

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MARIA ISADORA GABRIEL SAMPAIO

**Avaliação do efeito antiproliferativo de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. em
linhagem de adenocarcinoma de endométrio humano.**

BRASÍLIA

2020

MARIA ISADORA GABRIEL SAMPAIO

**Avaliação do efeito antiproliferativo de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. em
linhagem de adenocarcinoma de endométrio humano.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito parcial à obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Alberto Simeoni
Coorientadora: Profa. Dra. Cinthia Gabriel Meireles

BRASÍLIA

2020

Dedico este trabalho...

.... Aos meus pais, ao meu irmão, à minha família e
amigos, que sempre estiveram ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter guiado a minha vida nos meus momentos de insegurança e incertezas. Se hoje estou onde estou devo tudo a Ele, que planejou, com muito zelo, cada detalhe e me mostrou, várias vezes que estava ao meu lado.

Agradeço, ainda a Deus, pelas pessoas maravilhosas que colocou em meu caminho. Sou uma pessoa de muita sorte, pois nunca segui sozinha. Em cada canto que percorri, encontrei pessoas incríveis que sempre estiveram ao meu lado.

Uma dessas pessoas maravilhosas é o professor Luiz. Agradeço imensamente por todo o carinho que sempre teve comigo. Ele foi muito mais que um orientador de mestrado, me ensinou muito mais que química e farmacologia. Com ele eu descobri uma nova língua, uma nova cultura (um dia eu ainda termino o curso de russo), aprendi e refinei meu gosto culinário, aprendo sempre sobre as mais diversas curiosidades sobre o mundo. Muito obrigada, pelos almoços, pelos cafés depois dos almoços, pelos chocolates, pelos mimos nos aniversários, páscoas e natais. E, principalmente, muito obrigada pela paciência que teve comigo.

Agradeço a Cinthia, que aceitou o desafio de me coorientar e, bem dizendo a verdade, foi quem me incentivou a fazer e seguir o mestrado. Todas as vezes que eu quis desistir, ela não deixou. Brigou, aconselhou, deu dicas, disse várias vezes que ia desistir de mim, mas não desistiu. Se eu cheguei até aqui, devo muito a você.

Agradeço aos meus pais, Edna Maria e Evandro Gabriel, que sempre estiveram ao meu lado e me apoiaram de diversas formas para que eu pudesse me dedicar ao mestrado. Devo somente a minha vida todinha a vocês, né!!

Ao meu irmão, João Gabriel, que com seu exemplo, me incentiva a seguir em busca dos meus sonhos.

A minha família e amigos, por me mostrarem o quanto sou amada e por nunca esconderem o orgulho que sentem de mim. Obrigada por todo o apoio e por serem minha força e porto seguro.

Aos amigos farmolíticos, minha eterna gratidão, por todos os ensinamentos que me passaram, pelo incentivo e, principalmente, pela amizade. Em especial, gostaria de agradecer aos meus companheiros de shisha/viagem/festas, professora Djane, Simone, Henrique, Kaian, Natália, Sidney, Carol, Dani, obrigada pelas sessões de terapia com cerveja gelada, que mantiveram minha sanidade diversas vezes.

Obrigada a todos do Farmol, que se tornaram minha família. Todos! Agradeço imensamente aos professores, que sempre estiveram disponíveis para me ajudar, professora

Fátima, professora Angélica, professor Francisco, professora Flora e, em especial, professora Adriana – que idealizou e incentivou esse trabalho, e as técnicas, especialmente a Rilva, muito obrigada.

Agradeço aos meus colegas, Rafael, Marcela e Kimberly, que sofreram comigo e me apoiaram diversas vezes.

Agradeço a professora Dâmaris, ao Laboratório de Produtos Naturais, a professora Eliete e o Laboratório Histopatologia Bucal, por todo o suporte durante esse período.

Agradeço a banca, por ter aceitado o convite de fazer parte desse momento. Eu fico muito feliz de serem vocês os escolhidos, pois de uma forma ou de outra vocês realmente fizeram parte disso. A Bel, nem deve se lembrar, mas quando eu fui pela primeira vez ao FarMol, foi ela quem abriu a porta pra mim e foi ela quem me deu os primeiros ensinamentos sobre “tripsinizar” uma placa. O Sidney, nem se fala, introduziu o receptor de estrogênio na minha vida, companheiro de dança nas confraternizações do laboratório e companheiro de shisha. João, não deve se lembrar também, mas me ajudou muito quando eu tive que preparar os extratos. Sou muito grata a vocês.

Agradeço a minha psicóloga, Karolyne, por me manter mentalmente estável e me ajudar a controlar minhas emoções e sentimentos. Sem essa ajuda, certamente eu teria desistido.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo financeiro.

*“Não podemos mudar o passado, mas podemos
construir um novo futuro, uma nova história. ”*

(Desconhecido)

RESUMO

SAMPAIO, Maria Isadora Gabriel. **Avaliação do efeito antiproliferativo de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. em linhagem de adenocarcinoma de endométrio humano.** Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

O câncer de endométrio é um dos mais incidentes entre as mulheres e, nos estágios iniciais, o prognóstico costuma ser positivo e a taxa de sobrevida elevada. Porém, em casos metastáticos ou de recorrentes o tratamento ainda é limitado, levando a um mau prognóstico e baixa taxa de sobrevida. Por isso, a busca por novos agentes que possam ser utilizados no tratamento desse tipo de câncer e de outros torna-se cada vez mais importante.

A espécie *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. é uma planta que pertence à família Malvaceae e nosso conhecimento a respeito de seu uso medicinal ainda é pouco desenvolvido. Um estudo anterior realizado pelo mesmo grupo de estudos deste trabalho mostrou que os extratos aquoso, etanólico e hexânico de *O. pyramidale*, na presença do agonista de receptor de estrogênio (ER) β -estradiol, reduziram significativamente a ativação dos receptores nucleares ER α e ER β , sugerindo que pudessem ter ação antagonista nesses receptores. A partir desses resultados o objetivo desse trabalho foi verificar se o efeito antagonista da *O. pyramidale* no ER poderia provocar alterações na proliferação celular em linhagens celulares provenientes de cânceres influenciados por hormônios estrogênicos, como é o caso do câncer de endométrio. Para alcançar esse objetivo foram conduzidos ensaios de MTT, que avaliaram a viabilidade indireta das células Ishikawa (adenocarcinoma de endométrio humano) tratadas com extratos de *O. pyramidale*, e RT-qPCR, que avaliou o efeito sob a expressão genica dos receptores de estrogênio.

Os resultados mostraram-se bastante promissores, uma vez em que os extrato de *O. pyramidale* conseguiram diminuir a proliferação das células Ishikawa, quando adicionados juntos com o β -estradiol. Os extratos também apresentaram uma tendência em diminuir a expressão gênica dos receptores de estrogênio, ER α e ER β .

Palavras-chaves: Câncer de endométrio; *Ochroma pyramidale*, Pau de balsa, Receptores nucleares, Receptor de estrogênio; ER α , ER β .

ABSTRACT

SAMPAIO, Maria Isadora Gabriel. **Evaluation of the antiproliferative effect of *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam.) Urb. In human endometrial adenocarcinoma lineage.** Brasília, 2020. Master's Dissertation in Pharmaceutical Sciences - Faculty of Health Sciences, University of Brasília, Brasília, 2020.

Endometrial cancer is one of the most common incidents among women and, in the early stages, the prognosis is usually positive and the survival rate is high. However, in metastatic or recurrent cases, treatment is still limited, leading to a poor prognosis and low survival rate. Therefore, the search for new agents that can be used to treat this type of cancer and others becomes increasingly important.

The species *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam.) Urb. is a plant that belongs to the Malvaceae family and our knowledge regarding its medicinal use is still underdeveloped. A previous study carried out by the same group of studies in this work showed that the aqueous, ethanolic and hexane extracts of *O. pyramidale*, in the presence of the estrogen receptor agonist (ER) β -estradiol, significantly reduced the activation of the nuclear receptors ER α and ER β , suggesting that they could have antagonistic action on these receptors.

From these results, the objective of this work was to verify whether the antagonistic effect of *O. pyramidale* on the ER could cause changes in cell proliferation in cell lines from cancers influenced by estrogenic hormones, such as endometrial cancer. To achieve this objective, MTT assays were conducted, which evaluated the indirect viability of Ishikawa cells (human endometrial adenocarcinoma) treated with extracts of *O. pyramidale*, and RT-qPCR, which evaluated the effect on the estrogen receptor gene expression.

The results showed to be very promising, since the extracts of *O. pyramidale* managed to decrease the proliferation of Ishikawa cells, when added together with β -estradiol. The extracts also showed a tendency to decrease the gene expression of estrogen receptors, ER α and ER β .

Keywords: Endometrial cancer; *Ochroma pyramidale*, Balsa stick, Nuclear receptors, Estrogen receptor; ER α , ER β .

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Ensaio da ação agonista ou antagonista por gene-repórter em células HeLa transfectadas por meio de lipofectamina com plasmídeos constituídos por sequências do ER α e ER β GAL.....	14
Figura 2 Ciclo menstrual	20
Figura 3 Ilustração esquemática dos mecanismos de sinalização de ER.	23
Figura 4 Mecanismo geral dos receptores nucleares.....	24
Figura 5 Estrutura primária dos receptores nucleares.	25
Figura 6 Folha de <i>Ochroma pyramidale</i> (Cav. ex Lam.) Urb.....	27
Figura 7 Árvore de <i>Ochroma pyramidale</i> (Cav. ex Lam.) Urb.....	27
Figura 8 Células Ishikawa.	31
Figura 9 Curva de ativação dos receptores ER α e ER β GAL transfectados em células HeLa	33
Figura 10 Curva de Melt	37
Figura 11 Ensaio colorimétrico de viabilidade indireta com MTT.	40
Figura 12 Ensaio colorimétrico de viabilidade indireta com MTT, na presença do agonista β -estradiol (10 ⁻⁷ M).....	42
Figura 13 Expressão de genes codificadores dos receptores ER α e ER β em células Ishikawa tratadas com o extrato aquoso de <i>O. pyramidale</i>	44
Figura 14 Expressão de genes codificadores dos receptores ER α e ER β em células Ishikawa tratadas com os extratos hexânico e etanólico de <i>O. pyramidale</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Principais tipos de câncer endometrial	17
Tabela 2 Concentrações e purezas obtidas após a extração do RNA total em cada experimento independente	34
Tabela 3 Sequência dos <i>primers</i> (5' - 3') utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real	36
Tabela 4 Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRq) por SYBR® Green	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR - Receptor de androgênio

BCRJ – Banco de células do Rio de Janeiro

CDK - Quinase dependente de ciclina

DAX1 - Reversão sexual sensível à dosagem, região crítica de hipoplasia adrenal, no cromossomo X, gene 1

DEPC - Dietil pirocarbonato

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ER – Receptor de estrogênio

ERE - Elementos de resposta ao estrogênio

ER α - Receptor de estrogênio do tipo alfa

ER β - Receptor de estrogênio do tipo beta

ESR1 – Gene codificador do receptor de estrogênio alfa

ESR2 - Gene codificador do receptor de estrogênio beta

FEBRASGO - Federação brasileira das associações de ginecologia e obstetrícia

FSH – Hormônio folículo estimulante

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

HCG - Gonadotrofina coriônica humana

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LH – Hormônio luteinizante

LNCaP - Células tumorais de próstata humanas sensíveis a androgênio

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol

NMDR - Relações não monotônicas de resposta à dose

PC3 - Células tumorais de próstata humanas insensíveis a androgênio

PR - Receptor de progesterona

PSA - Antígeno específico do câncer de próstata

PXR - Receptor pregnano X

RN – Receptor nuclear

RNA - Ácido ribonucleico

RT-PCRq - *Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction*

RXR - Receptor retinoide X

SBC - Sociedade brasileira de cancerologia

SMD - Extrato de digestão do leite de soja

TR - Receptor Tireoidiano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 CÂNCER DE ENDOMÉTRIO	15
2.2 FISIOLOGIA DO ENDOMÉTRIO.....	19
2.3 RECEPTORES RELACIONADOS À FISIOLOGIA DO ENDOMÉTRIO	21
2.4 RECEPTORES NUCLEARES.....	23
2.5 PRODUTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER.....	25
2.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA <i>OCHROMA PYRAMIDALE</i>	26
3 OBJETIVOS	29
3.1 GERAL.....	29
3.2 ESPECÍFICOS	29
4 METODOLOGIA.....	30
4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>OCHROMA PYRAMIDALE</i> (CAV. EX LAM.) URB.....	30
4.2 CULTURA DE CÉLULAS	30
4.3 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR.....	31
4.4 TRANSFEÇÃO E ENSAIO DE GENE-REPÓRTER.....	32
4.5 RT-PCR.....	33
4.5.1 Especificidade do RNA	37
4.6 ESTATÍSTICA.....	38
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 VIABILIDADE CELULAR DOS EXTRATOS DE <i>OCHROMA PYRAMIDALE</i> EM CÉLULAS ISHIKAWA.....	39
5.2 EXPRESSÃO GÊNICA DO ER	44
CONCLUSÃO.....	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos adjacentes. Essas células podem dividir-se rapidamente, permanecendo de forma localizada (tumores) e/ou atingindo todo o organismo (metástase). Segundo o Instituto Nacional do Câncer do Ministério da Saúde (INCA), estima-se a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer no Brasil, por ano (BRASIL, 2018).

