

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

RANNA BATISTA WANZELER

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO EXTRATO HIDROLISADO DA
ESPÉCIE *Euphorbia tirucalli* L. EM MODELOS IN VITRO EM CÂNCER DE
OVÁRIO**

**VITÓRIA, ES
2024**

RANNA BATISTA WANZELER

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO EXTRATO HIDROLISADO DA
ESPÉCIE *Euphorbia tirucalli* L. EM MODELOS IN VITRO EM CÂNCER DE
OVÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Leticia Batista Azevedo Rangel

VITÓRIA, ES

2024

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

W244e Wanzeler, Ranna Batista, 1995-
ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO
EXTRATO HIDROLISADO DA ESPÉCIE *Euphorbia tirucalli* L.
EM MODELOS IN VITRO EM CÂNCER DE OVÁRIO / Ranna
Batista Wanzeler. - 2024.
93 p. : il.

Orientadora: Leticia Batista Azevedo Rangel.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Câncer. 2. Quimioterapia. 3. Princípio ativo
(Farmacologia). 4. Plantas. 5. Ovários - Tumores. I. Rangel,
Leticia Batista Azevedo. II. Universidade Federal do Espírito
Santo. Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61

RANNA BATISTA WANZELER

**ESTUDO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO EXTRATO HIDROLISADO DA
ESPÉCIE *Euphorbia tirucalli* L. EM MODELOS *IN VITRO* EM CÂNCER DE
OVÁRIO**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Bioquímica.

Aprovado(a) em 30 de julho de 2024.


BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 LETICIA BATISTA AZEVEDO RANGEL
Data: 07/08/2024 14:01:24-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Leticia Batista Azevedo Rangel – Orientadora

Documento assinado digitalmente
 MARCELLA PORTO TAVARES
Data: 09/08/2024 16:20:03-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof^a. Dr^a. Marcella Porto Tavares – Examinador Interno

Documento assinado digitalmente
 KARLA LIRIO SOARES
Data: 07/08/2024 15:58:41-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dr^a. Karla Lirio Soares – Examinador Externo

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desta tese. Primeiramente, agradeço à minha família, principalmente a minha mãe Mara Jane Batista pelo apoio incondicional, amor, paciência e incentivo constante em todas as etapas da minha jornada acadêmica. Aos meus amigos, pelo suporte emocional, companheirismo e pelas risadas ao longo deste percurso.

Ao meu noivo, Cassio Fiorotti Meneghel que esteve ao meu lado com paciência, compreensão e encorajamento, me ajudando a manter a determinação e a motivação para seguir em frente. Agradeço também à Universidade Federal do Espírito Santo, local de realização desse projeto e as agências de fomento CAPES e CNPq, por fornecer os recursos, o ambiente acadêmico e as oportunidades que foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, sou imensamente grata a minha orientadora Prof. Dra. Leticia Batista Azevedo Rangel, cuja orientação, conhecimento e dedicação foram essenciais para a conclusão desta dissertação, agradeço também a companhia e os cafés no Lab junto dos alunos do LBCMCH. E a banca pela sabedoria e tempo dedicados a mim. A Prof. Marcella e ao Prof. Tadokoro que auxiliaram no processo. E a todos os outros que fazem parte da minha vida e participaram direta ou indiretamente me dando apoio. A todos vocês, meu sincero muito obrigado.

*“Devagarzinho, flor em flor
Entre os meus inimigos beija-flor.”*

(Cazuza)

RESUMO

O câncer é um conjunto de doenças caracterizadas pela proliferação desordenada das células, que pode ser influenciado por diversos fatores. O câncer de ovário (CAOV) é a segunda neoplasia ginecológica e a quinta causa mais comum de morte por câncer em mulheres, principalmente devido ao crescimento assintomático dos tumores. O tratamento do câncer envolve abordagens variadas, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia. No entanto, a quimiorresistência é um desafio no tratamento de neoplasias malignas, o que tem levado a um aumento nas pesquisas sobre combinações terapêuticas que incluem compostos naturais. Uma substância que vem se destacando é o eufol, um composto encontrado no látex da planta *Euphorbia tirucalli*. Há relatos de seu uso na medicina popular para tratar condições como inflamações, asma, tosse, verrugas e tumores malignos. Dessa forma, este estudo teve como objetivo principal avaliar o potencial antitumoral do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em modelos *in vitro*, utilizando linhagens celulares de CAOV (A2780, ACRP e OVCAR-3). Foram realizados experimentos de viabilidade celular metabólica (VCM), cálculo da IC₅₀, nas linhagens OVCAR-3, A2780 e ACRP. O ensaio clonogênico, migração celular e análise do ciclo celular foram realizados apenas na linhagem OVCAR-3. Os resultados do ensaio de VCM mostraram que as linhagens A2780 e ACRP apresentaram baixa sensibilidade ao extrato de *Euphorbia*, enquanto que a linhagem OVCAR-3 apresentou uma diminuição significativa na VCM. Os ensaios posteriores demonstraram que o extrato hidrolisado interfere tanto na migração quanto na formação de colônias, reduzindo a viabilidade drasticamente. Finalmente, o ensaio de ciclo celular realizado por citometria de fluxo mostrou que as células pararam na fase G1, o que corroborou com outros estudos. Portanto, esses resultados sugerem um provável potencial antitumoral do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*.

Palavras-chave: Câncer. Quimiorresistência. Produto natural. Extrato hidrolisado de *Euphorbia*.

ABSTRACT

Cancer is a group of diseases characterized by the disordered proliferation of cells, which can be influenced by various factors. Ovarian cancer (OC) is the second most common gynecological neoplasm and the fifth most common cause of cancer-related death in women, primarily due to the asymptomatic growth of tumors. Cancer treatment involves various approaches, such as surgery, chemotherapy, and radiotherapy. However, chemoresistance is a challenge in the treatment of malignant neoplasms, leading to increased research on therapeutic combinations that include natural compounds. One substance that has been gaining attention is euphol, a compound found in the latex of the *Euphorbia tirucalli* plant. There are reports of its use in folk medicine to treat conditions such as inflammation, asthma, cough, warts, and malignant tumors. Thus, this study aimed to evaluate the antitumor potential of the hydrolyzed extract of *Euphorbia tirucalli* *in vitro* models using OC cell lines (A2780, ACRP, and OVCAR-3). Metabolic cell viability (MCV) experiments and IC₅₀ calculations were performed for OVCAR-3, A2780, and ACRP cell lines. Clonogenic assay, cell migration, and cell cycle analysis were performed only with OVCAR-3 cell line. MCV assay results showed that the A2780 and ACRP cell lines were not sensitive to the Euphorbia hydrolyzed extract, while the MCV of OVCAR-3 cell line had a significant decrease. Subsequent assays demonstrated that the hydrolyzed extract interferes with both migration and colony formation, drastically reducing viability. Finally, the cell cycle assay performed by flow cytometry showed that the cells were arrested in the G1 phase, corroborating other studies. Therefore, these results suggest a potential antitumor effect of the hydrolyzed extract of *Euphorbia tirucalli*.

Keywords: Cancer. Chemoresistance. Natural product. Hydrolyzed extract of Euphorbia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023.....	16
Figura 2. Atividade dos quimioterápicos nas fases do ciclo celular	19
Figura 3. Classificação do câncer de ovário de acordo com sua origem.....	21
Figura 4. Estrutura da cisplatina.....	26
Figura 5. Espécie <i>Euphorbia tirucalli</i>	29
Figura 6. Estrutura química do eufol.....	32
Figura 7. Esqueletos diterpênicos do tipo tigliano e ingenano e suas formas hidroxiladas forbol e ingenol.....	35
Figura 8. Migração celular - Realização da ranhura com a ponta da ponteira e representação da atividade de migração celular.....	41
Figura 9. Demonstração do plaqueamento, adição da droga e formação das colônias do ensaio clonogênico.....	42
Figura 10. Cálculo para quantificar a eficiência do plaqueamento (EP = Eficiência de Plaqueamento).....	42
Figura 11. Cálculo para quantificar a fração sobrevivente após o experimentos - FS (Fração sobrevivente).....	44
Figura 12. Análise da VCM das linhagens celulares A2780 e ACRP.....	46
Figura 13. Análise da VCM da linhagem celular OVCAR-3 submetida à exposição ao extrato hidrolisado de <i>Euphorbia tirucalli</i> por um período de 24 horas.....	48
Figura 14. Análise da VCM em linhagens celulares A2780 e ACRP submetidas ao tratamento com cisplatina.....	51
Figura 15. Análise da VCM na linhagem celular OVCAR-3	
Figura 16. Análise da VCM na linhagem celular OVCAR-3 submetida ao tratamento com a IC ₂₅ (106,15µg/mL) do extrato.....	58
Figura 17. Ensaio de Migração Celular - Resultados dos 0h até 48h após tratamento com a IC ₅₀ (212,3µg/mL) do Extrato de Euphorbia.....	58
Figura 18. Ensaio de Migração Celular - Resultados obtidos entre 0h e 48h após tratamento das células OVCAR-3 com a IC _{37,5} (159,22µg/mL).....	61
Figura 19. Ensaio de Migração Celular - Resultados dos 0h a 48h após tratamento com IC ₂₅ (106,15µg/mL) do extrato de Euphorbia.....	62

Figura 20. Ensaio de Migração celular - Resultados dos 0h até 48h após tratamento com a IC _{12,5} (53,07µg/mL) do extrato de Euphorbia.....	65
Figura 21. Evidência do comportamento da cicatrização da ferida em diferentes concentrações do extrato de <i>Euphorbia tirucalli</i>	66
Figura 22. Alterações morfológicas na linhagem celular OVCAR-3 após 48h de exposição ao extrato hidrolisado de <i>Euphorbia tirucalli</i>	67
Figura 23. Ensaio de Migração Celular - Resultados dos 0h a 24h após tratamento com IC ₂₅ (28,05µM) do fármaco cisplatina.....	69
Figura 24. Ensaio de Migração Celular - Resultados dos 0h a 24h após tratamento com a combinação extrato hidrolisado Euphorbia em sua IC ₂₅ (106,15µg/mL) + Cisplatina em sua IC ₂₅ (28,05µM).....	71
Figura 25. Ensaio de Migração das Celular - Pré-tratamento (24h) com extrato hidrolisado de Euphorbia, seguido do tratamento com cisplatina (24h).....	73
Figura 26. Ensaio Clonogênico - Coloração das colônias com cristal violeta	66
Figura 27. Ensaio Clonogênico - Formação de colônias da linhagem celular OVCAR-3 submetida ao tratamento com o IC ₂₅ (106,15µg/mL) <i>Euphorbia tirucalli</i>	67
Figura 28. Ensaio Clonogênico - Formação de colônias da linhagem OVCAR-3 submetida ao tratamento com o IC ₅₀ (212,3µg/mL) <i>Euphorbia tirucalli</i>	77
Figura 29. Ciclo celular na linhagem OVCAR-3.....	78
Figura 30. Parada do ciclo celular na fase G1 induzida pelo extrato hidrolisado de <i>Euphorbia tirucalli</i>	79
Figura 31. O ciclo celular (Revisado por SCHAFER, K. A. 1998).....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: A variação do valor de IC_{50} na linhagem celular OVCAR-3 em resposta a distintos regimes terapêuticos.....	23
Tabela 2: Mecanismos de resistência a cisplatina.....	26
Tabela 3: A variação do valor de IC_{50} na linhagem celular OVCAR-3 em resposta a distintos regimes terapêuticos (cisplatina).....	54
Tabela 4: Cálculo da eficiência de plaqueamento e da fração sobrevivente após 24h de tratamento com a IC_{50} e IC_{25} do extrato.....	72

LISTA DE SIGLAS

CAOV	Câncer de Ovário
CDKs	Quinases dependentes de ciclinas
DAG	Diacilglicerol
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido
CO ²	Dióxido de carbono
EP	Eficiente de plaqueamento
FS	Fração sobrevivente
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
PKC	Proteína quinase C
PI	Iodeto de propídeo
RE	Receptores de Estrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Receptores de Progesterona
PBS	Tampão fosfato-salino
SFB	Soro Fetal Bovino
TMZ	Temozolomida
VCM	Viabilidade Celular Metabólica
GSH	Glutationas
SRI	Sistema de reparo de incompatibilidade
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno

SUMÁRIO


1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1 O CÂNCER E O CICLO CELULAR	20
2.2 CAO V	22
2.3 QUIMIOTERAPIA E QUIMIOTERÁPICOS CONVENCIONAIS	24
2.4 CISPLATINA E A QUIMIORRESISTÊNCIA	26
2.5 COMPOSTOS NATURAIS	30
2.6 EXTRATO DE <i>Euphorbia tirucalli</i> .	30
3. OBJETIVOS	34
3.1 OBJETIVO GERAL	34
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 LINHAGENS CELULARES	35
4.2 EXTRATO DE <i>Euphorbia tirucalli</i>	35
4.3 DESCONGELAMENTO CELULAR	36
4.4 CULTIVO CELULAR	37
4.5 ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM RESISTENTE	37
4.6 PLAQUEAMENTO PARA O TESTE DE VCM PELO MÉTODO DE MTT	38
4.7 CÁLCULO DA IC ₅₀ ESTIMADA DAS MOLÉCULAS TESTADAS EM CÉLULAS DE CAO V	38
4.8 ANÁLISE DA VCM DAS CÉLULAS DE CAO V EM RESPOSTA AO EXTRATO HIDROLISADO DE <i>Euphorbia tirucalli</i>	39

4.9 ANÁLISE DA VCM DE CÉLULAS DE CAO V EM RESPOSTA À IC ₂₅ DO EXTRATO HIDROLISADO DE <i>Euphorbia tirucalli</i>	39
4.10 ANÁLISE DA VCM DAS CÉLULAS DE CAO V EM RESPOSTA À CISPLATINA	40
4.11 INVESTIGAÇÃO DA VCM DE CÉLULAS DE CAO V EM RESPOSTA À CISPLATINA COM PRÉ-TRATAMENTO DE EXTRATO HIDROLISADO DE <i>Euphorbia tirucalli</i>	40
4.12 ANÁLISE DA VCM DAS CÉLULAS DE CAO V NA COMBINAÇÃO DE CISPLATINA COM EXTRATO HIDROLISADO DE <i>Euphorbia tirucalli</i>	41
4.13 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR	41
4.14 ENSAIO CLONOGÊNICO	43
4.14.1 INCUBAÇÃO E CONTAGEM DAS COLÔNIAS	44
4.14.2 CONTAGEM DAS COLÔNIAS	44
4.15 CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO	45
4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 A LINHAGEM OVCAR-3 APRESENTA UMA MAIOR SENSIBILIDADE AO EXTRATO HIDROLISADO DE <i>Euphorbia tirucalli</i> EM RELAÇÃO À A2780 E ACRP	47
5.2 ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM RESISTENTE: A LINHAGEM DERIVADA ACRP É APROXIMADAMENTE 3,5 VEZES MAIS RESISTENTE À CISPLATINA QUE SUA PARENTAL A2780	51
5.3 REDUÇÃO NA VCM DA LINHAGEM OVCAR-3 TRATADAS COM CISPLATINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM EXTRATO HIDROLISADO DE <i>Euphorbia tirucalli</i>	53
5.4 POTENCIAL REDUÇÃO NA VCM DA LINHAGEM OVCAR-3 COM A COMBINAÇÃO DE EXTRATO HIDROLISADO DE <i>Euphorbia tirucalli</i> E CISPLATINA	

	56
5.5 ANÁLISE DO EFEITO DA IC25 DO EXTRATO HIDROLISADO DE <i>Euphorbia tirucalli</i> NA VCM DA LINHAGEM DE CAO V OVCAR-3	56
5.6 POTENCIAL MODULAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS OVCAR-3 PELO EXTRATO HIDROLISADO DE EUPHORBIA	57
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS	86

1. INTRODUÇÃO

O câncer é caracterizado como um grupo de mais de 100 doenças que compartilham as propriedades de proliferação e crescimento descontrolado das células (INCA, 2022). Todos os tipos de neoplasias malignas apresentam uma fundamentação genética, podendo manifestar-se por meio de mutações hereditárias ou mutações esporádicas. Alguns dos fatores de risco associados à sua ocorrência são: exposição a radiações, substâncias químicas, infecções virais, entre outros (INCA, 2022). Em relação ao câncer da mulher, o segundo câncer ginecológico mais comum é o câncer de ovário (CAOV), perdendo apenas para o câncer de colo de útero (INCA, 2023). O CAOV é uma doença multifatorial, sendo que a maior parte das pacientes é diagnosticada em estágios avançados devido principalmente à ausência de sintomas patognomônicos (Revisado por LELE, 2022).



	Localização Primária	Casos	%
Mulheres	Mama feminina	73.610	30,1%
	Cólon e reto	23.660	9,7%
	Colo do útero	17.010	7,0%
	Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
	Glândula tireoide	14.160	5,8%
	Estômago	8.140	3,3%
	Corpo do útero	7.840	3,2%
	Ovário	7.310	3,0%
	Pâncreas	5.690	2,3%
	Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma*

Fonte: INCA, 2023. *Números arredondados para múltiplos de 10.

Os sintomas comumente relatados pelas mulheres, quando presentes, são dor nas costas e dor abdominal, inchaço abdominal, fadiga/cansaço, constipação ou sintomas urinários (Revisado por OVIEDO, VANEGA, 2021). Porém, esses sintomas só são relatados nos estágios mais avançados da doença, dificultando no seu diagnóstico precoce e impactando negativamente o prognóstico (Revisado por OVIEDO, VANEGA, 2021). De acordo com dados da GLOBOCAN (2023), no ano de 2020, o CAOV teve quase 314 mil novos casos no mundo, com aproximadamente

207 mil mortes. Em relação aos tratamentos, os métodos que são comumente utilizados são, cirurgias, quimioterapias e radioterapias (INCA, 2022).

Quimioterápicos como a cisplatina e o paclitaxel, por exemplo, são comumente utilizados no tratamento de uma gama de neoplasias malignas, bem como câncer de mama e ovário (Revisado por GHOSH, 2019). O paclitaxel, um composto obtido da espécie *Taxus brevifolia*, exerce seu mecanismo de ação mediante a ligação nos microtúbulos, promovendo a fosforilação da β -tubulina. Esse processo estimula a estabilização da polimerização dos microtúbulos, interrompendo a progressão da mitose das células somáticas no estágio G2/M da replicação celular, resultando na indução da morte celular (Revisado por ALQAHTANI, et al., 2019). Já a cisplatina exerce sua atividade anticancerígena se ligando ao DNA, formando aductos que culminam com a quebra da α -hélice do DNA, levando as células à necrose ou à apoptose (Revisado por GHOSH, 2019).

Muitas pacientes têm tumores que são resistentes refratários à cisplatina ou que recidivam com resistência adquirida à droga. A resistência das células tumorais à quimioterapia pode ocorrer de forma extrínseca e intrínseca, sendo a extrínseca (adquirida) se desenvolvendo em resposta a um tratamento selecionado, como resultado de mutações relacionadas à quimioterapia. Já a resistência intrínseca ou resistência primária a medicamentos ocorre quando as células cancerosas não respondem à quimioterapia desde o primeiro tratamento (Revisado por ROMANI, 2022). De fato, com fins à superação da quimiorresistência, o fármaco é comumente usado em politerapia, sendo os agentes antineoplásicos sintéticos ou compostos naturais (Revisado por GHOSH, 2019). A busca por novos fármacos que tenham um potencial quimioterápico eficaz para o tratamento de neoplasias malignas é de extrema relevância. Substâncias naturais são muito estudadas devido ao fato de que possuem uma grande diversidade de propriedades, as quais podem ser utilizadas terapeuticamente (REZENDE et al., 2016). Neste contexto, destaca-se a espécie *Euphorbia tirucalli* pertencente à família Euphorbiaceae, do gênero *Euphorbia*. Esse gênero é constituído por mais de 2.000 espécies que são compreendidos por árvores, arbustos e ervas. A espécie *Euphorbia tirucalli* é conhecida popularmente como avelós, dedinho, forquilha, coroa-de-cristo e árvore-de-são-sebastião (REFLORA, 2022). No látex da planta são encontradas inúmeras substâncias, como hidrocarbonetos terpênicos e aldeídos (Revisado por MININEL, 2022). Também se encontram presentes goma tirucalli, resina, diterpenos

do tipo tigliano (ésteres de forbol) e ingenano (ésteres de ingenol), eufol e outros (DE SOUZA et al., 2019). O álcool triterpênico tetracíclico eufol é um dos principais constituintes do látex seco do gênero *Euphorbia* (DE SOUZA et al., 2019).

Do ponto de vista clínico, é frequente a identificação de células cancerosas com um fenótipo resistente à quimioterapia, o que está associado à progressão da doença e comprometimento da eficácia do tratamento (Revisado por GHOSH, 2019). Este estudo é de fundamental importância devido à limitada quantidade de pesquisas que investigam o uso do extrato hidrolisado de *Euphorbia* como potencial agente quimioterápico em linhagens celulares de câncer, mais especificamente, há uma lacuna significativa no conhecimento referente a pesquisas com o uso desse extrato em linhagens de CAO. Diante dessa carência de dados, torna-se essencial explorar esse composto para que possam ter mais estudos referentes ao mesmo e especialmente para oferecer opções terapêuticas adicionais para pacientes que apresentam resistência aos tratamentos convencionais.

Nesse contexto, é fundamental explorar novos fármacos para combater neoplasias malignas e auxiliar no tratamento de pacientes cujos tumores são resistentes aos tratamentos convencionais. Portanto, este trabalho teve como objetivo investigar os efeitos anticancerígenos do extrato hidrolisado da planta *Euphorbia tirucalli* em células de CAO, contribuindo para o avanço das pesquisas e estudos científicos nesta área.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O CÂNCER E O CICLO CELULAR

Todas as células estão expostas a um número significativo de agentes mutagênicos com o potencial de danificar o DNA e provocar mutações. Os seres vivos, a todo tempo, podem sofrer alterações genéticas como resultado de funções celulares normais (mutações espontâneas) ou em decorrência de tratamentos com determinados compostos (agentes mutagênicos), ocasionando mutações induzidas (ZAHA, FERREIRA, PASSAGLIA, 2012). A exemplo, pode-se citar: toxinas de fungos, luz ultravioleta, poluentes industriais, raios X e produtos químicos. Alguns danos sofridos pelo DNA podem ser reparados, já que a informação genética é preservada em ambas as fitas da dupla-hélice. Já outras lesões podem acontecer quando ambas as fitas de uma mesma molécula de DNA são clivadas e, caso não sejam reparadas, as quebras podem ocasionar morte celular ou câncer (ZAHA, FERREIRA, PASSAGLIA, 2012).

O câncer, patologia associada à proliferação descontrolada de células, configura-se como uma das principais causas de mortalidade em escala global. Os índices mostram que os principais tumores que acometem os homens são os cânceres de próstata e pulmão, liderando as estatísticas de diagnóstico (Revisado por TORRE et al., 2015), enquanto entre as mulheres, os cânceres de mama e colo do útero são identificados com maior frequência (Revisado por TORRE et al., 2015). As neoplasias surgem como uma consequência do aumento de variações genéticas nos proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA. A carcinogênese é estimulada por agentes cancerígenos e muitos agentes mutagênicos atuam diretamente no DNA, devido à sua capacidade de atuar como base nitrogenada ou de incorporar-se à cadeia polinucleotídica (ZAHA, FERREIRA, PASSAGLIA, 2012). Este processo evolui lentamente e se divide em estágios, como: iniciação (com alterações genéticas), promoção (com influência de oncopromotores) e progressão (caracterizado pela multiplicação descontrolada das células acompanhada de manifestações clínicas) (INCA, 2022).

As células estão em constante divisão e apresentam um desenvolvimento ínfimo de células tumorais em relação ao número total de divisões ao longo do

tempo. Este fenômeno é atribuído, por exemplo, aos pontos de controle do ciclo celular (Revisado por WARD, 2002). A progressão do ciclo celular é modulada por proteínas denominadas quinases dependentes de ciclinas (CDKs), especialmente nas transições de fases, como de G₁ para S e de G₂ para M. Os inibidores do ciclo celular (CKIs) desempenham um papel crucial ao regular negativamente as vias de sinalização envolvidas na progressão do ciclo celular. Qualquer tradução de sinal anormal pode resultar em proliferação celular descontrolada, metástase, comprometimento de morte celular e angiogênese (Revisado por WARD, 2002). Erros também podem ocorrer durante a replicação do DNA e são corrigidos pela capacidade de revisão de leitura da própria DNA-polimerase e pelo sistema de reparação de maus pareamentos (ZAHA, FERREIRA, PASSAGLIA, 2012).

