: host-pathogen interaction and antifungal resistance. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010a.
135. PERES, N.T.; SANCHES, P.R.; FALCAO, J.P. Transcriptional profiling reveals the expression of novel genes in response to various stimuli in the human dermatophyte *Trichophyton rubrum*. **BMC Microbiol** v.10, n. 39, 2010.
136. PINTO, F. C. L.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, F. M.; THEODORO, P. N. E. T.; ESPÍNDOLA, L. S. Glicoalcaloides antifúngicos, flavonoides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Quimica Nova**, vol. 34, no. 2, 284-288, 2011.
137. PONTES, Luciola de Barros et al. Glioblastoma: enfoque no tratamento de pacientes idosos. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo, v. 10, n. 4, Dez, 2012.
138. PUNJABI, S.; COOK, L. J.; KERSEY, P.; MARKS, R.; CERIO, R. Solasodine glycoalkaloids: a novel topical therapy for basal cell carcinoma. A double-blind, randomized, placebocontrolled, parallel group, multicenter study. **International Journal of Dermatology**, v. 47, p. 78–82, 2008.
139. PURVES, D.; HARVEY, C.; TWEATS, D.; LUMLEY, C.E. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesis**;10(4):297-312, 1995.
140. RICHARDSON, M.D.; WARNOCK, D.W. Fungal infection: diagnosis and management. **Wiley-Blackwell**, Oxford, UK, 4rd ed, 2012.
141. RIES, L.A.G.; EISNER, M.P.; KOSARY, C.L. SEER Cancer Statistics Review. 1973-1999. Bethesda, MD: **National Cancer Institute**; 2009.
142. RIVERA, Z. S.; LOSADA, L.; NIERMAN, W.C. Back to the Future for Dermatophyte Genomics. **COMMENTARY. mbio.asm.org**, v. 3 ed. 6, 2012.
143. ROBERT KOCH-INSTITUT Gesundheitsberichterstattung des Bundes, Heft 25, Brustkrebs.2012.Online:[http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_](http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_)

Deutschland/kid\_2012/kid\_2012\_c50.pdf?\_\_blob=publicationFile. Acessado:  
05.11.2013

144. ROBERT KOCH-INSTITUT  
Online:<http://www.rki.de/Krebs/DE/Content/ZfKD/Aktuelles/Brustkrebsmortalitaet.htm>  
l. Acessado: 02.03.2015.
145. ROBINSON, K.S; CLEMENTS, A; WILLIAMS, A.C; BERGER, C.N; FRANKEL, G.  
BAX Inhibitor 1 in apoptosis and disease. **Oncogene**. 30, 2391-2400, 2011.
146. RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics  
and apoptotic events. **Biol Chem**. 385:449-64, 2004.
147. SHANKER, K.; GUPTA, S.; SRIVASTAVA, P.; SRIVASTAVA, S.K.; SINGH, S.C.;  
GUPTA, M.M. "Simultaneous determination of three steroidal glycoalkaloids in  
*Solanum xanthocarpum* by high performance thin layer chromatography," **Journal of  
Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, vol. 54, no. 3, pp. 497–502, 2011.
148. SCHULER, M.; MAURER, U.; GOLDSTEIN, J.C. p53 triggers apoptosis in oncogene-  
expressing fibroblasts by the induction of Noxa and mitochondrial Bax translocation.  
**Cell Death Differ**. 10:451-60, 2003.
149. SCHWARZ, A.; SOARES, M. R.; FLÓRIDO, J.C.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H.  
S. Rats exposed to *Solanum lycocarpum* fruit in utero and during lactation:  
Neurochemical, behavioral and histopathological effects. **Neurotoxicology and  
teratology**. v. 27, p. 861-870, 2005.
150. SCHWARZ, A.; PINTO, E.; HARAGUCHI, M.; OLIVEIRA, C.A.; BERNARDI,  
M.M.; SPINOSA, H.S. Phytochemical study of *Solanum lycocarpum* (St. Hil.) unripe  
fruits and its effects inratgestation. **Phytother Res**; 21:1025–8, 2007.
151. SEER Databank. Online:<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html>. Acessado:  
02.03.2015.