Dentre os cânceres mais incidentes entre as mulheres e que envolvem a participação de estrogênio e androgênio destaca-se o câncer de endométrio, o qual ocupou a sexta posição em incidência em mulheres no mundo, em 2018, e o segundo lugar no que tange os cânceres do trato ginecológico (FRIEDENREICH *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2005). Esse tipo de câncer possui relação com hormônios estrogênicos, que participa na regulação do crescimento desse e outros tumores (EISENBERG; KOIFMAN, 2001).

Órgãos e tecidos dos sistemas reprodutores femininos e masculinos como glândula mamária, útero, vagina, ovário, testículos, epidídimo e próstata são influenciados por hormônios estrogênicos, que regulam o crescimento, a diferenciação e o funcionamento daqueles órgãos. (KUIPER *et al.*, 1998).

Entre os fatores de risco associados ao aparecimento do câncer de endométrio, o mais comum relatado é a obesidade. No entanto, outros fatores também são considerados, como o diabetes mellitus, a menopausa tardia, a nuliparidade, o uso de terapia estrogênica dentre outros (ADORNO *et al.*, 2019).

O principal sintoma associado ao câncer endometrial é o sangramento uterino anormal, porém esse deve ser investigado, uma vez que outras doenças podem gerar o mesmo sintoma. Contudo, esse sintoma é a causa do grande número de diagnósticos na fase inicial da doença em mulheres na pós-menopausa, o que favorece um prognóstico favorável (AMANT *et al.*, 2005; CORNEL *et al.*, 2018). Em estágios avançados ou em casos recorrentes, o câncer de endométrio possui um prognóstico negativo, com uma taxa de sobrevida em 5 anos de 17%, provavelmente devido à baixa resposta às terapias convencionais (KASOHA *et al.*, 2019).

O tratamento de câncer de endométrio inclui cirurgia, radiação e/ou quimioterapia, terapia hormonal dependendo do estágio da doença (FRIEDENREICH *et al.*, 2019). A histerectomia total é o tratamento terapêutico de eleição. A extensão do procedimento cirúrgico, no entanto, depende de caso a caso. Quando diagnosticado o câncer de endométrio em mulheres em fase reprodutiva, há a indicação de tratamento medicamentoso com progestina,

anticoncepcionais, injeção ou dispositivo intrauterino contendo progesterona, que podem diminuir o tamanho do tumor ou mesmo fazer com que ele desapareça por algum tempo, dando à mulher a chance de engravidar (BAHAMONDES, 2004). Porém, ainda são muito escassas as opções de tratamento que não envolvam procedimentos cirúrgicos para esse tipo de câncer. A quimioterapia e radioterapia são indicadas para tentar impedir a recidiva da doença e, a quimioterapia geralmente inclui paclitaxel e carboplatina, ou possivelmente cisplatina e doxorubicina, mas outras combinações também podem ser utilizadas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

A grande incidência do câncer de endométrio e o tratamento limitado para essa doença justificam a busca de novos alvos terapêuticos e estudos que possam elucidar mecanismos de ação do câncer. Sabemos que existe uma relação entre o hormônio estrogênio e o câncer de endométrio e que o mecanismo de ação do estrogênio envolve a ativação de receptores nucleares específicos, os receptores de estrogênio (ER), induzindo uma alteração conformacional que permite a interação do receptor com o DNA, modulando a transcrição gênica (KUIPER *et. al.*, 1998).

Em um trabalho anterior, realizado por este grupo de pesquisa, foi avaliada a ação agonista e antagonista de extratos de folhas de *Ochroma pyramidale* (cav. ex lam.) urb. (Malvaceae) em receptores nucleares (Sampaio, 2017). Este estudo mostrou que os extratos de *Ochroma pyramidale* (extrato hexânico 100 µg/mL, extrato etanólico 60 µg/mL e extrato aquoso 250 µg/mL) reduziram significativamente a ativação dos receptores de estrogênio do tipo alfa (ER α) e beta (ER β) em células HeLa (células de câncer do colo uterino humano), na presença do agonista de ER, β -estradiol (10^{-7} M), sugerindo uma ação antagonista, uma vez que na presença dos extratos sozinhos não houve ativação dos receptores descartando-se, assim, a ação agonista dos compostos (Sampaio, 2017).

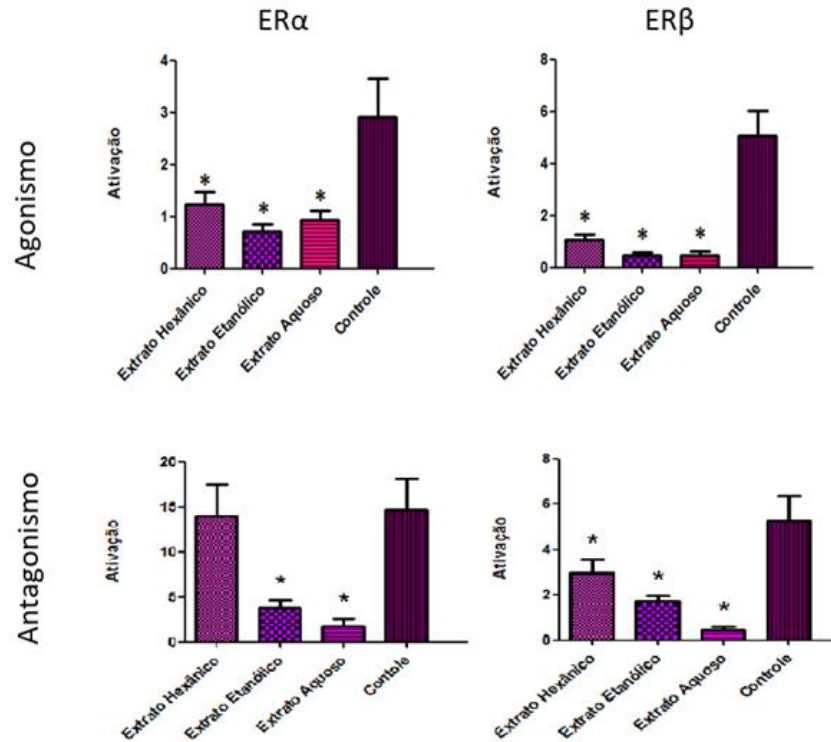


Figura 1 Ensaios da ação agonista ou antagonista por gene-repórter em células HeLa transfectadas por meio de lipofectamina com plasmídeos constituídos por seqüências do ER α e ER β GAL. Os extratos foram adicionados nas seguintes concentrações: extrato hexânico (100 μ g/mL), extrato etanólico (60 μ g/mL) e extrato aquoso (250 μ g/mL), sozinhos (ensaio agonista) e na presença do agonista β -estradiol (ensaio antagonista). Controle positivo: β -estradiol (10⁻⁷M). Os resultados estão expressos em média \pm SD de, no mínimo, três experimentos em triplicata. * p<0,05 vs controle (Sampaio, 2017).

A biodiversidade brasileira, por sua enorme variedade de espécies de plantas, vem se tornando alvo importante na busca de novas biomoléculas com potencial terapêutico. Nesse sentido, o estudo do efeito da *Ochroma pyramidale* nas vias de sinalização relacionadas ao receptor de estrogênio é relevante, pois gera suporte para busca de possíveis novas estratégias para o tratamento de cânceres relacionados aos hormônios estrogênicos. Este trabalho justifica-se ainda pela escassez de estudos quanto ao uso na medicina popular da *O. pyramidale*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE ENDOMÉTRIO

O câncer é um dos grandes desafios enfrentados pela população mundial. O envelhecimento e o rápido crescimento da população, assim como a exposição prevalente de diversos fatores de risco para o câncer associados, muitas vezes, ao desenvolvimento socioeconômico, fazem com que a incidência e mortalidade por câncer cresça rapidamente em todo o mundo, superando taxas de mortalidade por acidente vascular cerebral e doença cardíaca em muitos países. (BRAY *et. al.*, 2018).

Desde a sua descoberta, os números sobre o câncer seguem figurando as principais preocupações da ciência. E apesar dos avanços na terapia oncológica, o câncer ainda leva consigo uma carga de sofrimentos que afeta não apenas o indivíduo, como também a sua família, pois se apresenta como uma doença de diagnóstico relacionado ao medo da morte (ALVES *et. al.*, 2016).

De acordo com pesquisadores da área e estudos divulgados, o câncer tende a se tornar uma preocupação ainda maior nos próximos anos. Tendo em vista a magnitude do problema enfrentado globalmente, são necessárias ferramentas que sejam capazes de gerar acessibilidade no que diz respeito ao processo de prevenção do câncer. Medidas de prevenção e de conscientização da população são essenciais para que haja redução na ocorrência de cânceres (RABELO *et. al.*, 2016). A tecnologia, felizmente, oferece algumas soluções, como os tratamentos modernos e instrumentos de computação móvel, sensores e dispositivos de comunicação (BILOTTI, 2017).

No contexto brasileiro, a chave para a atuação contra o câncer está nas ações de controle e também na prevenção. Dentro do Brasil, o câncer é uma das principais causas de morte e a incidência cresce, inclusive em pessoas com menos de 50 anos. Isso acontece pois os serviços de assistência oncológica são insuficientes, inadequados ou mal distribuídos, o que contribui para o número de mortes, que poderiam ser evitados por meio da prevenção e ações de controle (RABELO *et. al.*, 2016).

Em 2018, o câncer de endométrio ocupou a sexta posição entre os cânceres mais incidentes em mulheres em todo o mundo, com mais de 380.000 novos casos diagnosticados (FRIEDENREICH *et. al.*, 2019). O Instituto Nacional do Câncer (INCA) considera o câncer de endométrio o sétimo mais frequente entre brasileiras, quando excluídos da análise os cânceres

de pele não melanoma. O endométrio é importante para a geração de novas vidas, mas está sujeito a uma série de influências externas e internas que afetam o seu funcionamento.

Nos EUA, o câncer de endométrio é responsável, pela principal causa de neoplasia maligna ginecológica, excetuando-se o câncer de mama (CHEN *et al.*, 2005). No Brasil, o câncer de endométrio é a segunda maior causa de neoplasia maligna ginecológica, ficando atrás do câncer de colo uterino (CHEN *et al.*, 2005). De acordo com a Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) e Sociedade Brasileira de Cancerologia (SBC) (2012), o câncer endometrial, em países da Europa Ocidental e América do Norte, representa uma das mais frequentes neoplasias malignas do trato genital feminino.

O câncer endometrial pode ser classificado como carcinoma endometriode, carcinoma seroso, carcinosarcoma e carcinoma de células claras. Essa classificação varia de acordo com as características histopatológicas, sendo os endometrioides relacionados ao tipo 1 e os serosos relacionados ao tipo 2. Ainda mais recente, uma classificação genômica foi proposta buscando uma especificidade no tratamento (MURALI; SOSLOW; WEIGELT, 2014).

Em média, de 75 a 80% dos casos de câncer de endométrio correspondem ao adenocarcinoma endometriode, tipo histológico mais comum. Esse tipo de tumor está relacionado à atividade aumentada de estrogênios e inicia-se com uma hiperplasia atípica (ADORNO *et al.* 2019). O segundo tipo mais comum é o adenocarcinoma seroso papilífero com 10% dos casos. Em seguida, aparecem os tumores de células claras com 4% de incidência os quais são menos frequentes e podem apresentar traços de semelhança com o câncer de ovário e tuba interina. Os demais tipos histológicos são ainda mais raros (ADORNO *et al.* 2019).

O câncer endometrial do tipo 1 é considerado de baixo grau, possui melhor prognóstico e está ligado a fatores de risco como obesidade, diabetes, dislipidemias, inatividade física, nuliparidade, menarca precoce e menopausa tardia, entre outros (AMANT; MOERMAN; NEVEN *et al.*, 2005).

Aproximadamente 10% dos cânceres endometriais são do tipo 2. Esse tipo é considerado de alto grau, não depende do estrogênio e pode ser relacionado com risco elevado de recidiva e até mesmo metástase (AMANT; MOERMAN; NEVEN *et al.*, 2005). O câncer endometrial do tipo 2 não está associado à hiperplasia endometrial, mas sim à atrofia endometrial (BOKHMAN, 1983).

Tabela 1 Principais tipos de câncer endometrial

Tipo 1	Tipo 2
- Dependente de estrogênio	- Independente de estrogênio
- Prognóstico favorável	- Pior prognóstico
- ~90% dos casos	- Mais agressivo
- Moderado ou altamente diferenciado	- Pouco diferenciado
- Associada à exposição prolongada a estrogênios que não é combatida pela progesterona	- Quimioterapia limitada

O aparecimento do câncer de endométrio possui correlação com o estilo de vida da população ocidental, marcado pelo sedentarismo e a obesidade – os principais fatores de risco relacionados à hiperplasia endometrial e consequente câncer (ADORNO *et. al.*, 2019). Do total de mulheres acometidas pelo câncer de endométrio, mais de 90% apresentam idade superior a 50 anos. Esses fatores podem desencadear uma exposição crônica a altos níveis de estrogênios, sem oposição de efeitos antiproliferativos da progesterona, hiperestimulando o endométrio. Isso acontece, pois, o tecido adiposo periférico converte androgênios em estrogênios, aumentando seus níveis (ATHANASIO; JUNIOR, 2007). Mulheres nulíparas, ou seja, que nunca passaram por uma gestação, também têm risco elevado de serem acometidas por essas enfermidades, uma vez que são expostas continuamente aos efeitos dos estrogênios sem o contrabalanço da produção de progesterona pela placenta (ATHANASIO; JUNIOR, 2007).