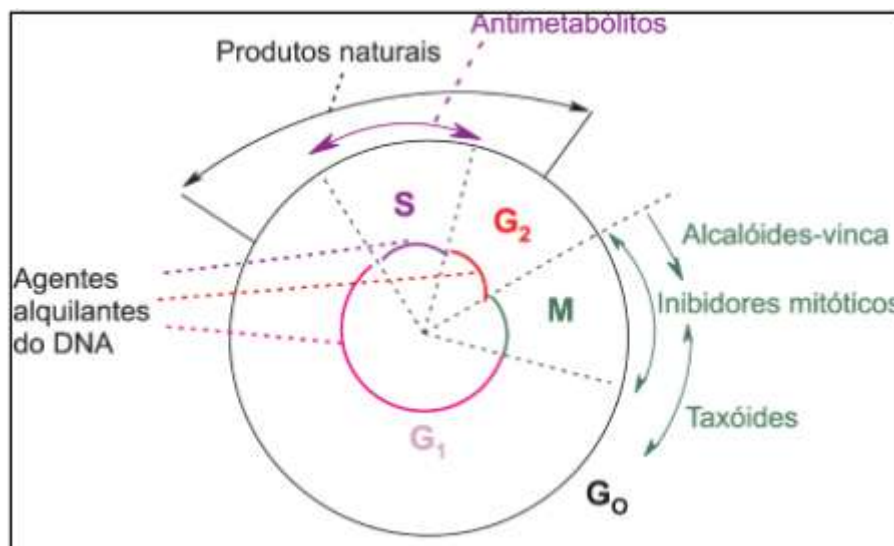


Figura 2. Atividade dos quimioterápicos antineoplásicos nas fases do ciclo celular (ALMEIDA et al., 2005).

A multiplicação desordenada das células tumorais resulta tanto de oncogenes quanto de anormalidades nos genes supressores tumorais. As mutações nos oncogenes podem ocorrer por meio de translocação cromossômica, amplificação gênica, inserção retroviral ou mutação pontual (Revisado por WARD, 2002). Proto-oncogenes atuam positivamente na progressão do ciclo celular, porém, quando mutados, transformam-se em oncogenes. Por outro lado, os genes supressores tumorais inibem ou impedem a expressão do fenótipo maligno, atuando no controle do ciclo celular (Revisado por WARD, 2002).

2.2 CAO V

O CAO V é uma das neoplasias que mais matam mulheres no mundo em relação ao número de casos. O estadiamento do CAO V é cirúrgico, sendo classificado nos seguintes estágios: estágio I (IA, IB e IC): o câncer está limitado ao ovário ou ovários; estágio II (IIA, IIB): o câncer está em um ou ambos os ovários e se espalhou para outras partes da pelve (INCA, 2022); estágio III (IIIA, IIIB e IIIC): o câncer está em um ou ambos os ovários, e se disseminou pelos gânglios linfáticos próximos ou para outros órgãos abdominais, exceto para o fígado; estágio IV: o câncer atingiu o pulmão, fígado ou outros órgãos distantes (INCA, 2022).

Em relação aos potenciais fatores de risco para o desenvolvimento do CAO V, estão incluídos menarca precoce, nuliparidade, menopausa tardia, fatores hereditários e endometriose, bem como a ovulação (Revisado por LELE, 2022). Por outro lado, as múltiplas gravidezes e o uso de anticoncepcionais podem ser considerados como fatores de proteção por diminuírem a ocorrência de ovulação (Revisado por ZACHOW BÜHRING et al., 2021). O CAO V pode ser oriundo das células epiteliais (que revestem os ovários e outros órgãos como a tuba de Falopio), células germinativas (que formam os óvulos) e células estromais (que produzem a maior parte dos hormônios femininos). Os tumores epiteliais representam a maior parte dos CAO Vs e são subdivididos em seroso, mucinoso, endometrióide e de células claras (INCA, 2022). Com base em estudos genéticos morfológicos e moleculares, vários tipos de CAO V são classificados em dois grupos: tipo I e tipo II. O grupo designado tipo I é composto por carcinomas serosos de baixo grau, endometrióides de baixo grau, células claras, mucinosos e transicionais, são relativamente estáveis geneticamente e não possuem mutações de TP53 (proteína supressora de tumor que controla o reparo do DNA e a apoptose em resposta ao estresse). Em contrapartida, tumores denominados tipo II são altamente agressivos, evoluem rapidamente e quase sempre existem como doença em estágio avançado. Os tumores do tipo II incluem carcinoma seroso convencional de alto grau, carcinoma indiferenciado e tumores mesodérmicos mistos malignos (carcinossarcoma) e exibem mutações da TP53 em mais de 80% dos casos (KURMAN, SHIH, 2010). Ademais, o subtipo seroso pode ser classificado em carcinoma seroso de baixo grau ou carcinoma seroso de alto grau. Adenocarcinomas de alto grau são diagnosticados na maior parte das vezes,

enquanto os de baixo grau ocupam cerca de 5% dos casos de CAOV detectados em mulheres portadoras da doença (Revisado por MOTTA, 2015).

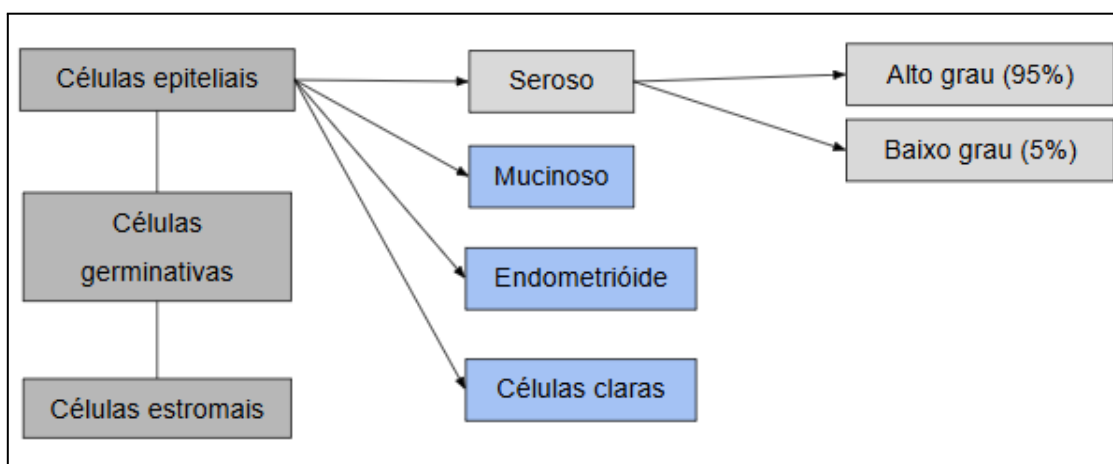


Figura 3. Classificação do câncer de ovário de acordo com sua origem.

Os carcinomas ovarianos serosos classificados como de alto grau (grau 3), grau intermediário (grau 2) ou baixo grau (grau 1) (Revisado por KALDAWY et al., 2016), recebem essa classificação baseada principalmente em atipia nuclear e taxa mitótica. Tumores com moderada atipia e moderado índice mitótico são classificados como cânceres serosos de baixo grau, enquanto os tumores com marcada atipia nuclear e índice mitótico aumentado são classificados como cânceres serosos de alto grau. Os tumores de grau 2 têm características entre os graus 1 e 3 (Revisado por KALDAWY et al., 2016). Pesquisas vêm demonstrando que o CAOV é três vezes mais letal do que o câncer de mama e a taxa de sobrevivência das pacientes é usualmente inferior a 5 anos, posto que mais da metade das pacientes diagnosticadas apresenta doença metastática (Revisado por OVIEDO, VANEGA, 2021; PAES et al., 2011).

2.3 QUIMIOTERAPIA E QUIMIOTERÁPICOS CONVENCIONAIS

A quimioterapia antineoplásica convencional é um tratamento realizado por meio da administração de fármacos (quimioterápicos) para o combate de neoplasias malignas. No entanto, esses medicamentos não possuem especificidade celular, ou seja, não destroem exclusivamente as células tumorais, mas sim todas as células com alto potencial mitótico (INCA, 2022). A quimioterapia pode ser administrada por via oral, por via parenteral, injeções intramusculares, subcutâneas ou intratecais. Além disso, em alguns casos, pode ser aplicada de forma tópica, diretamente sobre a pele (INCA, 2013). Os quimioterápicos, como dito anteriormente, são agentes farmacológicos utilizados no tratamento do câncer, e têm como objetivo, muitas vezes, intervir no ciclo celular das células malignas, seja inibindo sua proliferação ou induzindo a morte celular.

Esses agentes podem ser classificados quanto à sua origem, sendo aqueles extraídos de plantas ou aqueles de origem sintética. Além disso, os quimioterápicos também são categorizados em relação ao seu mecanismo de ação, como mostrado na Tabela 1 (Revisado por BUKOWSKI, et al., 2020). Como exemplo, agentes à base de platina (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina) criam ligações cruzadas inter ou intra-cadeias em resíduos de guanina do DNA, o que resulta na formação de pares incorretos nas bases do DNA (Revisador por BUKOWSKI, et al., 2020). Grande parte dos quimioterápicos são utilizados em combinação com outros agentes antineoplásicos para aumentar sua eficácia e minimizar a ocorrência de quimiorresistência cruzada. No caso do CAO, alguns tratamentos são considerados de primeira linha e frequentemente apresentam boas taxas de sobrevida para as pacientes. O tratamento padrão para os estágios avançados do CAO envolve cirurgia para remoção do tumor, seguida de quimioterapia adjuvante com a combinação de derivado de platina e taxano. Embora eficaz como terapia inicial, a recorrência do CAO afeta até 75% das pacientes (Revisado por DASARI e BERNARD TCHOUNWOU, 2014; PAES et al., 2011).

Tabela 1. Classificação dos quimioterápicos comumente usados, dependendo do seu mecanismo de ação.

QUIMIOTERÁPICOS (MECANISMO DE AÇÃO)	<i>Diferentes tipos de quimioterápicos</i>
Agente Alquilantes	<ul style="list-style-type: none"> - Ciclofosfamida e ifosfamida; - Busulfan, clorambucil e melfalano; - Temozolomida;
Agentes a base de platina	<ul style="list-style-type: none"> - Agentes à base de platina (cisplatina, carboplatina e oxaliplatina).
Antimetabólicos	<ul style="list-style-type: none"> - Antagonistas da pirimidina (citarabina, 5-fluorouracil, gencitabina e capecitabina); - Antagonistas das purinas (fludarabina); - Análogos das purinas (6-mercaptopurina, azatioprina e cladribina); - Antifolatos (metotrexato, pemetrexedo e pralatrexato); - Inibidores da ribonucleotídeo redutase (hidroxiuréia).
Inibidores da topoisomerase	<p>Inibidores da topoisomerase I:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Irinotecano e topotecano; <p>Inibidores da topoisomerase II:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Etoposídeo, teniposídeo e antraciclina.
Inibidores do fuso mitótico	<p>Inibidores do fuso mitótico:</p> <ul style="list-style-type: none"> - Taxanos (docetaxel e paclitaxel); - Alcalóides da vinca (vincristina e vimblastina).
Outros agentes quimioterápicos (Mecanismos de ação não homogêneos)	<ul style="list-style-type: none"> - Algumas enzimas: eu-asparaginase; - Inibidores de proteassoma: Bortezomibe; - Inibidores de tirosina quinase: Imatinibe e erlotinibe; - Antibióticos: Bleomicina, actinomicina D.

(Revisado por BUKOWSKI, et al., 2020)

Com o objetivo de aumentar as taxas de resposta inicial e prolongar o intervalo entre o tratamento de primeira linha e a recorrência da doença, novas opções de tratamento são utilizadas atualmente, sendo que muitas vêm sendo estudadas e/ou desenvolvidas (ZHANG e ZHOU, 2018). Dentre algumas destas estão a combinação intraperitoneal e intravenosa de paclitaxel/cisplatina, paclitaxel/carboplatina, e a combinação de paclitaxel/cisplatina com bevacizumabe (Avastin®), um anticorpo monoclonal que tem como alvo o fator de crescimento endotelial vascular (ZHANG e ZHOU, 2018). A cisplatina também é utilizada em combinação com outros agentes ou compostos químicos para tratar o CAO V em linhagens celulares resistentes e sensíveis. Por exemplo, a cisplatina é usada junto com o veneno do mel, withaferin, tricostatina A ou desoxicidina (Revisado por DASARI e BERNARD TCHOUNWOU, 2014). Estes tratamentos mostram a importância das pesquisas na melhoria dos resultados para os pacientes. O uso da cisplatina em conjunto com agentes antineoplásicos e compostos químicos sublinham a busca por tratamentos eficazes para superar a resistência das células cancerosas.

2.4 CISPLATINA E A QUIMIORRESISTÊNCIA

Anualmente, quase 6 milhões de pacientes são diagnosticados com câncer. Um dos tratamentos empregados contra vários tumores malignos é a cisplatina (Revisado por PEREIRA et al., 2021). De fato, fármacos à base de platina, especialmente a cisplatina, são utilizados no tratamento de uma ampla variedade de malignidades sólidas, incluindo cânceres testicular, ovariano, de cabeça e pescoço, colorretal, de bexiga e de pulmão (Revisado por GALLUZZI et al., 2012).

Cisplatina, carboplatina e oxaliplatina são compostos com íon platina duplamente carregados e cercados por quatro ligantes (Revisado por DASARI e BERNARD TCHOUNWOU, 2014). A cisplatina é um complexo inorgânico solúvel em água contendo um átomo central de platina rodeado por dois átomos de cloro e porções de amônia, sendo utilizada por via intravenosa no tratamento de diversas formas de câncer, o quimioterápico forma ligações covalentes, fazendo interconexões entre as cadeias do DNA, o que induz quebras na molécula do ácido nucléico (NIDDK, 2020). Essa lesão no DNA desencadeia a morte celular e inibe a

síntese de RNA e proteínas. Além disso, a interação da cisplatina com o material genético promove a formação de aductos que induzem à quebra da estrutura da dupla-hélice do DNA, resultando no desencadeamento de processos de necrose ou apoptose celular (morte celular dependente de energia) (Revisado por DASARI e BERNARD TCHOUNWOU, 2014; Revisado por GHOSH, 2019). Agentes à base de platina também podem causar ruptura do DNA por alteração na angulação do sulco maior e do sulco menor da alfa-hélice, pois distorcem a dupla-hélice e reduz o comprimento de ponta-a-ponta da molécula do DNA. Ademais, a cisplatina se liga ao DNA das células cancerosas através das purinas, causando danos que bloqueiam a divisão celular e resultam em apoptose. A droga ainda pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio que danificam proteínas celulares, lipídios e DNA, levando a lesões celulares fatais. O estresse oxidativo causado pela cisplatina afeta principalmente as mitocôndrias, sendo que esse estresse perturba as funções biológicas e pode promover apoptose, necrose e autofagia nas células cancerosas (Revisado por DASARI e BERNARD TCHOUNWOU, 2014).

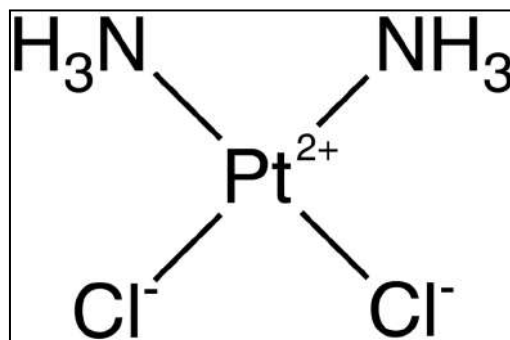


Figura 4. Estrutura da cisplatina (“CISPLATIN”, 2024)

Dados estatísticos mostram que mais de 90% da mortalidade dos pacientes com câncer é atribuída à resistência aos medicamentos antineoplásicos, sendo este um dos fatores limitantes para o uso dos fármacos. A quimiorresistência à cisplatina é multifatorial e muitos tumores malignos são resistentes ou recidivam resistentes à droga. Dentre os mecanismos de resistência à droga estão: indução do estresse genotóxico (ativa múltiplas vias de tradução de sinal as quais contribuem tanto para a apoptose, como também para a resistência à quimioterapia), defeitos na sinalização apoptótica (Revisado por GALLUZZI et al., 2012). Aumento do efluxo das drogas, fatores genéticos (mutações genéticas, ampliações e alterações

epigenéticas), fatores de crescimento, ou aumento da capacidade de reparo do DNA (sistema reparador de aductos) (Revisado por BUKOWSKI, et al., 2020; Revisado por MAKOVEC, 2019). Além disso, alterações nas isoformas da proteína quinase C e a ativação da MAPK/proteína G como resultado do tratamento com cisplatina promovem resistência ao fármaco (Revisado por DASARI e BERNARD TCHOUNWOU, 2014; Revisado por ROMANI, 2022). O remodelamento da matriz extracelular, pode contribuir para resistência, pois no remodelamento, as células malignas modificam seu microambiente tumoral ao superexpressar colágeno VI, o que aumenta a insensibilidade à cisplatina (SHERMAN-BAUST et al., 2003).

Os diversos mecanismos de resistência a cisplatina (tabela 2), podem ocorrer tanto em etapas anteriores à ligação da cisplatina ao DNA (resistência pré-alvo), como também relacionando diretamente aos aductos DNA-cisplatina (no alvo), ou como resistência pós-alvo, além de afetar circuitos moleculares que não apresentam ligações óbvias com sinais induzidos por cisplatina (resistência fora do alvo) (revisado por GALLUZZI et al., 2012).

Tabela 2: Alguns dos Mecanismos de resistência à cisplatina (Revisado por GALLUZZI et al., 2012).

Mecanismos de resistência à cisplatina	
<i>Mecanismos de resistência pré-alvo:</i>	A resistência está relacionada ao acúmulo intracelular reduzido de cisplatina e a um sequestro aumentado de cisplatina por glutatonas (GSH) ou metalotioneínas, por exemplo.
<i>Mecanismos de resistência no alvo:</i>	As células resistentes à cisplatina adquirem a capacidade de reparar aductos em um ritmo acelerado ou tornam-se capazes de tolerar lesões de DNA não reparadas.
<i>Deficiência do sistema de reparo de incompatibilidade (SRI):</i>	Em células resistentes, os genes MSH2 e MLH1 que codificam as proteínas SRI são frequentemente mutados ou sub-expressos.
<i>Mecanismo de resistência pós-alvo:</i>	A resistência pós-alvo à cisplatina pode resultar em defeitos nas vias de tradução

	de sinal. Alterações genéticas e epigenéticas, como por exemplo, mutações na TP53, têm sido associadas à resistência à cisplatina.
<i>Mecanismos de resistência fora do alvo:</i>	O fenótipo resistente à cisplatina também pode ser sustentado por alterações nas vias de sinalização que não são diretamente envolvidas pela cisplatina, mas interrompem os sinais letais induzidos por ela.

O fenótipo resistente à cisplatina das células cancerosas pode derivar de alterações em qualquer um dos circuitos moleculares, bem como de alterações que afetam a captação intracelular da cisplatina ou na indução da apoptose (Tabela 2). Enfim, as células cancerosas adotam múltiplos mecanismos de resistência que são intensamente estudados e identificados.

Além disso, segundo o *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases* (2020), um outro fator limitante para a utilidade clínica da cisplatina estão nos severos efeitos colaterais associados ao uso do quimioterápico, tais como a otorrinotoxicidade, a neurotoxicidade e a nefrotoxicidade. Os efeitos adversos da cisplatina são muitas vezes relacionados às alterações das funções renais, como na indução de danos nos túbulos proximais que causam diminuição na capacidade de filtração do rim, sendo que o estresse oxidativo também é um dos mecanismos envolvidos na toxicidade desse quimioterápico. Náuseas e vômitos, também são observados no tratamento com a cisplatina (monoterapia ou em combinação). Essas toxicidades, dependendo da dose, muitas vezes são cumulativas e podem envolver lesões extensas em órgãos, podendo impactar na qualidade de vida de pacientes em remissão do câncer (Revisado por PEREIRA et al., 2021).

2.5 COMPOSTOS NATURAIS

Os compostos naturais há muito são usados como fontes imensuráveis para a síntese de medicamentos, como por exemplo o farmacóforo do produto natural mevastatina do fungo *Penicillium* (RODRIGUES et al., 2016). Programas de pesquisa farmacêutica voltados para a descoberta de medicamentos frequentemente incorporam derivados de produtos naturais, e as plantas, em particular, são ricas em uma ampla gama de substâncias resultantes de seu metabolismo (RODRIGUES et al., 2016).

O metabolismo nas células vegetais pode ser dividido em metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário engloba processos essenciais, como fotossíntese e produção de componentes vitais. Já o metabolismo secundário resulta em compostos não essenciais, mas desempenha funções adaptativas, como atração de polinizadores, defesa contra herbívora e proteção contra condições adversas (REZENDE et al., 2016). Os metabólitos secundários são divididos em três grupos principais: os terpenos, compostos fenólicos e os compostos nitrogenados (TAIZ e ZEIGER, 2009). Essas substâncias secundárias são os chamados princípios ativos vegetais. O princípio ativo é uma mistura de substâncias que proporciona a ação farmacológica. As substâncias formadas a partir dos metabólitos secundários são utilizadas em diversos produtos e terapias, sendo responsáveis pelo efeito medicinal (REZENDE et al., 2016) dos produtos naturais. Devido a essa capacidade que as plantas apresentam de desenvolver substâncias essenciais na manutenção da sua sobrevivência, há uma variedade de compostos bioativos que é estudada por pesquisadores e tem despertado o interesse da indústria farmacêutica na obtenção de novos medicamentos (SOUZA et al., 2007). Assim, pode-se verificar o importante papel do reino vegetal no desenvolvimento de terapias antineoplásicas.

2.6 EXTRATO DE *Euphorbia tirucalli*.

O gênero *Euphorbia*, pertencente à família Euphorbiaceae, destaca-se como o terceiro maior gênero de plantas, compreendendo aproximadamente 2.000 espécies. Uma de suas características distintivas é a presença de um látex esbranquiçado, que se torna visível quando a planta é submetida a injúrias

mecânicas (SOUZA e LORENZI, 2008). A família Euphorbiaceae tem um impacto significativo na atividade econômica, especialmente na alimentação humana e na medicina tradicional. O uso de espécies dessa família é visto desde a antiguidade (JOSÉ e LAMEIRA, 2014). Algumas espécies da família Euphorbiaceae são reconhecidas na medicina popular por suas propriedades diuréticas, na dissolução de cálculos renais, no tratamento da hepatite B e no manejo do câncer (TRINDADE, 2015). Na Austrália, o látex da planta *Euphorbia peplus* L. é utilizado topicamente como terapia domiciliar para o tratamento do câncer de pele e ceratose actínica, inspirando o desenvolvimento do medicamento Picato® (MEBUTATO DE INGENOL) (ERNST et al., 2015).

O mebutato de ingenol demonstra eficácia citotóxica direta e regulação das isoformas da PKC em células tumorais, manifestando efeitos antitumorais. Concentrações elevadas de mebutato de ingenol, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, resultam em edema mitocondrial e comprometimento da integridade da membrana celular, levando à morte celular. Em contrapartida, concentrações mais baixas estimulam a ativação dependente de PKC em células endoteliais humanas, promovendo a adesão de neutrófilos à parede dos vasos, conforme documentado na bula do produto Picato 150mcg (PICATO, 2024).

Outra planta pertencente ao gênero *Euphorbia*, é a espécie *Euphorbia tirucalli* L., caracterizada pela presença de ramificações cilíndricas, verdes e dispostas de forma alternada (Figura 5), além da secreção de um látex esbranquiçado (Revisado por SOUZA et al. 2019).



