

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Departamento de Genética, Ecologia e Evolução**

**Programa de Pós-Graduação em Genética**

Ana Carolina Rodrigues de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO DA AÇÃO ANTITUMORAL  
DO EXTRATO DO FUNGO *Trichoderma asperelloides***



Belo Horizonte

2023

Ana Carolina Rodrigues de Oliveira

**CARACTERIZAÇÃO DA AÇÃO ANTITUMORAL  
DO EXTRATO DO FUNGO *Trichoderma asperelloides***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do Instituto Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Genética

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Abalen  
Martins Dias

Belo Horizonte

2023

043

Oliveira, Ana Carolina Rodrigues de.

Caracterização da ação antitumoral do extrato do fungo *Trichoderma asperelloides* [manuscrito] / Ana Carolina Rodrigues de Oliveira. – 2023. 127 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Abalen Martins Dias.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Trichoderma. 3. Anticarcinógenos. 4. Citotoxinas. I. Dias, Adriana Abalen Martins. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
 Instituto de Ciências Biológicas  
 Programa de Pós-Graduação em Genética

### ATA DE DEFESA DE TESE

ATA DA DEFESA DE TESE	<b>182/2023</b>
Ana Carolina Rodrigues de Oliveira	<b>Entrada: 2º/2019</b> <b>CPF: 103.367.876-77</b>

Às quatorze horas do dia **21 de dezembro de 2023**, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Caracterização da ação antitumoral do extrato do fungo *Trichoderma asperelloides***", requisito para obtenção do grau de Doutora em **Genética**. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Adriana Abalen Martins Dias**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	CPF	Indicação
Adriana Abalen Martins Dias	UFMG	544.099.346-00	APROVADA
Luciana Maria Silva	FUNED	977.664.456-20	APROVADA
Thaise Gonçalves de Araújo	UFU	057.893.356-08	APROVADA
Cláudia do Ó Pessoa	UFC	520.891.184-15	APROVADA
Claudiana Lameu	USP	218.829.428-92	APROVADA

Pelas indicações, a candidata foi considerada: **APROVADA**

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

**Belo Horizonte, 21 de dezembro de 2023.**

Adriana Abalen Martins Dias – Orientadora (UFMG)

Luciana Maria Silva (FUNED)

Thaise Gonçalves de Araújo (UFU)

Cláudia do Ó Pessoa (UFC)

Claudiana Lameu (USP)

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Abalen Martins Dias, Professora do Magistério Superior**, em 21/12/2023, às 18:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudiana Lameu Gomes, Usuária Externa**, em 22/12/2023, às 09:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Claudia do Ó Pessoa, Usuária Externa**, em 22/12/2023, às 14:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thaise Gonçalves de Araújo, Usuária Externa**, em 26/12/2023, às 11:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Maria Silva Lopes, Usuário Externo**, em 26/12/2023, às 21:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **2918533** e o código CRC **B09466C0**.

Dedico este trabalho a todos os cientistas incansáveis, cuja dedicação à ciência persistiu diante de inúmeras adversidades e ceticismo. Em especial, expresso minha gratidão àqueles que, durante a pandemia da COVID-19, se dedicaram ao desenvolvimento de vacinas e terapias.

## AGRADECIMENTOS

Repleta de gratidão, expresso meus agradecimentos, acima de tudo, a Deus por guiar meus passos e me fortalecer diante todas as minhas fragilidades e tribulações ao longo dessa jornada e a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desse projeto.

À Nossa Senhora, em virtude de sua intercessão e proteção.

Aos meus pais, Maria José e Denilson, cujo amor incondicional se tornou minha âncora. Agradeço pela educação e pela estrutura familiar que me possibilitaram alçar voos cada vez mais altos. Por serem um exemplo de perseverança e apoio constante.

Aos meus irmãos, Ana Paula e Mateus, fundamentais em minha vida. Agradeço à minha irmã, Ana Paula, por sua amizade constante, por sempre acreditar em mim e por estar ao meu lado, incentivando-me e pronta para ajudar. Ao meu irmão Mateus, que ilumina meus dias com seu carinho, alegria e luz, tornando-os ainda mais especiais.