Esse tipo de câncer é responsável por 1% a 2% de todos os casos de mortes por câncer. Porém, é comumente diagnosticado em estágio inicial, podendo ser tratado e levando a uma taxa de sobrevida, em 5 anos, de 80% (FRIEDENREICH *et. al.*, 2019). Quando diagnosticada de forma precoce, a enfermidade se encontra restrita ao útero, o que potencializa a chance de sobrevida, que globalmente é de 80 a 85% (FEBRASGO, 2012).

O câncer de endométrio costuma disseminar-se, principalmente, por meio da cadeia pélvica e para-aórtica. Dessa forma, evidencia-se que o determinante para o estadiamento, tratamento e prognóstico da doença é o acometimento dos linfonodos dessas regiões. O tratamento cirúrgico, normalmente envolve a linfadenectomia pélvica e para-aórtica clássica,

procedimentos que podem ocasionar complicações pós-operatórias e risco de outras doenças (ADORNO *et. al.*, 2019).

O tratamento de câncer de endométrio inclui cirurgia, radiação e/ou quimioterapia, terapia hormonal dependendo do estágio da doença (FRIEDENREICH *et. al.*, 2019). A histerectomia total é o tratamento terapêutico de eleição. A extensão do procedimento cirúrgico, no entanto, depende de caso a caso e pode incluir histerectomia, salpingo-ooforectomia bilateral e avaliação de envolvimento linfonodal regional, especificamente as cadeias linfonodais pélvicas e aórticas, como já mencionado (ADORNO *et. al.*, 2019). Além disso, o tratamento das doenças que afetam o endométrio pode ser realizado por intermédio de diversos meios, como o uso de hormônios sintéticos. Quando diagnosticado o câncer de endométrio em mulheres em fase reprodutiva, há a indicação de tratamento medicamentoso com progestina, anticoncepcionais, injeção ou dispositivo intrauterino contendo progesterona, que podem diminuir o tamanho do tumor ou mesmo fazer com que ele desapareça por algum tempo, dando à mulher a chance de engravidar (BAHAMONDES, 2004). O acompanhamento médico especializado é indispensável para a eficiência dos métodos adotados (ADORNO *et. al.*, 2019). A quimioterapia e radioterapia são indicadas para tentar impedir a recidiva da doença e, a quimioterapia geralmente inclui paclitaxel e carboplatina, ou possivelmente cisplatina e doxorubicina, mas outras combinações também podem ser utilizadas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Vários estudos têm sido realizados buscando novas estratégias de tratamento não só para o câncer de endométrio, como para todos os tipos de câncer. A metformina, um medicamento utilizado no tratamento da diabetes, surgiu como uma nova estratégia adjuvante no combate a diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer endometrial. Vários estudos sugerem que o tratamento adjuvante com metformina pode auxiliar na reversão da hiperplasia endometrial, na redução dos biomarcadores de proliferação celular e na melhora da sobrevida global no câncer endometrial (MEIRELES *et. al.*, 2017).

Para que o tratamento do câncer de endométrio seja eficiente, ele deve ser feito de forma rápida. O diagnóstico precoce potencializa o tempo de sobrevida do paciente, podendo evitar a morte na maioria dos casos. O sintoma mais comum é o sangramento uterino anormal, que pode variar desde uma alteração no volume a irregularidades na duração e no ciclo menstrual (TELECONDUTAS, 2018), e pode aparecer de forma concomitante com outras complicações, como a perda de peso em baixo ventre, dor na região pélvica, secreção com odor fétido e alterações urinárias ou intestinais (ADORNO *et. al.* 2019).

No entanto, é importante ressaltar que nem todo sangramento uterino implica no diagnóstico de câncer de endométrio. Acometendo cerca de 10% das mulheres em idade reprodutiva, as principais causas do sangramento uterino anormal são disfunções ovulatórias, gravidez, anormalidades estruturais, distúrbios de coagulação e causas iatrogênicas (TELECONDUTAS, 2018), e para confirmar um indicativo de câncer de endométrio é necessário que seja feita uma investigação, que pode ser feita com exames de ultrassonografia e similares. O exame histopatológico fornece o diagnóstico definitivo (ADORNO *et. al.*, 2019).

Foi o avanço da ciência médica que revelou que a probabilidade de câncer de endométrio, quando este apresenta espessura igual ou inferior a 4 milímetros, é praticamente nula. Em casos de sangramentos frequentes, exames adicionais devem ser obrigatoriamente feitos (NOGUEIRA, 2005), pois raramente pode-se tratar de um carcinoma endometrial ou de uma lesão precursora. A não ser que se trate de uma mulher com sangramento após menopausa, nesse caso o diagnóstico de câncer de endométrio ou de lesões precursoras deve ser afastado (BAHAMONDES, 2004). Nesse último caso, faz-se necessário o exame clínico e a determinação sérica da glicose, uma vez que o câncer de endométrio possui relação com fatores como a obesidade e a hipertensão arterial. O peso, o sobrepeso e a obesidade mórbida devem ser considerados, tendo em vista que esse tipo de câncer é cada vez mais presente em mulheres que apresentam essas condições (BAHAMONDES, 2004).

2.2 FISILOGIA DO ENDOMÉTRIO

O sistema reprodutor feminino tem como principais funções a reprodução, consistindo em produzir óvulos, que serão fertilizados pelos espermatozoides, e favorecer a implantação do embrião, o crescimento e o desenvolvimento do feto, e o nascimento (MOLINA, 2014). Esse sistema inclui os ovários, as tubas uterinas e o útero, assim como as mamas.

O útero é constituído de três camadas, o endométrio é a camada mais interna da cavidade uterina e possui grande potencial proliferativo e regenerativo (KUNDU *et al.*, 2019). Duas camadas formam o endométrio: a basal, responsável pela regeneração do endométrio após a menstruação, e a funcional sobrejacente, eliminado durante a menstruação (GARGETT; MASUDA, 2010). Cada camada é composta, principalmente, por dois componentes: o componente epitelial, como glândulas ou epitélio superficial, e o componente mesenquimal de células estromais pluripotentes (DALLENBACH-HELLWEG, 1981).

Fisiologicamente, durante o ciclo menstrual, o endométrio responde a um balanço entre estrogênio e progesterona e com isso sofre modificações estruturais e funcionais, resultando em

duas fases do endométrio, proliferativas e secretoras (Figura 2) (BULUN, 2011). A exposição irregular ao estrogênio pode levar à hiperplasia endometrial, e consequente aumento na chance de desenvolvimento de câncer endometrial tipo 1 (AMANT *et. al.*, 2005).

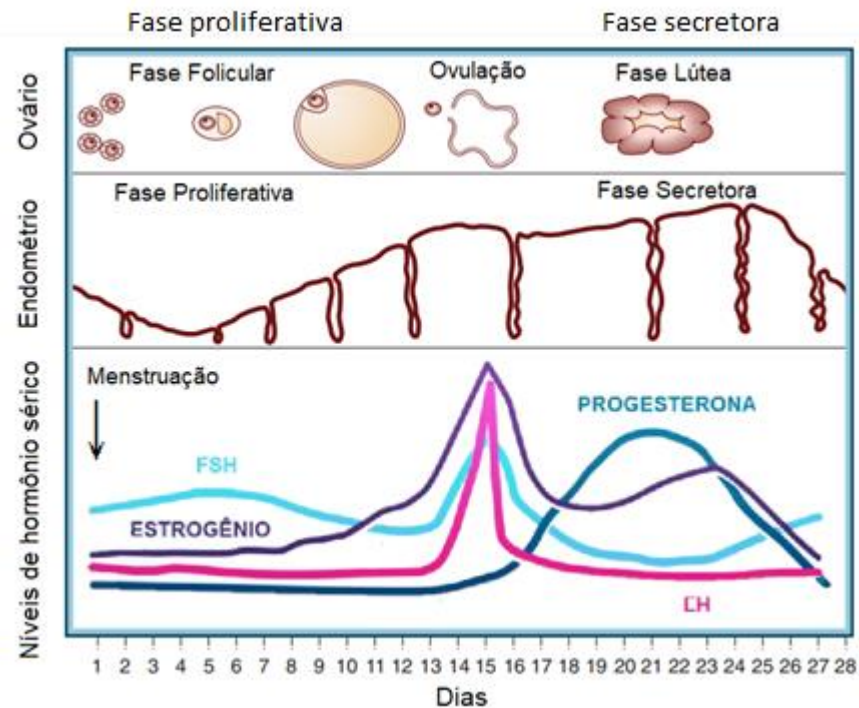


Figura 2 Ciclo menstrual. FSH (hormônio folículo estimulante), liberado pela hipófise, age nos ovários estimulando a maturação dos ovócitos e liberação de estrogênio. O estrogênio age no endométrio estimulando a proliferação celular. Com o aumento dos níveis de estrogênio, ocorre *feedback* negativo na hipófise diminuindo a liberação de FSH e começando a liberação de LH (hormônio luteinizante). O LH age nos ovários induzindo a ovulação e estimulando a liberação de progesterona. A progesterona age no endométrio mantendo a camada espessa formada, aguardando a implantação do embrião. Caso não ocorra fecundação, os níveis desses hormônios caem e ocorre a descamação da camada funcional do endométrio, a menstruação, e o ciclo recomeça.

Adaptado de BULUN, 2011.

O ciclo menstrual regular origina-se de funções fortemente coordenadas do hipotálamo, hipófise, ovários e endométrio, funções previsíveis que indicam uma ovulação regular. Da puberdade à menopausa, a função reprodutiva feminina pode ser vista como um relógio extremamente delicado (BULUN, 2011).

No início do ciclo, que corresponde ao primeiro dia de menstruação, o hormônio folículo estimulante (FSH) é produzido e secretado pela hipófise. Esse hormônio age nos ovários e é responsável por estimular a produção de óvulos maduros nos folículos. Estimulados pelo FSH, os ovários secretam estrogênio que garante que o endométrio fique mais espesso e

nutrido, pronto para receber o óvulo fecundado (SAMPAIO, 2002; BOUZAS; BRAGA; LEAO, 2010; BULUN, 2011).

O aumento do nível de estrogênio sinaliza para a hipófise começar a liberar um outro hormônio, o hormônio luteinizante (LH), que faz o folículo romper e liberar o óvulo maduro. Esse processo é conhecido como ovulação. O folículo rompido estimula, então, o ovário a produzir e liberar progesterona, que causa um aumento ainda maior no revestimento do útero como preparação para o óvulo fecundado (BOUZAS; BRAGA; LEAO, 2010; BULUN, 2011).

Com estrogênio e progesterona elevados, a hipófise diminui a liberação de FSH e LH, fazendo com que o folículo, agora chamado corpo lúteo, regrida. Consequente à regressão do corpo lúteo, os níveis de estrogênio e progesterona também diminuem, então ocorre descamação do endométrio, ou menstruação, iniciando um novo ciclo (SAMPAIO, 2002; BOUZAS; BRAGA; LEAO, 2010; BULUN, 2011; SPEROFF, 2019).

Caso ocorra a fecundação, o óvulo fecundado deve se implantar no revestimento do útero e começa a ser produzido o hormônio da gravidez, gonadotrofina coriônica humana (hCG), que mantém o corpo lúteo produzindo progesterona e estrogênio até que haja a formação da placenta (SPEROFF, 2019).

2.3 RECEPTORES RELACIONADOS À FISIOLOGIA DO ENDOMÉTRIO

A regulação endócrina do sistema reprodutor é determinada pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (MOLINA, 2014). Os hormônios derivados dos ovários regulam o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal em um padrão clássico de retroalimentação negativa e são responsáveis por efeitos observados no ambiente endometrial. Portanto, o endométrio está relacionado, principalmente, a efeitos desencadeados pelos receptores de estrogênio (ER) e de progesterona (PR).

O metabolismo do estrogênio é de suma importância no desenvolvimento e manutenção do câncer endometrial, no caso do tipo 1, e sabemos que seu mecanismo de ação envolve receptores nucleares específicos (YOUNG, 2013; KASOHA *et. al.*, 2019).

O receptor de estrogênio (ER) é um membro da superfamília de receptores nucleares, que é capaz de traduzir sinais extracelulares (pequenas moléculas lipofílicas) em resposta transcricional (MOSSSELMAN; POLMAN; DIJKEMA, 1996). São conhecidas duas isoformas diferentes de receptores de estrogênio, o receptor de estrogênio do tipo alfa (ER α) e o receptor de estrogênio do tipo beta (ER β), cada um derivado de um gene distinto, *ESR1* e *ESR2*, respectivamente (YOUNG, 2013).

O *ESR1* (gene que codifica ER α) é expresso principalmente no útero, ovário, testículos, fígado, rim e coração, enquanto o *ESR2* (gene que codifica ER β) é expresso principalmente no ovário, útero, testículos, próstata, pulmão, trato gastrointestinal, bexiga, sistemas hematopoiético e nervoso central (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003; SPERLING, 2015). ER α e β também podem estar expressos, concomitantemente, em vários tecidos como a glândula mamária, epidídimo, tireoide, adrenal, osso e certas regiões do cérebro (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003).

O receptor tipo alfa está relacionado à promoção da progressão do ciclo celular e proliferação celular. A ativação do receptor tipo beta, ao contrário, foi relacionada a efeitos que muitas vezes se opõe às ações de ER α , sendo considerado pró-apoptóticos e antiproliferativos, o que resulta em provável efeito compensatório ou protetor (MATTHEWS; GUSTAFSSON, 2003). Embora o ER α e o ER β estejam presentes no endométrio, ER α parece ser o mediador primário da ação estrogênica neste tecido (BULUN, 2011).