Figura 5. Espécie *Euphorbia tirucalli*
Fonte: HERBÁRIO VIES - UFES (Goiabeiras-Vitória-ES)

O látex que é extraído das ramificações da planta contém ésteres diterpênicos, triterpenos e compostos fenólicos, os quais muitas vezes são utilizados na medicina popular tradicional como analgésico, para queimar verrugas e como medicamento antitumoral (MININEL, 2022). A comercialização do extrato dessa planta foi proibida devido à presença de alguns compostos considerados tóxicos, como os ésteres diterpênicos (tigliano e ingenano) (Revisado por SOUZA et al. 2019).

Através da Resolução 2.917, de 6 de julho de 2011, a ANVISA proibiu a distribuição e comercialização de medicamentos contendo essa planta na composição:

“Considerando, ainda, a constatação de que o produto vem sendo irregularmente comercializado no País, com indicações terapêuticas para tratamento de câncer e outras doenças de alta complexidade (ANVISA, 2011), resolve:”

“Art. 1º Proibir, como medida de interesse sanitário, em todo o território nacional, a distribuição e comercialização do produto AVELOS (ou AVELOZ), nome científico *Euphorbia tirucalli* L., bem como a manipulação ou fabricação de medicamentos contendo tal substância, por não ter sido submetida a testes de segurança e eficácia perante esta Agência” (ANVISA, 2011).

Além disso, alguns estudos mostraram que a planta possui alta toxicidade devido à presença de ésteres de forbol. Os ésteres de forbol são diterpenos tetracíclicos geralmente conhecidos por sua atividade promotora do tumor. Os ésteres de forbol imitam a ação do diacilglicerol (DAG), ativador da PKC, que regula diferentes vias de tradução de sinal e outras atividades metabólicas celulares (Revisado por FEITOSA, 2010). Alguns desses compostos são reconhecidos por suas propriedades pró-carcinogênicas, agindo como promotores de tumor ao mimetizarem a ação do DAG sobre a PKC (Revisado por FEITOSA, 2010)

Um estudo com o fracionamento do látex da *Euphorbia tirucalli* em uma coluna de gel de sílica e a análise das frações obtidas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, revelou que triterpenos como o eufol e tirucalol são os principais constituintes químicos deste produto natural. Eufol e

tirucalol foram identificados em diferentes frações e confirmados por espectrometria de massa (SOUZA et al. 2019). Portanto, os triterpenos constituem a classe predominante de compostos no látex da *Euphorbia tirucalli*, seguidos pelos ésteres de diterpenos, triterpenos oxigenados e ácidos graxos (SOUZA et al. 2019). O álcool triterpênico tetracíclico eufol é um dos principais constituintes encontrados em espécies de plantas da família Euphorbiaceae. O eufol possui atividades biológicas como ação anti-inflamatória, antiviral e analgésica (SILVA et al., 2018).

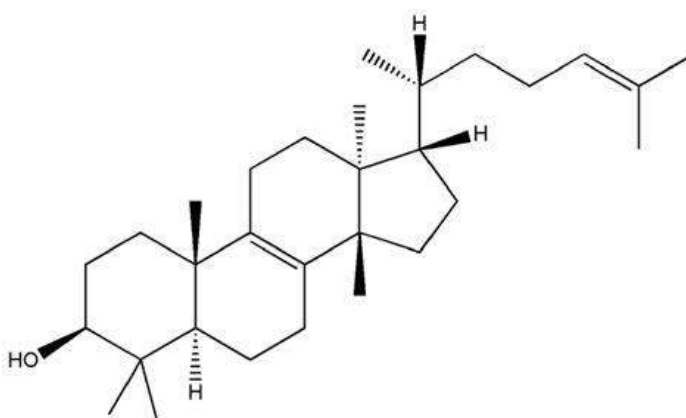


Figura 6. Estrutura química do eufol

Fonte: (SILVA et al., 2018)

Estudos *in vitro* mostraram que o eufol, substância encontrada na planta, parece ter atividade antineoplásica. No câncer de mama, por exemplo, essa molécula interrompe o ciclo celular, mantendo as células na fase G1 (WANG et al., 2013). Já em gliomas, o eufol promove citotoxicidade e potencializa a diminuição da viabilidade celular (SILVA et al., 2019), o que também já foi visto em outras linhagens, como no câncer gástrico, por exemplo (LIN et al. 2012). Apesar dos resultados obtidos em pesquisas voltadas para as propriedades do eufol, ainda são necessários mais estudos para compreender a ação e a citotoxicidade tanto do látex quanto do extrato hidrolisado da planta e da substância isolada eufol.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Tendo como base as informações supramencionadas, o objetivo geral do presente trabalho foi analisar o efeito antitumoral do extrato hidrolisado da planta *Euphorbia tirucalli* em modelos *in vitro* de CAOV em monoterapia e em combinação com o quimioterápico convencional cisplatina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para contemplar o objetivo geral, delineamos os objetivos específicos, a saber:

- Evocar a resistência à cisplatina na linhagem ACRP (oriunda da linhagem parental e sensível à cisplatina, A2780) a partir de aplicações de concentrações da droga na linhagem de CAOV referida;
- Determinar a IC₅₀ das drogas em cada linhagem celular utilizada;
- Avaliar, através do ensaio de MTT, os efeitos do extrato hidrolisado da planta *Euphorbia tirucalli* na viabilidade celular metabólica (VCM) das linhagens de CAOV A2780, ACRP e OVCAR-3;
- Analisar a eficácia antineoplásica do extrato hidrolisado de *Euphorbia* combinada com o quimioterápico convencional cisplatina;
- Avaliar a eficácia antineoplásica do extrato hidrolisado de *Euphorbia* quando administrado como pré-tratamento, seguido pelo uso da quimioterapia convencional com cisplatina;
- Comparar o efeito antitumoral do extrato de *Euphorbia tirucalli* com a cisplatina, quimioterápico convencional;
- Investigar os mecanismos antineoplásicos do extrato de *Euphorbia tirucalli* como alterações no ciclo celular;
- Analisar o potencial de migração celular das linhagens tratadas com o extrato de *Euphorbia*;
- Analisar e avaliar os efeitos do extrato de *Euphorbia tirucalli* na formação de colônias.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LINHAGENS CELULARES

Foram utilizadas as linhagens celulares de CAO V A2780, ACRP e OVCAR-3. A linhagem A2780 (linhagem celular sensível à cisplatina), foi estabelecida a partir de tecido tumoral de um paciente não tratada (MERCK, 2021). A linhagem ACRP (células com resistência adquirida à cisplatina), foi originada pelo tratamento intermitente da linhagem celular A2780 com cisplatina (SHERMAN-BAUST et al., 2003; BCRJ, 2023). Por sua vez, a linhagem OVCAR-3 (células multirresistentes, resistência intrínseca a diversos antineoplásicos convencionais, incluindo a cisplatina), é oriunda de células epiteliais provenientes da ascite de uma paciente portadora de adenocarcinoma ovariano em estágio avançado que foram isoladas no ano de 1982 (ATCC, 2023). Estas células foram subsequentemente utilizadas como modelo experimental para a análise da resistência a fármacos no contexto do CAO V.

4.2 EXTRATO DE *Euphorbia tirucalli*

O extrato de *Euphorbia tirucalli* foi gentilmente doado pelo Prof. Dr. Ricardo Kuster, do Laboratório de Produtos Naturais (Universidade Federal do Espírito Santo - UFES). Os exemplares da espécie *Euphorbia tirucalli* foram coletados no campus da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado em Goiabeiras (Vitória/ES) ao longo de todo o ano 2022. *Euphorbia tirucalli* L. latex (sinônimos: *Euphorbia tirucalli* var. rhip-saloides (Willd.) A. Chev. foi verificado de acordo com o acesso ao site Plant List; <http://www.theplantlist.org>) (“Lista de Plantas”, 2013). O látex foi coletado, após a incisão dos caules das plantas, gota a gota, entre 8 e 9 horas da manhã, em solução contendo 100 mL de água destilada (SOUZA, et al. 2019). O composto eufol manteve uma média consistente em sua porcentagem nas diferentes colheitas realizadas, registrando uma média de aproximadamente 80% do extrato total. O extrato utilizado foi submetido à hidrólise, resultando na quebra das substâncias como os ésteres diterpênicos de ingenol e forbol de acordo com o procedimento descrito por SOUZA, et al., (2019).

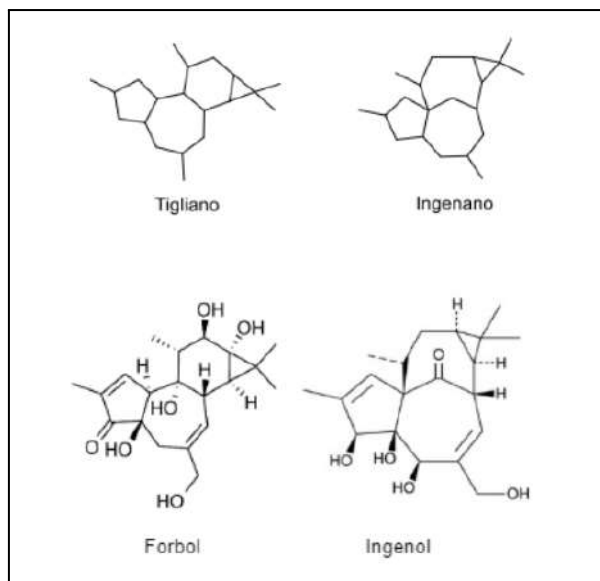


Figura 7. Esqueletos diterpênicos do tipo tigliano e ingenano e suas formas hidroxiladas forbol e ingenol.

A hidrólise é necessária devido à restrição do uso do extrato pela presença de substâncias tóxicas em sua composição pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). De acordo com Souza et al., (2019) uma das justificativas para a proibição do uso comercial da *Euphorbia tirucalli* foi a detecção de compostos diterpênicos em seus extratos, mais especificamente ésteres diterpênicos de núcleo tigliano e ingenano. As amostras hidrolisadas de *Euphorbia tirucalli* foram armazenadas a $-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solução estoque foi preparada em concentração de 20 mg/mL em DMSO.

4.3 DESCONGELAMENTO CELULAR

As amostras das linhagens celulares de CAO V OVCAR-3, ACRP e A2780 foram armazenadas em freezer -80°C e, posteriormente, descongeladas bruscamente a 37°C . Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a $1120 \times g$ e *break zero* a 27°C . Após a centrifugação, foi observado *pellet* no fundo do tubo, sendo o sobrenadante descartado. As células, então, foram ressuspensas em 1mL de meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de SFB (Vitrocell), 1% (p/v) de solução estabilizada de penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (100 μg /mL) (Gibco/Invitrogen) e 1% (p/v) de solução anfotericina B

(Sigma). Por fim, foram transferidas para garrafa de cultura de 75cm², que foram então incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

4.4 CULTIVO CELULAR

As células de adenocarcinoma de ovário OVCAR-3, ACRP e A2780 foram cultivadas em garrafas de 75cm², com adição de 15mL de meio Meio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% (v/v) de SFB (Vitrocell), 1% (p/v) de solução estabilizada de penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (100µg/mL) (Gibco/Invitrogen) e 1% (p/v) solução anfotericina B (Sigma). O cultivo foi realizado em estufa a 37°C e com atmosfera a 5% de CO₂ até a subconfluência. Semanalmente, as garrafas foram analisadas em microscópio óptico de luz invertida ZEISS para avaliação do aspecto do meio e das células em cultivo, bem como seu crescimento e confluência.

Durante o período de cultivo, o conteúdo das garrafas (meio de cultivo) era descartado sempre que o meio DMEM apresentasse uma coloração amarelada ou alaranjada, o que sinaliza acidificação e torna o meio inadequado para a cultura celular. Posteriormente, as células foram submetidas a três lavagens com solução tampão fosfato-salino (PBS) 1X. Em seguida, um novo meio foi adicionado e as garrafas foram novamente incubadas sob as mesmas condições de cultivo previamente mencionadas. Quando a confluência das células ultrapassava 70%, procedia-se à tripsinização, onde, dependendo da necessidade, as células eram submetidas à passagem, ao congelamento ou eram descartadas.

4.5 ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM RESISTENTE

Com o propósito de evocar a resistência à cisplatina na linhagem ACRP (originada a partir da linhagem A2780), foram aplicados choques com concentrações crescentes (4 a 6 mM) do quimioterápico padrão cisplatina, ocorrendo aproximadamente uma vez por semana, ao longo de um período que se estendeu por quase dois meses. Os choques foram aplicados utilizando micropipeta diretamente no meio de cultura DMEM das garrafas de 75 cm² em que as células

foram cultivadas. O desenvolvimento de linhagens resistentes tem sido amplamente utilizado para investigar mecanismos de citotoxicidade e resistência de células tumorais aos quimioterápicos.

4.6 PLAQUEAMENTO PARA O TESTE DE VCM PELO MÉTODO DE MTT

Às células cultivadas em garrafas de 75 cm² até a subconfluência, foram adicionados 2 a 3mL de solução de tripsina. Em seguida foram armazenadas na estufa durante 5 minutos a 37°C e 5% de CO₂. Após esse período, foi conferido o desprendimento das células utilizando microscópio invertido. As células foram tripsinizadas e o sobrenadante descartado. Posteriormente, foi adicionado 1mL de meio DMEM e, após a homogeneização, foi retirada a alíquota de 10µL para preparação com a solução de coloração azul de Tripán. A contagem do número de células foi realizada utilizando a câmara de Neubauer e, após a contagem, foi calculada a densidade ideal de células por poço, sendo esta 1x10⁴. A seguinte fórmula foi usada para o cálculo do número total de células:

$$\text{CÉLULAS IDEAIS POR POÇOS X 1000/QUANTIDADE DE CÉLULAS TOTAIS}$$

As células foram plaqueadas em triplicatas e adicionados 100µL de meio DMEM em uma densidade 1x10⁴ células por poço. Posteriormente, as placas de 96 poços foram incubadas por 24h a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas mecânicas e biológicas.

4.7 CÁLCULO DA IC₅₀ ESTIMADA DAS MOLÉCULAS TESTADAS EM CÉLULAS DE CAO V

A estimativa da IC₅₀ das moléculas testadas em células de CAO V foi conduzida com base nas curvas dose-resposta individuais geradas para cada substância por meio do ensaio de MTT de VCM, conforme detalhado anteriormente. Os valores de IC₅₀ foram empregados como métricas para a comparação da

potência relativa das diferentes substâncias testadas. A determinação da IC₅₀ foi realizada utilizando o software GraphPad Prism, versão 5.0. A partir da determinação do valor da IC₅₀ foram determinados outros valores necessários para realização dos experimentos como IC_{37,5}, IC₂₅ e IC_{12,5}.

4.8 ANÁLISE DA VCM DAS CÉLULAS DE CAO V EM RESPOSTA AO EXTRATO HIDROLISADO DE *Euphorbia tirucalli*

Para avaliação do efeito citotóxico do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* nas linhagens de CAO V estudadas e supracitadas, foi utilizado o método de determinação da VCM por meio do ensaio de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5- difeniltetrazólio) (Sigma) (RISS et. al., 2013). As células foram depositadas em placas de 96 poços em uma densidade de 1×10^4 células por poço, foram adicionados 100µL de meio DMEM e mantidas na estufa por 24h a 37°C e 5% de CO₂ para aderência das células. Após esse período, foi adicionado o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* nas concentrações de 50 a 400µg/mL. Após 24h de incubação, 50µL de MTT estéril (5 mg/mL, Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço. Após a incubação a 37°C por 4h, foram adicionados 100µL de DMSO para solubilizar o produto MTT-formazan e homogeneizados completamente. A absorbância espectrométrica a 560nm foi medida com um leitor de ELISA com monocromador EPOCH. A IC₅₀, definida como a concentração da droga que resultou em 50% das células metabolicamente viáveis e 50% de células metabolicamente inviáveis, foi estimada utilizando o programa GraphPad Prism a partir da curva dose-resposta obtida pela porcentagem de VCM versus a concentração do extrato hidrolisado da planta.

4.9 ANÁLISE DA VCM DE CÉLULAS DE CAO V EM RESPOSTA À IC₂₅ DO EXTRATO HIDROLISADO DE *Euphorbia tirucalli*

Para avaliação do efeito citotóxico da IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* na linhagem OVCAR-3, foi empregada a determinação da VCM pelo método de MTT de Riss et. al., (2013). As células foram depositadas em placas de 96 poços em uma densidade de 1×10^4 células por poço. Após 24h, foi adicionado o extrato

hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* na concentração de 106,15µg/mL. E depois 24h de incubação, 50µL de MTT estéril (5 mg/mL, Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada poço. Após a incubação a 37°C por 4h, foram adicionados 100µL de DMSO para solubilizar o produto MTT-formazan e homogeneizados completamente. A absorbância espectrométrica a 560nm foi medida com um leitor de ELISA com monocromador EPOCH. Os valores de IC₅₀ foram utilizados para analisar a potência do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. O software GraphPad Prism versão 5.0 foi empregado para o cálculo da VCM a partir da curva dose-resposta obtida pela porcentagem de VCM versus a concentração do extrato hidrolisado da planta.

4.10 ANÁLISE DA VCM DAS CÉLULAS DE CAO V EM RESPOSTA À CISPLATINA

Para fins de análise de VCM das células de CAO V estudadas, utilizamos diferentes concentrações do fármaco convencional cisplatina (0,78-100M) e empregado o método de MTT descrito por Riss et. al., (2013). A absorbância espectrométrica a 560nm foi medida com um leitor de ELISA com monocromador EPOCH. Para o cálculo da IC₅₀ foi utilizado o software GraphPad Prism versão 5.0.

4.11 INVESTIGAÇÃO DA VCM DE CÉLULAS DE CAO V EM RESPOSTA À CISPLATINA COM PRÉ-TRATAMENTO DE EXTRATO HIDROLISADO DE *Euphorbia tirucalli*

Para fins de análise de VCM de células e CAO V estudadas, realizamos um pré-tratamento com a IC₅₀ do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*, seguido do tratamento com o fármaco convencional cisplatina, utilizando o método de MTT de determinação da VCM de Riss et. al., (2013). As linhagens em análise receberam um pré-tratamento utilizando o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* na concentração previamente determinada de sua IC₅₀. As células foram depositadas em placas de 96 poços em uma densidade de 1×10⁴ células por poço. Foram adicionados 100µL de meio DMEM às células que foram mantidas na estufa por 24h a 37°C e 5% de CO₂ para aderência das células. Após esse período foi adicionado o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* na concentração de 212,3µg/mL. Após um período de 24 horas, essas linhagens foram submetidas ao tratamento com

cisplatina em concentrações variando de 0,78 a 100M. A leitura da absorbância espectrométrica a 560nm foi realizada utilizando um leitor de ELISA equipado com monocromador EPOCH. Os valores de IC₅₀ obtidos foram utilizados para analisar a potência das substâncias testadas. O cálculo da IC₅₀ foi realizado por meio do software GraphPad Prism na versão 5.0.

4.12 ANÁLISE DA VCM DAS CÉLULAS DE CAO V NA COMBINAÇÃO DE CISPLATINA COM EXTRATO HIDROLISADO DE *Euphorbia tirucalli*

As linhagens celulares em estudo foram submetidas a um tratamento de cisplatina em combinação com o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. Inicialmente, as células foram semeadas em placas de cultura de 96 poços, com uma densidade de 1×10^4 células por poço (RISS et. al., 2013). Posteriormente, 100µL de meio DMEM foram adicionados e as células foram incubadas a 37°C com uma atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas para permitir a aderência celular.

Após esse período, o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*, nas concentrações previamente determinadas de IC₂₅ ou IC₅₀, foi adicionado aos poços, juntamente com cisplatina nas concentrações correspondentes às suas respectivas IC₂₅ ou IC₅₀. A absorbância espectrofotométrica das células foi então medida a 560nm usando um leitor de ELISA equipado com monocromador EPOCH. Os valores de IC₅₀ foram utilizados para analisar a potência das substâncias testadas. O software GraphPad Prism versão 5.0 foi empregado para o cálculo da IC₅₀.

4.13 ENSAIO DE MIGRAÇÃO CELULAR

O ensaio de migração celular ou ensaio do arranhão (MARTINOTTI e RANZATO, 2019) foi realizado para analisar o desempenho de migração das células estudadas quando tratadas com o extrato hidrolisado de *Euphorbia* ou com o quimioterápico cisplatina. A linhagem de CAO V OVCAR-3 foi cultivada em meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de SFB (Vitrocell), 1% (p/v) de solução estabilizada de penicilina (100 unidades/mL), estreptomicina (100µg/mL) (Gibco/Invitrogen), e 1% (p/v) solução anfotericina B (Sigma) em placa de 24 poços a 37°C e 5% CO₂. As células foram tripsinizadas e centrifugadas e o sobrenadante

descartado. Após isso, as células foram plaqueadas em uma densidade média de 10^7 por poço, em placas de 24 poços e mantidas em estufa nas especificações padrão. Após as células atingirem uma confluência entre 80-95% foi feito um arranhão com a ponta de uma ponteira 200 ($\pm 0,6$ mm) em uma monocamada de células (Figura 8). Após a execução do arranhão, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Em seguida, adicionou-se um novo meio de cultura contendo mitomicina (5mg/mL) para inibir a proliferação celular, sendo aplicado 200 μ l por poço. Após duas horas, a mitomicina foi removida e os poços foram lavados novamente com PBS 1X. Posteriormente, foram realizados tratamentos farmacológicos na linhagem OVCAR-3, utilizando diferentes concentrações do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*, a saber: IC₅₀ (212,3 μ g/mL), IC_{37,5} (159,4 μ g/mL), IC₂₅ (106,15 μ g/mL), e IC_{12,5} (53,25 μ g/mL). Também foram conduzidos tratamentos com cisplatina em monoterapia utilizando IC₂₅ (28,03 μ M), bem como em associação com o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*, e ainda um pré-tratamento com IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia* seguido por tratamento com IC₂₅ da cisplatina na linhagem de CAO V referida.

As imagens do ensaio de migração celular foram capturadas usando um microscópio ZEISS, e a quantificação das medidas das áreas de migração foram realizadas por meio de análise de imagens utilizando o software ImageJ. Foram feitas cinco medições por região de cada imagem capturada para obter as médias individuais. A média das áreas foi calculada a partir da soma dessas medições individuais, utilizando o grupo controle como referência. A análise estatística dos resultados foi realizada empregando os softwares ImageJ e GraphPad Prism.

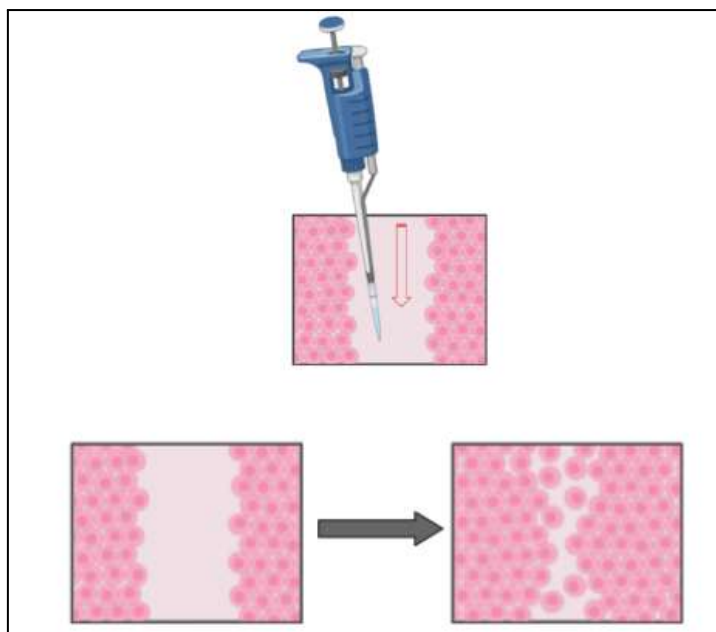


Figura 8. Migração celular - Realização da ranhura com a ponta da ponteira e representação da atividade de migração celular.

4.14 ENSAIO CLONOGÊNICO

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônias foi realizado de acordo com o protocolo descrito por Franken et al. (2006). A linhagem celular OVCAR-3 foi mantida em meio DMEM, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell), 1% (p/v) de uma solução estabilizada contendo penicilina (100 unidades/mL) e estreptomicina (100µg/mL) (Gibco/Invitrogen) e 1% (p/v) de solução de anfotericina B (Sigma). As culturas foram mantidas na estufa a 37°C em uma atmosfera controlada de 5% de CO₂. Após o período de cultivo, as células foram submetidas a tripsinização e centrifugadas a 1120 x g e *break zero* a 27°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram plaqueadas em uma densidade de 10² células por poço em placas de cultura de 6 poços. As células foram, então, incubadas por 24 horas para promover sua adesão às placas. Após este período, a droga de interesse foi adicionada às células em duas concentrações, a primeira correspondente à IC₂₅ (106,15µg/mL) e a segunda correspondente à IC₅₀ (212,3µg/mL).

