

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

UNIFAL-MG

ANA PAULA DE LIMA SABINO

**INDUÇÃO DE MORTE EM CÉLULAS MCF-7 E MDA-MB-435 TRATADAS COM
FRAÇÃO ISOLADA DO EXTRATO DE FOLHAS DE BARBATIMÃO**

Alfenas/MG

2010

ANA PAULA DE LIMA SABINO

**INDUÇÃO DE MORTE EM CÉLULAS MCF-7 E MDA-MB-435 TRATADAS COM
FRAÇÃO ISOLADA DO EXTRATO DE FOLHAS DE BARBATIMÃO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção, identificação e avaliação de compostos bioativos.

Orientadora: Profa. Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa

Alfenas/MG

2010

ANA PAULA DE LIMA SABINO

**INDUÇÃO DE MORTE EM CÉLULAS MCF-7 E MDA-MB-435 TRATADAS COM
FRAÇÃO ISOLADA DO EXTRATO DE FOLHAS DE BARBATIMÃO**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção, identificação e avaliação de compostos bioativos.

Aprovada em:

Prof.^a. Dr.^a. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Prof. Dr. João Evangelista Fiorini
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano

Assinatura:

Prof. Dr. Jorge Kléber Chavasco
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:

Dedico à minha mãe e ao meu pai, por estarem sempre ao meu lado, por acreditarem em mim, pelo amor infinito e pela confiança que sempre me dedicaram.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção, por essa oportunidade e por conseguir concluí-la.

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

À CAPES pela bolsa concedida.

À Prof^ª. Dr^ª. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa pelos ensinamentos, dedicação, profissionalismo e paciência com que me orientou.

À minha família pelo amor, carinho, preocupação, apoio e incentivo.

Aos amigos e colegas do laboratório pela ajuda e apoio.

A todos os meus amigos que me cederam carinho, tempo, palavras e conselhos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo investigar o tipo de morte induzida nas linhagens de carcinoma mamário humano MCF-7 (ER+) e MDA-MB-435 (ER-), pela fração isolada do extrato de folhas de barbatimão. As folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Fabaceae) foram coletadas, secas e utilizadas para o preparo do extrato acetônico, que foi particionado com acetato de etila. A fração aquosa remanescente foi liofilizada e fracionada por cromatografia em Sephadex LH 20. As frações coletadas foram submetidas à cromatografia em camada delgada e a fração eluída com metanol a 100% foi utilizada nos experimentos, por apresentar o maior conteúdo de proantocianidinas. A análise por HPLC permitiu verificar que a fração isolada contém procianidina dimérica B1, epigalocatequina-3-*O*-galato e ácido gálico. As células de adenocarcinoma mamário MCF-7 (ER+) e MDA-MB-435 (ER-) foram tratadas por 24 h com diferentes concentrações da fração (5 – 160 µg/mL) e com ciclofosfamida a 550 µg/mL. O tratamento das células com a fração isolada induziu redução da viabilidade celular e alterações morfológicas nas duas linhagens, incluindo perda da morfologia celular típica, condensação da cromatina e diminuição da área das colônias e das células. A DE₅₀ para células MCF-7 foi de 12,35 µg/mL e para as células MDA-MB-435 foi de 34,43 µg/mL, sendo as células MCF-7 mais sensíveis ao tratamento. A análise por Western blotting mostrou que tratamento com a fração induziu aumento da expressão de Bax e diminuição de Bcl-2 nas células, indicando apoptose. Houve ainda aumento da expressão de caspase-9, caspase-3-ativa e caspase-8, além da diminuição da expressão da caspase-3 e pró-caspase-8. Estas proteínas estão envolvidas na via intrínseca de indução da apoptose. Foi observado também aumento de proteínas marcadoras da autofagia, LC-3 nas duas linhagens e beclin-1 nas células MDA-MB-435. Assim, os resultados do presente trabalho permitem concluir que a fração isolada do extrato de folhas de barbatimão induziu a morte por apoptose com autofagia nas células MCF-7 e MDA-MB-435. Estes resultados são importantes, pois foram demonstradas a citotoxicidade e indução de morte das células MDA-MB-435, que são ER-, além das células MCF-7 (ER+). Tendo em vista que não há tratamento curativo para tumor mamário ER-, bem como para ER+ em estágio avançado, a fração isolada parece ser candidata promissora para o desenvolvimento de fármaco para o tratamento e prevenção do câncer de mama.

Palavras-chave: Apoptose. Autofagia. Câncer de mama. Cultura de células. Extrato vegetal. *Stryphnodendron adstringens*.

ABSTRACT

The aim of the present work was to investigate the type of cell death induced in the MCF-7 (ER+) and MDA-MB-435 (ER-) human mammary carcinoma cell lineages by the fraction isolated from the barbatimão leaf extract. *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville (Fabaceae) leaves were collected, dried and the acetone extract was prepared. It was partitioned with ethyl acetate and the remaining aqueous solution was lyophilized and fractionated by Sephadex LH 20 chromatography. The collected fractions were analyzed by thin layer chromatography and the fraction eluted with 100 % methanol was used in the experiments, because it showed the highest proanthocyanidin content. The HPLC analysis showed that the isolated fraction is composed by procyanidin dimer B1, epigallocatechin-3-*O*-gallate and gallic acid. The MCF-7 (ER+) and MDA-MB-435 (ER-) cells were treated for 24 h with different concentrations of the fraction (5 – 160 µg/mL) and with 550 µg/mL cyclophosphamide. The cell treatment with the isolated fraction induced cell viability reduction and morphologic alterations in both cell lines, including cell typical shape loss, chromatin condensation and a decrease in the colony and cell area. The ED₅₀ dose for MCF-7 cells was 12.35 µg/mL and the ED₅₀ dose for MDA-MB-435 cells was 34.43 µg/mL, being the MCF-7 cells more sensitive to the fraction treatment. The Western blotting analysis showed that the fraction treatment induced an increase in the Bax and a decrease in the Bcl-2 cell expression that is indicative of apoptosis. There were also an increase in the caspase-9, caspase-3-active and caspase-8 expression and a decrease in the caspase-3 and pro-caspase-8 expression. These proteins are involved in induction of the intrinsic apoptosis pathway. It was also observed an increase in the expression of autophagy protein markers: LC-3 expression increased in both cell lines and beclin-1 expression increased only in the treated MDA-MB-435. The results of the present work allowed the conclusion that the isolated fraction from barbatimão leaf extract induced apoptotic death with autophagy in both cell lines, MCF-7 and MDA-MB-435. These results are important because it was demonstrated the cytotoxic effect and the ER- MDA-MB-435 cell death induction, besides the cytotoxicity to ER+ MCF-7 cells. As there is no a curative treatment for ER- mammary tumors as well as ER+ tumors in an advanced stage, the isolated fraction seems to be a promising candidate to a drug development for breast cancer treatment and prevention.

Key words: Apoptosis. Autophagy. Breast cancer. Cell culture. Plant extract. *Stryphnodendron adstringens*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF	- Fator de indução de apoptose (“Apoptosis inducing factor”).
ANOVA	- Análise de variância.
APAF-1	- Fator-1 ativador de protease apoptótica (“Apoptotic peptidase activating factor 1”).
ATP	- Trifosfato de adenosina.
BAD	- Proteína pró-apoptótica.
BAK	- Proteína pró-apoptótica.
BAX	- Proteína pró-apoptótica.
BCL-2	- Proteína anti-apoptótica.
BCL-XL	- Proteína anti-apoptótica.
BCRJ	- Banco de Células do Rio de Janeiro.
BECLIN-1	- Proteína marcadora da autofagia.
BH-3	- Proteína pró-apoptótica.
BID	- Proteína pró-apoptótica.
BRCA1	- Gene - câncer de mama tipo 1.
BRCA2	- Gene - câncer de mama tipo 2.
C	- Controle.
CASPASES	- Cisteína-aspartato proteases (“Cysteine- <u>aspartic</u> -acid-proteases”).
CDC-2	- Proteína quinase, responsável pelo controle do ciclo celular.
CP	- Ciclofosfamida.
DAB	- Diaminobenzidina.
DE ₅₀	- Dose efetiva para obtenção de 50% de redução significativa (p<0,05) do parâmetro analisado.
DNA	- Ácido desoxirribonucleico.
DNase	- Desoxirribonuclease.
DR3	- Receptor de morte 3 (“Death receptor-3”).
DR4	- Receptor de morte 4 (“Death receptor-4”).
DR5	- Receptor de morte 5 (“Death receptor-5”).
DR6	- Receptor de morte 6 (“Death receptor-6”).

dUTP	- 2-desoxiuridina 5'-trifosfato.
EC	- Epicatequina.
ECG	- Epicatequina galato.
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético.
EGC	- Epigallocatequina.
EGCG	- Epigallocatequina galato.
EGF	- Fator de crescimento epidermal ("Epidermal growth factor").
ER+	- Receptor de estrógeno positivo.
ER-	- Receptor de estrógeno negativo.
F80	- Fração de proantocianidinas isoladas da fração aquosa de folhas de barbatimão, com metanol a 80%.
F100	- Fração de proantocianidinas isoladas da fração aquosa de folhas de barbatimão, com metanol a 100%.
F-5	- Fração de barbatimão a 5 µg/mL.
F-10	- Fração de barbatimão a 10 µg/mL.
F-20	- Fração de barbatimão a 20 µg/mL.
F-40	- Fração de barbatimão a 40 µg/mL.
F-80	- Fração de barbatimão a 80 µg/mL.
F-160	- Fração de barbatimão a 160 µg/mL.
FAS	- Receptor de morte.
FAS L	- Ligante de Fas.
HER2	- Receptor do fator de crescimento epidérmico 2 ("Human epidermal growth factor receptor-type 2").
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência.
IAPs	- Inibidores de apoptose.
IC ₅₀	- Concentração para a inibição de 50% do parâmetro analisado.
IGFBP	- Fator de crescimento que se liga a proteína como insulina ("Insulin-like growth factor binding proteins").
INCA	- Instituto Nacional do Câncer.
LC-3	- Cadeia leve 3 da proteína associada à microtúbulos.
MAP-LC-3	- Cadeia leve 3 da proteína associada à microtúbulos ("Microtubule-associated protein 1 light chain 3").

- MCF-7 - Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano, receptor de estrógeno positivo (“Michigan Cancer Foundation”).
- MCF-10A - Linhagem celular epitelial mamário não-tumorigênica.
- MCP - Morte celular programada.
- MDA-MB-435 - Linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano, receptor de estrógeno negativo.
- MDA-MB-431 - Linhagem celular de carcinoma mamário humano.
- MDA-MB-436 - Linhagem celular de carcinoma mamário humano.
- MDA-MB-468 - Linhagem celular de carcinoma mamário humano.
- NF- κ B - Fator nuclear kappa ativador de células B (“Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells”).
- OMI/HTRA2 - Serina protease que cliva os inibidores de apoptose.
- p53 - Proteína codificada pelo gene supressor de tumor, *p53*.
- p21 - Proteína reguladora do ciclo celular.
- PARP-1 - Poli-ADP-ribose- polimerase 1.
- PBS - Tampão fosfato salina.
- PGR+ - Receptor de progesterona positivo.
- PGR- - Receptor de progesterona negativo.
- PI3K - 3-Fosfatidilinositol quinase.
- pRb - Proteína retinoblastoma.
- PTEN - Gene supressor de tumor (“Phosphatase and tensin homolog”).
- PVDF - Fluoreto de polivinilideno.
- SDS - Dodecil sulfato de sódio.
- SKBR-3 - Linhagem celular de carcinoma mamário humano.
- SMAC/DIABLO- Serina protease ativadora de caspase (“Second mitochondria-derived activator of caspase”).
- TCA - Ácido tricloroacético.
- TGF α - Fator de crescimento transformante α .
- TL1A - Ligante para DR3 e TR6/DcR3 semelhante ao fator de necrose tumoral (“TNF-like Ligand for DR3 and TR6/DcR3”).
- TNF- α - Fator de necrose tumoral α .

- TRAIL - Ligante indutor de apoptose relacionado ao fator de necrose tumoral (“TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand”).
- TSC2 - Gene supressor de tumor (“Tuberous sclerosis protein 2”).
- TX-4 - Oncogene
- VPS34 - Fosfatidilinositol-3-quinase classe III (“Vacular Protein Sorting”).
- WNT7B - Oncogene.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	Incidência e fatores de risco do câncer de mama	8
1.2	Linhagens celulares: MCF-7 e MDA-MB-435	11
1.3	Morte celular e tumorigênese	12
1.4	Barbatimão: caracterização e propriedades medicinais	17
1.5	Procianidinas, catequinas e células tumorais	18
2	OBJETIVO	23
3	MATERIAL E MÉTODO	24
3.1	Obtenção, extração e fracionamento do material vegetal	24
3.2	Cromatografia em camada delgada	24
3.3	Composição da fração	25
3.4	Culturas celulares de tumor mamário humano	25
3.5	Tratamentos das células	26
3.6	Ensaio de citotoxicidade	26
3.6.1	Análise da viabilidade celular	26
3.6.2	Análise morfológica	27
3.7	Extração e dosagem de proteínas	27
3.8	Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS	27
3.9	Western blotting	28
3.10	Análise estatística	29
4	RESULTADOS	30
4.1	Cromatografia em camada delgada e composição da fração	30
4.2	Viabilidade celular	30
4.3	Análise morfológica das células	32
4.4	Western blotting	36
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	46
	REFERÊNCIAS	47
	ARTIGO	56

1 INTRODUÇÃO

1.1 Incidência e fatores de risco do câncer de mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, sendo que a cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. É relativamente raro antes dos 35 anos de idade, mas acima desta faixa etária sua incidência cresce rápida e progressivamente. As estatísticas indicam o aumento de sua frequência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde, nas décadas de 60 e 70 registraram-se aumento de 10 vezes nas taxas de incidência ajustadas por idade nos diversos continentes (INCA, 2009). No Brasil, o câncer de mama é o prevalente entre as mulheres. O Ministério da Saúde, por meio do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima que o número de casos novos de câncer de mama em 2010 seja de 49.240, com risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. Na Região Sudeste, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres, com risco estimado de 65 casos novos por 100 mil habitantes. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sul (64/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (30/100.000). No Estado de Minas Gerais o câncer de mama também é o mais frequente entre as mulheres, sendo a estimativa para 2010 de 4.250 novos casos e o número de novos casos na capital deve ser de 950 aproximadamente (INCA, 2009).

O câncer de mama apresenta fenótipos variados e alguns estudos apontam para dois tipos principais de câncer de mama: o primeiro tipo, mais frequente na pré-menopausa, é caracterizado por ser metastático agressivo e não expressar o receptor de estrógeno α (ER-); o segundo, com maior frequência na pós-menopausa, está associado com características indolentes, principalmente, por expressar o receptor de estrógeno α (ER+). A expressão do receptor de estrógeno determina as variações morfológicas tumorais, como por exemplo, os carcinomas medulares são ER-, enquanto os carcinomas tubulares e lobulares são ER+ (INCA, 2009). Cerca de 70% dos tumores de mama são ER+. A porcentagem de tumores ER+ aumenta linearmente com a idade, mas mesmo na pré-menopausa a proporção de tumores ER+ é alta, sendo estimada

em 62% para idades ≤ 35 e 72% para 49 anos. Além do receptor de estrógeno, a expressão do receptor de progesterona (PGR+) é importante para o prognóstico da doença. Estima-se que, aproximadamente 75% dos tipos ER+/PGR+; 33% do tipo ER+/PGR- e 45% de ER-/PGR+ respondam à terapia hormonal (CLARKE et al., 2009).

Outros fatores genéticos estão associados ao maior risco de desenvolvimento de câncer de mama. Mulheres que apresentam mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade. Os carcinomas medulares estão associados às mutações no gene *BRCA1* (cromossomo 17) e são mais frequentes em populações de baixo risco, como as japonesas. Por outro lado, os carcinomas tubulares e lobulares têm associação com as mutações do gene *BRCA2* (cromossomo 13) e são mais comuns em populações de alto risco, como nos Estados Unidos (JO et al., 2005; INCA, 2009). Outras mutações genéticas, como as que ocorrem no gene *p53* parecem ser desencadeadoras da doença, surgindo com maior frequência em alguns grupos étnicos (VALLE, 1999). O gene *HER2* é um receptor do fator de crescimento epidérmico 2 com propriedades oncogénicas e mutações com ganho de função aparecendo em 20 a 30% dos casos de câncer de mama (DOWSET et al., 2000). A ativação da via 3-fosfatidilinositol quinase (PI3K)/Akt está envolvida na progressão e invasão tumoral e ainda reduz a eficácia da terapia. O aumento da expressão de HER2 coopera na promoção da invasão e sobrevivência tumoral dependente de PI3K (FOLGIERO et al., 2008). Fatores prognósticos tais como: expressão dos receptores de estrógeno e progesterona e de HER2 são utilizados para a classificação de risco e como fatores preditivos para a resposta ao tratamento (YAMASHIRO; TOI, 2008).

Além das características genéticas está bem estabelecido que fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher, tais como: menarca precoce, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal estão envolvidas no desenvolvimento do câncer de mama. Além desses, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos, e posteriormente, ocorre de forma mais lenta, o que tem sido atribuído à menopausa. Além disso, alguns estudos recentes mostram que a exposição à radiação ionizante, mesmo em baixas doses, aumenta o risco de desenvolver câncer de mama, particularmente durante a puberdade. Ao contrário do câncer do colo do útero, o câncer de mama encontra-se relacionado

ao processo de urbanização da sociedade, evidenciando maior risco de adoecimento entre mulheres com elevado status socioeconômico (INCA, 2009).