O mecanismo clássico de ação do ER envolve a ligação do estrogênio a receptores no núcleo (Figura 3 - 1), formando dímeros que se ligam a elementos de resposta específicos ao estrogênio (EREs) localizados nos promotores dos genes alvo. A ligação do hormônio ao receptor também provoca uma mudança conformacional no domínio de ligação do ligante, e essa mudança conformacional permite que proteínas coativadoras sejam recrutadas (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005).

Entretanto, vias de sinalização diferentes desse modelo clássico agora são aceitas como mecanismos reguladores de expressão gênica do ER. O ER no núcleo pode regular a expressão gênica por ligação indireta de outros fatores de transcrição ao DNA (Figura 3 - 2). O estrogênio também liga-se ao receptor acoplado à proteína G (GPR30) e ativa as vias de sinalização PI3K e MAPK (Figura 3 - 3). O ER na membrana plasmática ativa a via de sinalização PI3K (Figura 3 - 4). O estrogênio não apenas regula a transcrição do gene, mas também liga-se ao ER na membrana celular para ativar a via de sinalização PI3K (BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005).

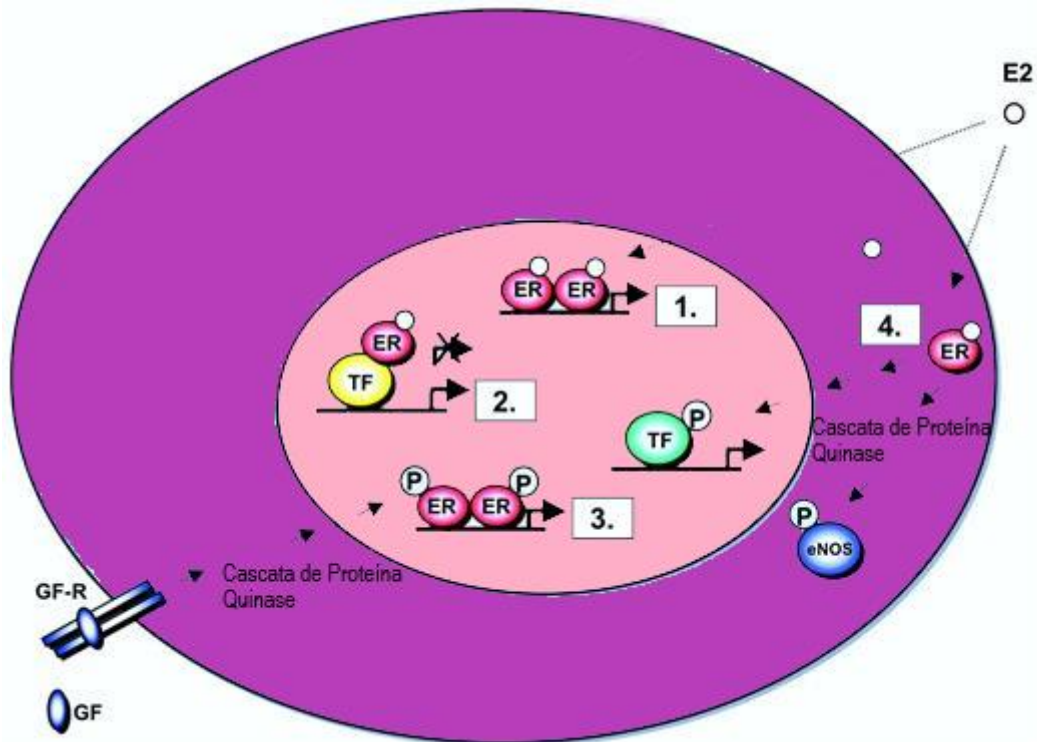


Figura 3 Ilustração esquemática dos mecanismos de sinalização de ER. (1) Mecanismo clássico do ER. (2) regulação gênica por ligação indireta de outros fatores de transcrição. (3) regulação gênica por ativação do receptor acoplado à proteína G. (4) regulação gênica por ativação da sinalização via PI3K. Adaptado de BJÖRNSTRÖM; SJÖBERG, 2005.

2.4 RECEPTORES NUCLEARES

Independentemente do estímulo dado, as células respondem mediadas por proteínas específicas denominadas receptores. Receptores são estruturas moleculares altamente especializadas, que interagem com substâncias presentes no organismo, com funções fisiológicas, ou substâncias externas, que se assemelham químicas e estruturalmente àquelas endógenas. A ligação entre as moléculas sinalizadoras e seus receptores específicos desencadeia vários processos de respostas específicas dentro da célula-alvo (FRANZOTTI, 2006).

Os receptores podem ser classificados em dois grandes grupos, de acordo com sua localização na célula. O primeiro é constituído por proteínas do tipo transmembrana que se localizam na superfície das células-alvo. Os receptores do tipo transmembrana, quando ativados por ligação de uma molécula sinalizadora específica, desencadeia uma cascata de sinais intracelulares (FRANZOTTI, 2006).

O segundo grupo é formado por receptores localizados dentro das células, os receptores nucleares (RN), e necessitam da entrada da molécula sinalizadora no citoplasma ou no núcleo

para serem ativados, e assim interagir com sequências específicas no interior do núcleo, desencadeando suas ações (FRANZOTTI, 2006) (Figura 4).

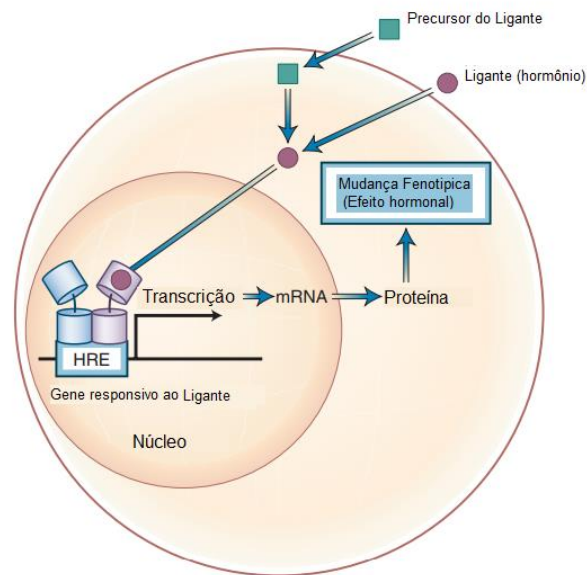


Figura 4 Mecanismo geral dos receptores nucleares. A molécula sinalizadora entra no citoplasma ou no núcleo e se ligam ao receptor que é ativado, e assim pode interagir com sequências específicas de DNA no interior do núcleo, desencadeando suas ações Adaptado de LAZAR, 2011.

Os receptores nucleares são membros de uma superfamília de fatores de transcrição ligados ao DNA e estão envolvidos no controle de diversos processos fisiológicos (GERMAIN, 2006). A descoberta dos RN é extremamente recente, o primeiro foi identificado bioquimicamente na década de 1960, quando Elwood Jensen e colaboradores mostrou que o estradiol ficava acumulado em suas células-alvo, levando a acreditar que sua atividade celular seria mediada por um receptor de alta afinidade específico (GERMAIN, 2006). Desde então, os RN tornaram-se reconhecidos como uma superfamília de fatores de transcrição e o campo de pesquisa passou por um desenvolvimento muito rápido e abrange áreas que vão desde análises estruturais e funcionais até mecanismos moleculares de regulação da transcrição (GERMAIN, 2006).

Os RN possuem domínios altamente conservados: o domínio C, que se liga ao DNA, e o domínio E, onde a molécula sinalizadora específica liga-se (Figura 5). Por meio da evolução desses domínios, 48 RN já foram identificados e esses foram subdivididos em: receptores hormonais, por exemplo, o receptor tireoidiano (TR), o receptor de estrogênio (ER), o receptor de progesterona (PR) e o receptor de androgênio (AR); receptores sensíveis a metabólitos, a exemplo dos receptores ativados por proliferadores de peroxissoma (PPAR); receptores ativados por vitaminas, como o receptor retinoide X (RXR); outros receptores parecem funcionar como integradores de sinais ambientais exógenos, incluindo os naturais, nesses casos,

a função do receptor é induzir enzimas do complexo citocromo P450, que facilitam a desintoxicação de compostos no fígado, por exemplo, o receptor pregnano X (PXR) (SPERLING, 2015; GERMAIN, 2006; LAZAR, 2011).

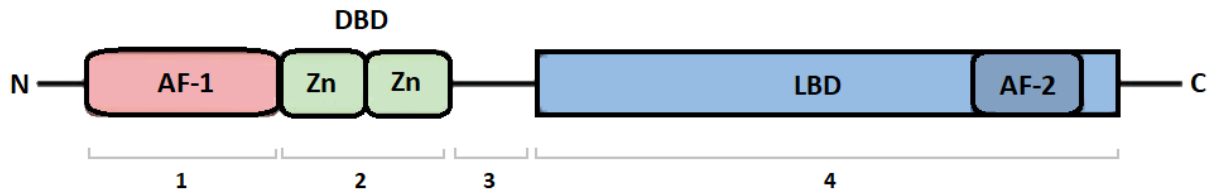


Figura 5 Estrutura primária dos receptores nucleares. (1) Domínio amino-terminal, no qual se encontra o domínio de função de ativação 1 (AF-1), que ativa a transcrição independente do ligante; (2) Domínio de ligação ao DNA ou DBD (domínio C), onde se localizam os dois dedos de zinco (Zn); (3) Hinge ou dobradiça; (4) Domínio de ligação ao ligante ou LBD (domínio E), onde fica a função de ativação 2 (AF-2); porção amino terminal (N) e carboxiterminal (C). Adaptado de Lacerda, 2016.

Considerando sua estrutura e não a sua função, esses mesmos receptores também foram classificados em seis subfamílias, por exemplo: a subfamília 0 contém receptores como os de gônada embrionária e o DAX1 (reversão sexual sensível à dosagem, região crítica de hipoplasia adrenal, no cromossomo X, gene 1), que não apresentam domínios C ou E conservados; a subfamília 3 contém os receptores de esteroides, de glicocorticoide, androgênio, progesterona e mineralocorticoide, pois evidências sugerem que esses receptores evoluíram a partir de um gene comum de receptor de esteroide há milhões de anos (SPERLING, 2015).

Os receptores nucleares são alvos ideais para a descoberta de novos fármacos, não somente porque são mediadores em uma infinidade de processos biológicos e doenças, mas porque são regulados por pequenas moléculas lipofílicas que podem ser facilmente substituídas por um fármaco alternativo (SLADEK, 2003).

2.5 PRODUTOS NATURAIS PARA O TRATAMENTO DE CÂNCER

Apesar da ciência estar sempre em busca de novas estratégias de tratamento para o câncer e diversas outras doenças, vários tumores ainda não dispõem de tratamento adequado. Dentro do contexto apresentado, os produtos naturais têm papel importante como fonte na busca de novos agentes antitumorais.

Registros da antiga China cerca de 2700 a.C. e em papiros egípcios de cerca de 1500 a.C., além de outros indícios, mostram que o homem utiliza-se desse recurso para o tratamento de doenças desde os primórdios de sua história (SOUZA, 2013). Além disso, os recursos

naturais são extremamente abundantes e ainda há muito o que ser explorado, por isso oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico.

Os produtos naturais já são utilizados como base para tratamentos de diversas doenças, como a artemisinina, antimalárico obtido da planta *Artemisia annua*; a atropina, anticolinérgico extraído de *Atropa belladonna*; a cafeína, estimulante extraído de diferentes plantas, como *Coffea arabica* (café), *Ilex paraguariensis* (erva-mate) e *Paullinia cupana* (guaraná); a estreptomicina, o primeiro antibiótico utilizado no tratamento da tuberculose, isolado do fungo *Streptomyces griseus*; o eugenol, anestésico extraído do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia); a morfina, narcótico utilizado como analgésico isolado da *Papaver somniferum* (papoula); a penicilina G, antibiótico isolado do fungo *Penicillium notatum*; a pilocarpina, utilizada no tratamento do glaucoma e extraída das folhas da planta *Pilocarpus jaborandi*; entre outros (ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001).

No contexto do câncer, atualmente são utilizados vários antineoplásicos, utilizados em diversos tipos de câncer, derivados de produtos naturais, a exemplo do paclitaxel, isolado do *Taxus brevifolia*; alcaloides da vinca, derivados da planta *Catharanthus roseus*; o etoposídeo, que é um derivado da podofilotoxina, extraída do *Podophyllum peltatum* (Mandrágora Americana) (YOUNES; VARELLA; SUFFREDINI, 2007; COSTA-LOTUFO, 2010).

2.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA *OCHROMA PYRAMIDALE*

A espécie *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. é uma planta que pertence à família Malvaceae, antes conhecida como Bombacaceae, popularmente chamada de pau-de-balsa, pau-de-jangada ou simplesmente balsa, sendo anteriormente denominada de *Ochroma lagopus* Swartz (RIZZINI, 1977 apud NETTO, 1994). Costuma ser encontrada em áreas tropicais, como o sul do México, Bolívia, Peru e Amazonas, mais frequentemente na sua metade ocidental. Está presente em matas primárias e secundárias e às margens dos rios igapós (RIZZINI, 1978; LOUREIRO, 1979 apud NETTO, 1994).

A madeira do pau-de-balsa é ideal para construir jangadas, balsas, salva-vidas, boias e brinquedos, por causa de suas características: ela é muito leve, elástica e macia, facilitando a manipulação (LÊDO, 1977; LOUREIRO, 1979; RIZZINI, 1977 apud NETTO, 1994). A paina dos frutos pode ser usada no enchimento de almofadas e travesseiros (RIZZINI, 1976 E 1977 apud NETTO, 1994).