As células plaqueadas ficaram por 24h em contato com a droga e, após esse período, a droga foi retirada e as células receberam meio DMEM e ficaram na estufa em condições padrão a 37°C e 5% de CO₂ por um período de 7 dias.

4.14.1 Incubação e Contagem das colônias

Após o período de incubação, a formação das colônias foi avaliada utilizando o microscópio óptico invertido ZEISS. Para garantir a acurácia dos resultados, os experimentos foram conduzidos em triplicata biológica. As placas foram lavadas com 2 mL de PBS 1X por poço e foram adicionados 2 mL de uma mistura de 6,0% (v/v) de formaldeído e 0,5% (p/v) de violeta de cristal por pelo menos 30 minutos.

Após esse período, o formaldeído e o cristal violeta foram cuidadosamente removidos utilizando água destilada, as placas ficaram ao ar livre em temperatura ambiente para secagem.

4.14.2 Contagem das colônias

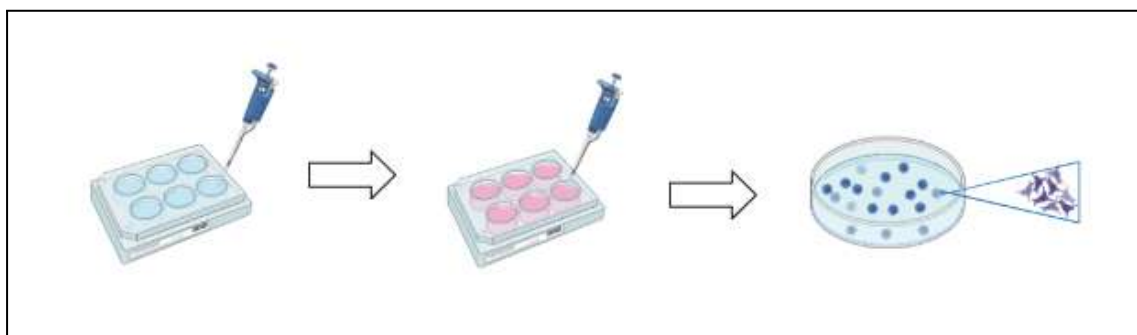


Figura 9. Demonstração do plaqueamento, adição da droga e formação das colônias do ensaio clonogênico.

As colônias foram contadas uma a uma e os dados foram coletados para determinar a eficácia do tratamento. Para calcular a eficiência do plaqueamento das células OVCAR-3 foi utilizada a fórmula como mostra a Figura 10.

$$EP = \frac{\text{N}^\circ \text{ Colônias formadas}}{\text{N}^\circ \text{ Células plaqueadas}} \times 100\%$$

Figura 10. Cálculo para quantificar a eficiência do plaqueamento (EP = Eficiência de Plaqueamento)

$$FS = \frac{\text{N}^\circ \text{ Colônias após tratamento}}{\text{N}^\circ \text{ Células plaqueadas} \times EP}$$

Figura 11. Cálculo para quantificar a fração sobrevivente após os experimentos - FS (Fração sobrevivente)

Também foram calculadas as taxas de sobrevivência clonogênica para as condições experimentais testadas. Para realizar os cálculos, foi utilizado a fórmula como mostra a Figura 11. Após a contagem das colônias, os dados foram analisados, utilizando o software GraphPad Prism 5.

4.15 CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo é uma técnica que permite a análise de células suspensas em meio líquido. Dentre outras finalidades, a técnica pode ser utilizada para analisar as fases do ciclo celular. Foram analisados os efeitos do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em monoterapia nas etapas do ciclo celular. Além disso, para controle das fases do ciclo celular, também foram realizadas as leituras do ciclo com IC₅₀ do paclitaxel e controle com células não tratadas. Os ensaios foram realizados de acordo com o protocolo publicado pelo *Institute of Cell and Molecular Science - Flow Citometry Core Facility - Barts and The London* (School of Medicine and Dentistry, 2024). As células foram semeadas na densidade de 1x10⁴ cel/mL em placas de 96 poços, sendo que, após 24h, foram tratadas com IC₅₀ do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. Após 24h de tratamento, as células foram tripsinizadas e centrifugadas por 5 min a 1120 x g a 20°C, o sobrenadante foi descartado e o *pallet* lavado com PBS 1X. As células foram, então, ressuspensas em 150µL de PBS e fixadas com 1350µL de etanol 70% (v/v). Depois de fixar por pelo menos 30 min a 4°C, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1120 x g e lavadas com 1mL de PBS 1X. Após uma nova centrifugação, foram adicionados 50µl de RNAase (100µl/mL) (Sigma) e 30µl de iodeto de propídeo (PI) (40µl/mL) (Quatro G) em 200mL de PBS 1X. As amostras foram incubadas por 5 dias a 4°C, protegidas da luz. A leitura foi realizada no citômetro ACEA BIO SCIENCE (NOVOCYTE 3000), a excitação (488nm) e a emissão (617nm). Os dados foram analisados pelo software FlowJo e pelo GraphPad Prism.

4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de uma via com *post tests* apropriados aos experimentos realizados e descritos na legenda de cada figura. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. O programa utilizado para os cálculos estatísticos foi o GraphPad Prism 5. Foi utilizando o programa ImageJ, para quantificar a migração celular. E para análise do ciclo celular, foi utilizado o software FlowJo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 A LINHAGEM OVCAR-3 APRESENTA UMA MAIOR SENSIBILIDADE AO EXTRATO HIDROLISADO DE *Euphorbia tirucalli* EM RELAÇÃO À A2780 E ACRP

Experimentos de VCM foram conduzidos com o propósito de analisar a viabilidade celular e determinar a IC_{50} estimada das linhagens de CAO V submetidas ao tratamento com o extrato hidrolisado de *Euphorbia* e com a cisplatina. O MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) penetra células viáveis metabolicamente viáveis e em suas mitocôndrias, por conta de sua polaridade positiva, pode ser metabolizado em cristais de formazan. Para a realização do ensaio de MTT, estabeleceu-se um grupo de controle composto por células não tratadas que foram cultivadas exclusivamente em meio DMEM e os grupos experimentais foram realizados com três linhagem de CAO V (A2780, ACRP e OVCAR-3). Os experimentos foram realizados durante um período de 24 horas de exposição ao extrato hidrolisado da *Euphorbia tirucalli*, e as linhagens demonstraram sensibilidade heterogênea à substância. As linhagens A2780 e ACRP apresentaram um declínio na VCM, e apesar dos resultados serem estatisticamente significativos, o valor da IC_{50} apresentado pelas linhagens excedeu o valor da concentração máxima testada (400 μ g/mL). De fato, a linhagem A2780 apresentou uma IC_{50} de 520,9 μ g/mL e a linhagem ACRP apresentou uma IC_{50} de 537,4 μ g/mL (Figura 12).

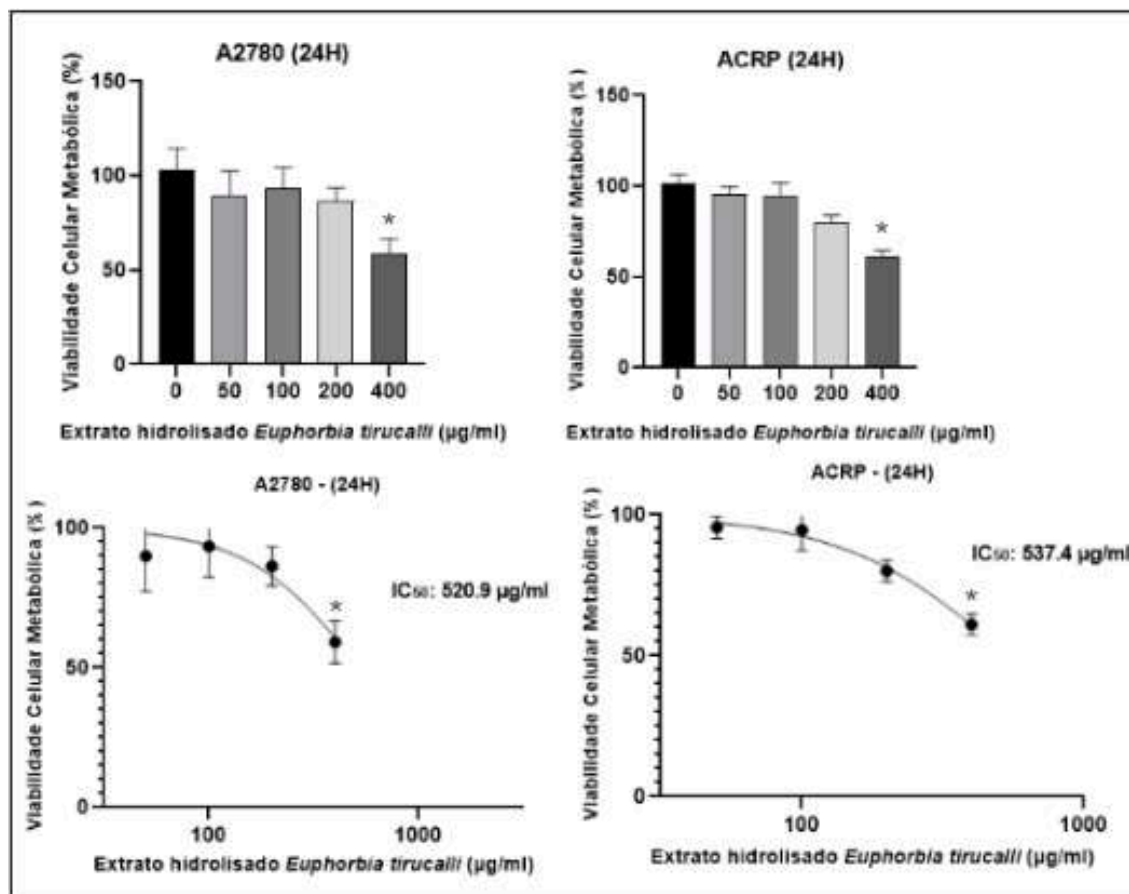


Figura 12. Análise da VCM das linhagens celulares A2780 (imagem à esquerda) e ACRP (imagem à direita), submetidas a um tratamento de 24 horas com extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em concentrações variando de 50 a 400µg/mL. A avaliação da VCM foi conduzida, utilizando o método MTT. Células não submetidas a tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, foram utilizadas como grupo controle. Os conjuntos de dados obtidos foram submetidos à análise estatística, empregando o software GraphPad Prism. Determinação dos valores de IC_{50} da substância de interesse nas linhagens celulares A2780 e ACRP foram 520,9 e 537,4 µg/mL, respectivamente. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via, com valor de $*p < 0,05$ estatisticamente significativos para ACRP e A2780. (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica).

Além disso, a VCM da linhagem OVCAR-3 diminuiu significativamente após exposição ao extrato hidrolisado de *Euphorbia* por 24 horas, demonstrando uma IC_{50} de 212,3µg/mL (Figura 13). Este resultado sugere uma potência considerável do extrato hidrolisado nessa linhagem celular, especialmente em comparação com as outras linhagens testadas. Vale ressaltar que a OVCAR-3 é conhecida por sua resistência a fármacos convencionais, o que torna sua sensibilidade ao extrato hidrolisado de *Euphorbia* um achado notável, podendo sugerir um potencial fármaco

para ser abordado em combinação com fármacos convencionais no tratamento de CAO.V.

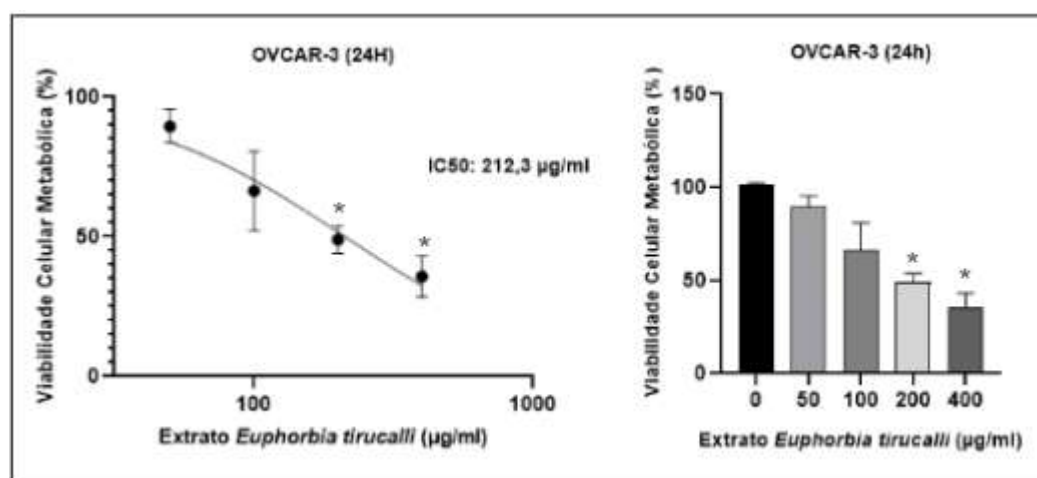


Figura 13. Análise da VCM da linhagem celular OVCAR-3 submetida à exposição ao extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* por um período de 24 horas, em concentrações variando entre 50 e 400µg/mL. A avaliação da VCM foi conduzida, utilizando o método do MTT. Células não submetidas a tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, serviram como grupo controle. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism. Determinação do valor de IC₅₀ na linhagem celular OVCAR-3 foi de 212,3µg/mL. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via, com valor estatisticamente significativo de p<0,05. (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica).

Esses resultados corroboram com alguns estudos, como o de Silva et al. (2019), no qual se evidenciou o efeito antitumoral do composto eufol por meio de ensaios de viabilidade metabólica em várias linhagens celulares de glioma. Neste estudo, apesar da demonstração de respostas heterogêneas ao eufol entre as diversas linhagens celulares investigadas, a análise da média dos valores obtidos revelou significância estatística, em concordância, portanto, com nossos achados que demonstraram que a linhagem OVCAR-3 se mostrou mais sensível ao extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em relação às linhagens A2780 e ACRP.

Além dessas observações, outros estudos, tais como o de Wang et al. (2013) e o de Lin et al. (2012) apresentaram descobertas similares. De fato, esses estudos evidenciaram uma redução na viabilidade celular das linhagens de câncer de mama e nas linhagens de neoplasia maligna gástrica quando submetidas ao tratamento

com eufol, indicando, mais uma vez, a eficácia dessa substância na inibição da proliferação celular.

Ademais outros trabalhos, como um estudo muito importante para compreensão do potencial da atividade antitumoral do extrato hidrolisado de *Euphorbia*, demonstrou que o eufol promoveu citotoxicidade em diversas linhagens celulares de câncer humano. A atividade antitumoral do eufol foi avaliada em 73 linhagens de neoplasias malignas, sendo elas divididas em 15 diferentes modelos de tumores sólidos (mama, cólon, bexiga, próstata, pulmão, pâncreas, esôfago, cabeça e pescoço, cervical, carcinoma epidermóide, meduloblastoma, coriocarcinoma placentário, carcinoma ovariano, glioblastoma e melanoma). A partir disso, foi visto que diversas linhagens demonstraram certa sensibilidade ao eufol, principalmente o carcinoma espinocelular do esôfago, o carcinoma pancreático, próstata, melanoma e cólon (SILVA et al., 2018).

Pode-se notar, portanto, que a substância eufol age de forma heterogênea em diferentes linhagens, sendo algumas mais sensíveis ao eufol e outras mais resistentes. Em nosso trabalho, foi visto o mesmo comportamento, quando tivemos linhagens mais sensíveis (OVCAR-3) e linhagens mais resistentes (A2780 e ACRP) ao extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. Em adição às pesquisas já mencionadas, um trabalho empregando o extrato bruto de *Euphorbia tirucalli* para inibir o crescimento do tumor ascítico de *Ehrlich* em camundongos *Swiss* revelou que houve uma redução no número total de células tumorais nos camundongos tratados com o extrato referido. No entanto, é importante ressaltar que os resultados dessa pesquisa não alcançaram significância estatística (SANTOS et al., 2016).

As diferentes respostas ao extrato, podem estar relacionadas a inúmeros fatores, como por exemplo, nas diferentes expressões de receptores celulares, tal qual, os receptores de tirosina quinases (RTK), os quais estão relacionados ao crescimento celular, motilidade, diferenciação e metabolismo das células. Além disso, outros fatores que podem estar relacionados à resposta heterogênea das linhagens estão na especificidade ou mutações dos receptores celulares, alterações nas vias metabólicas, microambientes tumorais ou até mesmo em mecanismos de resistência intrínsecos que podem influenciar e limitar a eficácia da substância.

Sendo assim, as diferentes respostas ao extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* entre as linhagens celulares de CAOV reforça a necessidade de estudos que avaliem tanto a eficácia e a potência, bem como os mecanismos de ação antitumorais dessa substância, visando potencializar seu uso terapêutico contra diferentes tipos de câncer.

5.2 ESTABELECIMENTO DA LINHAGEM RESISTENTE: A LINHAGEM DERIVADA ACRP É APROXIMADAMENTE 3,5 VEZES MAIS RESISTENTE À CISPLATINA QUE SUA PARENTAL A2780

Com o objetivo de analisarmos a resistência da linhagem ACRP à cisplatina em comparação com a A2780, conduzimos ensaio de VCM em ambas as linhagens. Anteriormente, para restaurar a resistência da ACRP à cisplatina, expusemos as células a concentrações crescentes do quimioterápico em intervalos semanais. A geração de linhagens resistentes tem sido uma abordagem amplamente empregada na pesquisa dos mecanismos de ação citotóxica e resistência aos agentes quimioterápicos. Estudos demonstram que quimioterápicos causam o desenvolvimento de resistência adquirida aos medicamentos em vários tipos de tecidos durante a quimioterapia (KARS et al., 2006).

Ao analisar a VCM dessas linhagens tratadas com a cisplatina, observou-se que a linhagem ACRP manifestou resistência ao tratamento com o fármaco quando comparada à linhagem A2780, conforme já esperado, considerando o perfil de resistência associado a essa linhagem. A linhagem ACRP apresenta resistência adquirida (ou extrínseca) à cisplatina, sendo aquela que em um primeiro momento é sensível à droga, porém se torna resistente em resposta ao tratamento, como resultado de mutações genéticas que alteram a expressão proteica ou produzem novas mutações a jusante do local de ação de um determinado medicamento, neutralizando a eficácia do fármaco (revisado por ROMANI, 2022). O método utilizado para gerar a linhagem ACRP resistente à cisplatina mimetiza o desfecho usual de esquema terapêutico utilizado na prática clínica do CAOV.

Notavelmente, uma diferença aproximada de 3,5 vezes foi constatada entre os valores de IC_{50} da cisplatina na linhagem A2780 (10,13 μ M) versus a linhagem

resistência aos fármacos antineoplásicos é crucial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes, que possam superar as barreiras ao longo do tratamento e melhorar os resultados para os pacientes de câncer.

Nos ensaios subsequentes, devido à maior sensibilidade da linhagem OVCAR-3 ao extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* e ao valor da sua IC_{50} , os ensaios foram realizados apenas com esta linhagem.

5.3 REDUÇÃO NA VCM DA LINHAGEM OVCAR-3 TRATADAS COM CISPLATINA APÓS PRÉ-TRATAMENTO COM EXTRATO HIDROLISADO DE *Euphorbia tirucalli*

O ensaio de VCM utilizando o quimioterápico convencional cisplatina também foi realizado na linhagem OVCAR-3 e, conforme previamente esperado, a linhagem demonstrou uma IC_{50} de $56,07\mu\text{M}$ após o tratamento com o fármaco (Figura 15A). De acordo com a literatura, a linhagem OVCAR-3 exibe resistência intrínseca, ou seja, resistência primária, à cisplatina. A resistência primária se caracteriza pela falta de resposta das células cancerosas à quimioterapia desde o primeiro tratamento (Revisado por ROMANI, 2022).

Dessa forma, com o propósito de investigar a possibilidade do extrato hidrolisado de *Euphorbia* auxiliar na diminuição da VCM promovida pelos agentes quimioterápicos convencionais, procedeu-se por período de pré-incubação das células OVCAR-3 com o extrato hidrolisado por 24 horas, seguido por um tratamento com a cisplatina também com duração de 24 horas. Conforme evidenciado na Tabela 3, observou-se uma drástica redução no valor de IC_{50} nas células submetidas ao pré-tratamento em comparação com as células tratadas em monoterapia com a cisplatina, resultando em uma diferença de 52,38%. As células da linhagem OVCAR-3 submetidas ao pré-tratamento apresentaram uma IC_{50} à cisplatina de $3,69\mu\text{M}$, enquanto as células tratadas somente com cisplatina a IC_{50} foi de $56,07\mu\text{M}$. Nossos achados demonstram um valor quinze vezes superior em relação ao grupo de células que não foram pré-tratadas evidenciando, mais uma vez, o potencial antitumoral do extrato hidrolisado de *Euphorbia Tirucalli*.

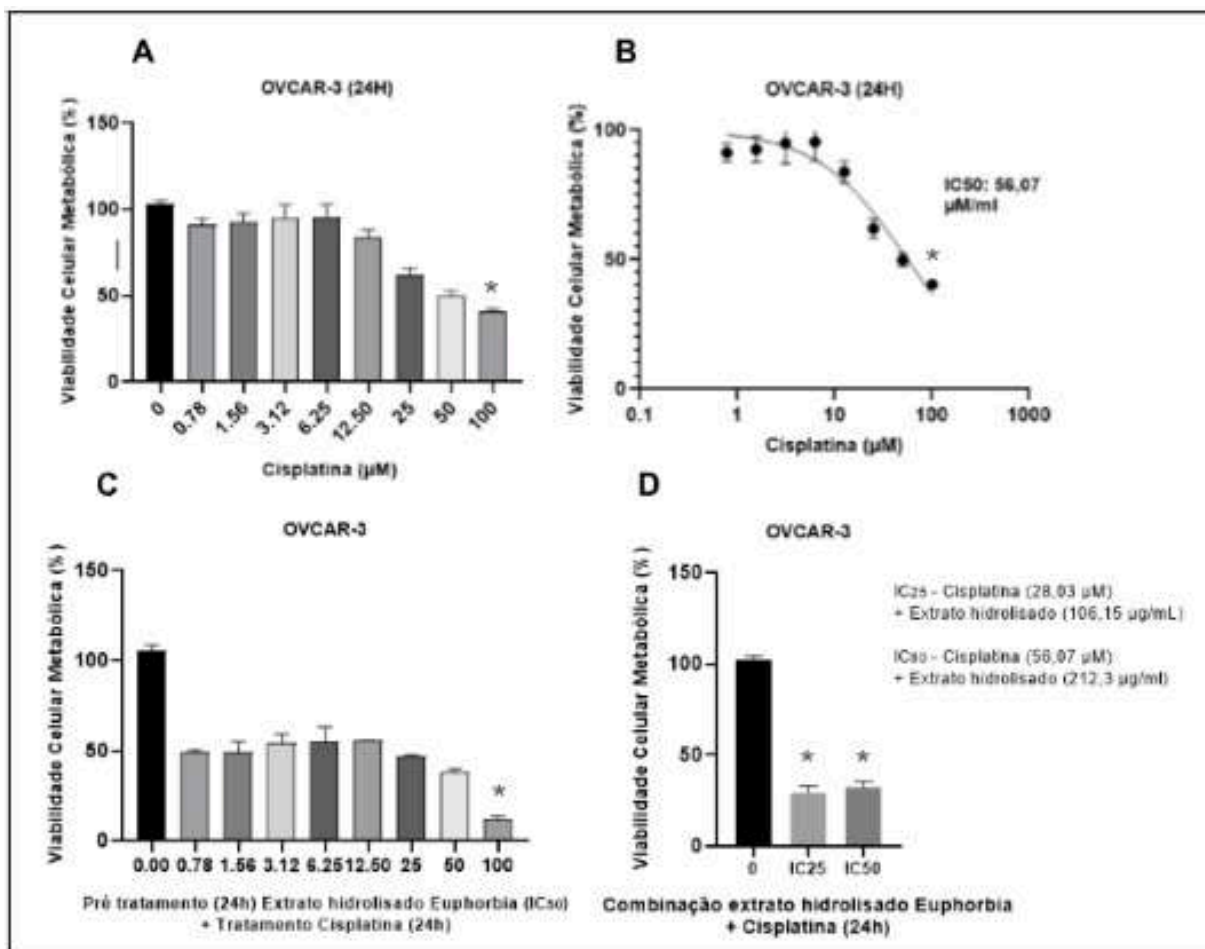


Figura 15. Análise da VCM na linhagem celular OVCAR-3. A avaliação da VCM foi conduzida pelo método do MTT. Células não expostas ao tratamento e cultivadas em meio de cultura DMEM foram empregadas como grupo de controle. Imagem A - Tratamento de 24 horas com o fármaco convencional cisplatina, em concentrações variando de 0,78 a 100µM. Os conjuntos de dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism. IC₅₀ estimada de 56,07µM. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via, sendo *p<0,05 estatisticamente significante (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica). Imagem B - Gráfico da VCM após o tratamento de 24h com o fármaco cisplatina. Imagem C - Pré-tratamento de 24 horas com a IC₅₀ do extrato hidrolisado de *Euphorbia Tirucalli*, seguido por um tratamento de 24 horas com cisplatina, em concentrações variando de 0,78 a 100µM. Os conjuntos de dados obtidos foram analisados utilizando o software GraphPad Prism. IC₅₀ da cisplatina em OVCAR-3 igual a 3,69 µM. Valor estatisticamente significante de *p<0,0001 (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica). Imagem D - Tratamento de 24 horas com a combinação do extrato hidrolisado de *Euphorbia Tirucalli* e cisplatina, nas respectivas concentrações (106,15µg/mL e 212,3µg/mL) e (28,03µM e 56,07µM). A IC₅₀ da cisplatina na OVCAR-3 igual a 0,5181µM. Valor estatisticamente significante de *p<0,0001. N=3 (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica).