A prevenção primária dessa neoplasia ainda não é totalmente possível, devido à variação dos fatores de risco e às características genéticas, que estão envolvidas na sua etiologia. A amamentação, prática de atividade física e alimentação saudável com a manutenção do peso corporal estão associadas a um menor risco de desenvolver esse tipo de câncer. Novas estratégias de rastreamento factíveis para países com dificuldades orçamentárias têm sido estudadas, uma vez que até o momento é recomendado a mamografia para mulheres com idade entre 50 e 69 anos, como método efetivo para detecção precoce (INCA, 2009).

No Brasil, o Ministério da Saúde recomenda como principais estratégias de rastreamento populacional um exame mamográfico, pelo menos a cada 2 anos, para mulheres de 50 a 69 anos, e o exame clínico anual das mamas, para mulheres de 40 a 49 anos. O exame clínico da mama deve ser realizado em todas as mulheres que procuram o serviço de saúde, independente da faixa etária, como parte do atendimento à saúde da mulher. Para mulheres de grupos populacionais considerados de risco elevado para câncer de mama (com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau) recomenda-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente, a partir de 35 anos. A Política Nacional de Atenção Oncológica, incorporada pela Portaria nº 2.048, de 3 de setembro de 2009, define, para o país, abrangente controle do câncer e considera vários componentes, desde as ações voltadas à prevenção até a assistência de alta complexidade, integradas em redes de atenção oncológica, com o objetivo de reduzir a incidência e a mortalidade por câncer (INCA, 2009).

Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas, devido ao diagnóstico tardio e falta de tratamento clínico adequado (INCA, 2009). Dados obtidos por meta-análise de pacientes com câncer de mama ER+ mostram aumento de sobrevida significativa utilizando-se terapia adjuvante endócrina. Não há tratamento curativo para o câncer de mama independente de estrógeno e para os tumores ER+ em estágio avançado ou em casos de metástases. Mesmo no caso de tumores dependentes de estrógeno, a utilização de terapia antiestrogênica é limitada pela aquisição de resistência pelas células tumorais. A mortalidade de portadores de câncer de mama advém de metástases do tumor primário que colonizam órgãos distantes e não há tratamento curativo para este tipo de patologia. Embora a progressão tumoral e formação de metástases venham sendo

estudadas há décadas, continuam pouco conhecidas, devido à complexidade do processo e à dificuldade de estabelecimento de modelos laboratoriais (CLARKE et al., 2009).

O tratamento do câncer de mama utiliza regime de quimioterapia múltipla, que em geral inclui a ciclofosfamida (CP), tanto no tratamento adjuvante como neo-adjuvante e ainda para tumores avançados e recorrentes e terapia antiestrogênica, baseada principalmente no uso de tamoxifen, que não é apropriado para tumores ER-. Anteriormente, o tratamento utilizava apenas um quimioterápico, entretanto, este protocolo apresentava muitos efeitos colaterais (SAEKI et al., 2006; PESSOA et al., 2007; PEINTINGER et al., 2008; YAMASHIRO; TOI, 2008).

A CP é um agente alquilante do DNA e de proteínas, induzindo apoptose. É um pró-fármaco, que é ativado no fígado, após metabolização pelo citocromo P450 (CYP 2B6). A ligação cruzada de fitas do DNA é o mecanismo primário de ação da CP, bem como de seu metabólito 4-hidroperóxi-CP. Este metabólito é convertido a fosforamida mostarda e acroleína, metabólitos muito ativos, que induzem a morte celular (MURATA et al., 2004).

Apesar das vantagens do regime de quimioterapia múltipla, a toxicidade (hematopoiética, renal e cardíaca) limita seu uso. Além disso, alguns tumores apresentam quimiorresistência, o que representa um desafio clínico. Assim, a prospecção de novos compostos com atividade antitumoral é importante para o aumento da eficiência terapêutica no tratamento de câncer de mama.

1.2 Linhagens celulares: MCF-7 e MDA-MB-435

As culturas celulares oferecem um sistema simplificado para avaliação de atividade, bem como determinação do mecanismo de ação de compostos diversos, uma vez que mantêm as propriedades dos órgãos de origem, mas não sofrem influências do organismo como um todo. Assim, para os estudos da biologia de carcinoma mamário humano bem como para a avaliação da atividade antitumoral de diversos compostos, têm sido utilizadas diversas linhagens celulares de adenocarcinoma mamário humano, tais como MCF-7 e MDA-MB-435 (DIMRI; BAND; BAND, 2005).

As células MCF-7 expressam o receptor de estrógeno α (ER+) e a análise citogenética revelou aneuploidia ($2n= 66-87$), a presença de um grande cromossomo submetacêntrico e três grandes subtelocêntricos em 80% das metáfases, além de nulissomia do cromossomo 20. Estas células mantêm várias características do epitélio mamário diferenciado, incluindo a capacidade de processar o estradiol por meio de receptores de estrógeno citoplasmáticos. Contêm o oncogene Tx-4, o crescimento é inibido por TNF α e a secreção de IGFBP pode ser modulada pelo tratamento com anti-estrogênios (LEVENSON; JORDAN, 1997).

As células MDA-MB-435 são independentes de estrógeno, pois não expressam o receptor de estrógeno α (ER-), expressam os receptores para EGF e TGF α e o oncogene WNT7B. A análise citogenética dessas células revelou aneuploidia, com duplicação cromossômica ($2n= 52-68$), ausência dos cromossomos 8 e 15, rearranjos cromossômicos e trissomia de autossomos.

Devido às suas características genéticas, as linhagens celulares de carcinoma mamário humano, MCF-7 e MDA-MB-435, apresentam potencial proliferativo diferente, bem como diferentes respostas a agentes quimioterápicos e antitumorais potenciais obtidos de plantas e de outras fontes, representando os dois fenótipos comumente encontrados em mulheres com carcinoma mamário.

1.3 Morte celular e tumorigênese

A morte celular programada (MCP) é um fenômeno biológico importante para o funcionamento normal de organismos multicelulares. Durante o desenvolvimento animal a MCP é importante para a formação de estruturas, controle do número de células e eliminação de células anormais e ectópicas. Nos tecidos maduros, participa da homeostase tecidual, que depende do balanço entre a proliferação e morte celular (KERR et al., 1994; LORENZO; SUSIN, 2007). Contudo, o desequilíbrio entre vida e morte celular tem importantes consequências patológicas. A morte celular deficiente está, frequentemente, envolvida no desenvolvimento de câncer e resistência tumoral à radio e quimioterapia (MASHIMA; TSURUO, 2005). Em excesso, a MCP está envolvida na perda aguda de células, como no caso de lesão por isquemia/reperfusão, choque

séptico, bem como em doenças crônicas, incluindo as neurodegenerativas e as neuromusculares (MATTSON, 2000).

Muitos trabalhos têm demonstrado a associação entre proliferação celular, câncer e morte celular. Trabalhos indicam que o controle do ciclo celular, particularmente da transição G1/S e G2/M, representam os pontos principais para garantir a divisão celular acurada (POZO-GUISADO et al., 2002). Os processos carcinogênicos frequentemente afetam a progressão do ciclo celular por indução de alterações na expressão ou atividade de reguladores do ciclo celular, tais como p53, p21, pRb, ciclinas, quinases dependentes de ciclinas além de outras proteínas envolvidas na sinalização celular da indução ou inibição da morte celular (GARTEL; RADHAKRISHNAN, 2005). Os tumores são formados por células com diferentes fenótipos e potencial metastático. Assim, os diferentes tumores respondem diferentemente às moléculas antiproliferativas, que podem exercer seus efeitos por indução de alterações na expressão e/ou atividade de reguladores específicos do ciclo celular (POZO-GUISADO et al., 2002).

Inicialmente, duas principais formas de morte celular foram propostas: apoptose e necrose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972); hoje se sabe que a MCP é um processo dinâmico, no qual a célula pode utilizar mecanismos diversos e pode ser classificada por critérios morfológicos, enzimáticos, aspectos funcionais ou características imunológicas (KROEMER et al., 2009).

A MCP por apoptose tem recebido atenção considerável, pois este é o mecanismo de ação de muitos quimioterápicos, demonstrado por estudos com linhagens celulares tumorais (CHEN et al., 2005). A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas que incluem: a condensação citoplasmática e da cromatina, a fragmentação do DNA, alterações na membrana plasmática e formação de corpos apoptóticos, que são fagocitados por macrófagos ou neutrófilos e o envolvimento de caspases (KROEMER et al., 2009).

Nas células de mamíferos há duas vias apoptóticas, a via dependente da mitocôndria (intrínseca) e a via independente da mitocôndria (extrínseca). A via intrínseca ou mitocondrial é regulada por proteínas pró e anti-apoptóticas, membros da família Bcl-2. Esta via envolve a transição de permeabilidade mitocondrial, colapso do potencial de membrana, liberação de citocromo c, exposição de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática e perda eventual da integridade desta. O citocromo c desencadeia a formação do apoptossomo, que é uma molécula multimérica composta pelo fator-1 ativador de protease apoptótica (APAF-1), ATP e citocromo c. O apoptossomo recruta e processa a caspase-9, formando um complexo

holoenzimático, que ativa outras moléculas de caspase-9, bem como a caspase-3, central na apoptose e a caspase-7, que clivam as pró-caspases 2, 6, 8 e 10, levando à degradação celular. Outro mecanismo, pelo qual o citocromo *c* pode ser liberado, envolve as proteínas da família Bcl-2, incluindo Bax, Bak e Bid, que promovem a apoptose e Bcl-2 e Bcl-x_L que impedem a liberação de citocromo *c*, sendo anti-apoptóticas. As proteínas Bcl-2, Bcl-x_L e Bak localizam-se predominantemente na membrana mitocondrial, regulando sua integridade e a liberação do citocromo *c*. As proteínas pró-apoptóticas Bax, Bid e Bad residem no citoplasma de células saudáveis. A translocação dessas proteínas (especialmente da Bax) para a mitocôndria é estimulada por fatores apoptóticos. Após a translocação, a Bax induz a liberação de citocromo *c* pela abertura de poro ou abertura de canal voltagem-dependente (LOGUE; MARTIN, 2008).

Na via independente da mitocôndria, extrínseca ou por ligação ao receptor de morte, a ativação do Fas (receptor de morte), por um ligante de Fas, ativa a caspase-8, com subsequente ativação do efetor, a caspase-3. A caspase-8 pode induzir a translocação de Bid para a membrana mitocondrial, ativando a via intrínseca. Estes processos resultam na clivagem de proteínas, condensação de cromatina, quebra de moléculas de DNA com padrão internucleossomal (DNA escada) e eventualmente na morte celular por apoptose (DANIAL; KORSMEYER, 2004; BRÖKER; KRUYT; GIACCONE, 2005; KROEMER; GALLUZZI; BRENNER, 2007). Vários receptores de morte participam da via extrínseca, tais como: Fas, TNFR-1, DR3, DR4, DR5 e DR6. Cada receptor é ativado por vias independentes, por ligação do ligante. Os ligantes incluem TNF- α , FasL, TL1A e “TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand” (TRAIL). Após a ligação o receptor sofre trimerização e recruta moléculas adaptadoras intracelulares, bem como a caspase-8 como transdutores do sinal apoptótico (HUANG; SHEIKH, 2007).

Outra proteína proveniente da mitocôndria, que contribui para a morte celular dependente e independente de caspase é a endonuclease G. Esta proteína parece cooperar com a exonuclease ativada por caspase e com a DNase I, para gerar fragmentos de DNA com padrão internucleossômico (DNA escada). A AIF (“apoptosis inducing factor”) é outra proteína liberada da mitocôndria que exerce papel fundamental na apoptose. Os efeitos letais da AIF são controlados pela proteína anti-apoptótica HSP 70, que interage com AIF. É interessante ressaltar que a proteína lisossômica catepsina D pode induzir a liberação de AIF independentemente da cascata de caspases (BIDERE et al., 2003).

As alterações celulares que ocorrem na via apoptótica podem ser classificadas em: precoces (4-18 h), médias (18-36 h) e tardias (≥ 36 h). As alterações precoces incluem as alterações dos membros da família Bcl-2. A permeabilização mitocondrial e exposição da fosfatidilserina são interpretadas como estágio médio e a liberação do citocromo c, alterações de coloração por iodeto de propídeo, aumento de marcação por dUTP transferase e clivagem da PARP-1 estão associados com a apoptose tardia ou necrose (CLARKE et al., 2009).

A distinção entre as formas de MCP pode ser útil para a compreensão da regulação destes eventos, contudo, crescente número de trabalhos evidencia que os diferentes tipos de MCP estão interrelacionados. A interrelação entre MCP dependente e independente de caspases também se aplica às organelas, como a mitocôndria, cuja permeabilização da membrana externa libera fatores apoptogênicos tais como citocromo c, Smac/Diablo, Omi/HtrA2, endonuclease G (Endo G) ou AIF. Uma vez no citossol estas proteínas podem iniciar a morte celular (LORENZO; SUSIN, 2007).

A MCP com autofagia tem sido associada à tumorigênese e tem recebido particular atenção dos oncologistas, pois muitos tratamentos anticâncer induzem autofagia (DE BRUIN; MEDEMA, 2008). É caracterizada pelo sequestro de material citoplasmático formando autofagossomos, que apresentam membrana dupla e se fundem à vesículas provenientes do complexo de Golgi, formando o endossomo primário. A ativação de H^+ -ATPase da membrana da organela permite a acidificação do meio interno do endossomo, com ativação enzimática, que promoverá a hidrólise e consequente degradação do conteúdo sequestrado, o que marca o término do processo autofágico. Ocorrem ainda inchaço mitocondrial, do retículo endoplasmático e Golgi. Condensação da cromatina e convolução da membrana plasmática também podem ocorrer, contudo, não há fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (LEVINE; KLIONSKY, 2004; LEVINE; KROEMER, 2008). Em situações de estresse serve para gerar nutrientes necessários. Quando muito ativada, no entanto, a destruição ordenada de organelas pode levar à morte celular e pode ser utilizada como alternativa à apoptose para remoção de células não necessárias, danificadas ou transformadas. Assim, a progressão tumoral tem sido relacionada à diminuição da autofagia e genes mediadores da execução deste processo celular têm se mostrado supressores de tumores. Contudo, a relação entre autofagia e desenvolvimento tumoral é complexa e este mecanismo pode também ser utilizado pela célula tumoral para

sobrevivência em situações de privação de nutrientes, na isquemia e na presença de sinais apoptóticos (DE BRUIN; MEDEMA, 2008).

As vias de sinalização que regulam a autofagia se sobrepõem as vias de controle de crescimento, proliferação, sobrevivência e de outros tipos de MCP. Vários supressores de tumor (PTEN, TSC2 e p53) envolvidos na rede de sinalização mTOR, estimulam a autofagia. Ao contrário, as oncoproteínas envolvidas nesta rede inibem a autofagia (ZENG; OVERMEYER; MALTESE, 2006). Esses achados, em conjunto com as observações que a deficiência da proteína beclin-1, supressora de tumor, promove a tumorigênese em vários tecidos e órgãos, dão credibilidade à idéia que a autofagia seja um mecanismo supressor de tumor (LEVINE; KROEMER, 2008).

A formação do autofagossomo é mediada por um grupo de proteínas conservadas evolutivamente, Atg (proteínas relacionadas a autofagia). Dois sistemas de conjugação de proteína são envolvidos na via autofágica. O primeiro sistema de conjugação produz o complexo Atg12-Atg5 que é associado não-covalentemente à beclin-1. O segundo sistema envolve a conjugação de MAP-LC-3 (cadeia leve 3 da proteína associada à microtúbulos) com fosfatidiletanolamina. A LC-3 é processada por uma cisteína-protease produzindo a forma citossólica LC-3 I, que é conjugada à fosfatidiletanolamina, gerando a forma LC-3-II associada às membranas interna e externa do autofagossomo (FADER; COLOMBO, 2009).

A beclin-1 é uma proteína de 60 kDa, uma PI-3 quinase, importante reguladora da autofagia. O gene foi mapeado no cromossomo 17q21 e apresenta deleção monoalélica em vários cânceres de mama, ovário e próstata (AITA et al., 1999; ZENG; OVERMEYER; MALTESE, 2006). Em 56% dos casos de tumor mamário humano ocorre perda significativa da expressão de beclin-1 e a expressão desta proteína em células MCF-7 aumenta o número de células positivas para autofagia, em resposta a privação de nutrientes, inibe a proliferação, a formação de colônias e a tumorigênese (LIANG et al., 1999; FURUYA et al., 2005). Won et al. (2010) observaram que a expressão de beclin-1 é inversamente correlacionada à expressão de Bcl-2 em tecidos de tumor mamário humano. Bcl-2 interage com a beclin-1, regulando a autofagia (LUO; RUBINSZTEIN, 2009). Outros estudos evidenciaram que a supressão da expressão da beclin-1 impede a autofagia e sensibiliza as células à apoptose induzida por privação de nutrientes para sobrevivência celular em condições adversas (BOYA et al., 2005). Assim, a beclin-1 é essencial para a indução da autofagia participando dos estágios iniciais da formação do autofagossomo.

Apesar de a autofagia ser distinta da apoptose, estas compartilham alterações morfológicas e vias de ativação comuns. A indução de autofagia por quimioterápicos também contribui para a erradicação da célula tumoral, o que oferece novas oportunidades para o tratamento do câncer envolvendo a manipulação desta via de MCP (DE BRUIN; MEDEMA, 2008).

1.4 Barbatimão: caracterização e propriedades medicinais

Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Fabaceae), conhecida popularmente como barbatimão, barbatimão-verdadeiro, barba-de-timão, chorãozinho-roxo e casca-da-virgindade é uma árvore comum no cerrado, com ampla distribuição geográfica, ocorrendo em vários estados, desde o Pará até norte do Paraná, incluindo Minas Gerais. Apresenta altas densidades em várias localidades do Brasil central e é encontrada mais frequentemente em fitofisionomias do cerrado típico, campo-sujo e cerradão (FELFILI; SILVA JÚNIOR, 1993; FELFILI et al., 1993, 1994; BORGES FILHO; FELFILI, 2003).