Graças ao seu rápido crescimento e tolerância à luminosidade direta, a *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. vem sendo utilizada em plantios mistos destinados à

recomposição de áreas degradadas e de preservação permanente. Em consequência da baixa reposição, da crescente demanda por produtos e subprodutos e da extinção de grandes populações de espécies florestais, o reflorestamento de grandes áreas torna-se cada dia mais necessário (ALVINO; RAYOL, 2007).

No que se refere a sua aplicabilidade clínica, poucos são os estudos quanto ao uso na medicina popular da *O. pyramidale*, sendo suas propriedades descritas como emoliente, emético, diurético, antidiarreico e expectorante (CORDERO, 1978; REVILLA, 2000). Existem relatos do uso de *O. pyramidale* na medicina veterinária, onde administra-se a infusão da casca em vacas para auxiliar na expulsão da placenta após o parto (PAULA et al., 1995; PAULA, 1997 apud PERDOMO ANGULO, 2009). Tem sido investigado, também, outra atividade biológica desta planta, por causa do grande número de insetos mortos em suas flores (PAULA et al., 1995; PAULA, 1997 apud PERDOMO ANGULO, 2009).

A figura 6 mostra uma folha e a figura 7 a árvore de *O. pyramidale* de onde foi coletado todo o material utilizado nesse estudo, localizado no Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília.



Figura 6 Folha de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. Foto da autora.



Figura 7 Árvore de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. localizada no Campus Darcy Ribeiro, UnB. Foto da autora.

Considerando todas as características mencionadas e a escassez de estudos de *O. pyramidale* na área medicinal, essa espécie instiga curiosidade e é ideal para investigação e desenvolvimento de possíveis moléculas que possam chegar a ter ação farmacológica.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Considerando a ação de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb., no receptor de estrogênio (ER), ainda não totalmente elucidada, e um possível desenvolvimento de moléculas que possam ter uma ação farmacológica, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito antiproliferativo de *Ochroma pyramidale* (Cav. Ex Lam.) em linhagem de adenocarcinoma de endométrio humano.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Obter os extratos (aquoso, etanólico e hexânico) das folhas de *Ochroma pyramidale*.
- ✓ Avaliar a viabilidade das células de adenocarcinoma de endométrio humano tratadas com os extratos (aquoso, etanólico e hexânico) de *Ochroma pyramidale* em concentrações variadas.
- ✓ Avaliar a expressão gênica do receptor de estrogênio alfa (ER α) das células de adenocarcinoma de endométrio humano tratadas com os extratos (aquoso, etanólico e hexânico) de *Ochroma pyramidale* em concentrações variadas.
- ✓ Avaliar a expressão gênica do receptor de estrogênio beta (ER β) das células de adenocarcinoma de endométrio humano tratadas com os extratos (aquoso, etanólico e hexânico) de *Ochroma pyramidale* em concentrações variadas.

4 METODOLOGIA

4.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *OCHROMA PYRAMIDALE* (CAV. EX LAM.) URB.

As folhas de *O. pyramidale* foram coletadas no Campus Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília. O indivíduo coletado é idêntico à exsicata depositada no Herbário da UnB (UB 8445). O material vegetal foi seco à temperatura ambiente e pulverizado.

O extrato aquoso de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. foi obtido por infusão, na proporção de 1:20 de planta e água, a 100 °C, das folhas pulverizadas, seguido por centrifugação à 4000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi liofilizado, obtendo-se, assim, o extrato aquoso bruto da planta.

Os extratos etanólico e hexânico foram obtidos por meio de maceração seguida de percolação, a temperatura ambiente. O material vegetal utilizado para os dois extratos foi recolhido de uma única vez. Para o extrato hexânico, em um percolador, as folhas trituradas (aproximadamente 100g) ficaram em contato com o líquido extrator (hexano), de 3 a 5 dias - maceração. Após esse período, lentamente por meio da força da gravidade, foi recolhido o extrato hexânico - percolação. Esse procedimento foi repetido mais uma vez. Para o extrato etanólico, sob o mesmo material vegetal utilizado na extração do extrato hexânico, foi repetido o mesmo processo (duas vezes) porém, dessa vez, o líquido extrator usado foi o etanol. Ambos os extratos foram secos em rotoevaporador, obtendo-se os extratos brutos concentrados.

4.2 CULTURA DE CÉLULAS

Células Ishikawa (adenocarcinoma de endométrio humano), foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) com baixo teor de glicose, contendo 10% de soro fetal bovino em placas de cultura de 15 cm em incubadora a 37°C e 5% CO₂.

As células Ishikawa são derivadas de um adenocarcinoma endometrial estágio 2, isolado de uma mulher japonesa de 39 anos (NISHIDA, 2002). Segundo ficha fornecida pelo BCRJ, banco de células do qual as células foram obtidas, as células Ishikawa produzem hormônio liberador de corticotropina, fosfatase alcalina placentária e gonadotrofina coriônica, e respondem a hormônios esteroides. Originalmente, as células Ishikawa possuíam receptores de

estrogênio e progesterona porém, após cultura de longo prazo, esses receptores tendem a desaparecer das células e as células se tornam indiferenciadas (NISHIDA, 2002).

As células foram consideradas aptas aos testes após atingirem uma confluência de mais ou menos 80% da placa (Figura 8).



Figura 8 Células Ishikawa. Aumento de 5X. Confluência de aproximadamente 90%. Foto da autora.

4.3 ENSAIOS DE VIABILIDADE CELULAR

Com o objetivo de definir a viabilidade das células Ishikawa expostas ao tratamento com os extratos preparados, foi realizado o ensaio colorimétrico com MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). O MTT possui uma coloração amarela e é reduzido por enzimas oxidoredutases celulares, presentes no citosol das células, para sua forma insolúvel, de cor púrpura. Ou seja, o MTT é reduzido em cristais de formazan em células metabolicamente viáveis, vivas. A viabilidade celular foi calculada considerando a absorbância do controle negativo (solvente utilizado para diluir os extratos) normalizada a 100%. A viabilidade com os extratos foi relativa ao controle.

Os ensaios de MTT foram realizados em placas de 96 poços, contendo 5.000 células/poço em 50 μ L de meio DMEM/poço. Para a contagem de células, foi utilizada a Câmara de Neubauer, sendo feita a contagem nos quatro quadrantes. Após o plaqueamento a

placa foi incubada a 37°C / 5% CO₂ por 24 horas, a fim de que as células pudessem aderir à placa. Após 24 horas, 50 µL do tratamento (extrato dissolvido no meio de cultura), em concentrações crescentes que variaram de 20 a 240 µg/mL, para os extratos aquoso e etanólico, e de 20 a 125 µg/mL para o extrato hexânico, conforme desenho experimental, foram adicionados em cada poço, totalizando o volume de 100 µL/poço.

A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas e 48h de tratamento, para isso, foi feita uma placa para cada tempo de tratamento. Após 24 ou 48 horas, o meio com tratamento foi aspirado e em seguida foram colocados 50 µL de MTT diluído em meio de cultura, na concentração de 1 mg/mL. As placas foram incubadas por 4 horas a 37°C / 5% CO₂. Após 4 horas, foram adicionados 150µL de isopropanol acidificado (26mL de isopropanol e 104 µL de HCl), também chamada solução reveladora. Os cristais de formazan foram homogeneizados até a dissolução completa e em seguida a leitura foi feita em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Foram usados como controles poços contendo células e meio DMEM e poços contendo células e DMSO (dimetilsulfóxido) 1%, solvente usado para diluir os extratos hexânico e etanólico, ou água, solvente usado para diluir o extrato aquoso, sendo esses últimos, chamados controles negativos.

4.4 TRANSFECCÃO E ENSAIO DE GENE-REPÓRTER

A tecnologia de gene repórter é amplamente utilizada para monitorar os eventos celulares associados com a transdução de sinal e a expressão do gene. A principal vantagem destes ensaios é a sua elevada sensibilidade, conveniência e adaptabilidade para medições de grande escala (NAYLOR, 1999). Foi utilizado uma placa de 48 poços, sendo semeadas 50.000 células em um volume de 250 µL de meio DMEM por poço. A placa foi incubada por 24 horas. Após este tempo, foi realizada a transfecção com lipofectamina (*Lipofectamine*® 2000, Invitrogen, CA, USA) de plasmídeos constituídos por sequências do ER α e ER β GAL, contendo o elemento responsivo de cada plasmídeo (ERE e GAL Luc, respectivamente), associados ao gene da luciferase, a transfecção dos plasmídeos foi realizada conforme o protocolo do fabricante. Esperadas 6 horas após a transfecção, o meio contendo lipofectamina foi aspirado e foi feito o tratamento para avaliar o efeito sobre a ativação dos receptores. Após 20-24 horas de tratamento, o meio presente no poço foi aspirado e adicionados 50 µL do tampão de lise em cada poço e levado ao vórtex por 1 minuto. 10 µL do lisado celular foram transferidos para um microtubo e foram adicionados 20 µL de luciferina para leitura em luminômetro.

O objetivo desse ensaio, nesse caso, foi encontrar a concentração de β -estradiol adequada para realização de ensaios posteriores. Com base nos dados obtidos no Laboratório de Farmacologia Molecular, após tratamento das células HeLa transfectadas com β -estradiol nas concentrações de 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} e 10^{-13} M (Figura 9), a concentração selecionada foi de 10^{-7} M.

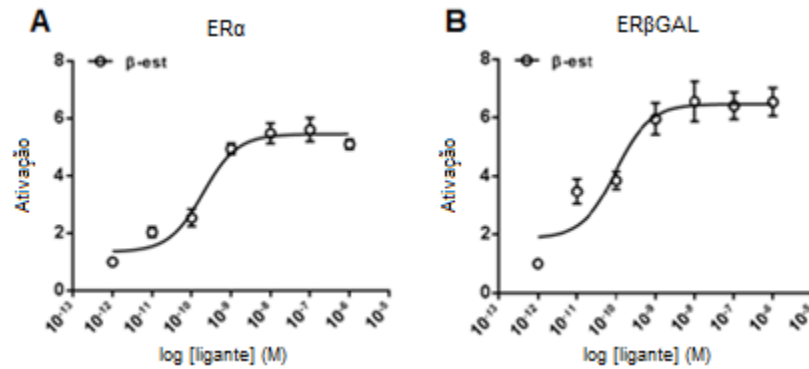


Figura 9 Curva de ativação dos receptores ER α (A) e ER β GAL (B) transfectados em células HeLa por meio de lipofectamina e avaliados por gene-repórter. Ensaio realizado por alunos do Laboratório de Farmacologia Molecular.

4.5 RT-PCR

Os efeitos dos extratos de *Ochroma pyramidale* em células Ishikawa sobre a expressão de genes relacionados ao mecanismo dos receptores de estrogênio (ESR1 e ESR2, genes codificadores dos receptores ER α e ER β , respectivamente) foram analisados por meio do ensaio de amplificação por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR-RT).

O tratamento das células Ishikawa foi realizado em placas de 6 poços, sendo colocadas 300.000 células por poço e deixadas em incubadora a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Após este tempo, foi feito o tratamento, e deixada a placa também em incubadora, por 24 horas, com as seguintes concentrações: extrato aquoso: 40 e 180 μ g/mL, extrato etanólico: 20 e 60 μ g/mL e extrato hexânico: 40 e 100 μ g/mL, seguidos da adição do agonista de ER, β -estradiol 10^{-7} M, 4 horas após o tratamento com os extratos. Poços tratados com DMSO e água, solventes utilizados para solubilização dos extratos, foram utilizados como controles e também receberam o tratamento com β -estradiol 10^{-7} M, 4 horas depois.

Na extração do RNA total das amostras, foi utilizado o reagente Trizol® (*Invitrogen*, Life Technologies, CA, EUA), de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Nesta etapa ainda estão presentes, além do RNA, DNA e proteínas das células. Para separação desses componentes foi adicionado clorofórmio concentrado às amostras. Nesse momento, três fases

aparecem no tubo: uma fase vermelha e inferior, contendo proteínas presentes no citoplasma celular; uma intermediária, branca e sólida, onde está presente o DNA; e por fim, uma fase incolor e superior, onde se encontra o RNA. Em seguida, a fase contendo RNA foi isolada em um novo tubo e foi adicionado isopropanol, que fez com que o RNA total precipitasse.

O precipitado contendo o RNA total foi ressuspenso em água Milli-Q tratada com dietil pirocarbonato 0,1% (v/v) - DEPC (Sigma-Aldrich®) - e sua concentração e pureza foram avaliadas com auxílio do espectrofotômetro *NanoVue Plus* (GE Health Sciences®, Life Sciences, Buckinghamshire, UK) no comprimento de onda de 260 nm e expressas em ng/μL. O grau de pureza das amostras foi verificado por meio da razão entre os comprimentos de onda 260 nm e 280 nm (A260/A280), relacionado à contaminação por DNA e outras proteínas, e da razão entre os comprimentos de onda 260 nm e 230 nm (A260/A230), relacionado à contaminação por sais, álcool ou outros reagentes da reação. A pureza foi considerada adequada quando a razão A260/A280 encontrava-se entre 1,7 e 2 e a razão A260/A230 acima ou próximo de 2 (Tabela 2).

Após extração e quantificação do RNA total contido nas amostras (Tabela 2) foi decidido seguir o experimento apenas com as menores concentrações: extrato aquoso 40 μg/mL, extrato hexânico 40 μg/mL e extrato etanólico 20 μg/mL.