5.4 POTENCIAL REDUÇÃO NA VCM DA LINHAGEM OVCAR-3 COM A COMBINAÇÃO DE EXTRATO HIDROLISADO DE *Euphorbia tirucalli* E CISPLATINA

Posteriormente, a fim de analisar se o extrato hidrolisado de *Euphorbia* poderia potencializar o efeito citotóxico dos quimioterápicos convencionais, combinamos o extrato hidrolisado *Euphorbia tirucalli* com o agente cisplatina, células OVCAR-3 foram plaqueadas e expostas a uma combinação das concentrações IC₂₅ ou IC₅₀ (106,15µg/mL e 212,3µg/mL respectivamente) do extrato de *Euphorbia tirucalli* e IC₂₅ ou IC₅₀ da cisplatina (28,03µM e 56,07µM, respectivamente). Houve uma notável diminuição na VCM da linhagem OVCAR-3 manejadas com esquema de tratamento combinado em comparação com as células tratadas exclusivamente com cisplatina, como demonstrado na Tabela 3.

Isso se traduziu em uma redução da IC₅₀ de 56,07µM na linhagem tratada com cisplatina para 0,5181µM na linhagem submetida à combinação do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* e cisplatina. Estes resultados representam um decréscimo em mais de cem vezes na IC₅₀, logo em aumento significativamente aumentado da potência do tratamento, em comparação com a linhagem tratada apenas com cisplatina (Figura 15D). Estes dados podem ser correlacionados com o estudo previamente conduzido por Silva et al., (2019), no qual o eufol, quando utilizado em conjunto com o agente terapêutico convencional temozolomida (TMZ), exibiu um efeito sinérgico substancial, resultando em uma diminuição significativa da VCM. Substâncias naturais empregadas em conjunto com agentes farmacológicos convencionais têm a capacidade de desempenhar um papel benéfico no contexto da terapia quimioterápica (REZENDE et al., 2016).

Em um estudo adicional que envolveu o uso do ácido rosmarínico, uma substância de origem natural, foi demonstrado, *in vitro*, que a combinação do ácido rosmarínico com o paclitaxel resultou em uma redução da VCM da linhagem de câncer de mama triplo-negativo, MDAMB-231, em mais de 80% (SOUZA, 2017).

Tabela 3: Variação do valor de IC₅₀ de cisplatina na linhagem celular OVCAR-3 em resposta a distintos regimes terapêuticos.

Tratamento OVCAR-3 (24h)	IC ₅₀ Cisplatina
Cisplatina	56,07µM
Pré-tratamento (24h) com extrato hidrolisado de Euphorbia e tratamento com cisplatina.	3,69µM
Combinação do fármaco cisplatina e extrato hidrolisado de Euphorbia	0,5181µM

N=3 (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica).

5.5 ANÁLISE DO EFEITO DA IC₂₅ DO EXTRATO HIDROLISADO DE *Euphorbia tirucalli* NA VCM DA LINHAGEM DE CAO V OVCAR-3

Além dos experimentos prévios conduzidos com o extrato hidrolisado, tornou-se necessário avaliar individualmente o efeito da IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* na linhagem celular de CAO V OVCAR-3. Embora os resultados preliminares tenham sugerido visualmente que a IC₂₅ poderia induzir diminuição na VCM das células, a análise estatística mostrou que os efeitos não foram significativos. No entanto, este ensaio específico teve importância para a análise e a discussão dos resultados relacionados à migração celular demonstrados a posteriori.

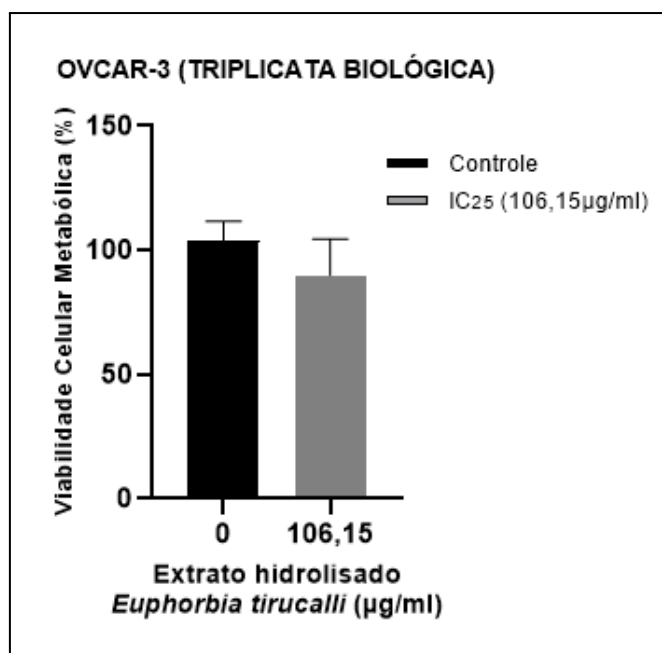


Figura 16. Análise da VCM da linhagem celular OVCAR-3 submetida ao tratamento com o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* por um período de 24 horas na concentração da IC₂₅ (106,15µg/mL). A avaliação da VCM foi conduzida utilizando o método do MTT. Células não submetidas a tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, serviram como grupo controle. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism. Os dados foram analisados pelo teste ANOVA de uma via. A interação não foi estatisticamente significativa, com valor de $p=0,2109$ (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica).

Este experimento será abordado e discutido novamente na seção 5.7, onde será estabelecida uma correlação entre os resultados de migração celular e o ensaio de VCM, com o objetivo de obter uma compreensão mais abrangente dos efeitos do extrato hidrolisado de *Euphorbia* em diferentes processos celulares e sua relevância para a pesquisa em tratamentos anticancerígenos.

5.6 POTENCIAL MODULAÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR DE CÉLULAS OVCAR-3 PELO EXTRATO HIDROLISADO DE EUPHORBIA

O ensaio de migração celular é fundamental para avaliar os efeitos de substâncias bioativas na mobilidade celular, especialmente no contexto de processos como cicatrização, angiogênese e metástase (LIANG, PARK, GUAN, 2007).

Nos ensaios realizados com a linhagem OVCAR-3, foram avaliados o efeito do extrato hidrolisado de *Euphorbia* na migração celular tanto em monoterapia

quanto combinação deste com a cisplatina. Observou-se que o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*, na IC₅₀ de 212,3µg/mL reduziu significativamente a quantidade de células metabolicamente viáveis da linhagem OVCAR-3. Nas primeiras 24 horas de tratamento (Figura 17A e 17B), constatou-se uma redução na taxa média de cicatrização da ferida no grupo exposto ao extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* correlacionada com uma diminuição da VCM da mesma linhagem de CAO. Este resultado sugere uma possível inibição da migração celular causada pela indução de morte celular. Essa tendência se acentuou após 48 horas de tratamento (Figura 17C e 17D), período em que o extrato hidrolisado mostrou reduzir de maneira significativa a VCM, como se pode observar na Figura 17, e, conseqüentemente, inibir a cicatrização celular. A continuidade do ensaio até 72 horas se tornou inviável devido à alta taxa de morte celular e da análise estatística.

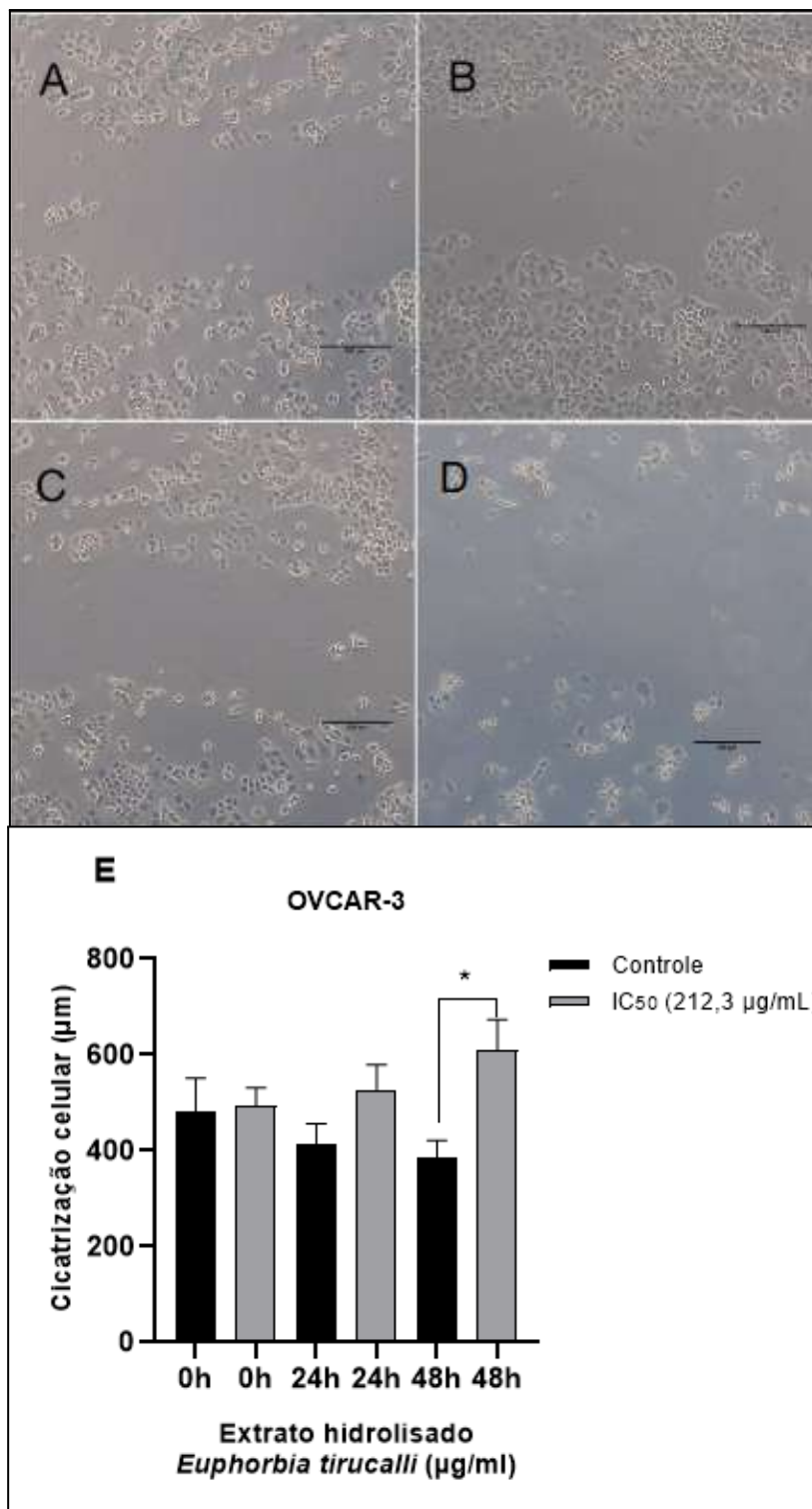


Figura 17. Ensaio de Migração Celular - Resultados obtidos entre 0h e 48h após tratamento com a IC₅₀ (212,3 ug/mL) do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. As imagens digitais das áreas foram obtidas a cada 24h através do microscópio invertido ZEISS para posterior cálculo da taxa de migração de células. Um arranhão padronizado (ferida) foi feito às monocamadas celulares. Células não submetidas ao tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, serviram como grupo controle. A - Controle OVCAR-3 em 0h. B - Controle OVCAR-3 em 48h. C - IC₅₀ do extrato hidrolisado em OVCAR-3 em 0h. D - IC₅₀ do extrato hidrolisado em OVCAR-3 em 48h. A distância em pixels foi

medida e padronizada em relação aos μm da imagem. A porcentagem de fechamento da ferida foi calculada de acordo com a distância no tempo inicial (0h). Medida de referência foi $200\mu\text{m}$. E - Gráfico representando a taxa de migração celular e a cicatrização de feridas ao longo de um período de 0h a 48h, utilizando o tratamento com a IC_{50} ($212,3\mu\text{g/mL}$) do extrato hidrolisado de *Euphorbia* em células OVCAR-3. Células não submetidas a tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, serviram como grupo controle. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism. Valor estatisticamente significativo de $*p < 0,0001$. (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica).

Foi observado que, após um período de 24 horas, houve uma diminuição significativa na cicatrização da ferida. Estes resultados foram estatisticamente significativos, conforme demonstrado na Figura 17. Resultados similares foram encontrados nos estudos de Silva (2019), onde a linhagem de glioma U373 exibiu uma redução na migração celular e uma diminuição na VCM quando expostas à IC_{50} do composto Eufol. Tais achados sugerem que o Eufol exerceu um efeito inibitório tanto sobre a capacidade de migração quanto sobre a VCM das células de glioma, corroborando a eficácia potencial deste composto como agente modulador da migração celular de células cancerosas.

Devido à considerável taxa de mortalidade celular evidenciada nos ensaios de migração celular empregando a IC_{50} do extrato hidrolisado de *Euphorbia*, foram conduzidos ensaios adicionais utilizando $\text{IC}_{37,5}$, IC_{25} e $\text{IC}_{12,5}$ equivalentes a $159,22\mu\text{g/mL}$, $106,15\mu\text{g/mL}$ e $53,25\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Este procedimento visou proporcionar uma análise mais precisa da migração celular, minimizando a influência da morte celular exacerbada observada com a IC_{50} do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em OVCAR-3 (Figura 19).

Os ensaios de migração celular utilizando a $\text{IC}_{37,5}$ do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em OVCAR-3 revelaram resultados análogos aos obtidos nos ensaios com a IC_{50} . O ensaio de migração celular foi realizado durante o período de 24h a 72h. Nas primeiras 24h, observou-se, uma redução na taxa de cicatrização celular no grupo tratado em comparação ao grupo controle, uma tendência que se intensificou após 48h de tratamento com a linhagem OVCAR-3 (Figura 18). No entanto, a continuação do ensaio até 72h foi inviabilizada de ser mensurada estatisticamente devido à alta taxa de morte celular.

Os resultados se mostraram estatisticamente significativos a partir de 24h após tratamento das células OVCAR-3 com a IC_{37,5} (159,22µg/mL) do extrato hidrolisado de *Euphorbia*, como inibição da migração celular. É de extrema importância buscar novos fármacos que tenham a capacidade de inibir a migração celular em células tumorais, já que a migração celular é um processo preocupante na progressão do câncer, permitindo que as células tumorais se movam e invadam tecidos adjacentes ou distantes, contribuindo para a disseminação metastática da doença.

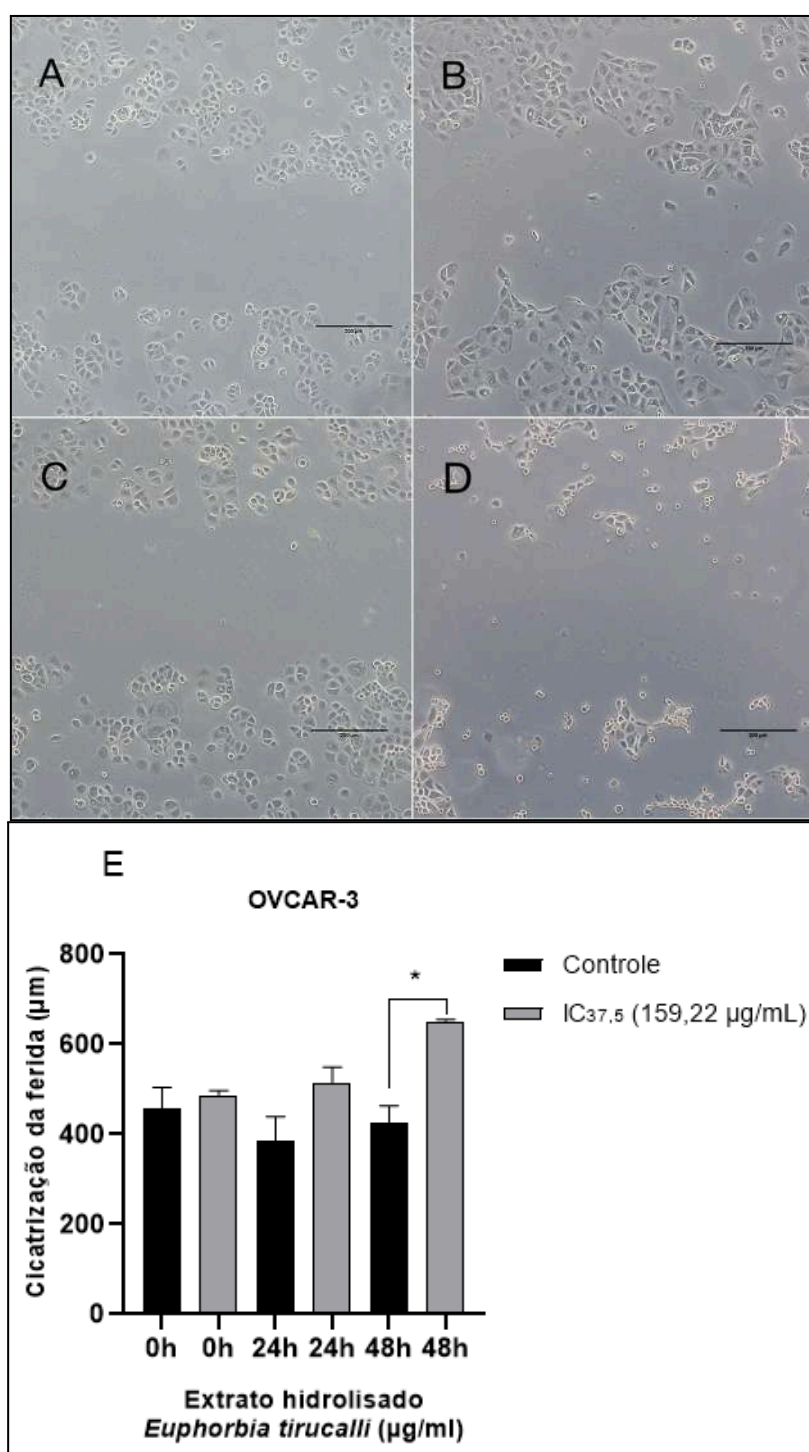


Figura 18. Ensaio de Migração Celular - Resultados obtidos entre 0h e 48h após tratamento das células OVCAR-3 com a $IC_{37,5}$ (159,22 μ g/mL) do extrato hidrolisado de *Euphorbia*. As imagens digitais das áreas foram obtidas a cada 24h através do microscópio invertido ZEISS para posterior cálculo da taxa de migração de células. Um arranhão padronizado (ferida) foi feito às monocamadas celulares. Células não submetidas ao tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, serviram como grupo controle. A - Controle OVCAR-3 em 0h. B - Controle OVCAR-3 em 48h. C - $IC_{37,5}$ do extrato em OVCAR-3 em 0h. D - $IC_{37,5}$ do extrato em OVCAR-3 em 48h. A distância em pixels foi medida e padronizada em relação aos μ m da imagem. A porcentagem de fechamento da ferida foi calculada de acordo com a distância no tempo inicial (0h). Medida de referência foi 200 μ m. E - Gráfico representando a taxa de migração celular e a cicatrização de feridas ao longo de um período de 0h a 48h, utilizando o tratamento das células OVCAR-3 com a $IC_{37,5}$ (159,22 μ g/mL) do extrato hidrolisado de *Euphorbia*. Células não submetidas a tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, serviram como grupo controle. Valor estatisticamente significativo de $*p < 0,0001$. (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica).

Durante a execução dos ensaios de migração celular utilizando a IC_{25} do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*, notamos uma dinâmica distinta na migração em comparação ao controle (dados obtidos com microscópio óptico invertido ZEISS na objetiva de 5x). As células expostas ao extrato hidrolisado seguiram a tendência de uma maior taxa de migração, resultando em uma cicatrização mais rápida em comparação ao grupo não tratado, conforme ilustrado na Figura 19.