A planta apresenta folhas compostas bipinadas, com seis a oito pares de folíolos por pina. As inflorescências apresentam número variável de flores pequenas de cor marrom, hermafroditas, com longevidade de apenas um dia, produzindo pequenas quantidades de néctar, o que atrai pequenos insetos. É descrita como uma espécie semi-caducifólia, com pico de floração, produção de folhas novas e queda de folhas entre julho e outubro. O fruto é um legume séssil, grosso e carnoso, linear-oblongo com cerca de 10 cm de comprimento (CORRÊA, 1984; FELFILI et al., 1999). O caule atinge de 20 a 30 cm de diâmetro e de 4 a 5 m de altura (FELFILI; SILVA JÚNIOR, 1993).

O extrato bruto obtido por decocção ou infusão da casca e das folhas de barbatimão, é utilizado na medicina popular para o tratamento de leucorreia, diarreia, como antisséptico, para cicatrização de feridas e em inflamações e trabalhos científicos demonstram inúmeras atividades biológicas do extrato de várias partes da planta (SANTOS; TORRES; LEONART, 1987; PANIZZA et al., 1988; MACEDO; FERREIRA, 2004). O extrato bruto da casca do barbatimão inibiu o crescimento de *Herpetomonas samuelpeessoai* (HOLETZ et al., 2005), *Candida albicans* (ISHIDA et al., 2006), a replicação de poliovírus e herpesvírus bovino e a síntese de antígenos

virais (FELIPE et al., 2006). *S. adstringens* apresenta ainda diversas outras atividades demonstradas tais como: anti-inflamatória, analgésica e protetora da mucosa gástrica (LIMA et al., 1998; AUDI et al., 1999; MARTINS et al., 2002).

A avaliação da toxicidade mostrou que a administração do extrato metanólico da casca de barbatimão para camundongos, por 7 dias, não apresentou toxicidade. Contudo, a administração prolongada (30 dias) para ratos foi tóxica, induzindo diminuição da massa corporal, aumento de glicose e aspartato aminotransferase séricas, além de involução do timo (REBECCA et al., 2002).

As propriedades medicinais ou atividades farmacológicas do barbatimão podem ser atribuídas a sua composição química. A planta contém compostos fenólicos, sendo que a casca possui pelo menos 20% de taninos (MELLO; DE PETEREIT; NAHRSTEDT, 1996a), flavonóis, ácidos fenólicos, ésteres de ácido gálico e outros compostos fenólicos complexados a glicosídeos e ao ácido gálico (SANTOS et al., 2002). Contém ainda diversas proantocianidinas, tais como prodelfinidinas 3-flavonóis, prorobinetidinas e proantocianidinas diméricas (MELLO; DE PETEREIT; NAHRSTEDT, et al., 1996a; 1966b; 1999), que apresentam inúmeras atividades biológicas (COS et al., 2004; DIXON; XIE; SHARMA, 2005).

Tem sido demonstrado que fatores ambientais podem afetar os teores de taninos na casca de barbatimão. Santos et al. (2006) determinaram maior produção de taninos na estação quente e chuvosa, quando preferencialmente, deve ocorrer a coleta de partes do vegetal para uso medicinal.

1.5 Procianidinas, catequinas e células tumorais

Os taninos são compostos fenólicos encontrados em todas as partes dos vegetais, contribuem para o sabor adstringente de alimentos e bebidas e desempenham importante papel na proteção de plantas contra herbívoros e patógenos (DIXON; XIE; SHARMA, 2005). Esses compostos (FIGURA 1) são solúveis em água, podem precipitar alcalóides e proteínas e segundo a estrutura química são classificados em três grupos: hidrolisáveis, complexos ou parcialmente hidrolisáveis e condensados ou não-hidrolisáveis (COS et al., 2004; KOLECKAR et al., 2008).

Os taninos hidrolisáveis consistem de ésteres de glicose ou outro poliol com ácido gálico (galotaninos) ou ácido elágico (elagitaninos), sendo os últimos mais frequentes. Os taninos complexos apresentam uma unidade 3-flavanol que se liga (ligação glicosídica) a um galotanino ou elagitanino. Os taninos condensados são oligômeros e polímeros compostos por unidades fenólicas 3-flavanol e como não se apresentam glicosilados, não são prontamente hidrolisáveis. Contudo, o aquecimento dos taninos condensados em meio alcoólico-ácido produz pigmentos vermelhos (antocianinas) e por isso são denominados proantocianidinas (COS et al., 2004; DIXON; XIE; SHARMA, 2005; KOLECKAR et al., 2008).

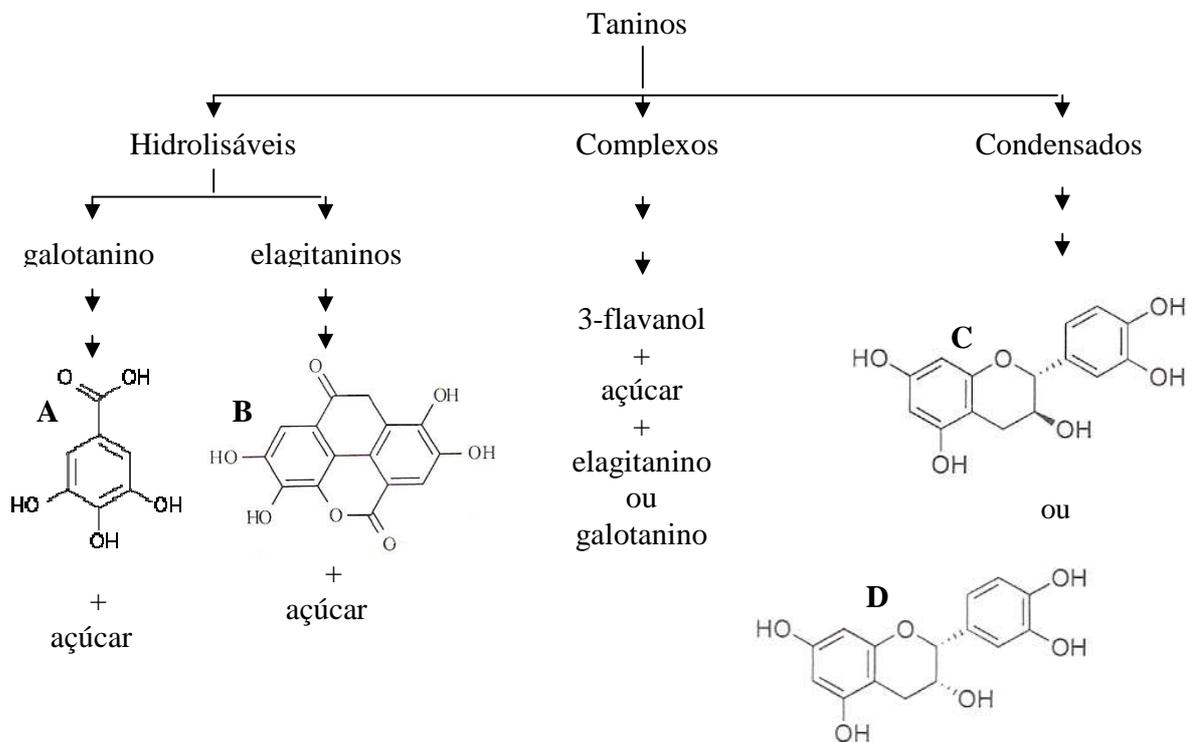


Figura 1- Classificação dos taninos. **A**, ácido gálico; **B**, ácido elágico; **C**, (+)-catequina; **D**, (-)-epicatequina. Fonte: adaptado de Cos et al. (2004).

As proantocianidinas originam-se por ligação, principalmente, tipo β entre o C4 do anel C de uma unidade nucleofílica flavanil e o C8 (C4 \rightarrow C8) ou C6 (C4 \rightarrow C6) do anel A de outra unidade flavanil, formando compostos oligoméricos ou poliméricos compostos de subunidades 3-flavanol, principalmente, (+)-catequinas e (-)-epicatequinas (FIGURA 2). Representam um grupo

com grande diversidade estrutural devido à variação no padrão de hidroxilação, estereoquímica dos três centros quirais, localização e tipo de ligação entre os monômeros, além da possibilidade de glicosilação e esterificação com o ácido gálico. São classificados de acordo com o padrão de hidroxilação em vários subgrupos incluindo as prodelfinidinas, propelargonidinas, profisetidinas, prorobinetidinas, proguibourtinidinas, proteracacinidinas, promelacacinidinas e procianidinas sendo estas as mais abundantes na natureza (FERREIRA; SLADE, 2002; NANDAKUMAR; SINGH; KATIYAR, 2008).

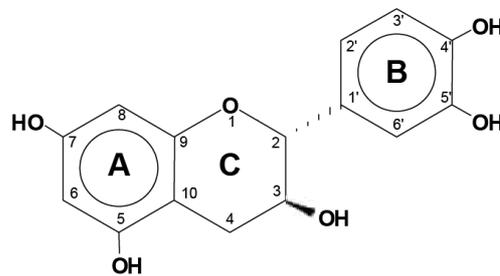


Figura 2- Fórmula estrutural da catequina. Fonte: adaptado de Dixon, Xie e Sharma (2005).

As procianidinas (FIGURA 3) do tipo B (diméricas) e C (triméricas) apresentam ligação simples entre os monômeros, enquanto as procianidinas A (diméricas) possuem ligação éter adicional entre o C2 de uma unidade e a hidroxila do C7 e/ou C5 de outra unidade (COS et al., 2004; KOLECKAR et al., 2008). São encontradas principalmente no vinho tinto, maçã, chá, uva, cacau, chocolate, feijões, grãos e várias frutas vermelhas (AUGER et al., 2004; COS et al., 2004; NANDAKUMAR; SINGH; KATIYAR, 2008).

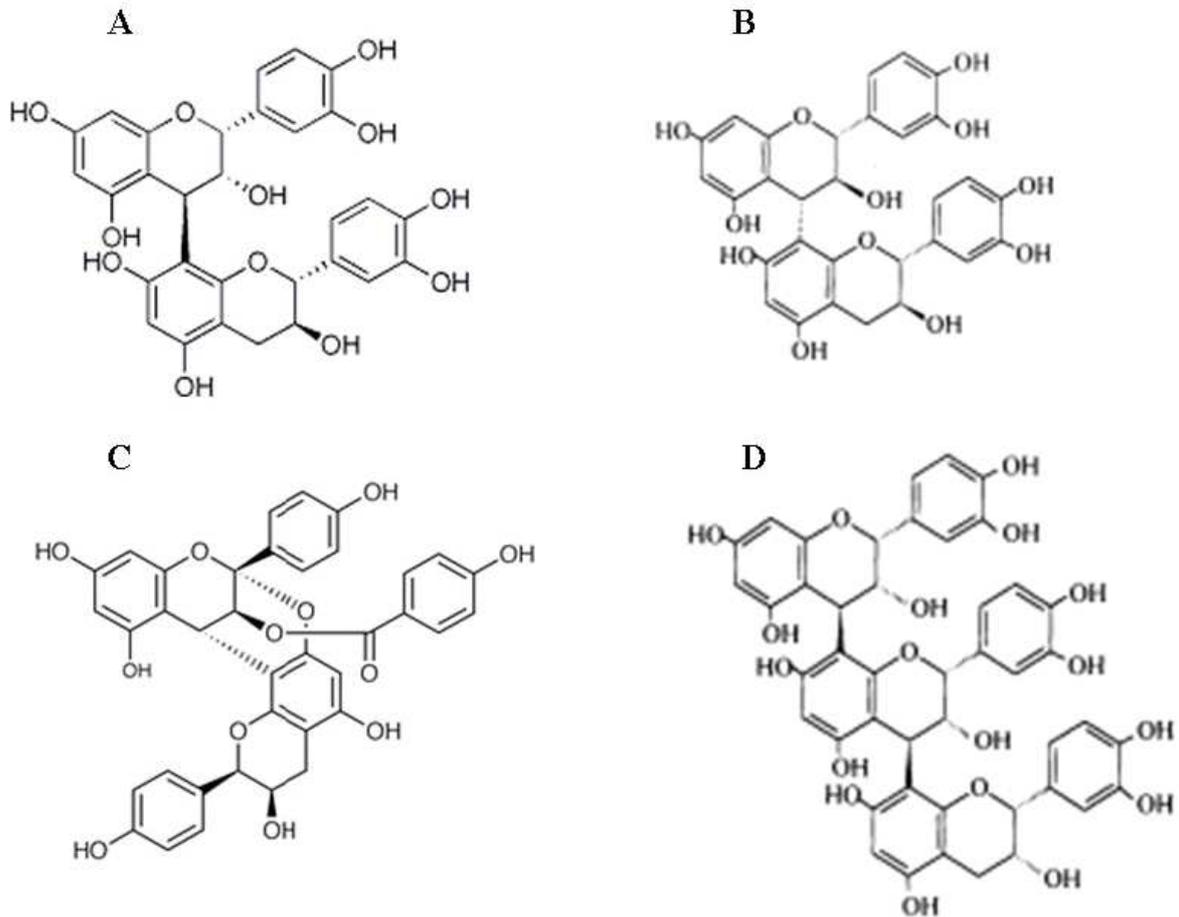


Figura 3- Fórmulas estruturais das procianidinas. **A**, procianidina B₁ (epicatequina-4 β →8-catequina); **B**, procianidina B₃ (catequina-4 α →8-catequina); **C**, procianidina A₂ (epicatequina-4 β →8, 2 β →7-epicatequina); **D** procianidina C₁ (epicatequina-4 β →8-epicatequina-4 β →8-epicatequina). Fonte: modificado de Cos et al. (2004).

As procianidinas oligoméricas, obtidas do fracionamento do extrato de semente de uva, apresentaram eficiente ação antioxidante. As frações que exibiram maior atividade antioxidante foram as que mais inibiram a proliferação de células MCF-7. Sugerindo que a atividade antioxidante pode ser, em parte, responsável por este efeito antiproliferativo das células de tumor mamário humano (FARIA et al., 2006).

Kozikowski et al. (2003) demonstraram que as procianidinas de cacau e sintéticas (com estrutura molecular idêntica à da procianidina de ocorrência natural) inibiram o crescimento de várias linhagens de células tumorais mamárias humanas, incluindo MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-435 e SKBR-3. Utilizando a linhagem MDA-MB-231 foi possível estabelecer que a

inibição celular foi provocada pela paralisação do ciclo celular na fase G₀/G₁ e a morte celular foi mais consistente com necrose do que apoptose.

Em outro estudo, Ramljak et al. (2005) demonstraram que a procianidina pentamérica natural de cacau induziu a paralisação do ciclo celular na fase G₀/G₁ das linhagens celulares de carcinoma mamário MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, SKBR-3 e MCF-7 e de células 184A1N4 e 184B5 imortalizadas por benzo(a)pireno. Entretanto, culturas primárias de células epiteliais mamárias normais e MCF-10A, espontaneamente imortalizadas, foram resistentes ao tratamento. Os autores verificaram que a procianidina pentamérica induziu despolarização da membrana mitocondrial das células MDA-MB-231, mas não das células MCF-10A. A despolarização da membrana das células MDA MB-231, induziu desfosforilação específica, sem alteração da expressão de proteína moduladoras da fase G₁ como Cdc2, p53 e outras. A desfosforilação da p53 pela procianidina pentamérica foi também confirmada nas células MDA-MB-468. Este trabalho demonstrou que as células de carcinoma mamário humano são seletivamente susceptíveis aos efeitos citotóxicos da procianidina pentamérica.

Além das procianidinas, os flavonóides especialmente, epicatequina galato e epigallocatequina galato apresentam atividade antitumoral, modulam o ciclo celular e podem potencializar o efeito de quimioterápicos (VALCIC et al., 1996; SEERAM; ZHANG; NAIR, 2003; CHISHOLM; BRAY; ROSENGREN, 2004; FARABEGOLI et al., 2007; HSIEH; WU, 2008). Baek et al. (2004) relataram que os principais polifenóis do chá verde são epigallocatequina galato (EGCG), epicatequina galato (ECG), epigallocatequina (EGC) e epicatequina (EC) e contribuem para a atividade anti-tumoral do chá verde. Lim et al. (2006) demonstraram que o tratamento com ECG suprimiu, significativamente, a expressão da proteína ciclina D1 (proteína chave da regulação do ciclo celular, envolvida na transição G₁/S, regulação da proliferação e diferenciação celular) em células escamosas de carcinoma de cabeça e pescoço. Além disso, o tratamento com ECG induziu a morte da mesma linhagem celular.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi investigar o tipo de morte das linhagens de carcinoma mamário humano MCF-7 (ER+) e MDA-MB-435 (ER-) induzida pela fração isolada do extrato de folhas de barbatimão. Assim, os objetivos específicos foram:

2.1 Fracionar o extrato de folhas de barbatimão para obtenção da fração contendo procianidina.

2.2 Tratar as células de tumor mamário com a fração.

2.3 Avaliar se a fração induz alteração da viabilidade e da morfologia celular.

2.4 Extrair proteínas celulares.

2.5 Determinar o tipo de morte celular induzida.

2.6 Determinar se a fração apresenta potencial antitumoral.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção, extração e fracionamento do material vegetal

As folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville foram coletadas em Alfenas (Minas Gerais, Brasil) em julho de 2007. Exsiccatas foram depositadas no herbário da Universidade Federal de Alfenas (N. 196). As folhas foram secas a 30° C, em estufa com circulação de ar e trituradas. A seguir foi preparado o extrato acetônico, por maceração estática de 100 g de folhas em 1 L de acetona: água (7:3), durante 5 dias. Este procedimento foi repetido mais duas vezes. Os extratos combinados foram concentrados por evaporação a baixa pressão, a 30° C, para eliminar a acetona (LIMA et al., 2006).