Tabela 2 Concentrações e purzas obtidas após a extração do RNA total em cada experimento independente

N1			
	[ng/μL]	A260/A280	A260/A230
Ctrl H2O	758,4	1,879	1,866
H2O 40	803,6	1,741	1,633
H2O 180	34,0	1,474	0,410
Ctrl DMSO	603,2	1,871	1,327
EtOH 20	422,8	1,795	1,534
EtOH 60	64,0	1,633	0,755
HEX 40	346,4	1,839	1,839
HEX 100	301,2	1,819	1,565
N2			
	[ng/μL]	A260/A280	A260/A230
Ctrl H2O	654,4	1,907	1,995
H2O 40	734,0	1,863	1,919
H2O 180	110,8	1,601	0,487
Ctrl DMSO	494,0	1,891	2,283
EtOH 20	532,0	1,871	1,824
EtOH 60	166,4	1,726	1,726

HEX 40	524,8	1,890	1,949
HEX 100	235,6	1,829	1,737
N3			
	[ng/μL]	A260/A280	A260/A230
Ctrl H2O	861,6	1,906	2,234
H2O 40	703,6	1,877	1,916
H2O 180	173,2	1,443	0,520
Ctrl DMSO	504,8	1,884	2,214
EtOH 20	757,2	1,884	2,101
EtOH 60	453,2	1,819	1,387
HEX 40	924,8	1,904	2,225
HEX 100	828,4	1,907	2,229

As amostras de RNA total foram tratadas com a enzima DNase I (Sigma-Aldrich, MO, EUA), com o objetivo de remover contaminação por DNA genômico. Após o período de 15 minutos, a enzima foi inativada com uma solução de inativação a 70°C em termociclador (*Bio-Rad*, Hercules, CA, EUA) por 10 minutos.

A quantificação da expressão dos genes ESR1, ESR2 e GAPDH (normalizador dos dados) – sequências dos *primers* para determinação da expressão desses genes estão descritas na tabela 3, nas células Ishikawa tratadas com os extratos das folhas de *O. pyramidale* foi feita por meio do sistema *StepOnePlus™* Real-Time PCR System (*Applied Biosystems™*) e as reações de transcrição reversa e amplificação foram realizadas em uma única etapa por meio do kit Power SYBR® Green RNA-to-CT 1-Step (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA). O kit Power SYBR® Green utiliza-se de fluoróforos que se intercalam na dupla fita de DNA e, ao serem excitados por luz, emitem fluorescência, sendo a intensidade desta proporcional à quantidade do produto amplificado.

Tabela 3 Sequência dos *primers* (5' - 3') utilizados para determinação da expressão gênica por PCR quantitativa em tempo real.

<i>ESR1</i> - forward	GGTGGGATACGAAAAGACCGA
<i>ERS1</i> - reverse	GGTTGGCAGCTCTCATGTCT
<i>ESR2</i> - forward	GCAGACCACAAGCCCAAATG
<i>ERS2</i> - reverse	AGCGATCTTGCTTCACACCA
GAPDH - forward	AAGGGCTCATGACCACAGTC
GAPDH - reverse	CAGGGATGATGTTCTGGGCA

As reações foram realizadas com volume final de reação de 10 μL (tabela 4), sendo 5,5 μL de uma mistura composta por Power SYBR® Green, enzima transcriptase reversa (RT), *primers* forward e reverse (5,0 pMol/ μL), e 4,5 μL da amostra de RNA total, que continham 5,0 ng de RNA total.

Tabela 4 Reagentes utilizados na reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCRq) por SYBR® Green

Reagentes	Volumes
Mix Power SYBR® Green RT-PCR (2x)	5,0 μL
Transcriptase reversa	0,08 μL
RNA (5 ng/4,5 μL)	4,5 μL
Primer forward (5 pmol/L)	0,2 μL
Primer reverse (5 pmol/L)	0,2 μL
Água MilliQ	0,02 μL
Volume total	10,0 μL

A fluorescência detectada é representada por meio do C_T (*cycle threshold* - ciclo limiar), que equivale ao número de ciclos de reação suficiente para a amplificação atingir o limiar da fase exponencial. Os dados encontrados foram normalizados pelo gene constitutivo GAPDH (C_T gene de interesse menos C_T constitutivo = ΔC_T) e, ainda, pelo controle negativo - grupo não tratado com os extratos - (ΔC_T dos grupos tratados menos ΔC_T do grupo controle = $\Delta\Delta C_T$),

uma vez que os dados são relativos ao controle não tratado. Os dados foram representados por $2^{-\Delta\Delta CT}$. O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ é uma maneira conveniente de analisar as mudanças relativas na expressão gênica de experimentos de PCR quantitativos em tempo real (LIVAK E SCHMITTGEN, 2001).

4.5.1 Especificidade do RNA

A Curva de Melt foi obtida por meio do sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR (*Applied Biosystems*™) (Figura 10), a qual mostra o ponto da reação em que 50% do DNA está em sua formação de dupla hélice e 50% encontra-se desnaturado, é possível observar que por existir apenas um pico, a reação ocorreu de forma específica ao gene de interesse (*ESR1*, *ESR2* e *GAPDH*). Ou seja, os *primers* colocados na reação eram específicos para os genes estudados.

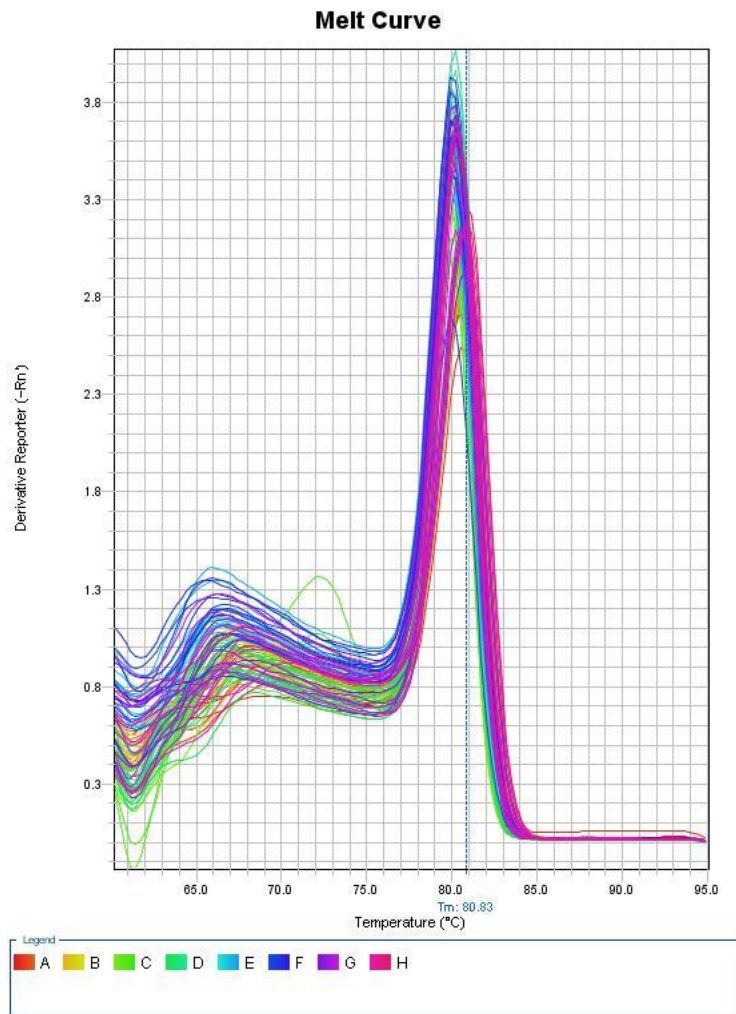


Figura 10 Curva de Melt, obtida por meio do sistema StepOnePlus™ Real-Time PCR (*Applied Biosystems*™).

4.6 ESTATÍSTICA

Os dados encontrados foram plotados no GraphPadPrism® versão 5.0 e, após testes de normalidade, foram usados a análise de variância One-way ANOVA para dados paramétricos ou a análise comparativa Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 VIABILIDADE CELULAR DOS EXTRATOS DE *OCHROMA PYRAMIDALE* EM CÉLULAS ISHIKAWA

O tratamento com os extratos foi feito somente com os extratos ou com os extratos e adição posterior do agonista de ER, β -estradiol 10^{-7} M, concentração considerada ideal pela proporção de receptores ativados (concentração definida no ensaio de gene-repórter – figura 9). Foram avaliadas concentrações crescentes que variaram de 20 a 240 $\mu\text{g/mL}$, para os extratos aquoso e etanólico, e de 20 a 125 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato hexânico. A dificuldade de solubilização do extrato hexânico foi um fator limitante na determinação das concentrações estudadas.

Após um período de 24 e 48 horas de tratamento, apenas nas concentrações mais altas dos extratos aquoso e etanólico foi possível identificar alteração significativa da viabilidade celular (Figura 11). No entanto, a diminuição observada não foi considerada expressiva e pode estar relacionada à toxicidade do extrato nas células.

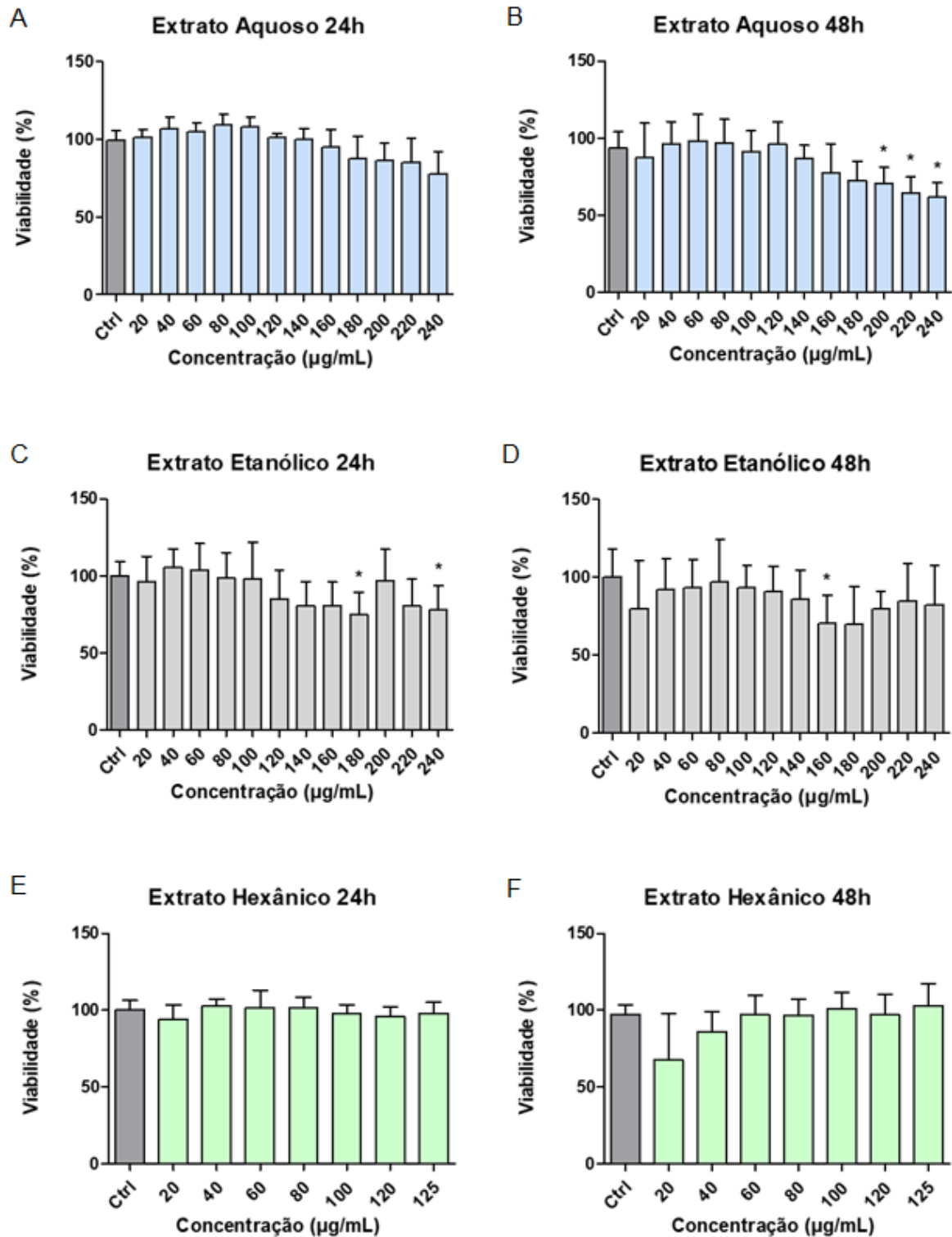


Figura 11 Ensaio colorimétrico de viabilidade indireta com MTT. Extrato aquoso 24h (A) e 48h (B); extrato etanólico 24h (C) e 48h (D); extrato hexânico 24h (E) e 48h (F). Controles: água, para extrato aquoso; DMSO, para extratos hexânico e etanólico. Os resultados estão expressos em média \pm SD de, no mínimo, três experimentos em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle.

Shenouda e colaboradores (2004) também avaliou algumas substâncias de origem vegetal (quercetina, baicaleína, apigenina, genisteína, resveratrol, curcumina e galato de epigallocatequina - EGCG) quanto à ligação ao receptor de estrogênio e inibição do crescimento de células tumorais. Diferente dos resultados aqui encontrados, as substâncias utilizadas por Shenouda (2004) foram capazes de inibir o crescimento de células tumorais de próstata humanas insensíveis a androgênio (PC3) e sensíveis a androgênio (LNCaP) expressivamente, alguns com mais potência que outros, em ensaio DC Bio-Rad (SHENOUDA *et.al.*, 2004).