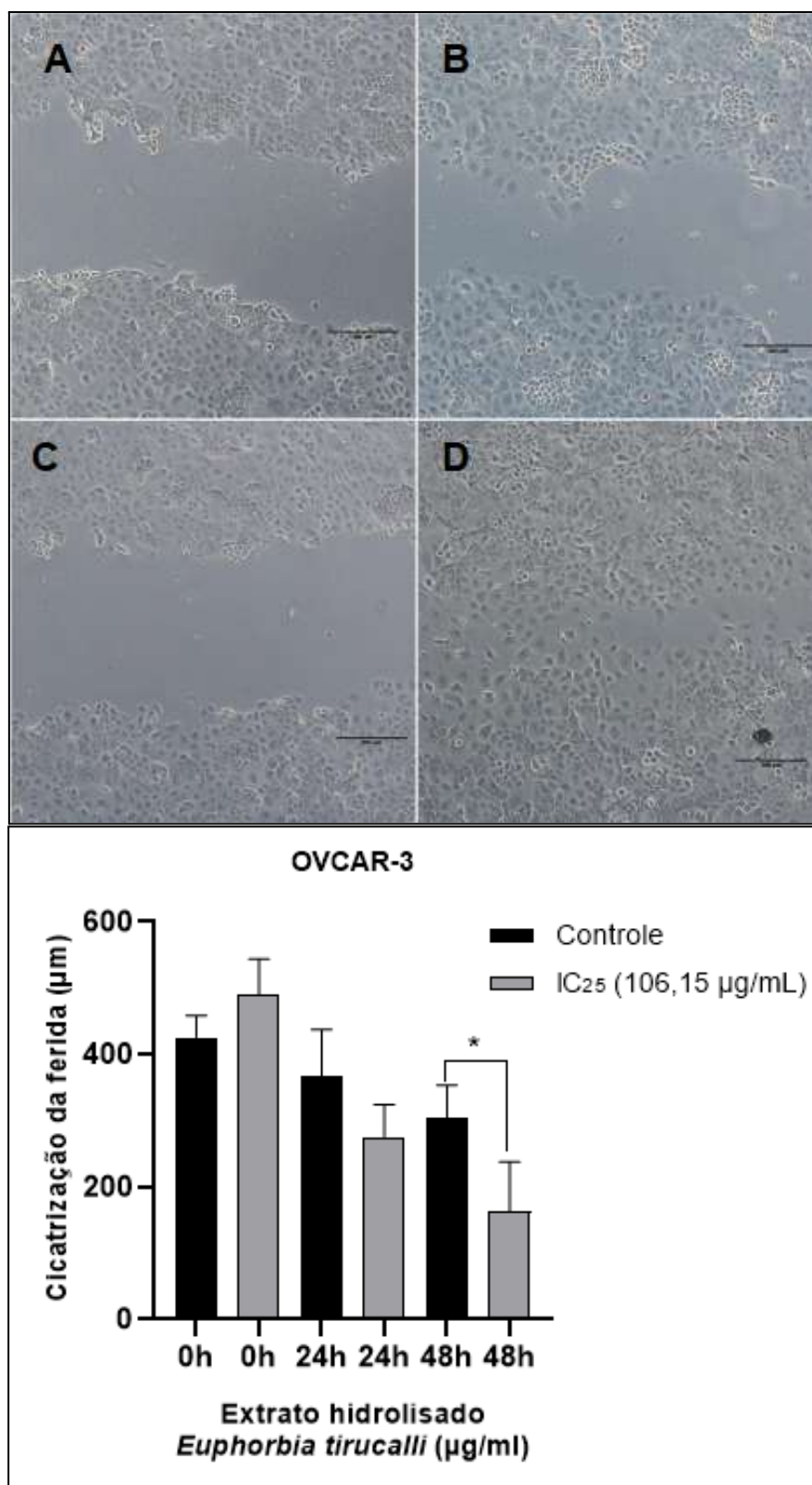


Figura 19. Ensaio de Migração Celular - Resultados obtidos entre 0h e 48h após tratamento com IC₂₅ (106,15 $\mu\text{g/mL}$) do extrato hidrolisado de *Euphorbia*. As imagens digitais das áreas foram obtidas a cada 24h através do microscópio invertido ZEISS para posterior cálculo da taxa de migração de células. Um arranhão padronizado (ferida) foi feito às monocamadas celulares. A - Controle OVCAR-3 em 0h. B - Controle OVCAR-3 em 48h. C - IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia* em

OVCAR-3 em 0h. D - IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia* em OVCAR-3 em 48h. A distância em pixels foi medida e padronizada em relação aos μm e a porcentagem de fechamento da ferida foi calculada de acordo com a distância no tempo inicial (0h). Medida de referência foi 200 μm . E - Gráfico representando a taxa de migração celular e a cicatrização de feridas ao longo de um período de 0h a 48h horas, utilizando a IC₂₅ de 106,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato hidrolisado de *Euphorbia*. Células não submetidas ao tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, serviram como grupo controle. Valor estatisticamente significativo de $*p < 0,0001$. (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica).

Além disso, para compreender melhor o efeito dual das concentrações testadas, foram realizados ensaios de migração celular utilizando a IC_{12,5} (53,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$) do extrato hidrolisado de *Euphorbia* em células OVCAR-3 (Figura 20). Análise de variância de uma via, que considera as variabilidades dentro e entre os grupos, revelou um efeito significativo na migração celular nessa concentração (Figura 20), sugerindo que, apesar de um efeito singelo em relação à IC₂₅, a concentração de 53,07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (IC_{12,5}) do extrato hidrolisado de *Euphorbia* também afetou a migração celular, promovendo uma diminuição da ferida nas células que foram tratadas com o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em OVCAR-3.

A VCM realizada no tópico (5.5) utilizando a IC₂₅ (106,15 $\mu\text{g}/\text{m}$) do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em OVCAR-3 demonstrou um resultado não significativo estatisticamente em 24h de exposição ao extrato hidrolisado (Figura 18). Isso sugere que, nessa concentração, essa substância não induz à diminuição na viabilidade das células em comparação ao controle. Esse resultado é interessante, pois quando analisamos a migração celular ao longo de 24h de exposição à IC₂₅ (106,15 $\mu\text{g}/\text{m}$) do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em OVCAR-3, não houve alterações na diminuição na cicatrização ou aumento da ferida, somente após 48h de exposição ao extrato, a migração apresentou resultados estatisticamente significativos, evidenciando uma exacerbada diminuição da fenda em relação ao grupo controle.

Esses resultados corroboram com outros estudos, onde em determinadas concentrações a droga pode exercer um efeito dual. A exemplo, nas pesquisas de ZHAO (2020), concentrações únicas específicas (100 μM e 5 μM) dos

quimioterápicos carboplatina e VP-16 respectivamente, aumentaram a migração das células cancerosas de ovário (SKOV-3 e A2780), contribuindo para a ocorrência de metástase. Nesse estudo, os quimioterápicos exacerbaram as propriedades semelhantes de células tronco tumorais das linhagens celulares de CAOv através da sinalização de GLI1-BMI1 (ZHAO et al., 2020).

Estes resultados podem ser atribuídos a um fenômeno de dualidade da substância, no qual sua atividade pode variar conforme a concentração, o que pode induzir apoptose celular ou facilitar o processo de migração celular e metástase. A metástase é uma das principais causas de insucesso no tratamento do câncer. Em um estudo adicional, com camundongos BALB/c portadores de tumor 4T1 (tumor de mama em camundongos), foram administradas concentrações baixas, em um regime com vinorelbina combinados com cisplatina ou fluorouracil (LIU et al., 2023). Estas concentrações foram usadas para estudar as associações dose-resposta com crescimento tumoral e metástase. Os resultados revelaram que as combinações dos medicamentos promoveram e suprimiram tanto o crescimento tumoral quanto a formação de metástases nos camundongos dependendo das concentrações administradas (LIU et al., 2023).

É possível ver na clínica a administração de concentrações baixas de quimioterápicos nos casos em que há necessidade de realizar a quimioterapia metronômica. A quimioterapia metronômica é uma alternativa de tratamento que em combinação com o quimioterápico padrão visa maximizar os efeitos antitumorais, enquanto minimiza os efeitos adversos. Esta terapia envolve a administração contínua de medicamentos antineoplásicos em doses menores, oferecendo potencialmente uma opção mais tolerável para alguns pacientes com câncer (Revisado por MUÑOZ et al., 2021). Os tratamentos farmacológicos anticâncer desencadeiam respostas no organismo que modificam o microambiente tumoral, e esses efeitos podem amplificar ou diminuir seu potencial terapêutico (Revisado por MUÑOZ et al., 2021).

Portando, esses resultados estão de acordo com nosso estudo, onde a linhagem OVCAR-3 também apresentou supressão ou promoção da migração, dependendo da concentração utilizada do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em OVCAR-3, fato que pode auxiliar na conduta terapêutica contra o CAOv.

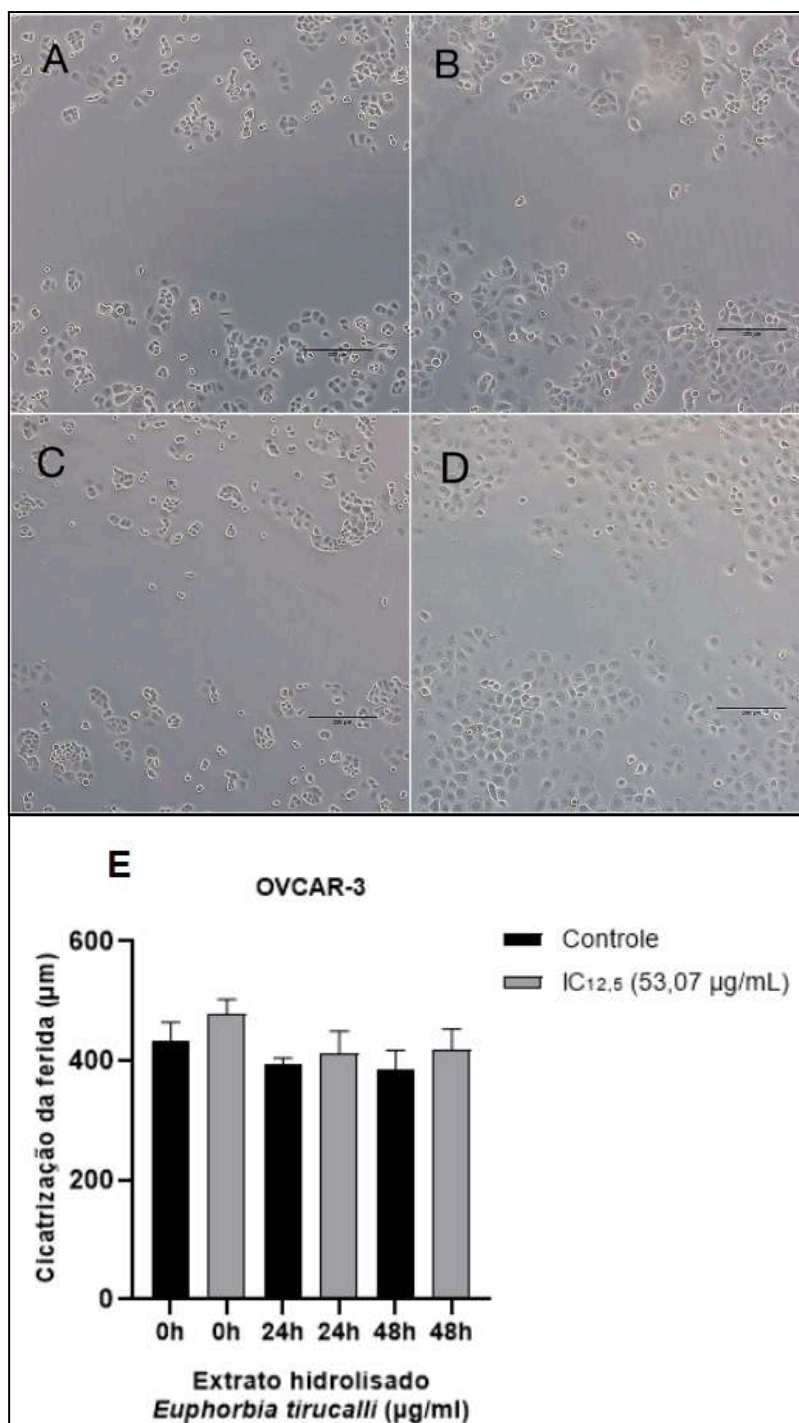


Figura 20. Ensaio de Migração Celular - Resultados obtidos entre 0h a 48h após tratamento com a IC_{12,5} (53,07 $\mu\text{g/mL}$) do extrato hidrolisado de Euphorbia. As imagens digitais das áreas foram obtidas a cada 24h através do microscópio invertido ZEISS para posterior cálculo da taxa de migração de células. Um arranhão padronizado (ferida) foi feito às monocamadas celulares. Células não submetidas ao tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, serviram como grupo controle. A - Controle OVCAR-3 em 0h. B - Controle OVCAR-3 em 48h. C - IC_{12,5} do extrato hidrolisado de Euphorbia em OVCAR-3 em 0h. D - IC_{12,5} do extrato hidrolisado de Euphorbia em OVCAR-3 em 48h. A distância em pixels foi medida e padronizada em relação aos μm e a porcentagem de fechamento da ferida foi calculada de acordo com a distância no tempo inicial (0h). Medida de referência foi

200 μ m. Resultados em 0h a 48h após tratamento com IC_{12,5} do extrato hidrolisado de Euphorbia. E - Gráfico representando a taxa de migração celular e cicatrização de feridas ao longo de um período de 0 a 48 horas, utilizando o tratamento com a IC_{12,5} de 53,07 μ g/mL do extrato hidrolisado de Euphorbia. Resultados observados durante o período de 0 a 48 horas após o tratamento. Anova one-way: O valor foi estatisticamente significativo com *p<0,0238. (Experimentos realizados em triplicata mecânica e biológica).

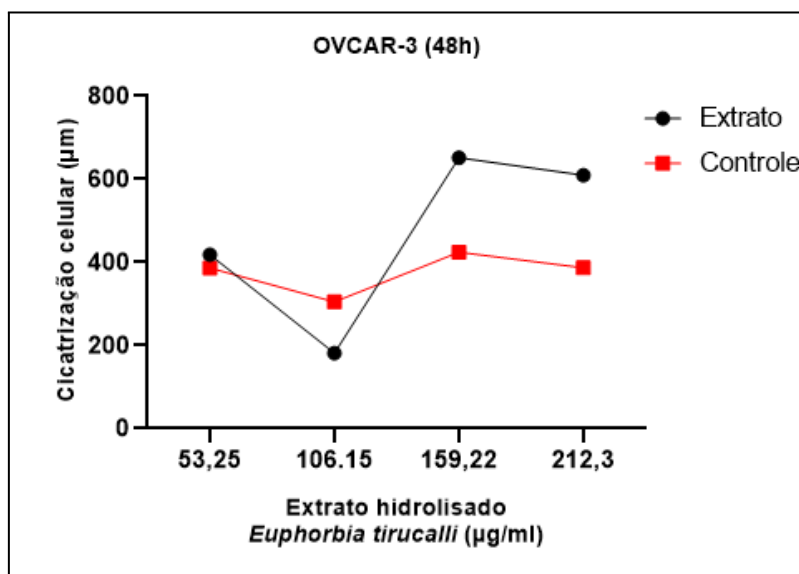


Figura 21. Evidência do comportamento da cicatrização da ferida em diferentes concentrações do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em OVCAR-3 após 48h de exposição. Concentrações do extrato hidrolisado de Euphorbia utilizadas em OVCAR-3: IC_{12,5} (53,25 μ g/mL), IC₂₅ (106,15 μ g/mL), IC_{37,5} (159,22 μ g/mL) e IC₅₀ (212,3 μ g/mL). Grupo controle (48h) exposto em vermelho no gráfico.

5.7 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS EM CÉLULAS DE CAO V OVCAR-3 INDUZIDAS POR CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS DE EXTRATO HIDROLISADO DE EUPHORBIA

Outro ponto relevante é que, durante os ensaios de migração celular, observou-se mudanças na conformação morfológica da linhagem OVCAR-3 tratada com a IC_{37,5} e IC₅₀ do extrato hidrolisado de Euphorbia. As células tratadas com IC_{12,5} e IC₂₅ do extrato hidrolisado de Euphorbia não tiveram sua morfologia alterada, demonstrando um comportamento dose-dependente. As células do grupo controle também mantiveram sua forma normal arredondada e sua morfologia não foi alterada (Figura 23A). Células expostas ao do extrato hidrolisado de Euphorbia em IC₅₀ e IC_{37,5} apresentaram alterações de uma forma arredondada para um formato mais fusiforme, além de variações no tamanho, conforme ilustrado na Figura 23B. Resultados semelhantes foram observados por Abubaker et al. (2013), onde o tratamento com a cisplatina induziu alterações morfológicas nas células de OVCA 433, resultando em perda de polaridade celular e mudança para uma morfologia fusiforme (ABUBAKER et al., 2013). Essas mudanças morfológicas sugerem que um tratamento único de quimioterapia de curto prazo deixa células residuais que são enriquecidas em características semelhantes às células-tronco tumorais, resultando num aumento do potencial metastático levando a um aumento da carga tumoral.

Um processo similar ocorre em relação às alterações morfológicas durante a transição epitelial-mesenquimal de células epiteliais que se inicia com a perda da forma cúbica com polaridade ápico-basal e um ganho de formato fusiforme alongado típico das células mesenquimais (NURMAGAMBETOVA et al., 2023). As células epiteliais perdem o contato célula-célula e obtêm maior motilidade e invasividade, sendo as alterações no perfil transcricional numerosas, incluindo a inibição da expressão da E-caderina, responsável pelas adesões célula-célula, e o aumento da expressão de N-caderina, vimentina e fibronectina que facilitam o aumento das interações célula-matriz (NURMAGAMBETOVA et al., 2023). A transição epitelial-mesenquimal pode contribuir para processos como progressão do câncer e metástases.

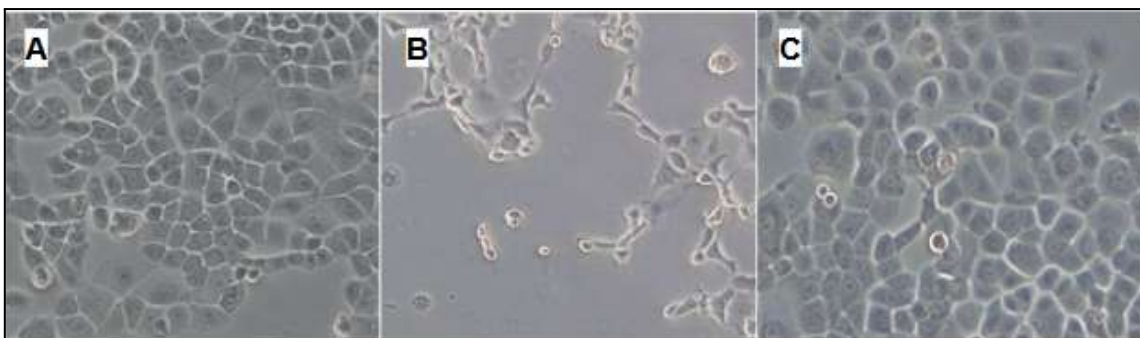


Figura 22. Alterações morfológicas na linhagem celular OVCAR-3 após 48h de exposição ao extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. A - Morfologia das células OVCAR-3 cultivadas apenas com DMEM (grupo controle). B - Morfologia das células OVCAR-3 tratadas com IC_{37,5} (159,22µg/mL) do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. C - Morfologia das células OVCAR-3 tratadas com IC_{12,5} (53,07µg/mL) do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*.

5.8 EFEITO DA CISPLATINA NA MIGRAÇÃO CELULAR EM MONOTERAPIA E EM COMBINADA COM EXTRATO HIDROLISADO DE EUPHORBIA

Foram conduzidos ensaios de migração celular utilizando o agente quimioterápico convencional cisplatina tanto em monoterapia quanto em combinação com o extrato hidrolisado de Euphorbia. Após o cultivo celular e preparação da placa, as células OVCAR-3 foram tratadas com a IC₂₅ do extrato hidrolisado de Euphorbia (106,15µg/mL) e a IC₂₅ da cisplatina (28,05µm). Foram utilizados a IC₂₅ de ambas as substâncias pois, a IC₅₀ em combinação e em pré-tratamento provocou um elevado índice na diminuição da VCM (Tabela 3), o que inviabilizaria a realização e observação do experimento. Além disso, a realização do ensaio com a IC₂₅ do extrato hidrolisado de Euphorbia foi feita antes da resposta inesperada da intensificação da migração celular utilizando a IC₂₅ do extrato hidrolisado de Euphorbia na migração celular.

Em relação à migração celular em monoterapia, após as primeiras 24h, observou-se uma notável distinção entre o grupo controle e o grupo experimental. Entretanto, devido ao elevado índice de morte celular após esse período, os dados não puderam ser utilizados para análise estatística. Apesar disso, observou-se que a cisplatina exerceu um efeito inibitório sobre a migração celular em comparação com o grupo controle.

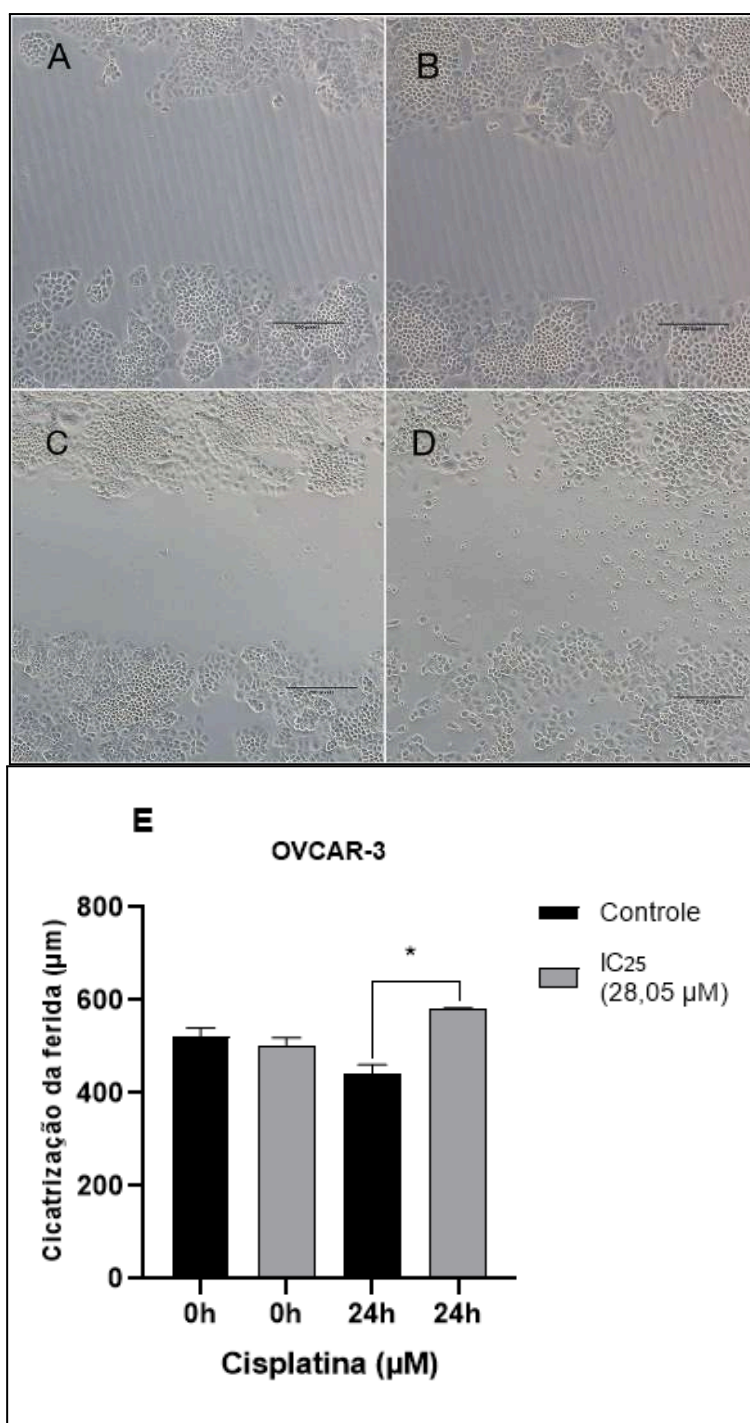


Figura 23. Ensaio de Migração Celular - Resultados obtidos em 0h a 24h após tratamento com IC₂₅ (28,05 μM) do fármaco cisplatina. As imagens digitais das áreas foram obtidas a cada 24h através do microscópio invertido ZEISS para posterior cálculo da taxa de migração de células. Um arranhão padronizado (ferida) foi feito às monocamadas celulares. A - Controle OVCAR-3 em 0h. B - Controle OVCAR-3 em 24h. C - IC₂₅ OVCAR-3 em 0h. D - IC₂₅ OVCAR-3 em 24h. A distância em pixels foi medida e padronizada em relação aos μm e a porcentagem de fechamento da ferida foi calculada de acordo com a distância no tempo inicial (0h). Medida de referência foi 200 μm . E - Gráfico representando a taxa de migração celular e cicatrização de feridas ao longo de um período de 0 a 24 horas, utilizando o tratamento com a IC₂₅ de 28,05 μM da cisplatina. Valor estatisticamente significativo

de $*p < 0,0001$. Um ferimento padronizado foi criado nas monocamadas celulares. A distância foi medida em pixels e padronizada em micrômetros (μm). A porcentagem de fechamento da ferida foi calculada em relação à distância no tempo inicial (0h).

Após a realização do ensaio de migração na linhagem OVCAR-3 em politerapia, foi possível observar que a inibição da migração celular na linhagem OVCAR-3 foi estatisticamente significativa quando o extrato hidrolisado de Euphorbia foi combinado com a cisplatina (Figura 24). Houve um processo de inibição da migração importante e queda na VCM, o que impediu a análise dos resultados após 48h de experimento. Este efeito sinérgico da coadministração do extrato hidrolisado de Euphorbia com a cisplatina potencializa a inibição da migração celular e sugere uma interação benéfica entre os dois compostos no contexto do tratamento de células de CAO. O achado sugere uma relação sinérgica entre esses dois compostos, auxiliando na quimioterapia em casos resistentes à cisplatina, já que dados mostram a maior parte da mortalidade de pacientes com câncer é devido à resistência aos medicamentos (Revisado por BUKOWSKI et al., 2020).