O extrato concentrado foi submetido a partição líquido-líquido com acetato de etila (1:1), por 5 vezes, para remover lipídeos e pigmentos solúveis em gordura (LIMA et al., 2006). A fração aquosa remanescente foi liofilizada e 2 mg de produto liofilizado foram dissolvidos em metanol aquoso (10%) e fracionados em coluna Sephadex LH-20 (Pharmacia) de 40 x 2 cm. Foi utilizado como eluente, metanol de 10-100% (v/v), em incrementos de 10% (100 mL cada), seguido por 2 frações de 100 mL de acetona-água (7:3). A taxa de eluição foi de 0,5 mL/min e frações de 50 mL foram coletadas separadamente (FOO; LU, 1999).

3.2 Cromatografia em camada delgada

O teor de proantocianidinas de todas as frações eluídas foi monitorado por cromatografia em camada delgada (FOO; LU, 1999). As frações cromatográficas foram analisadas em placas de 20 x 20 cm de sílica gel (Merck), utilizando-se metanol-tolueno-ácido acético (3:3:1, v/v/v). As manchas foram visualizadas com vanilina a 5% (p/v) em HCl à 10% (v/v). A fração eluída com metanol a 100% apresentou o maior teor de proantocianidinas e foi a utilizada nos experimentos.

3.3 Composição da fração

Para determinação da composição da fração foi realizada a análise por HPLC, segundo descrito por Foo e Lu (1999). A fração eluída com metanol a 100% foi submetida à degradação com floroglucinol. Amostras de 2 mg da fração, em triplicata, foram misturadas a 2 mg de floroglucinol e 1 mL de HCl a 1% em etanol e incubadas por 1 h à temperatura ambiente. Decorrido o tempo as amostras foram aplicadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu LC-20AD, equipado com detector de diodo, desgaseificador a vácuo, bomba quaternária, auto-injetor de amostras e coluna termostaticada RP-18 Shim-pack Shimadzu (poro de 4,5 μm ; 4,6 mm de diâmetro interno x150 mm de comprimento). Após filtração (filtro Millipore de 0,22 μm), 20 μL da solução dos produtos de degradação da fração foram injetados no cromatógrafo e eluídos com fluxo de 0,5 mL/min a 30° C. Foram utilizados os seguintes eluentes: A de 100 a 80% [ácido acético:água (2:98 v/v)] por 20 min, B a 100% [ácido acético/acetonitrila/água (2/20/78 v/v)], por 60 min, seguido de lavagem e recondicionamento da coluna por 10 min. Os produtos foram detectados a 280 nm. Para identificação dos compostos foram utilizados os padrões: ácido gálico, (-)-epicatequina-3-*O*-galato, procianidinas diméricas B1 e B2, catequina e epicatequina, que foram aplicadas no cromatógrafo em conjunto com a amostra.

3.4 Culturas celulares de tumor mamário humano

As linhagens MCF-7 (CR117) e MDA-MB-435 (CR119), provenientes do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram cultivadas em monocamadas e mantidas em meio de cultura RPMI-1640, contendo 20% (v/v) de soro fetal bovino inativado termicamente e penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 $\mu\text{g/mL}$), a 37° C em atmosfera umidificada com 5% de CO₂. O meio foi substituído a cada dois dias e as células foram subcultivadas a cada 5 dias, após tripsinização com solução de Tripsina-EDTA 0,25%.

3.5 Tratamentos das células

Após tripsinização a viabilidade celular foi determinada pelo método de exclusão do corante azul de trypan. As células (10^5 cels/mL) foram subcultivadas em placas com 24 poços (“multiwell”) ou sobre lamínulas em placa de Petri por 24 h, para obtenção do crescimento exponencial. O meio foi removido e novo meio acrescido de soro, antibióticos e da fração de barbatimão a 5, 10, 20, 40, 80 ou 160 $\mu\text{g/mL}$ foi adicionado às células, que foram incubadas por mais 24 h. O controle foi constituído por células incubadas em meio, soro e antibióticos. Utilizou-se ciclofosfamida a 550 $\mu\text{g/mL}$ como agente citotóxico e indutor de morte celular.

3.6 Ensaio de citotoxicidade

3.6.1 Análise da viabilidade celular

Foi utilizada a coloração das proteínas com sulforrodamina B para determinação do efeito de diferentes concentrações da fração sobre a viabilidade celular, de acordo com Houghton et al. (2007), com modificações. Após o tratamento das células MCF-7 e MDA-MB-435 por 24 h, as mesmas foram fixadas com 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 50 % (p/v), a 4° C, por 1 h. A seguir o conteúdo do poço foi removido e o mesmo foi lavado com água destilada e deixou-se a placa secando por 30 min em estufa a 37° C. Foram adicionados 50 μL de sulforrodamina B a 0,4 % (p/v) em ácido acético a 1% (v/v), por 30 min. Decorrido o tempo o corante foi removido e os poços foram lavados por 4 vezes com ácido acético a 1% (v/v). O corante foi dissolvido pela adição de 100 μL de Tris 10 μM , pH 10,5, por 10 min sob agitação e a absorbância foi lida a 560 nm.

3.6.2 Análise morfológica

A análise morfológica foi realizada como descrito por Pedro et al. (2006), com modificações. Após o tratamento das células cultivadas sobre lamínulas em placa Petri, estas foram fixadas com paraformaldeído tamponado a 4% e coradas com hematoxilina-eosina. As lâminas foram montadas em Entellan e observadas em microscópio de luz. Foi realizada a morfometria após captura das imagens e análise no programa Motic Images Plus 2.0. Foi determinada a área das colônias de células MCF-7 e a área das células MDA-MB-435.

3.7 Extração e dosagem de proteínas

Após o tratamento das células cultivadas em placa “multiwell”, o meio de cultura foi removido e as células foram tripsinizadas. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células foram lavadas com PBS 0,1 M (pH 7,4), centrifugadas e foram adicionados 50 µL de tampão da amostra de eletroforese [Tris-HCl 62,5 mM, pH 6,8, β-mercaptoetanol 5% (v/v), dodecil sulfato de sódio (SDS) a 1,25% (p/v), glicerol a 15% (v/v) e azul de bromofenol a 0,006% (p/v)]. Antes da aplicação no gel de eletroforese as amostras foram fervidas em banho-maria por 1 min para desnaturação e a seguir as proteínas foram quantificadas pelo método de Lowry modificado (PETERSON, 1977), utilizando-se 5 µL das amostras obtidas.

3.8 Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS

As proteínas (30 µg) foram separadas em gel de poliacrilamida-SDS contendo 12% de acrilamida (v/v), de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). A corrida eletroforética foi executada por 1 h, a 35 mA e em seguida foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF, por 1 h a 200 mA (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979). O gel foi

corado com azul de Coomassie R250 por 30 min em agitador mecânico e na seqüência descorado com solução de ácido acético:metanol:água (5:2,5:42,5), para monitoramento da transferência das proteínas. O padrão de peso molecular utilizado nas eletroforeses foi composto por albumina de soro bovino (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), pepsina (34,7 kDa), tripsinogênio (24 kDa), β -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,3 kDa) (Dalton VI - Sigma).

3.9 Western blotting

Esta técnica foi realizada de acordo com Sant'Ana et al. (2008), com modificações. A expressão de proteínas envolvidas na morte celular foi analisada utilizando-se os seguintes anticorpos monoclonais: anti-pró-caspase 8, anti-caspases-3, 8 e 9, anti-caspase-3 ativa, anti-Bcl-2, anti-Bax, anti-beclin-1 e anti-LC-3 (Sigma). Após a transferência a membrana foi autoclavada por 20 min à 120° C, para exposição dos epítopos das proteínas. As proteínas foram fixadas e bloqueadas, durante 1 h em tampão Tris-HCl 25 mM, pH 8 contendo NaCl 125 mM (TBS) e Tween 20 a 0,1% (v/v) (TBST) e 5% de leite em pó desnatado. A seguir foram lavadas em TBST. A membrana foi então, incubada com o primeiro anticorpo diluído em TBST/1% leite em pó desnatado e incubada por 12 h à 4° C. Decorrido o tempo foram feitas cinco lavagens em TBST por 5 min. A membrana foi incubada com o segundo anticorpo conjugado com peroxidase, por 2 h, à temperatura ambiente. A seguir foram feitas três lavagens com TBST e três com TBS por 5 min. A membrana foi incubada com diaminobenzidina (DAB) (1 mg/mL) em TBS e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 5% (v/v), para revelação das proteínas. Todos os resultados foram normalizados pela expressão de β -actina para corrigir eventuais diferenças na quantidade de proteínas de cada amostra. A densitometria foi realizada usando-se o programa Motic Images Plus 2.0 e os resultados foram expressos em porcentagem em relação ao controle.

3.10 Análise estatística

Os dados obtidos para os experimentos realizados foram comparados por análise de variância pelo teste ANOVA, seguido do teste de Tukey-Kramer, quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Cromatografia em camada delgada e composição da fração

A cromatografia em camada delgada identificou que a fração do extrato de barbatimão com o mais alto conteúdo de proantocianidinas foi isolada com metanol a 100 % (FIGURA 4A). Esta fração foi composta por procianidina, pois se obteve a produção de cianidina em meio alcoólico-ácido. A análise por HPLC (FIGURA 4B) revelou a presença de três compostos principais: ácido gálico, procianidina dimérica B1 (epicatequina-(4 β \rightarrow 8)-catequina; o principal componente) e epicatequina-3-*O*-galato.

4.2 Viabilidade celular

A fração de barbatimão apresentou citotoxicidade para as células MCF-7 e MDA-MB-435, com redução da viabilidade, estimada pela coloração de proteínas com sulforrodamina B (FIGURA 5). A fração apresentou citotoxicidade em concentração a partir de 40 μ g/mL para as duas linhagens, contudo foi mais citotóxica para as células MCF-7 do que para a MDA-MB-435, evidenciada pela menor viabilidade celular após o tratamento com as concentrações de 40, 80 e 160 μ g/mL.

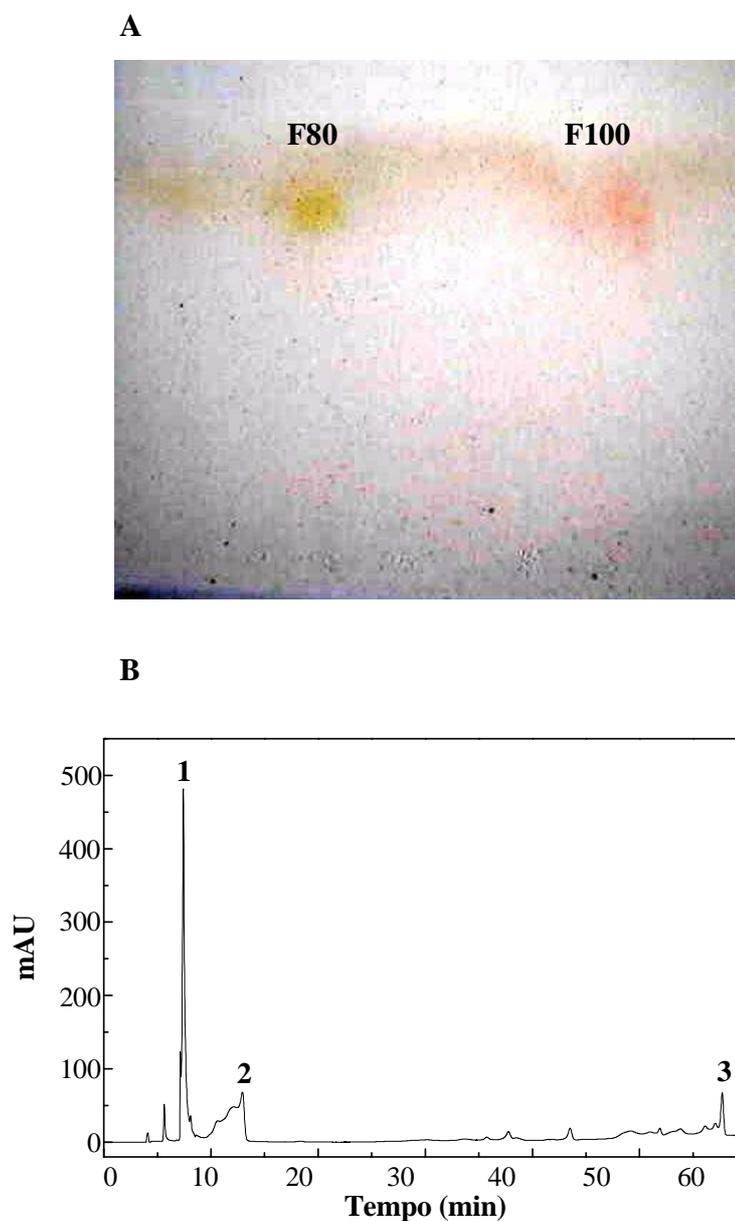


Figura 4- Cromatograma. **A**, Cromatografia em camada delgada das frações de proantocianidinas isoladas da fração aquosa de folhas de barbatimão, com metanol a 80% (F80) e 100% (F100). A fração F100 foi liofilizada e utilizada nos experimentos. **B**, HPLC-DAD (absorbância 280 nm) dos produtos da degradação com o floroglucinol, da fração de barbatimão eluída com metanol a 100%; Picos: **1**, ácido gálico; **2**, procianidina dimérica B1; **3**, (-)-epicatequina-3-*O*-galato.

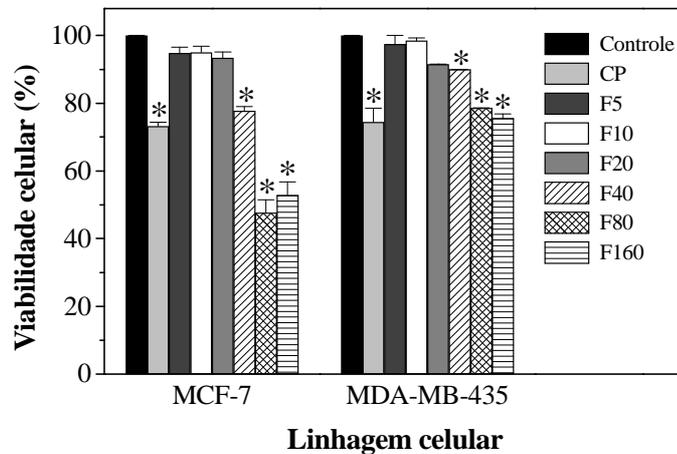


Figura 5- Viabilidade das células MCF-7 e MDA-MD-435 controle (C) e tratadas por 24 h com ciclofosfamida a 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CP) e fração de barbatimão (F) de 5 a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, estimada pela coloração de proteínas com sulforrodamina B. * $p < 0,05$.

4.3 Análise morfológica das células

O tratamento das células com a fração de barbatimão resultou em alterações morfológicas conspícuas, incluindo perda da morfologia celular típica, diminuição da célula e condensação da cromatina. As células MCF-7 crescem em colônias e possuem forma e tamanho assimétrico. Estas células, após o tratamento com a fração de barbatimão, assumiram formato arredondado, passaram a crescer isoladamente e exibiram vacúolos citoplasmáticos (FIGURA 6). A área das colônias diminuiu significativamente ($p < 0,001$) nas células tratadas com CP e com a fração de barbatimão nas concentrações a partir de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FIGURA 7). A dose efetiva para obtenção de 50% (DE_{50}) das células com redução significativa ($p < 0,05$) da área das colônias foi de 12,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As células MDA-MB-435 apresentaram alterações morfológicas, assumindo formato alongado após o tratamento (FIGURA 8). A área das células diminuiu significativamente ($p < 0,001$) com o tratamento por CP e fração de barbatimão em concentrações a partir de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (FIGURA 9), sendo a DE_{50} de 34,43 $\mu\text{g}/\text{mL}$. As alterações observadas foram dependentes da concentração.