Com base nos achados acerca da viabilidade celular, decidiu-se investigar se o extrato teria ação em reprimir a viabilidade das células de câncer de endométrio na presença do agonista β -estradiol. O ensaio foi realizado adicionando o agonista de ER, na concentração de 10^{-7} M, 4 horas após o tratamento com os extratos nas mesmas concentrações utilizadas na avaliação anterior. Dessa vez, foi possível observar uma queda significativa na viabilidade indireta das células (Figura 12).

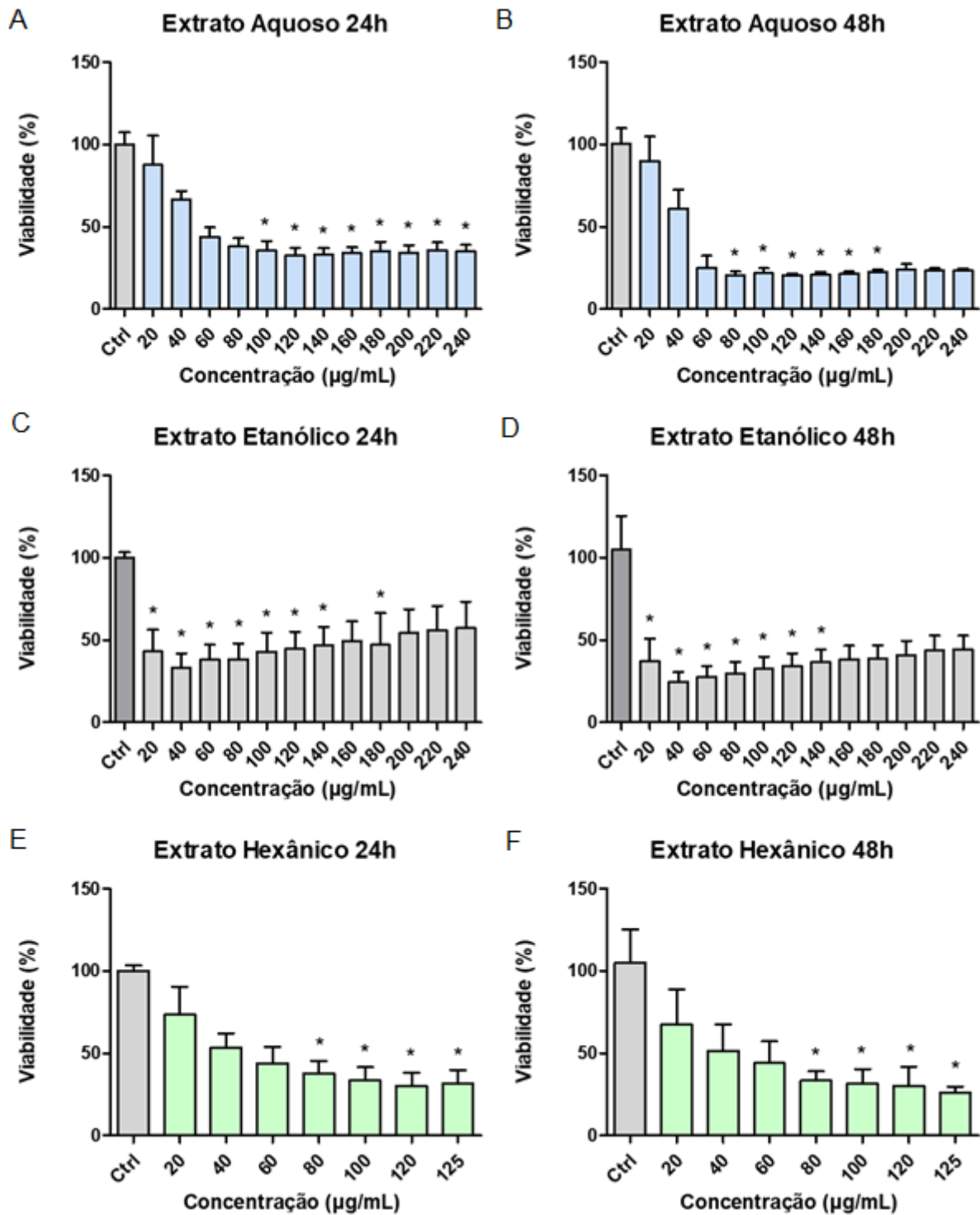


Figura 12 Ensaio colorimétrico de viabilidade indireta com MTT, na presença do agonista β -estradiol (10^{-7} M). (A) Extrato Aquoso 24h e (B) 48h; (C) extrato etanólico 24h e (D) 48h; (E) extrato hexânico 24h e (F) 48h. Controles: água, para extrato aquoso; DMSO, para extratos hexânico e etanólico. Os resultados estão expressos em média \pm SD de, no mínimo, três experimentos em triplicata. * $p < 0,05$ vs controle.

No extrato aquoso foi possível observar redução a partir da concentração de 100 µg/mL em 24 horas, enquanto em 48 horas o resultado foi significativo a partir de 80 µg/mL. O extrato hexânico reduziu significativamente a viabilidade celular a partir de 80 µg/mL tanto com 24 horas quanto com 48 horas de tratamento.

O extrato etanólico apresentou uma queda expressiva desde a primeira concentração - 20 µg/mL, porém, com o aumento das concentrações, a viabilidade tendeu a aumentar novamente. Uma pesquisa bibliográfica, realizada por Lagarde e colaboradores (2015) com o objetivo de identificar estudos publicados que relatam relações não monotônicas de resposta à dose (NMDR) com desreguladores endócrinos, mostrou a importância de considerar que esse efeito pode acontecer e descreve uma relação dose-resposta caracterizada por uma curva cuja inclinação muda de direção dentro da faixa de doses testadas. O NMDR pode surgir de vários mecanismos moleculares, como efeitos opostos induzidos por vários receptores que diferem por sua afinidade, dessensibilização do receptor, feedback negativo com o aumento da dose ou modulação do metabolismo dependente da dose (LAGARDE, 2015).

Semelhantes a esses achados, Visser, Mortimer e Louw (2013), buscando por uma nova geração de análogos de estrogênio que fornecessem os benefícios sem os riscos associados, e que, além disso, tivessem propriedades protetoras contra cânceres nos tecidos mamários e endometriais, avaliaram o efeito de três extratos de duas espécies de *Cyclopia*: *C. genistoides* e *C. subternata*: dois extratos metanólicos, P104 e SM6Met, e um extrato aquoso, por meio do ensaio com MTT e observaram que os extratos diminuíram a proliferação celular na presença de estrogênio a 10^{-9} M em células de câncer de mama. Esse efeito só foi observado na presença do estrogênio, sugerindo que essa diminuição poderia ser por via estrogênica (VISSER; MORTIMER; LOUW, 2013).

Da mesma forma, Kang (2016) avaliou os efeitos do extrato de digestão do leite de soja (SMD) na progressão do câncer de próstata através de ER β em células LNCaP. Para avaliar os efeitos do SMD na proliferação celular, foi feito o ensaio de viabilidade celular com MTT, mostrando que a viabilidade celular foi acentuadamente reduzida por SMD. Kang ainda observou que, na presença do antagonista de ER, o nível de proliferação se mantinha o mesmo em todas as situações (células tratadas com estrogênio e tratadas com SMD) mostrando que a diminuição na proliferação poderia ser via estrogênica (KANG, N. *et.al.*, 2016).

Confirmado a diminuição da proliferação celular, supostamente, por via estrogênica, o próximo passo então seria investigar se o efeito antagonista demonstrado em estudo anterior seria o responsável por tal diminuição. Para isso, foi realizado o ensaio de PCR em tempo real, que avaliou a expressão gênica dos receptores de ER, ER α e ER β .

5.2 EXPRESSÃO GÊNICA DO ER

Após o tratamento com o extrato aquoso de *O. pyramidale* por 24 horas, o RNA das células foi extraído e os produtos da PCR estão representados na figura 13. Os dados obtidos são preliminares e sugerem uma diminuição da expressão dos receptores de estrogênio, ER α (Figura 13A) e ER β (Figura 13B). Destaca-se ainda, que essa redução é acentuada para o tipo alfa do receptor.

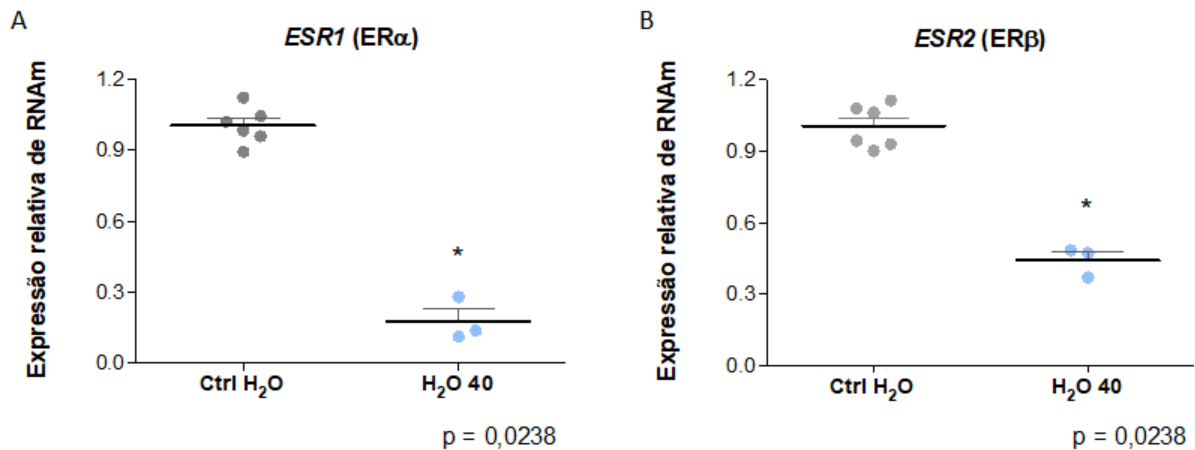


Figura 13 Expressão de genes codificadores dos receptores ER α (A) e ER β (B) em células Ishikawa tratadas com o extrato aquoso de *O. pyramidale* por 24h na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$, seguido pela adição do agonista β -estradiol 10^{-7} M, 4 horas depois. Os resultados estão expressos em média \pm SD de, no mínimo, três experimentos em triplicata. Significância estatística: $p < 0,05$ vs controle.

Para o tratamento feito com o extrato etanólico, o perfil de expressão de RNA foi semelhante ao tratamento com extrato aquoso, mostrando uma diminuição da expressão dos receptores de estrogênio, ER α (Figura 14A) e ER β (Figura 14B), destacando-se a redução acentuada para o tipo alfa do receptor.

No entanto, para o extrato hexânico não pôde ser observada alteração significativa da expressão gênica.

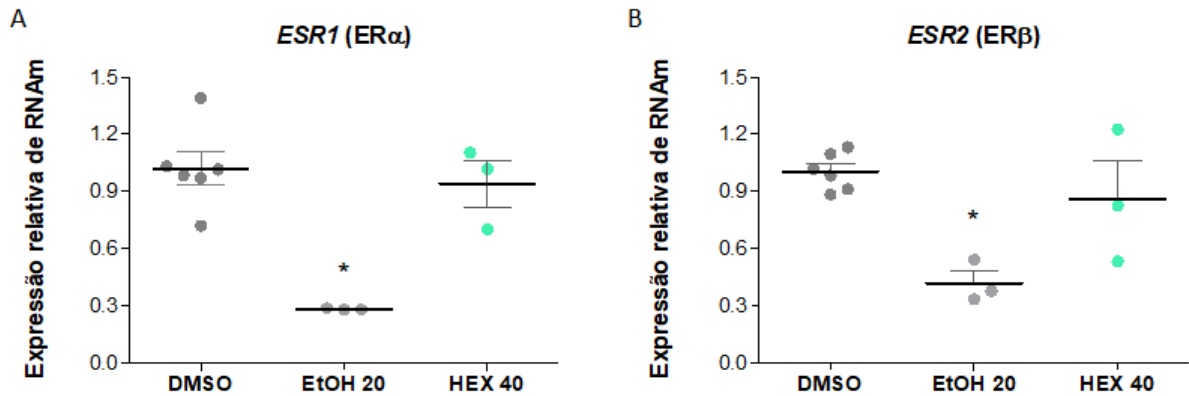


Figura 14 Expressão de genes codificadores dos receptores ER α (A) e ER β (B) em células Ishikawa tratadas com os extratos hexânico e etanólico de *O. pyramidale* por 24h nas seguintes concentrações: extrato hexânico 40 $\mu\text{g/mL}$ e extrato etanólico 20 $\mu\text{g/mL}$, seguidos pela adição do agonista β -estradiol 10^{-7}M , 4 horas depois. Os resultados estão expressos em média \pm SD de, no mínimo, três experimentos em triplicata. Significância estatística: $p < 0,05$ vs controle (DMSO).

Sabe-se que a atividade de ER α é muito mais evidenciada no endométrio que a atividade de ER β e que essa atividade está relacionada à proliferação celular. Enquanto, para o ER β relata-se uma atividade contrária, sendo responsável por uma atividade pró-apoptótica e antiproliferativa. Por isso, o resultado obtido mostra-se promissor uma vez que foi demonstrado a diminuição da expressão gênica dos receptores de estrogênio, especialmente de ER α .