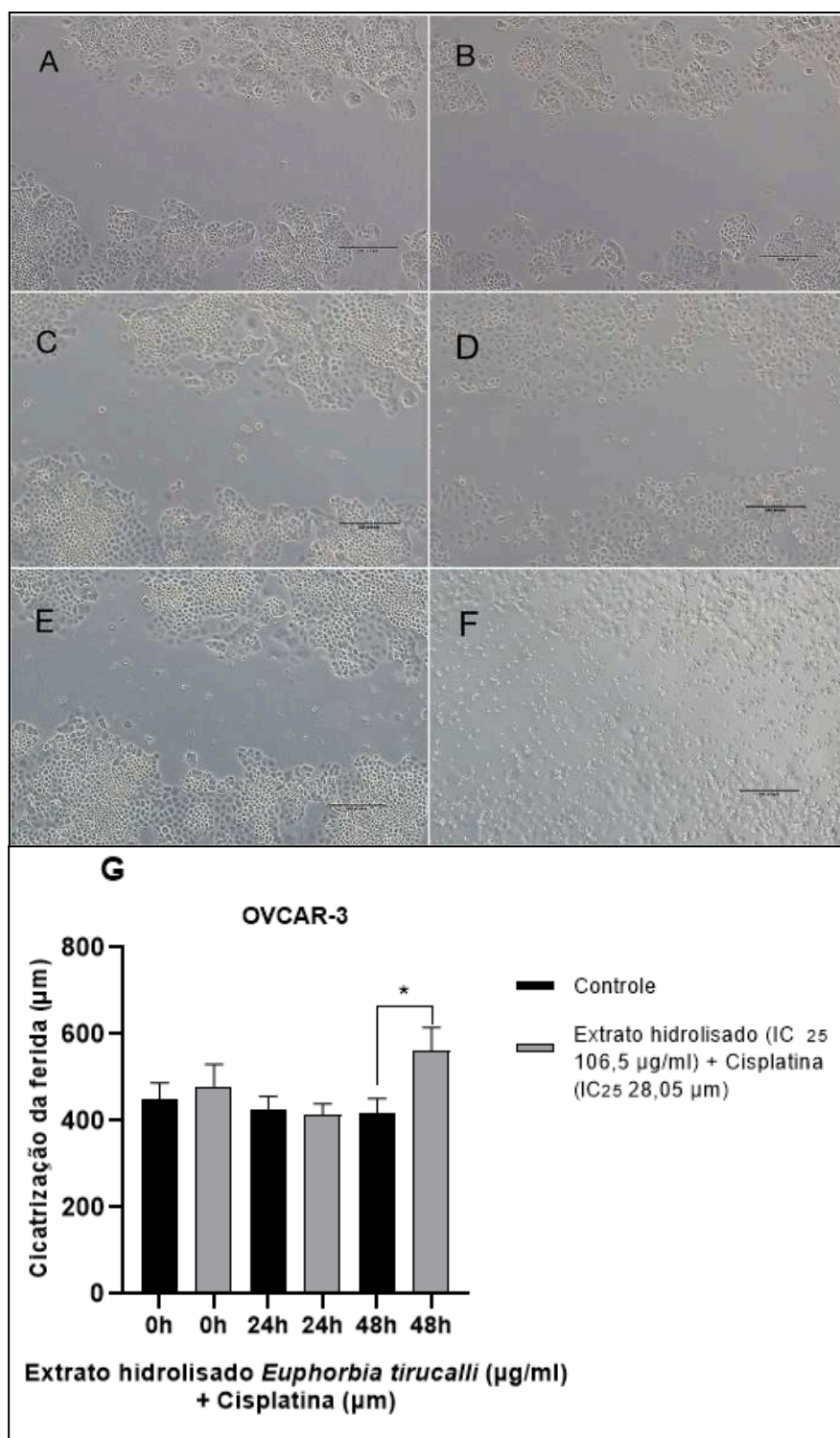


Figura 24. Ensaio de Migração Celular - Resultados obtidos em 0h a 24h após tratamento com a combinação extrato hidrolisado *Euphorbia* em sua IC₂₅ (106,15 $\mu\text{g/ml}$) + cisplatina em sua IC₂₅ (28,05 μM). As imagens digitais das áreas foram obtidas a cada 24h através do microscópio invertido ZEISS para posterior cálculo da taxa de migração de células. Um arranhão padronizado (ferida) foi feito às monocamadas celulares. A - Controle OVCAR-3 em 0h. B - IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia* em OVCAR-3 em 0h. C - Controle OVCAR-3 em 0h. Fig. D - IC₂₅ do extrato hidrolisado de

Euphorbia em OVCAR-3 em 24h. E - Controle OVCAR-3 em 48h. F - IC₂₅ do extrato hidrolisado de Euphorbia em OVCAR-3 em 48h. A distância em pixels foi medida e padronizada em relação aos μm e a porcentagem de fechamento da ferida foi calculada de acordo com a distância no tempo inicial (0h). Medida de referência foi 200 μm . G - Gráfico representando a taxa de migração celular e cicatrização de feridas ao longo de um período de 0 a 48 horas, utilizando o tratamento com a IC₂₅ de 28,05 μM do quimioterápico cisplatina e a IC₂₅ 106,15 $\mu\text{g/mL}$ do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. Um ferimento padronizado foi criado nas monocamadas celulares. A distância foi medida em pixels e padronizada em micrômetros (μm). A porcentagem de fechamento da ferida foi calculada em relação à distância no tempo inicial (0h). Valor estatisticamente significativo de $p < 0,0001$. Resultados observados durante o período de 0 a 48 horas após o tratamento.

5.9 PRÉ-TRATAMENTO COM EXTRATO DE *Euphorbia tirucalli* SEGUIDO DO TRATAMENTO COM CISPLATINA: IMPLICAÇÕES NA MIGRAÇÃO CELULAR

Para entender um pouco mais sobre a interação do extrato hidrolisado de Euphorbia com a cisplatina, foi realizado um ensaio de migração celular com um pré-tratamento de 24h com a IC₂₅ (106,15 $\mu\text{g/mL}$) do extrato hidrolisado, seguido de 24h de tratamento com o quimioterápico convencional cisplatina em sua IC₂₅ (28,05 μM). Mais uma vez, foi utilizado a IC₂₅ das drogas devido à diminuição exacerbada da VCM ocasionada pela IC₅₀ ou IC_{37,5} das drogas. Após 24h de tratamento com cisplatina, não foi possível realizar análise estatística, devido ao elevado nível de morte celular, inviabilizando as aferições das medidas. A análise estatística só foi possível ser realizada após 24h da exposição das células a IC₂₅ do extrato hidrolisado. Este protocolo de tratamento sequencial evidenciou que o pré-tratamento com o extrato pode potencializar o efeito inibitório da cisplatina na migração celular e na VCM, sugerindo que a preparação das células com extrato hidrolisado de Euphorbia aumenta a eficácia da cisplatina na supressão da migração celular no CAOV.

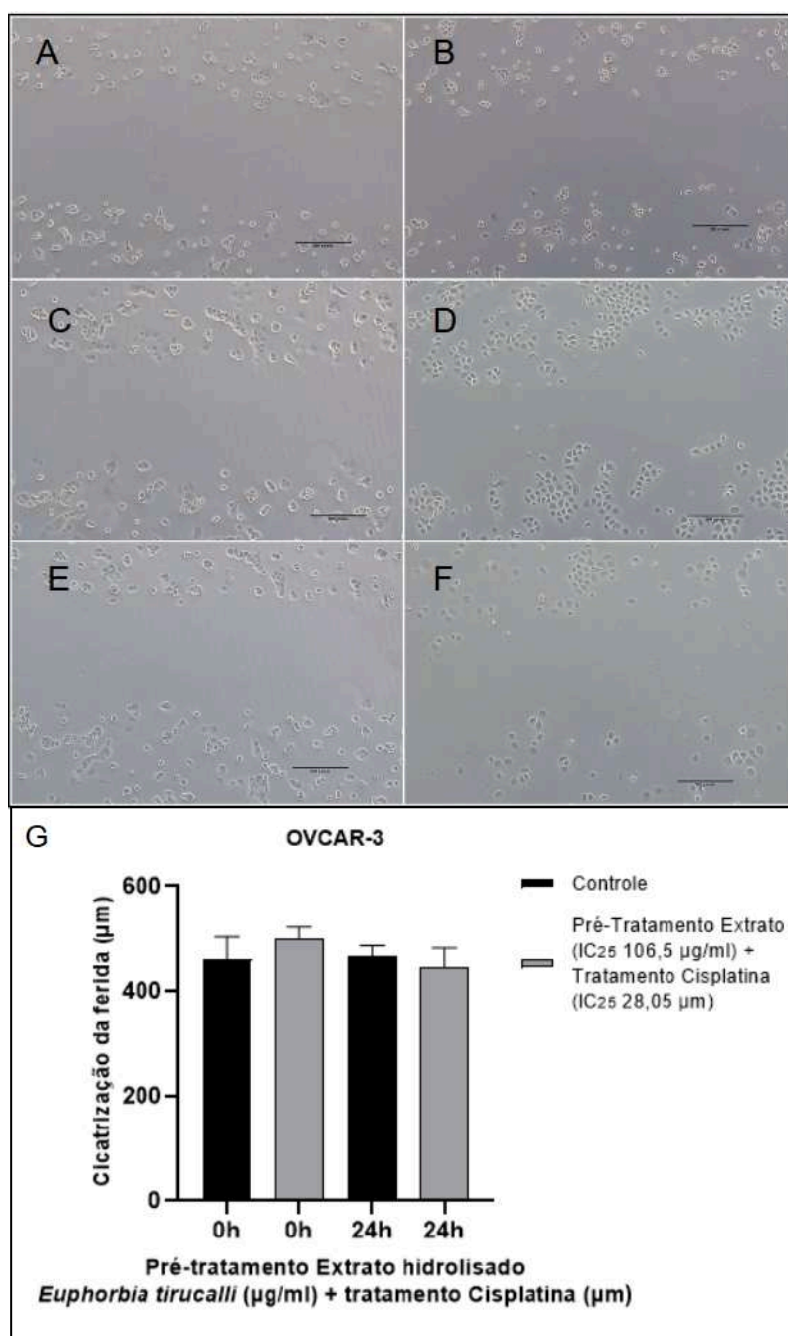


Figura 25 - Taxa de Migração das Celular - Pré-tratamento (24h) com extrato hidrolisado de *Euphorbia*, seguido do tratamento com cisplatina (24h). Um arranhão padronizado (ferida) foi feito às monocamadas celulares. As imagens digitais das áreas foram obtidas a cada 24h. A - Controle OVCAR-3 em 0h. Fig B - IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia* em OVCAR-3 em 0h. C - Controle OVCAR-3 em 24h. D - IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia* em OVCAR-3 às 24h. E - Controle OVCAR-3 em 48h. F - IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia* em OVCAR-3 em 48h. A distância em pixels foi medida e padronizada em relação aos µm e a porcentagem de fechamento da ferida foi calculada de acordo com a distância no tempo inicial (0h). G - Gráfico representando a taxa de migração celular e cicatrização de feridas ao longo de um período de 0 a 24 horas, utilizando um pré-tratamento de 24h com a IC₂₅ de 106,15µg/mL) do extrato de *Euphorbia tirucalli*. O tratamento

após esse período com cisplatina na sua IC_{25} de $28,05\mu\text{m}$) não está representado no gráfico acima, devido à demasiada queda na VCM, inviabilizando as medidas e posteriormente a análise estatística.

Em suma, nosso estudo fornece evidências preliminares do potencial do extrato hidrolisado de *Euphorbia* em modular a migração celular. Esses achados destacam a importância de investigações adicionais para explorar o uso terapêutico desse composto em condições relacionadas à migração celular aberrante, como metástases tumorais, além de ser um potencial fármaco para terapias em combinação com quimioterápicos convencionais.

5.10 A FORMAÇÃO DE COLÔNIAS É INIBIDA PELO EXTRATO HIDROLISADO DE *Euphorbia tirucalli*

O ensaio de formação de colônias é uma técnica empregada para avaliar a eficácia de substâncias no tratamento de linhagens de células cancerosas com moléculas de interesse, bem como avaliar a viabilidade celular perante as mesmas. Esse método permite analisar a capacidade de células individuais se proliferarem e formarem colônias quando expostas a uma substância específica. A linhagem de células OVCAR-3 foi submetida ao ensaio clonogênico para examinar a capacidade de formação de colônias em exposição ao extrato hidrolisado de *Euphorbia*. As células foram tratadas com as concentrações correspondentes às IC_{25} ($106,15\mu\text{g/mL}$) e IC_{50} ($212,3\mu\text{g/mL}$) do extrato de *Euphorbia tirucalli*. Para o ensaio, as células foram plaqueadas em uma densidade de 10^2 células por placa e submetidas a um tratamento por 24 horas com as drogas e 7 dias de incubação em estufa nas condições ideais. Após a coloração foi possível visualizar a olho nu as colônias, como mostra a Figura 28.

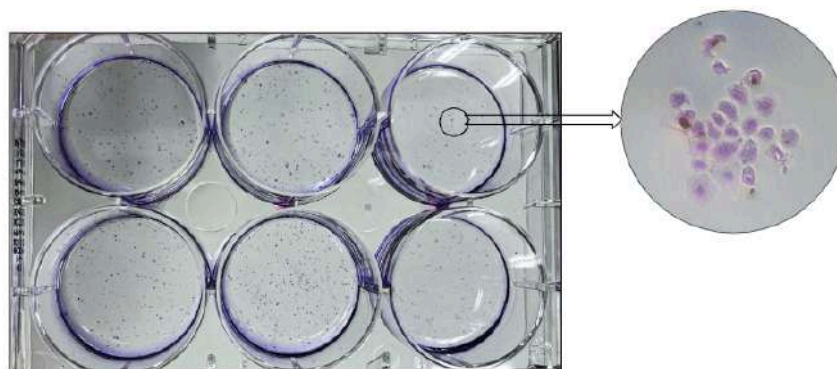


Figura 26. Ensaio clonogênico - Coloração das colônias com cristal violeta e captura da imagem de uma colônia em 5x pelo microscópio óptico invertido ZEISS.

Tabela 4: Cálculo da eficiência de plaqueamento e da fração sobrevivente após 24h de tratamento com as IC₅₀ e IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* na linhagem OVCAR-3.

	Fórmula	Total
Eficiência de plaqueamento	$96,25/10^2 * 100\%$	0,9625 ou 96,25%
Fração sobrevivente (IC ₅₀)	$0/100 * 0,9625$	0
Fração sobrevivente (IC ₂₅)	$90/100 * 0,9625$	0,9350 ou 93,50%

Ao realizar o plaqueamento das células OVCAR-3, observamos uma eficiência de 96,25% do plaqueamento celular. Isso indica que a média das células fixadas se aproximou do total ideal plaqueado (10^2) (Tabela 4). Após tratamento por 24 horas com diferentes concentrações do extrato hidrolisado e um período adicional de 7 dias em estufa a 37°C e 5% de CO₂, verificamos uma variação no número de colônias sobreviventes, tal que a porcentagem de colônias sobreviventes foi de 93,50% quando tratadas com a IC₂₅ do extrato hidrolisado de *Euphorbia* (Figura 27). No entanto, ao tratar as células com a IC₅₀ do extrato hidrolisado de *Euphorbia* por 24 horas de exposição ao mesmo, não houve formação de colônias (Figura 28).

A análise estatística da capacidade celular da linhagem OVCAR-3 na formação de colônias revelou que não houve diferença significativa entre as células tratadas com IC_{25} (106,15 μ g/mL) do extrato hidrolisado e o grupo controle. Estes resultados sugerem que, nas condições testadas, o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* não exerceu um efeito estatisticamente significativo na capacidade anti-clonogênica das células da linhagem OVCAR-3, conforme mostra a Figura 27.

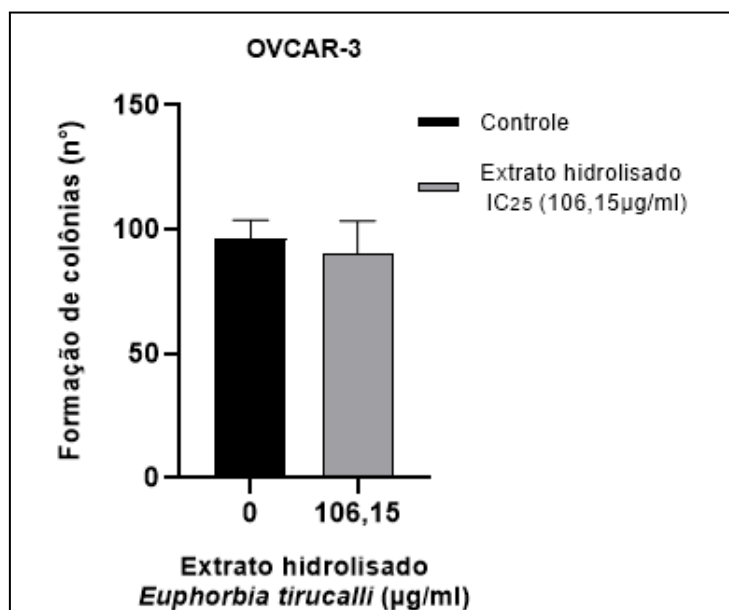


Figura 27. Ensaio Clonogênico - Formação de colônias da linhagem celular OVCAR-3 submetida ao tratamento com o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* por um período de 24h em concentrações da IC_{25} (106,15 μ g/mL). Células não submetidas ao tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, serviram como grupo controle. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism. A interação não foi estatisticamente significativa. Ensaio realizado em triplicata biológica.

Contudo, os resultados mudam quando as colônias são tratadas com a IC_{50} (212,3 μ g/mL) do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. Nessas condições, após 7 dias, não houve formação de colônias, ao contrário do observado no grupo controle (Figura 30), indicando um efeito anti-clonogênico devido ao alto índice de morte celular ocasionado pelo extrato hidrolisado de *Euphorbia* na linhagem OVCAR-3. Esses resultados estão de acordo com outros estudos utilizando substâncias naturais, como o estudo de SOUZA (2019), onde o ácido rosmarínico inibiu completamente a formação de colônias na linhagem de câncer de mama (MCF-7). Ademais, estudos de SILVA et al., (2018), empregando o eufol inibiu tanto a

formação de colônias, quanto a migração celular, em linhagens de células de câncer pancreático (Mia-Pa-Ca-2). Além disso, em um estudo adicional, foi investigado o efeito de um diterpeno extraído de *Euphorbia* (EFL2) na migração e na formação de colônias. Neste contexto, as células tratadas com EFL2 mostraram atrasos significativos no fechamento da ferida (FAN et al., 2019). Além disso, células de carcinoma hepatocelular (SMMC-7721) tratadas com EFL2 formaram menos colônias de Mia-Pa-Ca-2 de forma dose-dependente (FAN et al., 2019). A inibição da formação de colônias, sugere que o extrato hidrolisado de *Euphorbia*, onde a principal substância é o eufol, é capaz de interromper os processos de proliferação celular essenciais para o crescimento tumoral e de bloquear a formação de colônias, sugerindo, assim, uma alternativa promissora para pacientes de CAOV que desenvolveram resistência a tratamentos convencionais.

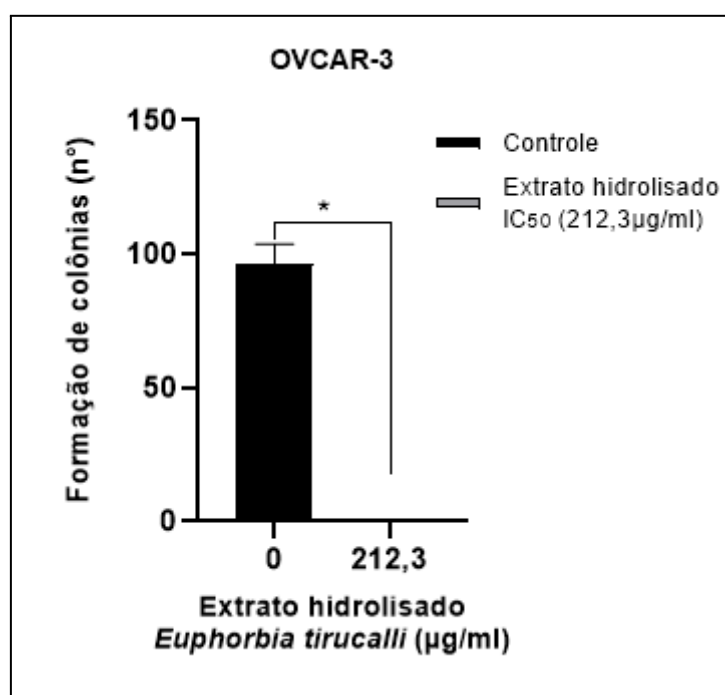


Figura 28. Ensaio Clonogênico - Formação de colônias da linhagem celular OVCAR-3 submetida ao tratamento com o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* por um período de 24 horas nas concentrações da IC₅₀ (212,3µg/mL). Células não submetidas a tratamento, cultivadas em meio de cultura DMEM, serviram como grupo controle. Os dados obtidos foram submetidos à análise estatística utilizando o software GraphPad Prism. A interação foi estatisticamente significativa *p<0,0001. Dados marcados com asterisco são considerados estatisticamente significativos em comparação ao controle. Ensaio realizado em triplicata biológica.

5.11 EXTRATO HIDROLISADO DE EUPHORBIA INTERROMPE O CICLO CELULAR DAS CÉLULAS DE CAO V NA FASE G1

Para verificar a interferência do extrato hidrolisado no ciclo celular na linhagem OVCAR-3, realizamos o ensaio do ciclo celular por citometria de fluxo, utilizando marcação com iodeto de propídeo (PI). As células foram tratadas por 24 horas com o extrato hidrolisado em monoterapia. O paclitaxel foi utilizado como droga controle devido à sua capacidade de estabilizar os microtúbulos, o que provoca a desestabilização do fuso mitótico, induzindo o bloqueio do ciclo celular na fase G2/M e resultando em apoptose celular (Revisado por ALQAHTANI, et al., 2019). Observamos uma tendência de aumento na fração celular na fase G1 com o tratamento utilizando o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. Quando realizamos a análise do ciclo celular por citometria de fluxo, foi possível observar que a maior parte das células estava na fase G0/G1 após o tratamento com o extrato hidrolisado de Euphorbia.

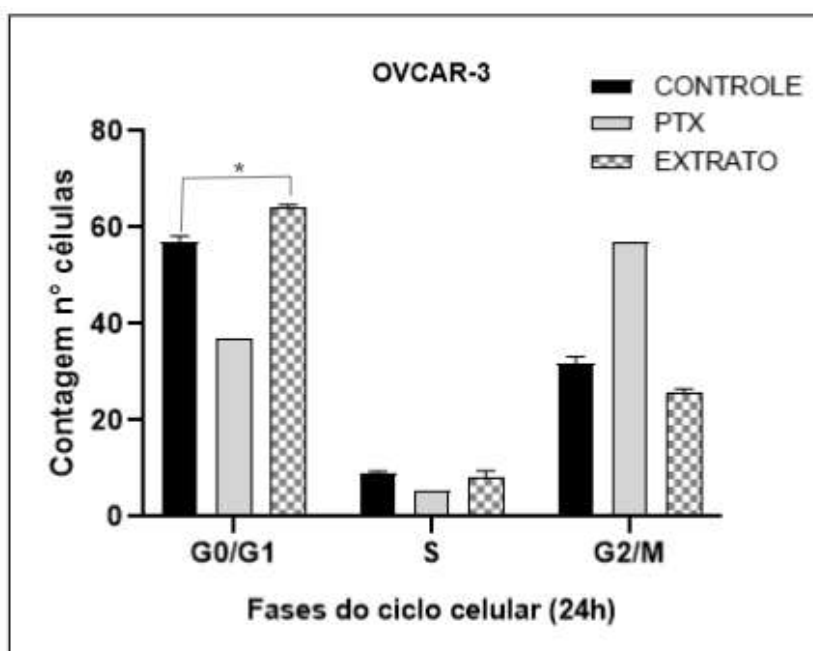


Figura 29 - Ciclo celular na linhagem OVCAR-3. Células OVCAR-3 foram coletadas, fixadas e marcadas com PI para análise das células ativadas por fluorescência com a concentração do extrato hidrolisado em IC₅₀ (212,3µg/mL) nas células tratadas por 24h. Os perfis do ciclo celular foram analisados por citometria de fluxo e os percentuais das células distribuídas nas fases G0/G1, S e G2/M foram calculadas pelo programa FlowJo. Paclitaxel - (PTX). As análises foram estatisticamente significativas com valor de *p<0,0001. Triplicatas mecânicas e biológicas.