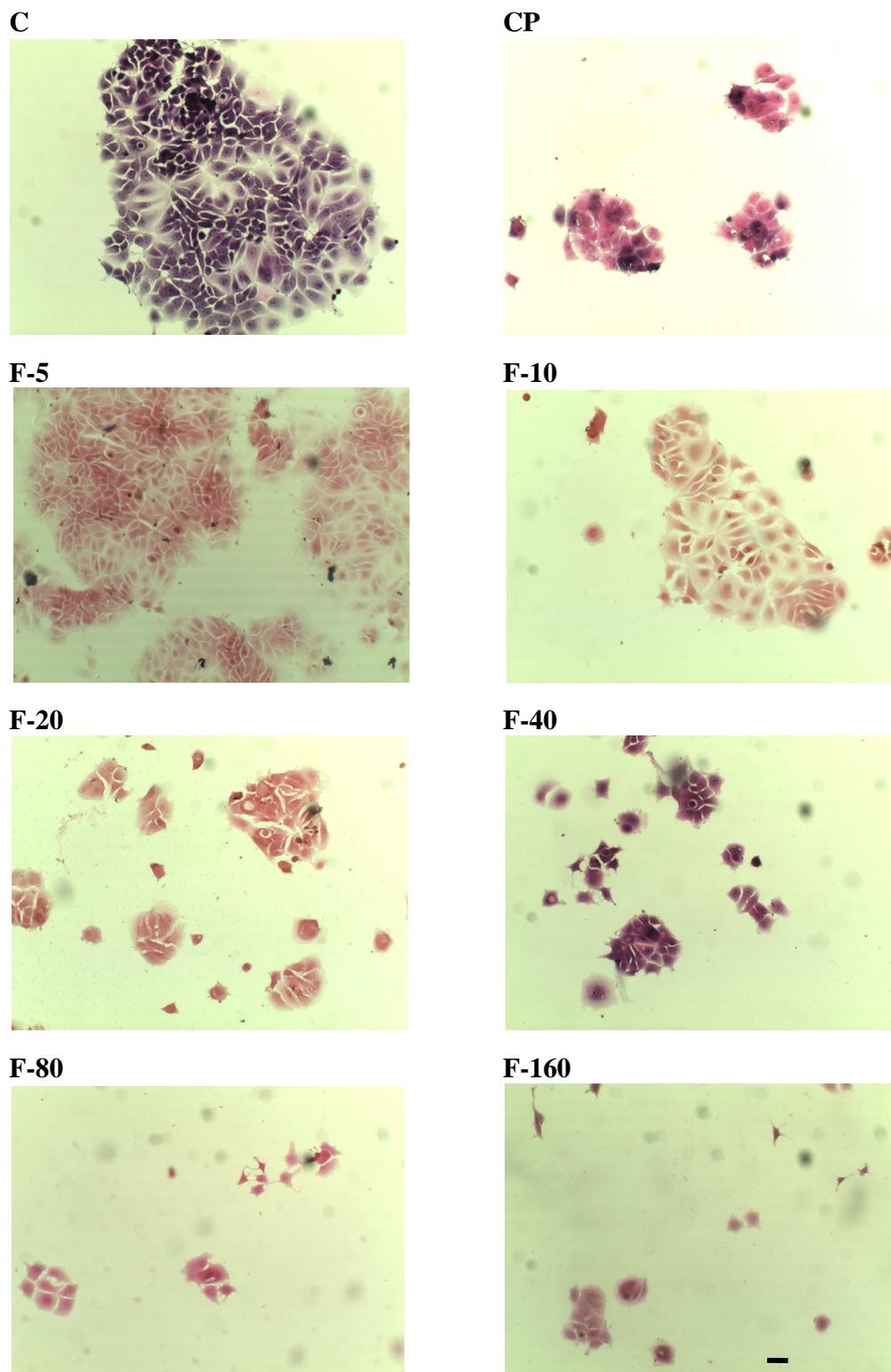


Figura 6 – Células MCF-7 controle (C) e tratadas por 24 h com ciclofosfamida a 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CP) e fração de barbatimão (F) de 5 a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$, coradas com hematoxilina-eosina. Observam-se diminuição do tamanho das colônias e alterações morfológicas com o tratamento. Barra = 1 μm .

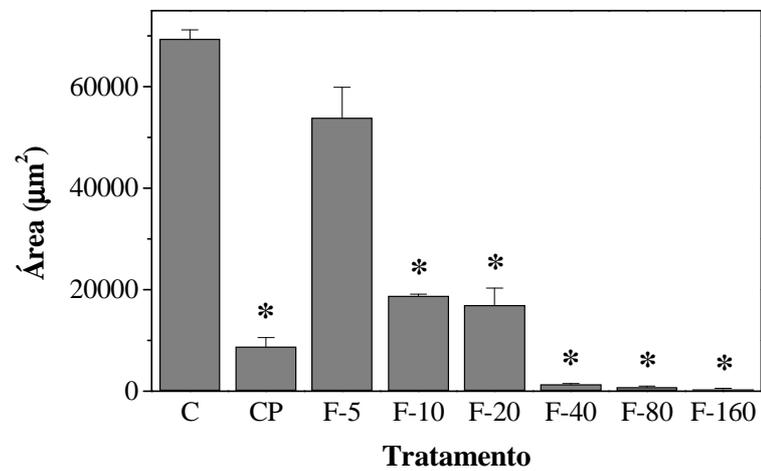


Figura 7 – Área das colônias de células MCF-7 controle (C) e tratadas por 24 h com ciclofosfamida a 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CP) e fração de barbatimão (F) de 5 a 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$. * indica diminuição significativa ($p < 0,001$) da área das colônias de células tratadas com CP e com a fração em concentrações a partir de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, em comparação ao controle.

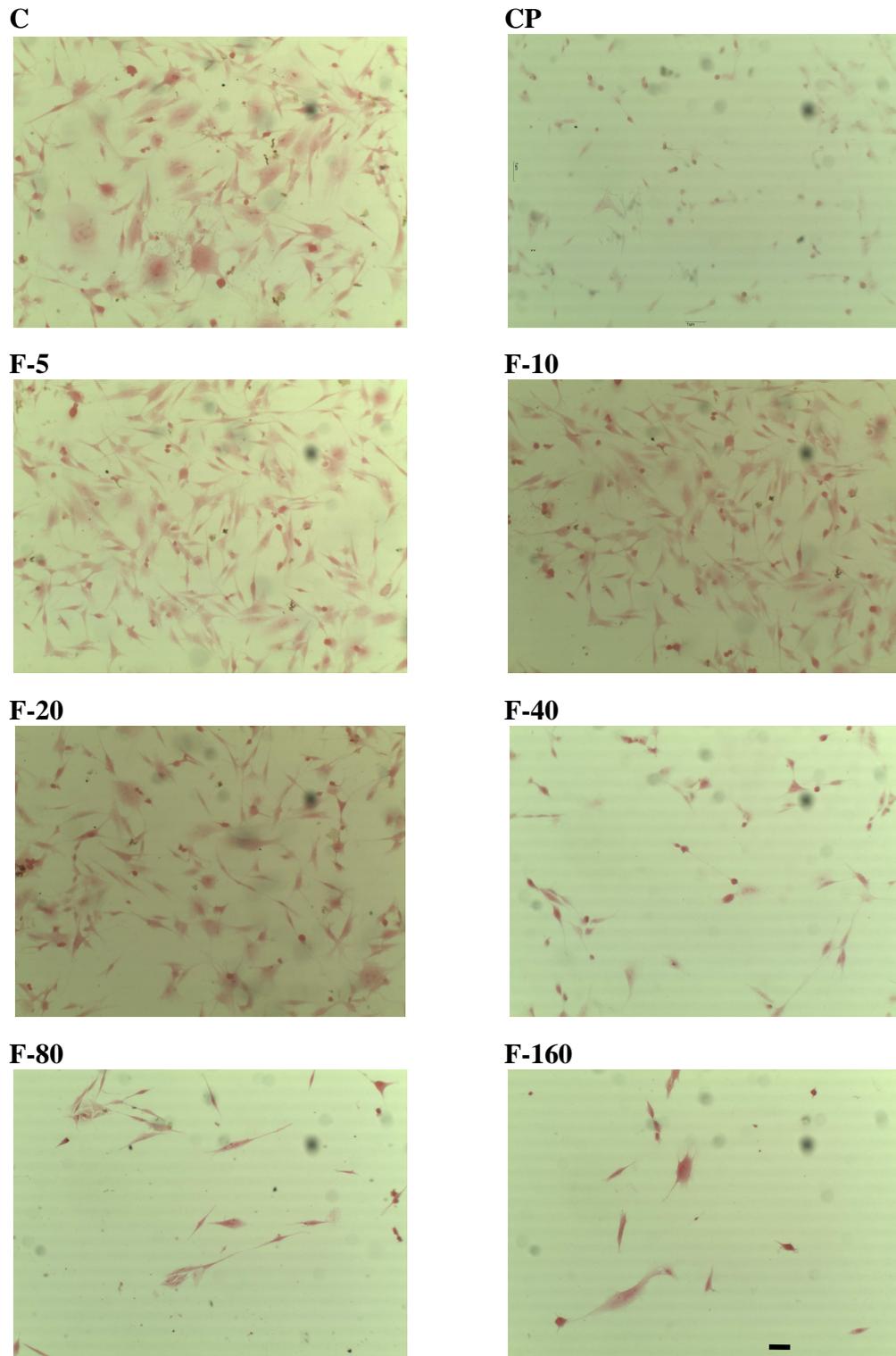


Figura 8 – Células MDA-MB-435 controle (C) e tratadas por 24 h com ciclofosfamida a 550 µg/mL (CP) e fração de barbatimão (F) de 5 a 160 µg/mL, coradas com hematoxilina-eosina. Observam-se diminuição do tamanho e alterações morfológicas com o tratamento. Barra = 1 µm.

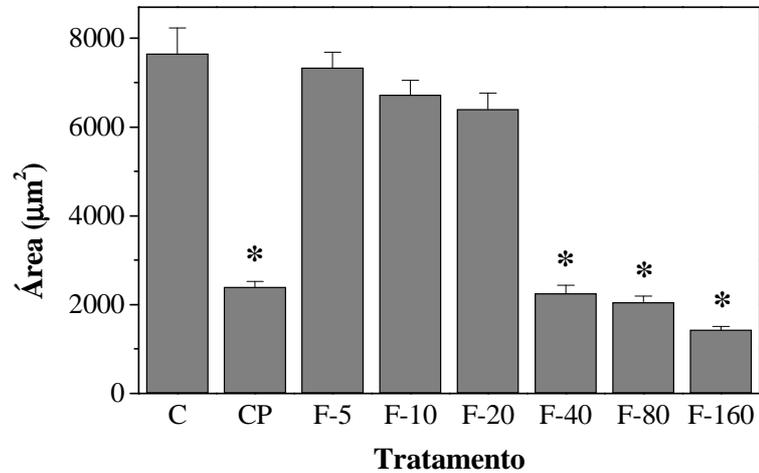


Figura 9 – Área das células MDA-MB-435 controle (C) e tratadas por 24 h com ciclofosfamida a 550 µg/mL (CP) e fração de barbatimão (F) de 5 a 160 µg/mL. * indica diminuição significativa ($p < 0,001$) da área das células tratadas com CP e com fração em concentrações a partir de 40 µg/mL, em comparação ao controle.

4.4 Western blotting

A expressão da proteína Bax, uma proteína pró-apoptótica, aumentou enquanto a expressão da proteína Bcl-2, uma proteína anti-apoptótica, diminuiu significativamente ($p < 0,001$) nas células MCF-7 e MDA-MB-435, tratadas com a fração e CP comparadas com o controle (FIGURA 10).

A razão entre a expressão das proteínas Bax e Bcl-2 é um fator chave na regulação do processo apoptótico. Nas células MCF-7 tratadas com a fração a razão Bax/Bcl-2 foi de $5,11 \pm 0,05$ e nas células MDA-MB-435 foi de $7,71 \pm 0,06$. O tratamento com a fração de barbatimão reduziu a expressão de Bcl-2, um potente inibidor de morte celular, enquanto a expressão de proteína Bax aumentou, indicando desregulação na razão Bax/Bcl-2 nas células MCF-7 e MDA-MB-435 e, portanto, indução de apoptose (FIGURA 11).

A

MCF-7			MDA		
C	CP	F	C	CP	F

B

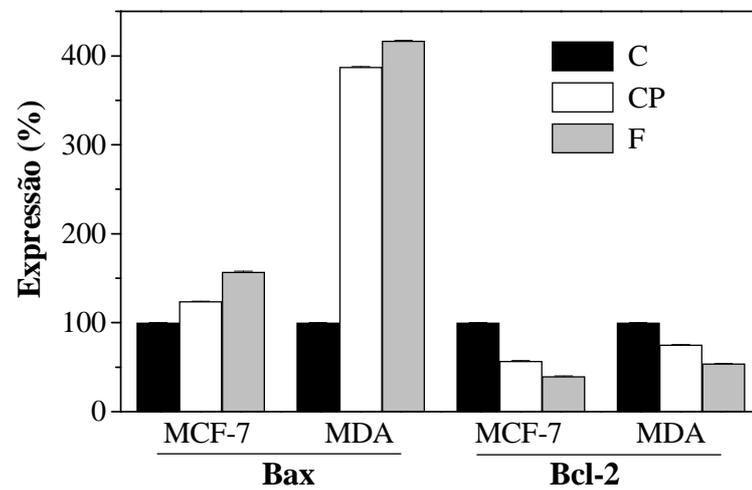


Figura 10 – Expressão de Bax e Bcl-2 em células MCF-7 e MDA-MB-435 controle (C) e tratadas por 24 h com ciclofosfamida a 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (CP) e fração de barbatimão a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F). **A.** Western blot. **B.** Densitometria. Observam-se aumento da expressão de Bax e diminuição da expressão de Bcl-2 nas células tratadas.

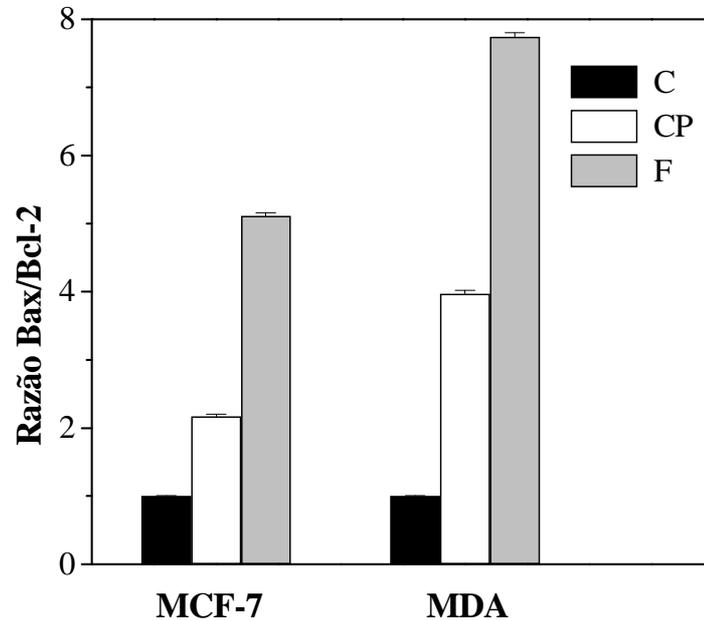


Figura 11 – Razão da expressão de Bax/Bcl-2 em células MCF-7 e MDA-MB-435 controle (C) e tratadas por 24 h com ciclofosfamida a 550 $\mu\text{g/mL}$ (CP) e fração de barbatimão a 40 $\mu\text{g/mL}$ (F). Observa-se aumento da razão Bax/Bcl-2 nas células tratadas, indicando processo apoptótico.

As caspases são enzimas consideradas importantes marcadores celulares da indução de apoptose. A expressão de caspase-9 aumentou significativamente ($p < 0,001$) nas células, MCF-7 e MDA-MB-435, tratadas com a fração e CP comparadas com as células controle. Nas células tratadas com a fração a expressão de caspase-9 foi significativamente maior ($p < 0,001$) do que nas tratadas com CP. A expressão da caspase-3 diminuiu significativamente ($p < 0,001$) nas células, MCF-7 e MDA-MB-435, tratadas com a fração e CP comparadas com o controle. A expressão da caspase-3 nas células MCF-7 tratadas com a fração não diferiu significativamente da expressão nas células tratadas com CP. Contudo, nas células MDA-MB-435 houve diminuição da expressão da caspase-3 significativa ($p < 0,01$) após tratamento com a fração comparado ao tratamento com CP. A expressão da caspase-3-ativa aumentou significativamente ($p < 0,01$) nas células MCF-7 e MDA-MB-435 tratadas com a fração e com CP. A expressão da pró-caspase-8 diminuiu significativamente ($p < 0,05$) nas células MCF-7 e MDA-MB-435 tratadas com a fração e com CP,

quando comparadas ao controle. Contudo, não houve diferença significativa da expressão da pró-caspase-8 nas células tratadas com a fração comparadas às tratadas com CP. A expressão da caspase-8 aumentou significativamente ($p < 0,01$) nas células, MCF-7 e MDA-MB-435, tratadas com a fração de barbatimão e CP comparadas com o controle, sendo a maior expressão nas células MCF-7. Não houve diferença significativa na expressão da caspase-8 nas células tratadas com a fração comparadas às tratadas com CP (FIGURA 12).

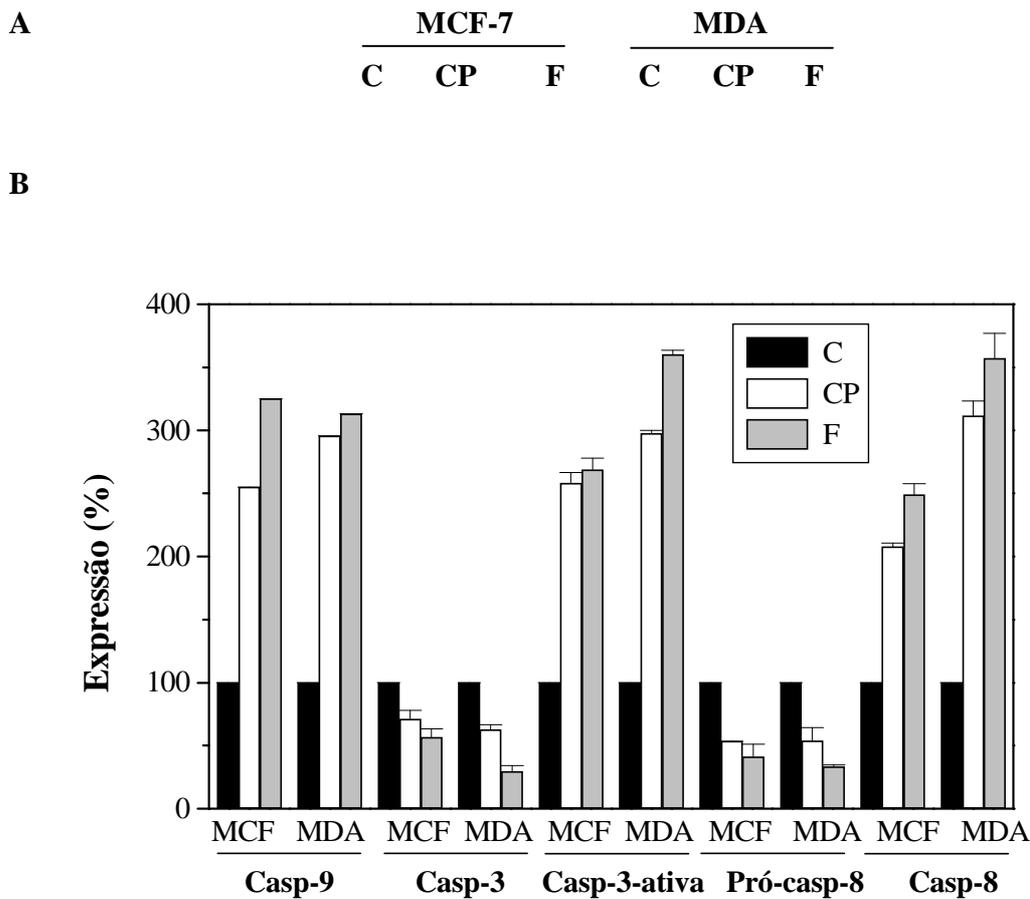


Figura 12 – Expressão de caspase-9 , caspase- 3, caspase-3-ativa, pró-caspase 8 e caspases 8 em células MCF-7 e MDA-MB-435 controle (C) e tratadas por 24 h com ciclofosfamida a 550 µg/mL(CP) e fração de barbatimão a 40 µg/mL (F). **A.** Western blot. **B.** Densitometria. Observa-se diminuição da expressão de pró-caspase-8 e caspase-3 e aumento de caspase-8, caspase-9 e caspase-3-ativa nas células tratadas.