Corroborando com o que é relatado a respeito de ER β , Kang e colaboradores (2016) avaliou os níveis de expressão de genes codificadores de ER β , antígeno específico do câncer de próstata (PSA) e reguladores do ciclo celular p21, ciclina D1 e quinase dependente de ciclina (CDK) 4. A expressão de ER β foi quase completamente diminuída por estradiol, enquanto foi significativamente elevada por SMD (KANG *et. al.*, 2016).

Observamos também, no estudo de Mori e colaboradores (2001), realizado em modelo animal, que alguns medicamentos fitoterápicos orientais suprimiram a expressão induzida por estradiol de alguns protooncogenes, como *c-fos*, *c-jun*, conhecidos por estarem relacionados à proliferação e diferenciação celular, sugerindo que esses fitoterápicos seriam agentes de prevenção promissores para o câncer de endométrio (MORI *et.al.*, 2001).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos sugerem que na presença do agonista do receptor de estrogênio (ER), β -estradiol, a viabilidade celular é reduzida significativamente, assim como a expressão gênica dos receptores ER α e ER β . Ainda que sejam dados preliminares e que haja a necessidade de mais experimentos, os resultados obtidos neste trabalho são bastante promissores, uma vez que houve diminuição, tanto na viabilidade celular indireta como na expressão gênica dos receptores, principalmente do receptor do tipo alfa - o mais influente no câncer endometrial -, como foi demonstrado em diversos estudos realizados em animais que indicam que os efeitos benéficos dos estrogênios no tecido adiposo e os efeitos adversos na glândula mamária e no útero são mediados pelo receptor alfa de estrogênio (ER α) (SAUNIER *et. al.*, 2011).

Os dados também sugerem que o efeito dos extratos de *Ochroma pyramidale* nos receptores de estrogênio (ER α e ER β), deve-se a diminuição na expressão gênica desses receptores, e não por uma possível ação antagonista, como foi sugerido anteriormente.

Estes resultados são inéditos para extratos de *Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb., porém, o mecanismo envolvido nesse processo ainda é desconhecido e, por isso, é necessário que se faça outros ensaios para melhor explicação.

Sabendo que existe um efeito dos extratos de *O.pyramidale* sobre a expressão gênica, pode-se avaliar se esse efeito se estende para a tradução de proteínas, utilizando a técnica de *western blot*, por exemplo.

O extrato hexânico diminuiu a viabilidade celular na presença de β -estradiol, porém não foi capaz de diminuir a expressão gênica, o que explica ele não ter tido um efeito, supostamente antagonista, tão expressivo quanto os outros extratos. Por isso, outros ensaios de viabilidade celular devem ser realizados para corroborar com os achados deste trabalho e para explicar a diminuição na proliferação celular causada pelo extrato hexânico, explorando outras vias, por exemplo vias de apoptose.

Além disso, pode-se fazer o fracionamento dos extratos com o objetivo de investigar e chegar a uma molécula responsável pelo efeito observado. Porém vários estudos e ensaio devem ser realizados até chegar a essa etapa.

REFERÊNCIAS

ADORNO, S. S. *et. al.* Linfonodo sentinela no câncer de endométrio: revisão narrativa. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, vol. 11 (5), e302, 1/2019.

ALVES, D. A. *et. al.* Cuidador de criança com câncer: religiosidade e espiritualidade como mecanismos de enfrentamento. *Revista Cuidarte*, 7(2), 1318–1324, 2016

ALVINO, F. O.; RAYOL, B. P. Efeito de diferentes substratos na germinação de *Chroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. (Bombacaceae). *Ciência Florestal*, 17, (1): 71-75, 2007.

AMANT, F. *et. al.* Endometrial cancer. *The Lancet*, 366, (9484): 491-505, 2005. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67063-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67063-8).

AMERICAN CANCER SOCIETY. Treating Endometrial Cancer. *American Cancer Society, Inc.*, 2019. Cancer A-Z. Endometrial Cancer. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/endometrial-cancer/treating/by-stage.html>. Acesso em: dez., 2020.

ATHANAZIO, D. A.; JUNIOR, N. L. C. A. Terapia de reposição hormonal e o câncer do endométrio. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, 23(11):2613-2622, nov, 2007.

BAHAMONDES, L. Câncer do endométrio – o que considerar? *Rev. Assoc. Med. Bras*, vol. 50 n.1, São Paulo, 2004.

BCRJ. Banco de Células do Rio de Janeiro. *Data Sheet Ishikawa*. Disponível em: <http://bcry.org.br/celula/ishikawa-uterus-endmetrium-human-epitelial-adenocarcinoma>. Acesso em: jul., 2018.

BILOTTI, C. C. *et. al.* M-Health no controle do câncer de colo do útero: pré-requisitos para o desenvolvimento de um aplicativo para smartphones. *Revista Eletrônica de Comunicação, Informação e Inovação em Saúde*, v.11, n.2, 2017.

BJÖRNSTRÖM, L.; SJÖBERG, M. Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Molecular Endocrinology*, 19(4), 833–842, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1210/me.2004-0486>

- BOKHMAN, J. V. Two pathogenetic types of endometrial carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 15, (1): 10-17, 1983. DOI: [https://doi.org/10.1016/0090-8258\(83\)90111-7](https://doi.org/10.1016/0090-8258(83)90111-7).
- BOUZAS, I.; BRAGA, C.; LEO, L. Ciclo menstrual na adolescência. *Adolescencia e Saude*, 7(3), 59–63, 2010.
- BRAY, F. *et. al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68, (6): 394-424, 2018. DOI: 10.3322/caac.21492.
- BULUN, S. E. Physiology and Pathology of the Female Reproductive Axis. In: MELMED, S. *et. al.* **Williams Textbook of Endocrinology**. 12th. Elsevier Health Sciences, p. 581-660, 2011.
- CHEN, M. J. *et. al.* Radioterapia adjuvante no tratamento do câncer de endométrio: experiência com a associação de radio-terapia externa e braquiterapia de alta taxa de dose. *Radiologia Brasileira*, vol.38 n. 6 São Paulo Nov./Dec. 2005.
- CORNEL, K. *et. al.* Local estrogen metabolism (intracrinology) in endometrial cancer: A systematic review. *Molecular and cellular endocrinology*, 2018.
- COSTA-LOTUFO, L. V *et. al.* A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. *Revista Virtual de Química*, 2(1), 47–58, 2010.
- DALLENBACH-HELLWEG, G. **Histopathology of the Endometrium**. 3. ed. New York: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 1981. English Translation by F. D. Dallenbach.
- EISENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais (revisão de literatura). *Rev Bras Cancerol*, 47, (4): 377-388, 2001.
- FEBRASGO; SBC. Carcinoma endometrial: tratamento. *Rev Assoc Med Bras*, 2012; 58(3):281-286.
- FRANZOTTI, E. M. *Identificação de agonistas e antagonistas de receptores nucleares em extratos de plantas medicinais: Morus nigra L., Plectranthus ornatus Codd., Ipomoea cairica (L) Sweet e Pouteria torta (Mart.) Radlk.* Doutorado - Universidade de Brasília, 2006.

FRIEDENREICH, C. M. *et. al.* Case-control study of endogenous sex steroid hormones and risk of endometrial cancer. *Cancer Causes & Control*, 2019. DOI: 10.1007/s10552-019-01260-5.

GARGETT, C. E.; MASUDA, H. Adult stem cells in the endometrium. *Molecular Human Reproduction*, v.16, n.11, nov, 2010, p.818–834.

GERMAIN, P. *et. al.* Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacological Reviews*, 58(4), 685–704, 2006.

KANG, N. *et.al.* Soy milk digestion extract inhibits progression of prostate cancer cell growth via regulation of prostate cancer-specific antigen and cell cycle-regulatory genes in human LNCaP cancer cells. *Mol Med Rep*, 14(2), 1809–1816. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5408>, 2016.

KASOHA, M. *et. al.* Crosstalk of estrogen receptors and Wnt/ β -catenin signaling in endometrial cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 2019. DOI: 10.1007/s00432-019-03114-8.

KUIPER, G. G. *et. al.* Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology*, 139, (10): 4252-4263, 1998.

KUNDU, P. R. *et. al.* Expression of Cyclin D1 in normal and hyperplastic endometrium. *International Journal of Reproduction, Contraception, Obstetrics and Gynecology*, v.8, n.11, p. 4474, 2019. DOI 10.18203/2320-1770.ijrcog20194878.

LACERDA, M. G. *Efeito dos organoestênicos sobre a atividade transcricional de receptores nucleares, adipogênese e inflamação em células de mamíferos.* 2016. Doutorado – Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

LAGARDE, F. *et. al.* Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environmental Health*, 14(1), 13, 2015.

LAZAR, M. A. Mechanism of Action of Hormones That Act on Nuclear Receptors. In: MELMED, S. *et. al.* **Williams Textbook of Endocrinology**. 12th. Elsevier Health Sciences, p. 51-61, 2011.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25(4), 402–408, 2001.

MATTHEWS, J.; GUSTAFSSON, J.-Å. Estrogen signaling: a subtle balance between ER α and ER β . *Molecular Interventions*, 3(5), 281, 2003.

MEIRELES, C. G. *et. al.* Effects of metformin on endometrial cancer: Systematic review and meta-analysis. *Gynecologic Oncology*, 147(1), 167–180, 2017. Disponível em: <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.07.120>

MOLINA, P. E. **Fisiologia Endócrina**. 4. ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2014.

MORI, H., *et.al.* Cell proliferation in cancer prevention; effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and on an in vitro model in human colorectal cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 480–481, 201–207, 2001. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00200-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00200-7)

MOSSELMAN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS letters*, 392, (1): 49-53, 1996.

MURALI, R.; SOSLOW, R. A.; WEIGELT, B. Classification of endometrial carcinoma: more than two types. *The Lancet Oncology*, 15, (7): e268-e278, 2014.

NAYLOR, L. H. Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical pharmacology*, 58, (5): 749-757, 1999.

NETTO, D. A. M. Germinação de sementes de pau-de-balsa (*Ochroma pyramidale* (Cav.) Urb.) -Bombacaceae. *Revista Brasileira de Sementes*, Vol. 16, n°. 2: p.159-162, 1994.

NISHIDA, M. The Ishikawa cells from birth to the present. *Human cell*, 15: 104-117, 2002.

NOGUEIRA, A. A. Pólipos endometriais. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v.27, n.5, Rio de Janeiro, maio, 2005.

PERDOMO ANGULO, A. W. *Contenido de polifenoles totales y capacidad antioxidante en extractos acuosos e hidroalcoholico de hojas y cortezas de Ochroma pyramidale (Cav. Ex. Lam.) Urban topa*. 2009. Tesis (Ing.Recursos Naturales Renovables Mención: Forestales)

Universidad Nacional Agraria de la Selva, Tingo María (Perú). Facultad de Recursos Naturales Renovables, 2009.

RABELO, M. O. *et. al.* O mutirão de prevenção ao câncer: um relato de experiência no âmbito da extensão universitária. *Revista Intercâmbio*, v.7, p.406-413, 2016.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, v.1, n.4, p. 364-369, 2001.

SAMPAIO, M. I. G. *Avaliação da ação agonista e antagonista de extratos de folhas de Ochroma pyramidale (Cav. ex Lam.) Urb. em receptores nucleares.* 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2017. [Orientador: Prof. Dr. Luíz Alberto Simeoni].

SAMPAIO, H. A. de C. Aspectos nutricionais relacionados ao ciclo menstrual. *Revista de Nutrição*, 15(3), 309–317, 2002.

SAUNIER, E. F. *et al.* Estrogenic Plant Extracts Reverse Weight Gain and Fat Accumulation without Causing Mammary Gland or Uterine Proliferation. *PLoS ONE*, v. 6, n. 12, p. 1–9, 2011. DOI 10.1371/journal.pone.0028333. Disponível em: <http://search-ebsohost-com.ez54.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=73936005&lang=pt-br&site=ehost-live>. Acesso em: 24 nov. 2020.

SHENOUDA, N. S. *et.al.* Phytoestrogens in common herbs regulate prostate cancer cell growth in vitro. *Nutrition and Cancer*, 49(2), 200–208, 2004.

SLADEK, F. M. Nuclear receptors as drug targets: new developments in coregulators, orphan receptors and major therapeutic areas. *Expert opinion on therapeutic targets*, 7, (5): 679-684, 2003.

SOUZA, M. V. N. de *et. al.* Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. *Revista Fitos*, v. 3, n. 02, p. 25-42, 2013.

SPERLING, M. A. **Endocrinologia Pediátrica**. Tradução de Saunders Elsevier Inc. 4th. Elsevier Brasil, 2015.

SPEROFF, L. **Endocrinologia Ginecologia Clínica e Infertilidade**. Thieme Revinter Publicações LTDA, 2019.

TELECONDUTAS. *Sangramento uterino anormal*. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/telessauders/documentos/telecondutas/tc_sangramento_uterino.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2020.

VISSER, K.; MORTIMER, M.; LOUW, A. Cyclopia Extracts Act as ER α Antagonists and ER β Agonists, In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. 1, 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0079223. Disponível em: <http://search.ebscohost.com.ez54.periodicos.capes.gov.br/login.aspx?direct=true&db=aph&AN=92669468&lang=pt-br&site=ehost-live>. Acesso em: 25 nov. 2020.

YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from Brazilian plant extracts using high throughput screening. *Clinics*, 62(6), 763–768, 2007.

YOUNG, S. L. Oestrogen and progesterone action on endometrium: a translational approach to understanding endometrial receptivity. *Reproductive BioMedicine Online*, 27, (5): 497-505, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.06.010>.