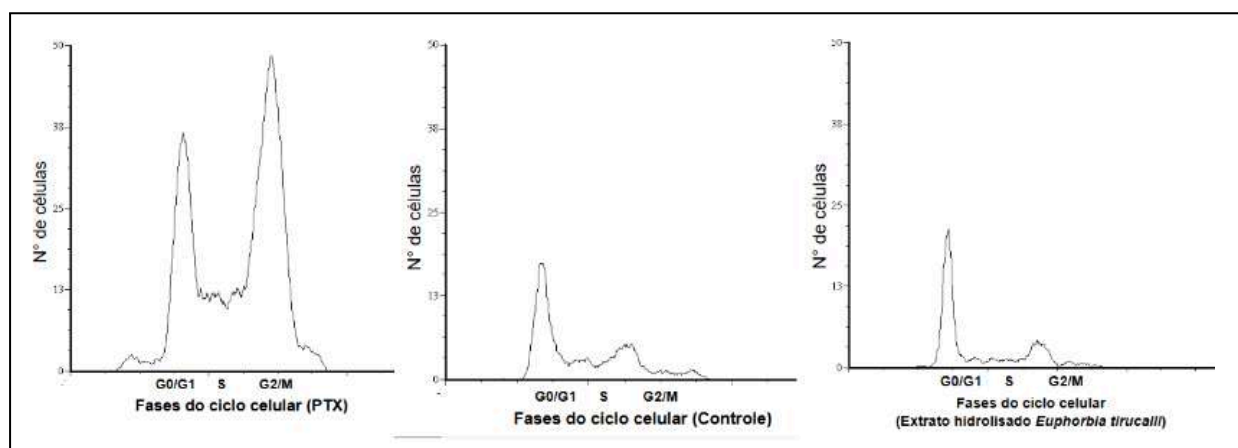


Figura 30 - Parada do ciclo celular na fase G1 induzida pelo extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em células de CAO V OVCAR-3. Células OVCAR-3 foram coletadas, fixadas e marcadas com PI para análise e classificação de células ativadas por fluorescência com a IC_{50} do extrato hidrolisado de *Euphorbia* por 24h. PTX - Paclitaxel utilizado como controle interno do experimento. Controle - Células tratadas apenas com meio. Os perfis do ciclo celular foram analisados por citometria de fluxo e os percentuais das células distribuídas nas fases G0/G1, S e G2/M foram calculadas pelo programa FlowJo.

Esses resultados sugerem que o extrato hidrolisado de *Euphorbia* induziu uma parada do ciclo celular das células OVCAR-3. Este bloqueio impede que as células progridam para as fases seguintes do ciclo celular (S e G2/M). A parada do ciclo celular na fase G1 pode indicar alguns processos, como a inibição da proliferação celular, indução de quiescência ou algum mecanismo de ação da droga (Revisado por WANG et al. 2013). O mecanismo de ação da droga pode estar associado à atuação sobre reguladores específicos do ciclo celular que controlam a transição da fase G1 para a fase S. Isto pode incluir a inibição de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs) que são necessárias para essa progressão (SCHAFER, 1998). Esta tendência também foi vista nos estudos de Wang et al., (2013), onde o eufol parou as células do câncer de mama (T47D) na fase G1 através da modulação da expressão de ciclina D1 e das proteínas p21 e p27. De acordo com os resultados do estudo referido, o eufol induziu a parada do ciclo celular na fase G0/G1, impedindo as células do câncer de mama de entrarem na fase S. Ainda de acordo com este estudo de Wang et al., (2013), a parada pode ter sido mediada pela redução da ciclina D1 e CDK2, bem como pela indução dos inibidores de CDK p21 e p27, seguida pela hiperfosforilação de Rb.

O ciclo celular é orientado por uma série de pontos de controle que determinam o período em cada fase da mitose, as células passam por várias etapas durante esse ciclo, sendo o ponto de restrição (R) um estágio crucial no final da fase G₁, a regulação do ciclo é realizada pela ação das ciclinas (NUSSBAUM et al., 2016). A ciclina D1 atua principalmente na fase G₁ (Figura 31) (SCHAFER, 1998). Este ponto de controle determina se a célula irá continuar para a fase S e replicar seu DNA. Na fase G₂, há outro ponto de verificação e regulação importante antes da entrada da célula na mitose, este ponto é regulado principalmente pela ciclina A (SCHAFER, 1998).

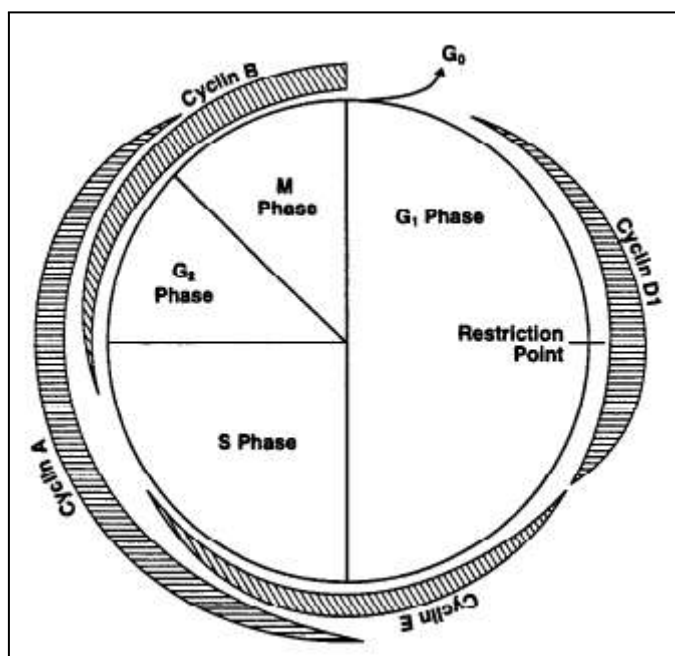


Figura 31. O ciclo celular (Revisado por SCHAFER, K. A. 1998).

Além disso, ainda no estudo WANG et al. (2013), foi analisado que os níveis diminuídos de ciclina A e B1 se correlacionaram com contagens de células mais baixas nas fases S e G₂/M, o que corrobora com os nossos resultados com a linhagem de CAO V OVCAR-3 tratada com o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. Ao longo dos ensaios, foi notório que extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* demonstrou uma significativa inibição da viabilidade celular, da migração e da formação de colônias de células de maneira dose-dependente. Além disso, há evidências de que o extrato hidrolisado estudado possivelmente induz a parada do

ciclo celular na fase G1. Esses achados sugerem que o extrato de *Euphorbia tirucalli* pode ter um potencial terapêutico anticancerígeno, pois interfere em múltiplos aspectos do comportamento de células malignas, principalmente na CAO V OVCAR-3.

6. CONCLUSÕES

No presente estudo, realizamos uma análise biológica detalhada do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*, cujo um dos principais componente é o eufol. Este estudo revela resultados interessantes na área científica, sendo o primeiro a trazer os efeito do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em linhagens de câncer de ovário. Os resultados obtidos fornecem uma base para futuras investigações e abrem novas possibilidades para o desenvolvimento de possíveis fármacos utilizando o Euphol, principal componente do extrato de Euphorbia. Essa pesquisa não só contribui para o avanço do conhecimento científico, mas também estabelece um precedente importante para pesquisas subsequentes.

Foram utilizadas três diferentes linhagens celulares de CAO V (A2780, OVCAR-3 e ACRP) para investigar o efeito antitumoral do extrato hidrolisado de Euphorbia *in vitro*. Nossos resultados sugerem que o extrato hidrolisado de Euphorbia apresentou efeitos citotóxicos nas três linhagens testadas, porém, apenas na linhagem OVCAR-3 a IC_{50} esteve abaixo da concentração máxima. O valor da IC_{50} para a linhagem OVCAR-3 foi de 212,3 μ g/mL após um tratamento de 24h com o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli*. De fato, na linhagem A2780 obtivemos uma IC_{50} de 520,9 μ g/mL e ACRP de 537,4 μ g/mL. Com base nesses resultados, decidimos concentrar nossos experimentos subsequentes na linhagem OVCAR-3, uma vez que a mesma demonstrou uma sensibilidade maior que nas demais linhagens de CAO V estudadas ao extrato hidrolisado de Euphorbia.

Além disso, quando comparamos a linhagem ACRP e a A2780 em relação ao quimioterápico convencional cisplatina quanto à VCM, a linhagem ACRP evidenciou resistência a droga em comparação com a linhagem sensível A2780, apresentando uma IC_{50} aproximadamente 3,5 vezes maior, sendo a IC_{50} da A2780 (10,13 μ M) e a da ACRP (39,44 μ M). Os ensaios de VCM em combinação com o quimioterápico convencional cisplatina e o pré-tratamento com o extrato hidrolisado foram realizados com a linhagem OVCAR-3. O pré-tratamento com o extrato, seguido do tratamento com a cisplatina na linhagem OVCAR-3, resultou em uma notável redução no valor de IC_{50} indicando um potencial de sensibilização das células à quimioterapia e a combinação do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* com a cisplatina demonstrou um efeito sinérgico, reduzindo significativamente o valor de

IC₅₀ em comparação com o tratamento exclusivo com cisplatina na linhagem OVCAR-3. Isso sugere que a combinação de substâncias naturais, como o extrato hidrolisado de *Euphorbia*, com agentes quimioterápicos convencionais podem representar uma estratégia promissora para melhorar a potência, bem como a eficácia, da quimioterapia no tratamento de CAO V.

O efeito do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* na migração celular foi avaliado, utilizando a linhagem OVCAR-3. Observamos que o extrato em sua IC₅₀ de 212,3µg/mL exerce uma alta interferência na capacidade migratória dessas células, reduzindo significativamente a viabilidade celular e, conseqüentemente, inibindo a migração, logo inferindo na redução na metástase tumoral. Além disso, foram realizados ensaios de migração com concentrações correspondentes às IC_{37,5}, IC₂₅ e IC_{12,5}. Nos ensaios com a IC_{37,5}, obtivemos resultados similares daqueles com a IC₅₀, com redução da VCM e levando à inibição da migração celular.

Entretanto, ao analisar o efeito do extrato hidrolisado de *Euphorbia* na concentração correspondente às IC₂₅ e IC_{12,5} foi observado um efeito oposto. Nestas concentrações, o extrato hidrolisado de *Euphorbia* estimulou a migração celular em comparação ao controle. Além disso, foi notório uma mudança na morfologia das células tratadas com a IC_{37,5} e a IC₅₀ das células, o que pode indicar que um tratamento único e com a quimioterapia em curto prazo podem deixar células residuais que reúnem características semelhantes a células-tronco tumorais, resultando num aumento do potencial metastático levando a um incremento na carga tumoral. Por fim, ao examinar os efeitos do tratamento combinado do extrato hidrolisado de *Euphorbia* com cisplatina e do pré-tratamento com o extrato estudado, verificou-se uma elevada interferência na capacidade migratória, refletida pela redução da viabilidade celular, sugerindo um potencial efeito sinérgico entre o extrato e a cisplatina.

Em relação ao ensaio clonogênico, o extrato hidrolisado de *Euphorbia* também evidenciou eficácia antineoplásica, impedindo o desenvolvimento de colônias celulares quando as células de OVCAR-3 foram submetidas ao tratamento com a IC₅₀ da droga. Entretanto, quando submetidas à IC₂₅, não foi possível observar alteração na formação de colônias. Por fim, em relação ao ciclo celular, a linhagem de CAO V OVCAR-3 demonstrou parada no ciclo celular em G₀/G₁, o que

pode indicar que o extrato hidrolisado interfere no ciclo celular de OVCAR-3. Esses achados sugerem que o extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* pode ser uma promissora alternativa terapêutica para o tratamento do CAOV, justificando estudos adicionais para elucidar os mecanismos subjacentes e seu potencial clínico.

Para futuras perspectivas, é imprescindível realizar ensaios utilizando linhagens de câncer de mama, com o objetivo de comparar os efeitos do extrato hidrolisado de *Euphorbia tirucalli* em outros tipos de cânceres que afetam a mulher. Além disso, é recomendável expandir os estudos com a linhagem OVCAR-3, incluindo a realização de técnicas como western blot, extração de proteínas e imunoblot, a fim de aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos. Ademais, é de grande interesse investigar a substância isolada eufol, conduzindo ensaios que permitam comparar seus resultados com os obtidos anteriormente com o extrato hidrolisado.

7. REFERÊNCIAS

ABUBAKER, K. et al. Short-term single treatment of chemotherapy results in the enrichment of ovarian cancer stem cell-like cells leading to an increased tumor burden. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 24, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-24>.

ACRP, **BCRJ**. Disponível em: <<https://www.bcrj.org.br/celula/acrp>>. Acesso em: 9 nov. 2023.

ALQAHTANI, F. Y. et al. Paclitaxel. **Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology**, p. 205–238, 2019.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **ANVISA**. Resolução-RDC nº 29, de 6 de julho de 2011. Disponível em: <https://bvs.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/res2914_06_07_2011.html>. Acesso em: [16/07/2024].

BARBOSA HENRIQUES, T. Papel de CXCR2 em células paquimiorresistentes de câncer de ovário seroso de alto grau. 2023. **Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)**—Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2023.

BUKOWSKI, K. et al. Mechanisms of Multidrug Resistance in Cancer Chemotherapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, p. 3233, 2 maio 2020.

CISPLATIN. Disponível em: <<https://www.biomol.com/products/chemicals/biochemicals/cisplatin-cay13119-50>>. Acesso em: 29 maio. 2024.

COSTA, L. M. C. S. (Org.). Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, 2017. ISSN 1984-6835.

DASARI, S.; BERNARD TCHOUNWOU, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, n. 1, p. 364–378, out. 2014.

DE SOUZA, L. S. et al. Analytical methods to access the chemical composition of an *Euphorbia tirucalli* anticancer latex from traditional Brazilian medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 237, p. 255–265, jun. 2019.

ERNST, M. et al. Global medicinal uses of *Euphorbia* L. (Euphorbiaceae). **J Ethnopharmacol.** 2015 Dec 24;176:90-101. doi: 10.1016/j.jep.2015.10.025. Epub 2015 Oct 17. PMID: 26485050.

FAN, L. et al. Euphorbia factor L2 inhibits TGF- β -induced cell growth and migration of hepatocellular carcinoma through AKT/STAT3. **Phytomedicine**, v. 62, p. 152931–152931, 1 set. 2019.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–9, 2006.

GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. **Oncogene**, v. 31, n. 15, p. 1869–83, 2012.

GHOSH, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, p. 102925, jul. 2019.

INSTITUTE of Cell and Molecular Science - Flow Citometry Core Facility - Barts and The London (**School of Medicine and Dentistry**). Disponível em: <[PI Cell Cycle Analysis Protocol \(qmul.ac.uk\)](#)>. Acesso em: 24 maio 2024.

INSTITUTO Nacional de Câncer - **INCA: O que é câncer?**. [S. l.], 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 25 jan. 2022.

INSTITUTO Nacional de Câncer. **Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022.

INSTITUTO Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). **Quimioterapia**. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/tratamento/quimioterapia>. Acesso em: [23/05/2024].

INSTITUTO Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA).

Quimioterapia antineoplásica. Disponível em:

<https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/causas-e-prevencao-do-cancer/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/medicamentos/quimioterapia-antineoplasica>. Acesso em: [23/05/2024].

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. Global Cancer Observatory: Cancer Today. **GLOBOCAN 2023**. Disponível em: <<https://gco.iarc.fr/>>. Acesso em: [16/07/2024].

JOSÉ, M.; LAMEIRA, Osmar Alves. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Rodriguésia**, v. 19, n. 4, p. 292–309, 1 dez. 2014.

KALDAWY, A. et al. Low-grade serous ovarian cancer: A review. **Gynecologic Oncology**, v. 143, n. 2, p. 433–438, nov. 2016.

KARS, M. D. et al. Development of rational in vitro models for drug resistance in breast cancer and modulation of MDR by selected compounds. **Anticancer research**, v. 26, n. 6B, p. 4559–4568, 2006. PMID: 17201178.

KURMAN, R. J.; SHIH, I.-M. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer: A Proposed Unifying Theory. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 3, p. 433–443, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1097/pas.0b013e3181cf3d79>.

LIANG, C.C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, fev. 2007.

LIU, H. et al. Dual-directional effect of vinorelbine combined with cisplatin or fluorouracil on tumor growth and metastasis in metronomic chemotherapy in breast cancer. **International journal of oncology**, v. 64, n. 2, 8 dez. 2023.

LABORATÓRIO de Sinalização Celular e Molecular. "Protocolos de Citometria de Fluxo". **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/labsinal/protocols/citometria.html>. Acesso em: [29/05/2024].

LELE S.; Ovarian Cancer. Brisbane (AU): **Exon Publications**; 2022 Sep 8. PMID: 36343121. DOI: 10.36255/exon-publications-ovarian-cancer.

LIN, M.W. et al. Euphol from *Euphorbia tirucalli* selectively inhibits human gastric cancer cell growth through the induction of ERK1/2-mediated apoptosis. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 50, n. 12, p. 4333–4339, 2012.

MAKOVEC, T. Cisplatin and beyond: molecular mechanisms of action and drug resistance development in cancer chemotherapy. **Radiology and Oncology**, v. 53, n. 2, p. 148–158, 28 mar. 2019.

MARTINOTTI, S.; RANZATO, E. Scratch Wound Healing Assay. **Methods in Molecular Biology**, p. 225–229, 2019.

MERCK. IR Spectrum Table & Chart. Merck, v. 1, n. 1, 2021. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/cb_93112519>.

MININEL, F. J. Análise fitoquímica do látex de *Euphorbia tirucalli* L. (avelós) utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS). **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 8, n. 9, p. 01–08, 30 set. 2022.

MOTTA, R.; SCHUNEMANN, E. Câncer no ovário ou do ovário? O grande dilema atual. p. 167–173, 1 jan. 2015.

MUÑOZ, R. et al. Metronomic Anti-Cancer Therapy: A Multimodal Therapy Governed by the Tumor Microenvironment. **Cancers**, v. 13, n. 21, p. 5414–5414, 28 out. 2021.

NATIONAL Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). LiverTox: **Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury**. Bethesda (MD): National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases; 2012–. Cisplatin, 15 set. 2020. PMID: 31643489. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK547852/>. Acesso em: 9 jul. 2024.

NURMAGAMBETOVA, A. et al. Morphological and cytoskeleton changes in cells after EMT. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 22164, 13 dez. 2023.

NUSSBAUM, R. L. et al. Thompson & Thompson genética en medicina. **Barcelona: Elsevier**, 2016.

OVCAR-3 [OVCAR3], **ATCC**. Disponível em:
<<https://www.atcc.org/products/htb-161>>. Acesso em: 9 nov. 2023.

OVIEDO, A. A.; VANEGA, G. P. Câncer de ovário. **Revista Medica Sinergia**, v. 6, n. 7, p. e690–e690, 1 jul. 2021.

PAES, Marcela F.; DALTOE, Renata D.; MADEIRA, Klesia P.; et al. A retrospective analysis of clinicopathological and prognostic characteristics of ovarian tumors in the State of Espírito Santo, Brazil. **Journal of Ovarian Research**, v. 4, p. 14, 2011.

PEREIRA, N. M. L. et al. Manejo e Prevenção de Reações Adversas da Quimioterapia Antineoplásica com Platinas em Pacientes com Cânceres Esofágico e Gástrico: Revisão Sistemática da Literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, n. 4, 16 nov. 2021.

PICATO (mebutato de ingenol). [Bula]. São Paulo: LEO Pharma Ltda, 2024. Gel 150 mcg/g e 500 mcg/g. Disponível em:
<https://araujo.vteximg.com.br/arquivos/ids/3733675/Bula-00000000503444.pdf>.
Acesso em: 9 jul. 2024.

PI Cell Cycle Analysis Protocol. Disponível em:
<<http://www.icms.qmul.ac.uk/flowcytometry/protocols/cellcycle/ICMSPI.html>>.
Acesso em: 21 maio. 2024.

REFLORA. **Herbário Virtual**. Disponível em:
<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/herbarioVirtual/> Acesso em 17/11/2022

REZENDE, F. M. *et al.* **Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas.** In: FURLAN, Cláudia Maria *et al.* **VI Botânica no Inverno 2016** – São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, **Departamento de Botânica:** [s. n.], 2016. cap. 10, p. 93-100. ISBN 978-85-85658-61-8.

RISS T. L. et al. Cell Viability Assays. **Assay Guidance Manual** [Internet]. [S.l: s.n.], 2013. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>

RODRIGUES, T. et al. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 531–541, 25 abr. 2016.

ROMANI, A. M. P. Cisplatin in cancer treatment. **Biochemical Pharmacology**, v. 206, p. 115323, 1 dez. 2022.

SANTOS, O. J. et al. Use of raw *Euphorbia tirucalli* extract for inhibition of ascitic Ehrlich tumor. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 43, n. 1, p. 18–21, fev. 2016.

SCHAFFER, K. A. (1998). The Cell Cycle: A Review. **Vet Pathol**, 35(5), 461-478.

SHERMAN-BAUST, C. A. et al. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. **Cancer Cell**, v. 3, n. 4, p. 377–386, abr. 2003.

SILVA, V.A.O. et al.,. In vitro screening of cytotoxic activity of euphol from *Euphorbia tirucalli* on a large panel of human cancer-derived cell lines. **Exp Ther Med**. 2018 Aug;16(2):557-566. doi: 10.3892/etm.2018.6244. Epub 2018 May 31. PMID: 30112023; PMCID: PMC6090420.

SILVA, V. A. O. et al. Euphol, a tetracyclic triterpene, from *Euphorbia tirucalli* induces autophagy and sensitizes temozolomide cytotoxicity on glioblastoma cells. **Investigational new drugs**, v. 37, n. 2, p. 223–237, 2019.

SOUZA, M. V. N. et al. Produtos Naturais em Fase Avançada de Testes Clínicos no Tratamento contra o Câncer. **Revista fitos**, v. 3, n. 02, p. 25–42, 2007.

SOUZA, M. L. M. **Estudo da citotoxicidade do ácido rosmarínico em modelos in vitro de câncer humano**. Dissertação de Mestrado—Universidade Federal do Espírito Santo: [s.n.] 2017.

SOUZA, Vinícius C.; LORENZI, Harri. Botânica sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. **Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA**, p.358-368, 2008.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; SANTARÉM, E. R. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. rev. [S. l.]: ARTMED, 2009. cap. 13, p. 343-350.

TRINDADE, Maria Trindade. Espécies úteis da família Euphorbiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, [S.l.], v. 19, n. 4, ene. 2015. ISSN 1028-4796. Disponível em: <<https://revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/113/105>>. Fecha de acceso: 14 mayo 2024

TORRE, L. A. et al. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends--An Update. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 25, n. 1, p. 16–27, 14 dez. 2015.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO. **Herbário VIES**. Vitória: Universidade Federal do Espírito Santo, 2024. Disponível em: <https://www.herbario.ufes.br>. Acesso em: 1 set. 2024.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351–360, ago. 2002.

WANG, L. et al. Euphol arrests breast cancer cells at the G1 phase through the modulation of cyclin D1, p21 and p27 expression. **Mol Med Rep**. v. 8, n. 4, p. 1279–1285, 1 out. 2013.

YANG, C. et al. Immunotherapy for Ovarian Cancer: Adjuvant, Combination, and Neoadjuvant. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 577869, 2020.

ZACHOW BÜHRING, C. A. et al. Câncer de ovário: uma revisão integrativa de literatura. **revista interdisciplinar de ensino, pesquisa e extensão**, v. 9, n. 1, p. 199–211, 16 dez. 2021.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. P. **Biologia Molecular Básica**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

ZHANG, L.; ZHOU, Q. Bevacizumab with dose-dense paclitaxel/carboplatin as first-line chemotherapy for advanced ovarian cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 837, p. 64–71, out. 2018.

ZHAO, Y. et al. Chemotherapy exacerbates ovarian cancer cell migration and cancer stem cell-like characteristics through GLI1. **British Journal of Cancer**, v. 122, n. 11, p. 1638–1648, 3 abr. 2020.