As proteínas LC-3 e beclin-1 são consideradas marcadores da autofagia. A expressão da proteína LC-3 aumentou significativamente ($p < 0,001$) nas células, MCF-7 e MDA-MB-435, tratadas com a fração e CP comparadas com o controle. Nas células tratadas com a fração o aumento foi significativamente maior ($p < 0,001$) do que nas células tratadas com CP. A expressão de beclin-1 nas células MCF-7 não variou com o tratamento. Contudo, nas células MDA-MB-435

houve aumento significativo ($p < 0,05$) quando as células tratadas com a fração e CP foram comparadas ao controle (FIGURA 13).

A

MCF-7			MDA		
C	CP	F	C	CP	F

B

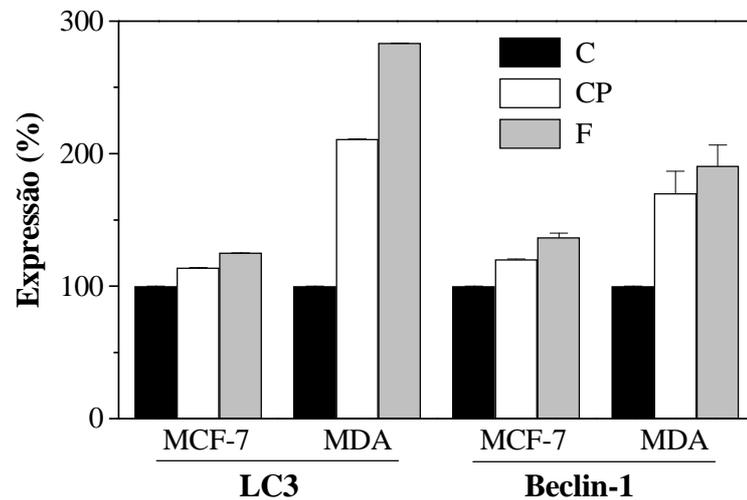


Figura 13 – Expressão de LC-3 e beclin-1 em células MCF-7 e MDA-MB-435 controle (C) e tratadas por 24 h com ciclofosfamida (CP, 550 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e fração de barbatimão a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F). **A.** Western blot. **B.** Densitometria. Observam-se aumento da expressão de LC-3 nas células tratadas e de beclin-1 apenas nas células MDA-MB-435 tratadas.

5 DISCUSSÃO

Os tumores mamários são constituídos por diferentes tipos celulares e o fenótipo das células tumorais é, geralmente, considerado um parâmetro relevante para determinação do grau de malignidade, sendo importante para a escolha do quimioterápico a ser utilizado. No presente trabalho foi avaliado o efeito da fração isolada de folhas de barbatimão sobre a indução de morte de células de adenocarcinoma mamário humano em cultura, MCF-7 (ER+) e MDA-MB-435 (ER-), células geneticamente distintas e que apresentam potencial proliferativo diferentes.

Neste trabalho foi demonstrado que a fração isolada do extrato de folhas de barbatimão é composta principalmente por procianidina dimérica B1 (epicatequina-(4 β \rightarrow 8)-catequina) e epicatequina-3-*O*-galato (ECG) e ácido gálico em menor proporção. O tratamento com a fração resultou em alterações morfológicas em ambas as linhagens, sendo que as células MCF-7 foram mais sensíveis que a MDA-MB-435, uma vez que a DE₅₀ foi menor para as primeiras células e este efeito foi dependente da concentração.

Os resultados obtidos neste trabalho podem ser atribuídos à composição da fração. As proantocianidinas apresentam vários efeitos biológicos e alvos moleculares *in vitro* e *in vivo*, que podem potencialmente ser úteis na prevenção e tratamento de câncer de vários órgãos (NANDAKUMAR; SINGH; KATIYAR, 2008; YANG et al., 2008). Tem sido demonstrado que a ECG apresenta potente atividade biológica, incluindo a indução de inibição do crescimento celular, apoptose e indução da expressão de proteína supressora de tumor (BAEK et al., 2004; LIM et al., 2006; CHO et al., 2007). As catequinas e procianidinas são os dois principais grupos de flavonóides presentes em grande variedade de alimentos e bebidas presentes na dieta humana. As procianidinas diméricas B, os monômeros de catequinas e epicatequinas livres ou condensados ao ácido gálico são os compostos com mais atividades biológicas descritas. Embora o metabolismo e biodisponibilidade destes compostos não sejam ainda bem esclarecidos, inúmeros efeitos biológicos *in vivo* destes compostos foram comprovados (AUGER et al., 2004; ACTIS-GORETTA et al., 2008).

A citotoxicidade de diferentes concentrações da fração de barbatimão foi avaliada pela coloração de proteínas com sulforrodamina B, que é um indicador da viabilidade celular. A fração mostrou-se tóxica para ambas as linhagens celulares, sendo a MCF-7 mais sensível.

Tendo em vista as alterações morfológicas obtidas, tais como: alterações da forma celular e da membrana plasmática, picnose e condensação da cromatina, que são compatíveis com apoptose, foi analisada a expressão de proteínas pró e anti-apoptóticas. Os resultados obtidos demonstram que a fração induziu apoptose nas duas linhagens celulares, pois houve desregulação das proteínas da família Bcl-2. O aumento da expressão de Bax (pró-apoptótica) e diminuição de Bcl-2 (anti-apoptótica) estimulam a via intrínseca apoptótica. Para confirmar esses achados foram investigados os níveis de caspases, que participam desta via.

O tratamento com a fração induziu aumento de caspase-9, caspase-3-ativa e caspase-8, enquanto houve diminuição de caspase-3 e de pró-caspase-8. Estas são enzimas-chave do processo apoptótico estimulado pela via mitocondrial, no qual a proteína Bax é translocada para a membrana mitocondrial, permeabilizando-a. Isto provoca o inchaço mitocondrial com exposição citoplasmática do citocromo c, que forma com a caspase-9 o apoptossomo. Este por sua vez ativa a caspase-3, que passa para a forma ativa, induzindo a clivagem da pró-caspase 8. Na via extrínseca, desencadeada por ligação ao receptor de morte celular, não ocorre ativação de caspase-9, como foi observado neste trabalho (LOGUE; MARTIN, 2008).

Kozikowski et al. (2003) sintetizaram procianidinas oligoméricas de epicatequina- (4 β → 8) e observaram que aquelas contendo 5 ou mais oligômeros a 100 μ g/mL foram citotóxicas para células MCF-7 e MDA-MB-435. Estas procianidinas induziram principalmente necrose das células e as diméricas não mostraram atividade. Estes resultados reforçam a hipótese de que a estrutura química seja importante para a atividade, pois no presente trabalho a procianidina dimérica B1 presente na fração isolada de folhas de barbatimão é formada por epicatequina- (4 β → 8)-catequina e a fração mostrou-se citotóxica para ambas as linhagens celulares tratadas. Actis-Goretta et al. (2008) observaram que a introdução de dois resíduos de ácido gálico à procianidina dimérica B1 aumentou a citotoxicidade para células MDA-MB-435 e MCF-7, quando comparado à procianidina dimérica B1. Estes autores verificaram que ocorreu efeito citotóxico por diminuição do conteúdo de ATP celular e as células MCF-7 foram mais sensíveis que as células MDA-MB-435, como foi observado no presente trabalho. A resposta diferencial das células pode ser provavelmente atribuída à presença do receptor de estrógeno α nas células

MCF-7 (ER+), mas não nas células MDA-MB-435 (ER-). Eng et al. (2003) demonstraram que as procianidinas diméricas B inibem a atividade da aromatase, por inibição competitiva, sugerindo que suprimem a síntese *in situ* de estrógeno e estes autores demonstraram que a procianidina B1 foi a mais eficiente. Kijima et al. (2006) demonstraram que além inibição da atividade da aromatase as procianidinas diméricas B também inibem a atividade de 2 fatores de transcrição, importantes para a expressão da aromatase, o que diminui a expressão da proteína.

A aromatase catalisa três reações consecutivas de hidroxilação, para conversão de andrógeno C-19 em estrógeno C-18, que é a etapa final e crítica para a síntese de estrógeno. A enzima é expressa em vários tecidos tais como adiposo, ovários, placenta, cérebro, pele e ossos. Antes da menopausa o estrógeno circulante é secretado principalmente pelo ovário e após a menopausa os andrógenos sintetizados pelas adrenais são convertidos nos tecidos periféricos. A expressão da aromatase está aumentada no tecido tumoral mamário, bem como no estroma circundante, em comparação ao tecido mamário normal. O estrógeno liga-se ao receptor de estrógeno α das células ER+, induzindo a dimerização do receptor, que se liga aos elementos responsivos ao estrógeno no DNA ou a fatores de transcrição ligados ao DNA, ativando a transcrição de genes-alvo e proliferação tumoral (ROSENGREN, 2003). Assim, a produção *in situ* de estrógeno é mais importante que o estrógeno circulante na estimulação do crescimento de tumores ER+ (BULUN et al., 2009).

Sonne-Hansen e Lykkesfeldt (2005) Smuc e Rizner (2009) demonstraram que as células MCF-7 apresentam atividade de aromatase suficiente para sintetizar estrógeno. Assim, a diferente resposta ao tratamento com a fração isolada pelas células MCF-7 e MDA-MB-435 pode ser, pelo menos em parte também atribuída à atividade da procianidina B1, como inibidora da aromatase. Outros efeitos já demonstrados para as procianidinas diméricas B1 tais como antioxidante (FARIA et al., 2006) e anti-inflamatória, por inibir a ligação de NF- κ B ao DNA podem ainda contribuir para o efeito da fração isolada de folhas de barbatimão observado neste trabalho.

A fração utilizada neste trabalho é também composta por ECG. Tem sido demonstrado que as catequinas reduzem a proliferação de células de tumor mamário *in vitro* e diminuem o crescimento do tumor em roedores. Valcic et al. (1996) isolaram 6 diferentes catequinas do chá verde e a ECG apresentou atividade antiproliferativa para células MCF-7, com IC₅₀ de 154,8 μ g/mL, concentração bem superior à da fração utilizada no presente trabalho. Chisholm, Bray e Rosengren (2004) estudaram o efeito de várias catequinas para células MCF-7 e MDA-MB-231 e

a ECG a 20 μ M mostrou-se citotóxica para células MDA-MB-231 e induziu morte celular por apoptose. Goodin e Rosengren (2003) demonstraram que a ECG não inibiu a atividade de aromatase e não diminuiu a concentração plasmática de estradiol, não sendo, portanto, antagonista do ER α . Outros trabalhos evidenciaram que a ECG induz a expressão da proteína supressora de tumor ATF3, que é regulada por NF- κ B (CHO et al., 2007) e induz apoptose por supressão da expressão de ciclina D1 e indução de NAG-1 (BAEK et al., 2004; LIM et al., 2006). Cabe salientar que a ECG apresenta atividade inibidora da DNA polimerase α e de proteassomo, portanto, reduzindo a proliferação e ativando a morte celular (SAITO et al., 2009). Não há trabalhos prévios demonstrando que a ECG induz a apoptose de células de tumor mamário humano.

É interessante ressaltar que foram observados vacúolos citoplasmáticos nas células tratadas, o que levou à investigação da ocorrência de morte celular com autofagia. As proteínas beclin-1 e LC-3 são importantes marcadores da autofagia, necessárias para as fases iniciais do processo, com a formação do autofagossomo (FADER; COLOMBO, 2009). O aumento da expressão de LC-3 foi evidente nas duas linhagens celulares, contudo, o aumento significativo da beclin-1 apenas foi observado nas células MDA-MB-435.

A apoptose e a autofagia podem ser correguladas, pois as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL regulam a autofagia negativamente, por ligação à beclin-1 e a proteína pró-apoptótica BH3 pode reverter esses efeitos, desfazendo esta interação. Assim, a apoptose pode suprimir a autofagia. A apoptose induzida por Bax pode reduzir a autofagia pelo aumento da clivagem de beclin-1 mediada por caspases. Após a clivagem os fragmentos N e C-terminal da beclin-1 não interagem normalmente com a Vps34, que é necessária para a autofagia. A clivagem da beclin-1 é o evento crítico de inibição da autofagia pelas caspases (ZENG; OVERMEYER; MALTESE, 2006; LUO; RUBINSZTEIN, 2009). Esta pode ser a explicação para os resultados obtidos nas células MCF-7, nas quais o tratamento com a fração não induziu aumento significativo de beclin-1, mas apenas de LC-3.

O papel da autofagia no tratamento do câncer é tema de vários trabalhos científicos. A autofagia é um processo conservado evolutivamente, por meio do qual os componentes do citoplasma são degradados por via lisossomal, como forma de obtenção de aminoácidos e energia. Assim, constitui-se em uma via de sobrevivência ativada por privação de nutrientes e outros estímulos tais como estresse metabólico e fármacos anticâncer, o que pode induzir

proliferação e proteção das células tumorais. Contudo, a autofagia pode resultar na morte da célula, contribuindo para conter a proliferação e pode erradicar as células tumorais (DE BRUIN; MEDENA, 2008; CHEN; KARANTZA-WADSWORTH, 2009).

Defeitos neste processo estão claramente relacionados à tumorigênese, pois em vários tipos tumorais, incluindo tumores mamários, ocorre a deleção monoalélica da beclin-1 (WON et al., 2010). Assim, o papel da autofagia no tratamento do câncer é complexo e tanto a indução como a inibição podem auxiliar na eliminação de células tumorais. A inibição da autofagia concomitante à quimioterapia e radioterapia tem sido apontada como uma boa estratégia para o tratamento do câncer, impedindo que células competentes para autofagia sobrevivam ao tratamento. Por outro lado a estimulação da autofagia induzida pelo aumento da expressão de beclin-1 deve ser considerada, pois a autofagia pode causar a morte celular, o que resulta na diminuição da proliferação celular e, portanto, na inibição da tumorigênese. A autofagia ainda determina a preservação do conteúdo celular sem alterações patológicas, por meio da manutenção de proteínas e organelas funcionais, supressão de danos ao DNA e instabilidade genômica, com a remoção de fontes genotóxicos, o que é fundamental para a prevenção do câncer (CHEN; KARANTZA-WADSWORTH, 2009). Estudos ainda são necessários para esclarecer o real papel da autofagia no tratamento e prevenção do câncer mamário e outros.

Assim, no presente trabalho foi demonstrado que a fração isolada de extrato de folhas de barbatimão induziu apoptose com autofagia de células MCF-7 (ER+) e MDA-MB-435 (ER-). Estes resultados são importantes, pois foram demonstradas a citotoxicidade e indução de morte das células MDA-MB-435, que são ER-, além das células MCF-7 (ER+). Tendo em vista que não há tratamento efetivo para tumor mamário ER-, bem como para ER+ em estágio avançado, a fração isolada parece promissora para o tratamento e prevenção do câncer de mama.

6 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho permitem concluir que:

- a fração isolada do extrato de folhas de barbatimão é composta por procianidina B1 (principal componente), epicatequina galato e ácido gálico;
- essa fração apresentou citotoxicidade para as células MCF-7 (ER+) e MDA-MB-435 (ER-), sendo mais ativa contra as primeiras células, induzindo diminuição de proteínas celulares e alterações morfológicas;
- o tratamento com a fração induziu a morte por apoptose com autofagia nas duas linhagens celulares estudadas;
- a fração obtida apresenta potencial antitumoral.

REFERÊNCIAS

- ACTIS-GORETTA, L. et al. Cytotoxic effects of digalloyl dimer procyanidins in human cancer cell lines. **J. Nutr. Biochem.**, v. 19, p. 797-808, 2008.
- AUDI, E. A. et al. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. **Phytother. Res.**, v. 13, p. 264-266, 1999.
- AUGER, C. et al. Catechins and procyanidins in Mediterranean diets. **Food Res. Int.**, v. 37, p. 233-245, 2004.
- AITA, V. M. et al. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. **Genomics**, v. 59, p. 59-65, 1999.
- BABICH, H. et al. Differential in vitro cytotoxicity of (-)-epicatechin gallate (ECG) to cancer and normal cells from the human oral cavity. **Toxicol. in Vitro**, v. 19, p. 231-242, 2005.
- BAEK, S. J. et al. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, p. 2425-2432, 2004.
- BIDERE, N. et al. CathepsinD triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 31401-31411, 2003.
- BORGES FILHO, H.; FELFILI, J. M. Avaliação dos níveis de extrativismo da casca de barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville] no Distrito Federal, Brasil. **Rev. Árvore**, v. 27, p. 735-745, 2003.
- BOYA, P. et al. Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 25, p. 1025-1040, 2005.
- BRÖKER, L.E.; KRUYT, F.A.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin. Cancer Res.**, v. 1, p. 3155-3162, 2005.
- BULUN, S. E. et al. Regulation of aromatase expression in breast cancer tissue. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1155, p. 121-131, 2009.