152. SENTAMIL SELVI, G.; KAMALAM, A.; AJITHADOS, K.; JANAKI, C.; THAMBIAH, A.S. Clinical and mycological features of dermatophytosis in renal transplant recipients. **Mycoses**, Madras, v. 42, n. 1-2, p.75-78, 1999.
153. SEYMOUR, T.; NOWAK, A.; KAKULAS, F. Targeting aggressive cancer stem cells in glioblastoma. **Frontiers in Oncology**, v. 5, 2015.
154. SHIU, L.Y.; CHANG, L.C.; LIANG, C.H.; HUANG, Y.S.; SHEU, H.M.; KUO, K.W. Solamargine induces apoptosis and sensitizes breast cancer cells to cisplatin. **Food Chem Toxicol** 45:2155–2164 36, 2007.
155. SIDAT, M.M.; CORREIA, D.; BUENE, T.P. *Tinea capitis* among rural school children of the district of Magude, in Maputo province, Mozambique. **Mycoses** 49, 480–483, 2006.
156. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKIL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. In:**Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4º ed. Porto Alegre-RG. Ed.UFRGS, cap 29, Alcalóides: Generalidades e Aspctos Básicos, p. 651-666, 2002.
157. SMITH, E.S.; FELDMAN, S.R.; FLEISCHER, A.B. JR.; LESHIN, B.; MCMICHAEL, A. Characteristics of office-based visits for skin cancer. Dermatologists have more experience than other physicians in managing malignant and premalignant skin conditions. **Dermatol. Surg.**v. 24, p.981–985, 1998.
158. SOARES-MOTA, M. R.; SCHWARZ, A.; BERNARDI, M. M.; MAIORKA, P. C.; SPINOSA, H. S. Toxicology evaluation of 10% Solanum ly- cocarpum St. Hill fruit consumption in the diet of growing rats: hematological, biochemical and histopathological effects. **Exp Toxicol Pathol**, 62:549–553, 2010.
159. SOCIEDADE BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA. <http://www.sbcancer.org.br/>. Acesso: 31/08/2015.
160. SOUZA-ESTEVEZ, A.; DA SILVA, T.M.S.; ALVES, C.C.F.; CARVALHO, M.G.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Cytotoxic activities against Ehrlich carcinoma

- and human K562 leukaemia of alkaloids and flavonoid from two *Solanum species*. **J Braz Chem Soc**, 13: 838–842, 2002.
161. STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. Andrew. The cancer genome. **Nature**, [S.l], n. 458, p.719-724, 9 abr, 2009.
162. SUN, F.; MIKUNI, S.; KINJO, M. Monitoring the caspase cascade in single apoptotic cell using a three-color fluorescent protein substrate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 404, p. 706-710, 2011.
163. SUN, L.; ZHAO, Y.; LI, X.; YUAN, H.; CHENG, A.; LOU, H. A lysosomal-mitochondrial death pathway is induced by solamargine in human K562 leukemia cells. **Toxicol In Vitro** 24: 1504–151, 2010.
164. SUN, L.; ZHAO, Y.; YUAN, H.; LI, X.; CHENG, A.; LOU, H. Solamargine, a steroidal alkaloid glycoside, induces oncosis in human K562 leukemia and squamous cell carcinoma KB cells. **Cancer Chemother. Pharmacol.** 67, 813–821, 2011.
165. SZLISZKA, E.; CZUBA, Z.P.; MAZUR, B.; PARADYSZ, A.; KROL, W. Chalcones and Dihydrochalcones Augment TRAIL-Mediated Apoptosis in Prostate Cancer Cells. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 8, p. 5336-5353, 2010.
166. TAIT, S. W. G.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.l], v. 11, p.621632, Set. 2010.
167. THE BROAD INSTITUTE. Dermatophyte Comparative Genome Database..[http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte\\_comparative/MultiHome.html](http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/MultiHome.html), 2010.
168. THOMAS, N.V.; KIM, S.K. Potential pharmacological applications of polyphenolic derivatives from marine brown algae. **Environ Toxicol Phar**, 32: 325–335, 2011.
169. TIOSSI, R.F.J.; MIRANDA, M.A.; SOUSA, J.P.B.; PRACA, F.S.G.; BENTLEY, M.V.L.B.; MCCHESENEY, J.D.; BASTOS, J.K. A validated reverse phase HPLC

analytical method for quantitation of glycoalkaloids in *Solanum lycocarpum* and its extracts. **J Anal Methods Chem.** doi:10.1155/2012/947836, 2012.

170. TIOSSI, R. F. J.; DA COSTA, J. C.; MIRANDA, M. A.; PRAÇA, F. S. G.; MCCHESENEY, J. D.; BENTLEY, M. V. L. B.; BASTOS, J. K. In vitro and in vivo evaluation of the delivery of topical formulations containing glycoalkaloids of *Solanum lycocarpum* fruits. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** 88, 28–33, 2014.
171. TORRE, L.A.; BRAY, F.; SIEGEL, R.L.; FERLAY, J.; LORTET-TIEULENT, J.; JEMAL, A. Global cancer statistic, 2012. *CA Cancer J Clin*, 65;87-108, 2015.
172. ULLAH, Mohd Fahad. Cancer Multidrug Resistance (MDR): A Major Impediment to Effective Chemotherapy. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.** [S.l.], v. 9, p.1-6, 2008.
173. VAN ENGELAND, M.; NIELAND, L. J.W.; RAMAEKERS, F. C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C. P. M. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. **Cytometry.** 31:1–9, 1998.
174. VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada.** v. 27, n.1, p.1-7, 2006.
175. VIEIRA, P.M.; DA COSTA, P.A.; E SILVA, C.R.; CHEN-CHEN, L. Assessment of the Genotoxic, Antigenotoxic, and cytotoxic activities of the ethanolic fruit extract of *Solanum lycocarpum* A. St. Hill. (Solanaceae) by Micronucleus Test in Mice. **Journal of Medicinal Food.** v.13 (6) p.1409–1414, 2010.
176. VILANI-MORENO, F.R.; ARRUDA, M.S.; CLARO, S.G.; MARCOS, E.V.; URA, S. Dermatophytosis: association between ABO blood groups and reactivity to the trichophytin. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 41, n. 5, p.285-290, 1999.
177. WALTER, L.C.; SCHONBERG, M.A. Screening mammography in older women: a review. **JAMA.**311(13):1336–1347, 2014.