CHEN, N.; KARANTZA-WADSWORTH, V. Role and regulation of autophagy in cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1793, p. 1516-1523, 2009.

CHEN, W.Y. et al. Goniotalamin induces cell cycle-specific apoptosis by modulating the redox status in MDA-MB-231 cells. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 22, p. 20-29, 2005.

CHISHOLM, K.; BRAY, B. J.; ROSENGREN, R. J. Tamoxifen and epigallocatechin gallate are synergistically cytotoxic to MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Anticancer Drugs**, v. 15, p. 889-897, 2004.

CHO, K-N. Green tea catechin (-)-epicatechin gallate induces tumour suppressor protein ATF3 via EGR-1 activation. **Eur. J. Cancer**, v. 43, p. 2404-2412, 2007.

CLARKE, R. et al. Gene network signaling in hormone responsiveness modifies apoptosis and autophagy in breast cancer cells. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 114, p. 8-20, 2009.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v. 1, 1984.

COS, P. et al. Proanthocyanidins in health care: current and new trends. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, p. 1345-1359, 2004.

DANIAL, N. N.; KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v. 116, p. 205-219, 2004.

DE BRUIN, E. C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treat. Rev.**, v. 34, p. 737-749, 2008.

DIMRI, G.; BAND, H.; BAND, V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. **Breast Cancer Res.**, v. 7, p. 171-179, 2005.

DIXON, R. A.; XIE, D. Y.; SHARMA, S. B. Proanthocyanidins--a final frontier in flavonoid research? **New Phytol.**, v. 165, p. 9-28, 2005.

DOWSET, M.; COOKE, T.; ELLIS, I. et al. Assessment of HER2 status in breast cancer: Why when and how? **Eur.J.Cancer**, v. 36, p.170-176, 2000.

ENG, E. T. et al. Suppression of estrogen biosynthesis by procyanidin dimers in red wine and grape seeds. **Cancer Res.**, v. 63, p. 8516-8522, 2003.

FADER, C. M.; COLOMBO, M. I. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. **Cell Death Differ.**, v. 16, p 70-78, 2009.

FARABEGOLI, F. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate downregulates estrogen receptor alpha function in MCF-7 breast carcinoma cells. **Cancer Detect. Prev.**, v. 31, p. 499-504, 2007.

FARIA, A. et al. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 2392-2397, 2006.

FELFILI, J. M.; SILVA JÚNIOR, M.C. A comparative study of cerrado (*sensu stricto*) vegetation in central Brazil. **J. Trop. Ecol.**, v. 9, p. 77-289, 1993.

FELFILI, J. M. et al. Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação arbórea do cerrado *sensu stricto* da Chapada Pratinha, Brasil. **Acta Bot. Bras.**, v. 6, p. 27-46, 1993.

FELFILI, J. M. et al. Projeto biogeografia do bioma cerrado: Vegetação e solos. **Cad. Geoc.**, v. 12, p. 75-166, 1994.

FELFILI, J. M. et al. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado *sensu stricto* da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. **Rev. Bras. Botânica**, v. 22, p 83-90, 1999.

FELIPE, A. M. et al. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine hHerpesvirus. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 29, p. 1092-1095, 2006.

FERREIRA, D.; SLADE, D. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles. **Nat. Prod. Rep.**, v. 19, p. 517-541, 2002.

- FOLGIERO, V. et al. Induction of ErbB-3 expression by $\alpha 6 \beta 4$ integrin contributes to tamoxifen resistance in ERb1-negative breast carcinomas. **PLoS ONE**, v. 3, p. e1592. doi:10.1371/journal.pone.0001592, 2008.
- FOO, L. Y.; LU, Y. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. **Food Chem.**, v 64, p. 511-518, 1999.
- FURUYA, N. et al. The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppression. **Autophagy**, v. 1, p. 46-52, 2005.
- GARTEL, A.L.; RADHAKRISHNAN, S.K. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. **Cancer Res.**, v. 65, p. 3980-3985, 2005.
- GOODIN, M. G.; ROSENGREN, R. J. Epigallocatechin gallate modulates CYP450 isoforms in the female Swiss-Webster mouse. **Toxicol. Sci.**, v. 76, p. 262-270, 2003.
- HOLETZ, F. B. et al. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 397-401, 2005.
- HOUGHTON, P. et al. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, p. 377-387, 2007.
- HSIEH, T.C.; WU, J.M. Suppression of cell proliferation and gene expression by combinatorial synergy of EGCG, resveratrol and gamma-tocotrienol in estrogen receptor-positive MCF-7 breast cancer cells. **Int. J. Oncol.**, v. 33, p. 851-889, 2008.
- HUANG, Y.; SHEIKH, M. S. TRAIL death receptors and cancer therapeutics. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v 1, p 284-289, 2007.
- INCA. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa-2010-incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=5>. Acesso em: 02 dez. 2009.
- ISHIDA, K. et al. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 58, p. 942-949, 2006.

JO, E. H. et al. Chemopreventive properties of the ethanol extract of chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis*) root: induction of apoptosis and G1 cell cycle arrest in MCF-7 human breast cancer cells. **Cancer Let.**, v. 230, p. 239-247, 2005.

KERR, J. F.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013-2026, 1994.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.

KIJIMA, I. et al. Grape seed extract is an aromatase inhibitor and a suppressor of aromatase expression. **Cancer Res.**, v. 66, p. 5960-5967, 2006.

KOLECKAR, V. et al. Condensed and hydrolysable tannins as antioxidants influencing the health. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 8, p. 436-447, 2008.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; BRENNER, C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. **Physiol. Rev.**, v. 87, p. 99-163, 2007.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. **Cell Death Differ.**, v. 16, p. 3-11, 2009.

KOZIKOWSKI, A. P. et al. Studies in polyphenol chemistry and bioactivity. 4.(1) Synthesis of trimeric, tetrameric, pentameric, and higher oligomeric epicatechin-derived procyanidins having all-4beta,8-interflavan connectivity and their inhibition of cancer cell growth through cell cycle arrest. **J. Org. Chem.**, v. 68, p. 1641-1658, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-6855, 1970.

LEVENSON, A. S.; JORDAN, V. C. MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Res.**, v. 57, p. 3071-3078, 1997.

LEVINE, B.; KROEMER, G. Autophagy in the pathogenesis of disease. **Cell**, v. 132, p. 27-42, 2008.

LEVINE, B.; KLIONSKY, D. J. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. **Dev. Cell**, v. 6, p. 463-477, 2004.

LIANG, X. H. et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin1. **Nature**, v. 402, p. 672-676, 1999.

LIMA, A. R. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 531-536, 2006.

LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O.; DE SOUZA JR, P. T. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for antiinflammatory activity. **Phytoth. Res.**, v. 12, p. 218-220, 1998.

LIM, Y. C. et al. Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. **Eur. J. Cancer**, v. 42, p. 3260-3266 2006.

LOGUE, S. E.; MARTIN, S. J. Caspase activation cascades in apoptosis. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 36, p. 1-9, 2008.

LORENZO, H. K.; SUSIN, S. A. Therapeutic potential of AIF-mediated caspase-independent programmed cell death. **Drug Resist. Updat.**, v. 10, p 235-255, 2007.

LUO, S.; RUBINSZTEIN, D. C. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL. **Cell Death Differ.**, 2009, doi:10.1038/cdd.2009.121.

MACEDO, M.; FERREIRA, A. R. Plantas medicinais usadas para tratamentos dermatológicos, em comunidades da Bacia do Alto Paraguai, Mato Grosso. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, p. 40-44, 2004.

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

MASHIMA, T.; TSURUO, T. Defects of the apoptotic pathway as therapeutic target against cancer. **Drug Resist. Updat.**, v. 8, p. 339-343, 2005.

- MATTSON, M. P. Apoptosis in neurodegenerative disorders. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 1, p. 120-129, 2000.
- MELLO, J. C. P.; DE PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, p. 807-813, 1996a.
- MELLO, J. C. P.; DE PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Prorubinetidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 42, p. 857-862, 1996b.
- MELLO, J. C. P.; DE PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. a dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 1105-1107, 1999.
- MURATA, M. et al. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 37, p. 793-802, 2004.
- NANDAKUMAR, V.; SINGH, T.; KATIYAR, S. K. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. **Cancer Lett.**, v. 269, p. 378-387, 2008.
- PEDRO, M. et al. Effects of natural prenylated flavones in the phenotypical ER (+) MCF-7 and ER (-) MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Toxicol. Lett.**, v. 164, p. 24-36, 2006.
- PANIZZA, S. et al. *Stryphnodendron barbadetiman* (Vellozo) Martius: teor em tanino na casca e sua propriedade cicatrizante. **Rev. Ciênc. Farmac.**, v. 10, p. 101-106, 1988.
- PEINTINGER, F. et al. Hormone receptor status and pathologic response of HER2-positive breast cancer treated with neoadjuvant chemotherapy and trastuzumab. **Ann. Oncol.**, v. 19, p. 2020-2025, 2008.
- PESSOA, E.C. et al. Avaliação da resposta à quimioterapia primária em amostra de mulheres brasileiras com tumores de mama localmente avançados. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, v. 29, p. 18-26, 2007.
- PETERSON, G. L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal. Biochem.**, v. 83, p. 346-356, 1977.

POZO-GUISADO, E. et al. The antiproliferative activity of resveratrol results in apoptosis in MCF-7 but not in MDA-MB-231 human breast cancer cells: cell-specific alteration of the cell cycle. **Biochem. Pharmacol.**, v. 64, p. 1375-1386, 2002.

RAMLJAK, D. et al. Pentameric procyanidin from *Theobroma cacao* selectively inhibits growth of human breast cancer cells. **Mol. Cancer Ther.**, v. 4, p. 537-546, 2005.

REBECCA, M. A. et al. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringens*. **J. Ethnopharmacol.**, v. 83, p. 101-104, 2002.

ROSENGREN, R. J. Catechins and the treatment of breast cancer: Possible utility and mechanistic targets. **IDrugs**, v. 6, p. 1073-1178, 2003.

SAEKI, T. et al. Efficacy and toxicity of vinorelbine with doxorubicin/cyclophosphamide combination chemotherapy in a phase I-II study for advanced or recurrent breast cancer patients. **Breast Cancer**, v. 13, p. 159-165, 2006.

SAITO, A. et al. Versatile synthesis of epicatechin series procyanidin oligomers, and their antioxidant and DNA polymerase inhibitory activity. **Tetrahedron**, v. 65, p. 7422-7428, 2009.

SANT'ANA, E. M. C. et al. Angiogenesis and growth factor modulation induced by alternagin C, a snake venom disintegrin-like, cysteine-rich protein on a rat skin wound model. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 479, p. 20-27, 2008.

SANTOS, C. A. M.; TORRES, K. R.; LEONART, R. **Plantas medicinais** (Herbarium, Flora et Scientia). Curitiba: Scientia et Labor, p. 39, 1987.

SANTOS, S. C. et al. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 552-556, 2006.

SEERAM, N. P.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G. Inhibition of proliferation of human cancer cells and cyclooxygenase enzymes by anthocyanidins and catechins. **Nutr. Cancer**, v. 46, p. 101-106, 2003.

SMUC, T.; RIZNER, T. L. Expression of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases and other estrogen-metabolizing enzymes in different cancer cell lines. **Chem. Biol. Interact.**, v. 178, p. 228-233, 2009.

SONNE-HANSEN, K.; LYKKESFELDT, A. E. Endogenous aromatization of testosterone results in growth stimulation of the human MCF-7 breast cancer cell line. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v. 93, p. 25-34, 2005.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p. 4350-4354, 1979.

VALCIC, S. et al. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. **Anticancer Drugs**, v. 7, p. 461-468, 1996.

VALLE, J.C. **Câncer de mama locorregional avançado**, Rio de Janeiro: Medsi. p. 221, 1999.

WILLIAMSON, G.; MANACH, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 81, p. 243S-255S, 2005.

WON, K. Y. et al. Clinicopathologic correlation of beclin-1 and bcl-2 expression in human breast cancer. **Hum. Pathol.**, v. 41, p. 107-112, 2010.

YAMASHIRO, H.; TOI, M. Update of evidence in chemotherapy for breast cancer. **Int. J. Clin. Oncol.**, v. 13, p. 3-7, 2008.

YANG, C. S. et al. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 52, p. S139-151, 2008.

ZENG, X.; OVERMEYER, J. H.; MALTESE, W. A. Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. **J. Cell Sci.**, v. 119, p. 259-270, 2006.

ARTIGO**Phytotherapy Research****Cytotoxic and Apoptotic Effects of Barbatimão Leaf Phytochemicals on Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB-435 Cells**

Running title: Cytotoxicity of barbatimão leaf fraction

Ana Paula de Lima Sabino, Lívia Mara Santos, Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa*

Departamento de Ciências Biológicas e da Terra, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 37130-000, Brazil.

*Corresponde to: Dra. Cibele Marli Cação Paiva Gouvêa
Universidade Federal de Alfenas
Departamento de Ciências Biológicas e da Terra
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
Alfenas, MG, Brazil
37130-000
E-mail: cibelegouvea@hotmail.com
Tel: 55-35-32991419
Fax: 55-35-32991067

ABSTRACT

The cytotoxic and apoptotic effects of a fraction isolated from *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) leaves were evaluated in two human breast cancer cell lines, the ER (+) MCF-7 and the ER (-) MDA-MB-435 cells. Identification analysis revealed that the fraction is composed by gallic acid, procyanidin dimer B1 (main component) and (-)-epicatechin-3-*O*-gallate (ECG). The SRB assay revealed that the fraction decreased cell viability. The morphological analysis showed cell alterations after treatment that includes rounding-up, shrinkage, chromatin condensation and plasma membrane blebbing. The area of MCF-7 colonies and MDA-MB-435 cells reduced significantly ($p < 0.001$) upon treatment. The fraction treatment increased the expression of Bax, caspase-9, active caspase-3, caspase-8, LC-3 and beclin-1 and decreased the Bcl-2, caspase-3 and pro-caspase-8 expression. The results indicate that the fraction is cytotoxic to both cell lines and induces apoptosis with autophagy. In view of cancer therapy, apoptosis and autophagy could be important to prevent tumorigenesis, tumor progression and to enhance the effects of anti-cancer therapies. Barbatimão leaf would be a valuable resource of bioactive phytochemicals.

Keywords: *Stryphnodendron adstringens*; Procyanidin B1; ECG; breast tumor; autophagy; programmed cell death.

INTRODUCTION

Stryphnodendron adstringens (Martius) Coville (Fabaceae) is a native tree that grows in open fields and savannah regions in Brazil, where it is popularly known as barbatimão (Felfili *et al.*, 1999). The commonly used part is the bark, which has a long history of use as a remedy in traditional medicine. Studies with barbatimão extracts have demonstrated that it possesses anti-inflammatory (Lima *et al.*, 1998) and antiulcerogenic activities (Audi *et al.*, 1999). There also are reports that barbatimão extracts have wound healing (Lopes *et al.*, 2005), antioxidant (Lopes *et al.*, 2005; Sanches *et al.*, 2005), antiviral (Felipe *et al.*, 2006), antiprotozoa (Holetz *et al.*, 2005), and antimicrobial effects (Sanches *et al.*, 2005; Ishida *et al.*, 2006). Data from chemical analysis demonstrated that the main constituents in barbatimão are flavan-3-ol phenolic compounds derivatives that are responsible for the herb's variety of pharmacological activities (Mello *et al.* 1996a; 1996b; 1999). Despite the great number of different reported activities of barbatimão extracts, there is no report on its anticancer effect.

Breast cancer is one of the most common malignant tumors worldwide, and is the first leading cause of death from cancer in women. Therefore, we chose two phenotypically different human breast carcinoma cell lines as model to explore the effects of a barbatimão leaf fraction containing procyanidin dimer B1 and (-)-epicatechin-3-*O*-gallate on cancer cell growth. The fraction was cytotoxic and induced apoptosis with autophagy of MCF-7 and MDA-MB-435 human breast carcinoma cells.

MATERIALS AND METHODS

Extraction and fractionation of plant material. This procedure was carried out as described by Lima *et al.* (2006), with minor modifications. Leaves of *Stryphnodendron adstringens* (Martius) Coville was collected in Alfenas (Minas Gerais State, Brazil) in Julho/2007. A voucher specimen (N. 196) is deposited at the Herbarium of the Universidade Federal de Alfenas (Brazil). The dried leaves were pulverized, extracted by homogenation with acetone/water (7:3) and low pressure evaporated at 30° C. The obtained concentrated aqueous solution was extracted with ethyl acetate (1:1) and the remaining aqueous solution was lyophilized and fractionated (Rösch *et al.*, 2004). Two mg of the lyophilized extract was dissolved in 10% aqueous methanol and fractionated on a 40 cm x 2 cm i.d. Sephadex LH-20 column (Pharmacia, Uppsala, Sweden). The column was eluted by increasing the methanol content of the eluent from 10 to 100% (v/v) in increments of 10% (100 mL each) followed by 2 x 100 mL fractions of acetone-water (70:30, v/v). The proanthocyanidin content of the fractions was monitored using thin-layer chromatography (TLC) system using 20 cm x 20 cm silica gel plates (Merck) and the spots were visualized with vanillin reagent. The fraction eluted with 100% methanol showed the highest content of proanthocyanidins, it was used in the experiments and referred as "fraction".

HPLC analysis. A sample of the fraction (2 mg) was mixed with phloroglucinol (2 mg) and 1 mL of 1% concentrated HCl in ethanol was added. After standing for 1 h at ambient temperature the reaction products were examined by HPLC (Foo and Loo, 1999). The HPLC analysis was performed on a Shimadzu high performance liquid chromatography LC-20AD system equipped with a diode array detector, vacuum degasser, quaternary pump, auto-sampler and thermostated column compartment. After filtration on Millipore filter paper (0.22 µm), 20 µL fraction after

phloroglucinol degradation were injected on a Shim-pack Shimadzu RP-18 column (4.5 μm pore size, 4.6 mm i.d. x 150 mm) and eluted with a flow rate of 0.5 mL/min with column temperature set at 30° C. The following solvents were used: A [acetic acid/water (2/98 v/v)] and B [acetic acid/acetonitrile/water (2/20/78 v/v)]. The gradient applied was 100 to 80% A for 20 min and then 100% B for 60 min followed by washing and reconditioning for 10 min. The products were detected by absorption at 280 nm. Gallic acid, (-)-epicatechin-3-*O*-gallate and procyanidin dimer B1 were identified as fraction constituents by comparison with authentic standards.

Cell culture. The two human breast cancer cell lines used, ER (+) MCF-7 (CR117) and ER (-) MDA-MB-435 (CR119), were provided by the Rio de Janeiro Cell Bank (Brazil). Cells were grown as monolayers and maintained in RPMI-1640 medium supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin and 100 $\mu\text{g/mL}$ streptomycin, at 37° C in a humidified atmosphere with 5% CO_2 .

Cell treatment. Viable cells were counted using Trypan blue excluding method in a hemocytometer. The exponential growing MCF-7 and MDA-MB-435 cells were obtained by plating 1×10^5 cells/mL in 24-well microtiter plates, followed by 24 h incubation. After that the cells were treated with six different concentrations (5, 10, 20, 40, 80 and 160 $\mu\text{g/mL}$) of fraction. Cyclophosphamide (CP; Sigma) was used as positive control (550 $\mu\text{g/mL}$). The lyophilized fraction and CP were dissolved in sterilized water, 10 μL solutions were added to cell cultures and the plates were incubated for another 24 h, at 37° C. Ten μL sterilized water were added to the control cells

Sulphorhodamine B assay. For determination of the dose response cytotoxic effect of the fraction, the SRB protein staining assay was used (Houghton *et al.*, 2007). The effect on cell viability was estimated by the reduction in the net increase of protein in the cells over vehicle control during fraction incubation and the IC_{50} was calculated by GraphPad Prism version 4.00 for Windows.

Cell morphologic analysis. After treatment, cells were fixed with 4% buffered paraformaldehyde and stained with hematoxylin-eosin. Slides were mounted in Entellan and observed under a light microscope.

Western blotting. Total proteins were extracted (Lim *et al.*, 2006) and quantified (Peterson, 1977). Thirty micrograms of protein were denatured by boiling in sample buffer at 96° C for 5 min, then electrophoresed using 12% SDS-PAGE gels (Laemmli, 1970) and the separated proteins were transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF, Bio-Rad) membranes. Membranes were heated in an autoclave for 20 min, blocked with blocking buffer containing 5% non-fat dry milk in TNT buffer (25 mM Tris-Cl, pH 8.0, 125 mM NaCl and 0.1% Tween-20) for 1 h at room temperature. Next, the membranes were incubated with specific primary antibodies, including anti- Bax, Bcl-2, caspases-9, 3 and 8, active caspase-3, pro-caspase 8, LC-3, beclin-1 and β -actin (Sigma) and proteins were detected (Sant'Ana *et al.*, 2008).

Statistical analysis Data were analyzed using ANOVA with post hoc analysis by Tukey test, when $p < 0.05$. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD).

RESULTS

The HPLC analysis revealed that the fraction is composed by gallic acid, procyanidin dimer B1 (epicatechin-(4 β \rightarrow 8)-catechin) and (-)-epicatechin-3-*O*-gallate (ECG) and it was cytotoxic to MCF-7 and MDA-MB-435 cells, reducing cell viability estimated by the SRB protein staining assay in concentrations higher than 40 $\mu\text{g/mL}$ for both cell lineages (Fig. 1). The IC_{50} for MCF-7 cells was $76.31 \pm 0.95 \mu\text{g/mL}$ and for MDA-MB-435 was $186.83 \pm 1.43 \mu\text{g/mL}$, indicating that the fraction is more effective against MCF-7 cells.

The treatment with the fraction resulted also in cell morphology alterations that include cell shrinkage, plasma membrane blebbing and chromatin condensation. MCF-7 cells that grow as asymmetric colonies, after the fraction treatment exhibited a round shape and isolated growth pattern and the MDA-MB-435 cells became pronouncedly fusiform (Fig. 2). The area of the MCF-7 cell colonies and MDA-MB-435 individual cells decreased significantly ($p < 0.001$) after fraction treatment with concentrations higher than 10 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 3A) and 30 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 3B) respectively to MCF-7 and MDA-MB-435 cells. The DE_{50} for MCF-7 cells was 12.35 $\mu\text{g/mL}$ and for MDA-MB-435 was 34.43 $\mu\text{g/mL}$. This assay also confirmed that the fraction is more cytotoxic to MCF-7 than to MDA-MB-435.

The protein expression analysis revealed that pro-apoptotic proteins increased while anti-apoptotic proteins decreased after the fraction treatment of the cells (Fig. 4A). The caspases are considered important cell markers of apoptosis. The expression of caspase-9, active caspase-3 and caspase-8 increased significantly ($p < 0.001$) in both cells treated with the fraction. By the other hand the level of caspase-3 ($p < 0.001$) and pro-caspase-8 ($p < 0.01$) decreased significantly, suggesting that apoptosis was induced. The observed deregulation of Bax and Bcl-2 expression, estimated by the ratio Bax/Bcl-2 (5.11 ± 0.05 for MCF-7 and 7.71 ± 0.06 for MDA-MB-435 cells) also indicates apoptotic cell death (Fig. 4B).

The proteins LC-3 and beclin-1 are considered reliable autophagy cell markers and the expression of LC-3 increased significantly ($p < 0.001$) in both treated cell lines while the beclin-1 expression increased significantly ($p < 0.05$) in treated MDA-MB435 cells, indicating that autophagy was induced upon treatment.

DISCUSSION

In the present work we evaluated the cytotoxic and apoptotic effect of a fraction isolated from barbatimão leaves on human breast cancer cells MCF-7 (ER+) and MDA-MB-435 (ER-) that are phenotypically distinct and exhibited different proliferative potential and drug response. The cell treatment with the fraction resulted in cell viability decreasing, morphology alterations and cell death, being the MCF-7 more responsive to the treatment than MDA-MB-435 cells.

As the fraction induced some morphological characteristics of apoptosis, but not internucleosomal DNA fragmentation (data not shown) we next investigated the expression of key proteins involved in apoptosis and autophagy. The results showed that the treatment with the fraction induced apoptosis in both cell lines due to a deregulation of the Bcl-2 proteins family, Bax (pro-apoptotic) and Bcl-2 (anti-apoptotic). It is well established that Bax increasing and Bcl-2 decreasing stimulates the intrinsic apoptotic pathway. To confirm that we investigated the expression of caspases linked to that pathway.

We found that the treatment increased caspase-9, active caspase-3 and caspase-8, and decreased caspase-3 and pro-caspase-8 expression. These are key enzymes in the apoptosis

mediated by the mitochondrial pathway. In this pathway Bax is translocated to the internal mitochondrial membrane and causes permeabilization and swelling of the mitochondria, with cytochrome c exposition to the cytosol and it forms with caspase-9 the apoptosome. The apoptosome activates caspase-3, that turn into its active form, inducing the pro-caspase-8 cleavage. It is important to point out that in the extrinsic pathway or death receptor ligand-mediated apoptosis, the expression of caspase-9 is not increased (Logue and Martin, 2008).

It is worth to note that some cells exhibited cytoplasmic vacuoles, what lead us to investigate if autophagy was also in course and we found that LC-3 was overexpressed in both treated cell lines and beclin-1 only in MDA-MB-435 cells. As these proteins are essential for initial stages of the autophagic process (Fader and Colombo, 2009), our finds indicate that the fraction treatment also induced autophagy, and could be useful for breast tumorigenesis prevention and treatment.

Autophagy is an evolutionarily conserved process, by means of what cytoplasm constituents are degraded via endosomal-lysosomal system, participating in organelle turnover and in the bioenergetic management of starvation. However, the role of autophagy in cancer treatment is a matter of debate and its definitive role in human tumorigenesis remains unclear. Autophagy may prevent a normal cell to become a malignant cell by degrading damaged organelles and thereby reduce cellular stress, or by degrading specific proteins that enhance tumor formation. It also may kill the developing premalignant cells and thereby prevent tumorigenesis (De Bruin and Medema, 2008; Chen and Karantza-Wadsworth, 2009). Defects in the autophagic process are clearly related to breast tumorigenesis and tumor progression, due to monoallelic beclin-1 deletion (Won *et al.*, 2010).

The fraction tested in the present work was biologically active against breast tumor cells and the phytochemicals, namely procyanidin dimer B1 and ECG, may be responsible for the fraction activity. Actis-Goretta *et al.* (2008) found that procyanidin dimer B1 was cytotoxic to MCF-7 and MDA-MB-435 cells, as found in the present work. The introduction of two gallic acid residues to the procyanidin dimer B1 increased its cytotoxicity and the MCF-7 cells were more sensitive than MDA-MB-435 cells. The procyanidin dimer B1 possesses other demonstrated biological effects such as antioxidant (Faria *et al.*, 2006) and anti-inflammatory that could also account for the effect of the isolated fraction from barbatimão leaves observed in the present work.

The isolated fraction is also composed by ECG. It has been demonstrated that catechins decrease breast tumor cells proliferation *in vitro* and in rodents. Valcic *et al.* (1996) isolated six different catechins from the green tea and ECG was antiproliferative for MCF-7 cells, with IC_{50} of 154.8 $\mu\text{g/mL}$, a dose higher than that obtained in the present work. Chisholm *et al.* (2004) demonstrated that 20 μM ECG was cytotoxic and induced apoptosis on MDA-MB-231 cells. Goodin and Rosengren (2003) demonstrated that ECG had no effect on aromatase activity and it is not an $ER\alpha$ antagonist. ECG can induce the expression of suppressor tumor protein (Cho *et al.*, 2007) and apoptosis (Baek *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2006).

In the present work we demonstrated that a fraction isolated from barbatimão leaves is cytotoxic to MCF-7 (ER+) and MDA-MB-435 (ER-) cells and induces apoptosis with autophagy of the cells. Apoptosis and autophagy cell death are highly genetically controlled processes. The programmed cell death plays an essential role as a protective mechanism against tumorigenesis and tumor progression, by removing damaged, transformed or malignant cells. Induction of apoptosis is a desirable mode of action of a chemotherapeutic or a chemopreventive agent for cancer control and treatment. The fraction isolated from barbatimão leaves seems to be a promising source of phytochemicals to improve the breast cancer treatment and prevention.

Acknowledgments. This work was supported by a grant from FAPEMIG (1305-06) and FINEP CT-INFRA (0106052800). The authors are grateful to Capes and UNIFAL-MG for the fellowship of A.P.L. Sabino and L.M. Santos.

REFERENCES

- Actis-Goretta L, Romanczyk LJ, Rodriguez CA *et al.* 2008. Cytotoxic effects of digalloyl dimer procyanidins in human cancer cell lines. *J Nutr Biochem* **19**: 797-808.
- Audi EA, Toledo DP, Peres PG *et al.* 1999. Gastric antiulcerogenic effects of *Stryphnodendron adstringens* in rats. *Phytother Res* **13**: 264-266.
- Baek SJ, Kim JS, Jackson FR *et al.* 2004. Epicatechin gallate-induced expression of NAG-1 is associated with growth inhibition and apoptosis in colon cancer cells. *Carcinogenesis* **25**: 2425-2432.
- Chen N, Karantza-Wadsworth V. 2009. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1793**: 1516-1523.
- Chisholm K, Bray BJ, Rosengren RJ. 2004. Tamoxifen and epigallocatechin gallate are synergistically cytotoxic to MDA-MB-231 human breast cancer cells. *Anticancer Drugs* **15**: 889-897.
- Cho K-N. 2007. Green tea catechin (-)-epicatechin gallate induces tumour suppressor protein ATF3 via EGR-1 activation. *Eur J Cancer* **43**: 2404-2412.
- De Bruin EC, Medema JP. 2008. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treat Rev* **34**: 737-749.
- Fader CM, Colombo MI. 2009. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* **16**: 70-78.
- Faria A, Calhau C, De Freitas V *et al.* 2006. Procyanidins as antioxidants and tumor cell growth modulators. *J Agric Food Chem* **54**: 2392-2397.
- Felfili JM, Silva Júnior MC, Dias BJ *et al.* 1999. Estudo fenológico de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville no cerrado *sensu stricto* da Fazenda Água Limpa no Distrito Federal, Brasil. *Rev Bras Botânica* **22**: 83-90.
- Felipe AMM, Rincão VP, Benati FJ *et al.* 2006. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on poliovirus and bovine herpesvirus. *Biol Pharm Bul* **29**: 1092-1095.
- Foo LY, Lu Y. 1999. Isolation and identification of procyanidins in apple pomace. *Food Chem* **64**: 511-518.
- Goodin MG, Rosengren RJ. 2003. Epigallocatechin gallate modulates CYP450 isoforms in the female Swiss-Webster mouse. *Toxicol Sci* **76**: 262-270.
- Holetz FB, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP *et al.* 2005. Biological effects of extracts obtained from *Stryphnodendron adstringens* on *Herpetomonas samuelpessoai*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **100**: 397-401.
- Ishida I, De Mello JC, Cortez DAG *et al.* 2006. Influence of tannins from *Stryphnodendron adstringens* on growth and virulence factors of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* **58**: 942-949.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

- Lima AR, Barbosa VC, Santos Filho PR *et al.* 2006. Avaliação *in vitro* da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. *Rev Bras Farmacogn* **16**: 531-536.
- Lima JCS, Martins DTO, De Souza PT. 1998. Experimental evaluation of stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville for anti-inflammatory activity. *Phytother Res* **12**: 218-220.
- Lim YC, Lee SH, Song MH *et al.* 2006. Growth inhibition and apoptosis by (-)-epicatechin gallate are mediated by cyclin D1 suppression in head and neck squamous carcinoma cells. *Eur J Cancer* **42**: 3260-3266.
- Logue SE, Martin SJ. 2008. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* **36**: 1-9.
- Lopes GC, Sanches ACC, Nakamura CV *et al.* 2005. Influence of extracts of *Stryphnodendron polyphyllum* Mart. and *Stryphnodendron obovatum* Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. *J Ethnopharmacol* **99**: 265-272.
- Mello JCP, Petereit F, Nahrstedt A. 1996. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* **41**: 807-813.
- Mello JCP, Petereit F, Nahrstedt A. 1996. Prorobinetinidins from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* **42**: 857-862.
- Mello JCP, Petereit F, Nahrstedt A. 1999. A dimeric proanthocyanidin from *Stryphnodendron adstringens*. *Phytochemistry* **51**: 1105-1107.
- Peterson GL. 1977. A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal Biochem* **83**: 346-356.
- Rösch D, Mügge C, Fogliano V *et al.* 2004. Antioxidant oligomeric proanthocyanidins from sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) Pomace. *Agric Food Chem* **52**:6712-6718.
- Sanches ACC, Lopes GC, Nakamura CV *et al.* 2005. Antioxidant and antifungal activities of extracts and condensed tannins from *Stryphnodendron obovatum* Benth. *Rev Bras Cienc Farmac* **41**: 101-107.
- Sant'Ana EMC, Gouvea CMCP, Nakaie CR *et al.* 2008. Angiogenesis and growth factor modulation induced by alternagin C, a snake venom disintegrin-like, cysteine-rich protein on a rat skin wound model. *Arch Biochem Biophys* **479**: 20-27.
- Valcic S, Timmermann BN, Alberts DS *et al.* 1996. Inhibitory effect of six green tea catechins and caffeine on the growth of four selected human tumor cell lines. *Anticancer Drugs* **7**: 461-468.**
- Won KY, Kim GY, Kim YW *et al.* 2010. Clinicopathologic correlation of beclin-1 and bcl-2 expression in human breast cancer. *Hum Pathol* **41**: 107-112.

Figure legends

Fig. 1. Effect of the fraction from barbatimão leaves on the cell viability estimated by the sulphorodamine B assay. Cells were treated with 550 µg/mL cyclophosphamide (CP) and with 5, 10, 20, 40, 80 and 160 µg/mL fraction, for 24 h. Results are the mean ± SD of three independent experiments (* p < 0,05).

Fig. 2. Morphology of MCF-7 (**A**) and MDA-MB-435 (**B**) cells. Light microscopy of hematoxylin-eosin stained untreated control (C) and treated with 550 µg/mL cyclophosphamide (CP) and 5 to 160 µg/mL fraction (F5 - F160), for 24 h. Scale bar = 1 µm.

Fig. 3. Area of MCF-7 colonies (**A**) and MDA-MB-435 cells (**B**) untreated control (C) and treated with 550 µg/mL cyclophosphamide (CP) and 5 to 160 µg/mL fraction (F5 - F160), for 24 h. Results are the mean ± SD of three independent experiments (* p < 0.001).

Fig. 4. Protein expression in MCF-7 and MDA-MB-435 cells (**A**) untreated control (C) and treated for 24 h with 550 µg/mL cyclophosphamide (CP) and 40 µg/mL fraction (F40). The ratio Bax/Bcl-2 increased indicating apoptosis (**B**).