178. WHITE, T.C.; OLIVER, B.G.; GRÄSER, Y.; HENN, M.R. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. **Eukaryot Cell**, v. 7, n. 8, p. 1238-45, 2008.
179. WU, C. H.; LIANG, C. H.; SHIU, L. Y.; CHANG, L. C.; LIN, T. S.; LAN, C. C. E.; TSAI, J. C; WONG, T. W.; WEI, K. J.; LIN, T. K.; CHANG, N. S.; SHEU, H. M. Solanum incanum extract (SR-T100) induces human cutaneous squamous cell carcinoma apoptosis through modulating tumor necrosis factor receptor signaling pathway. **Journal of Dermatological Science**, v. 63, p. 83-92, 2011.
180. WU, L. C.; SUN, P. L.; CHANG, Y. T. Extensive deep dermatophytosis cause by *Trichophyton rubrum* in a patient with liver cirrhosis and chronic renal failure. **Mycopathologia**, v. 176, n. 5-6, p. 457-62, 2013.
181. [www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.phd](http://www.SABiosciences.com/pcrarraydataanalysis.phd). Acesso em: Set, 2014.
182. XIE, X.; ZHU, H.; YANG, H.; HUANG. W.; WU, Y.; WANG, Y.; LUO, Y.; WANG, D.; SHAO, G. Solamargine triggers hepatoma cell death through apoptosis. **Oncology Letters**, 10: 168-174, 2015.
183. XIONG, S.; MU, T.; WANG, G.; JIANG, X. Mitochondria-mediated apoptosis in mammals. **Protein Cell**, [S.l], v. 5, n. 10, p.737–749, Out. 2014.
184. YAACOB, Nik Soriani et al. Anticancer activity of a sub-fraction of dichloromethane extract of *Strobilanthes crispus* on human breast and prostate cancer cells in vitro. *Complementary and Alternative Medicine*, [S.l], v. 10, n. 42, p.1-14, 2010.
185. YANCIK, R.; RIES, L.A. Cancer in older persons: an international issue in an aging world. **Semin Oncol**, 31(2):128–136, 2004.
186. YANG, S. A.; PAEK, S. H.; KOZUKUE, N.; LEE, K. R.; KIM, J. A.  $\alpha$ Chaconine, a potato glycoalkaloid, induces apoptosis of HT-29 human colon cancer cells through caspase-3 activation and inhibition of ERK 1/2 phosphorylation. **Food Chem. Toxicol.** 44, 839–846, 2006.

187. YUAN, J. S.; REED, A.; CHEN, F.; STEWART, C.N. JR. Statistical analysis of real-time PCR data. **BMC Bioinformatics**, [S.l], v. 85, n. 7, p.1-12, 22 fev, 2006.
188. ZHAO, X.; GAO, L.; WANG, J.; XU, W.; ZHOU, Y. Antifungal activity of five solanaceous glycoalkaloids and their mixtures against phytopathogenic fungi *Cercospora brassicae* and *Alternaria porri*. **Journal written in English**. v.21, n.1, p. 36-43, 2011.
189. ZHOU, Y.; TANG, Q.; ZHAO, S.; ZHANG, F.; LI, L.; WU, W.; WANG, Z.; HANN, S. Targeting signal transducer and activator of transcription 3 contributes to the solanamine-inhibited growth and induced apoptosis of human lung cancer cells. **Tumour Biol**. Aug;35(8):8169-78, 2014.
190. ZONG, W.X.; THOMPSON, C.B. Necrotic death as a cell fate. **Genes Dev**. 20:1-15. 2006.
191. ZUPKÓ, I.; MOLNÁR, J.; RÉTHY, B.; MINORICS, R.; FRANK, É.; WÖLFLING, J.; MOLNÁR, J.; OCSOVSZKI, I.; TOPCU, Z.; BITÓ, T.; PUSKÁS, L. G. Anticancer and multidrug resistance-reversal effects of solanidine analogs synthesized from pregnadienolone acetate. **Molecules**, 19, 2061–2076, 2014.