Aos demais amigos e familiares, especialmente, minha avó Sallete e tia Efigênia, exemplos de humildade, fé e generosidade. Obrigada pelas orações, carinho e torcida constante.

Às minhas amigas, Ana Flávia, Marcela, Thamara, Flavinha, Vanessa, Nayara, Deise, Nayele e Joyce, gratidão por serem minha fonte de descontração, me proporcionando momentos de risadas e por me encorajar em todas as minhas inseguranças.

Expresso minha sincera gratidão à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Abalen, um exemplo de professora e pesquisadora, pela oportunidade e acolhimento em seu laboratório. Meus agradecimentos se estendem pelos inestimáveis ensinamentos, orientações, amizade, constante incentivo e pela incansável dedicação e disponibilidade para contribuir para minha formação. Tenho imensa admiração, carinho e respeito por essa mulher inspiradora.

Aos colegas de equipe do Laboratório de Inflamação e Câncer (LINC), Flávia, Nayara, Diogo, Izabela, Ana Flávia, Áudria e Rillery, por compartilharem não apenas bancadas e conhecimento, mas também momentos de angústia e descontração. Obrigada pelo incentivo, troca de experiências, inestimável ajuda e amizade durante essa caminhada.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Patricio e à doutoranda Ingrid Amélia do Departamento de Química do CEFET-MG pela colaboração na caracterização da composição do extrato.

Ao Jamil Silvano, do Laboratório de Físico- Química de Proteínas e Enzimologia, pela condução do fracionamento do extrato.

Agradeço a todos do Laboratório de Vírus pela confiança e pelo acolhimento em seu espaço, permitindo pleno acesso à infraestrutura fundamental para a realização dos experimentos de cultivo celular.

À equipe da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elaine Fagundes pelo treinamento e ajuda das análises de citometria de fluxo.

Agradeço ao Laboratório de Micologia por disponibilizar espaço para o cultivo do fungo.

Ao Prof. Dr. Anderson Miyoshi por disponibilizar a estrutura do Laboratório TecnoGen.

Agradeço à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jane Lima e ao doutorando Uener pelo apoio constante e por estarem sempre à disposição para auxiliar em todas as dúvidas.

Aos membros da banca por gentilmente aceitarem contribuir e fazerem parte da minha banca de defesa desta tese.

À UFMG por proporcionar uma formação profissional de qualidade.

A todos os funcionários do ICB e UFMG.

Às agências de fomento, FAPEMIG, CNPQ e ao Programa de Pós-Graduação em Genética pelo auxílio financeiro que permitiu o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, à CAPES, financiadora da minha bolsa.

Por fim, àqueles que contribuíram para meu aprendizado, a todos meu sincero e carinhoso MUITO OBRIGADA!

*“Nada na vida deve ser temido, somente compreendido. Agora é hora de compreender mais para temer menos.”*

*- Marie Curie*

## RESUMO

O câncer é uma doença multifatorial que constitui uma das principais causas de mortalidade global. No tratamento, são comuns desafios como a falta de resposta, o desenvolvimento de resistência, ocorrência de recidivas e de efeitos adversos. A descoberta de novas substâncias antitumorais para alternativas terapêuticas é essencial para melhorar a eficácia e especificidade, superar resistências e permitir uma abordagem mais personalizada. Compostos ativos com propriedades farmacológicas têm sido extraídos com êxito de fontes naturais, incluindo plantas e microrganismos. O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito citotóxico do extrato bruto etanólico do fungo *T. asperelloides* (ExtTa) sobre linhagens celulares tumorais e sua interação com quimioterápicos. Nos ensaios de citotoxicidade pelo método MTT, foi observado que o ExtTa reduziu significativamente a viabilidade celular de linhagens humanas de glioblastoma (T98G), carcinoma de mama (MDA-MB-231) e de pulmão (A549), câncer colorretal (HCT116 e WiDr), osteossarcoma (Saos-2), melanoma (LB373) e fibrossarcoma (HT1080). Também foi observada citotoxicidade para as linhagens murinas 4T1 e SaI/N de adenocarcinoma de mama e fibrossarcoma, respectivamente. Embora o ExtTa tenha apresentado citotoxicidade para as células não tumorais humanas de fibroblasto (GM637) e rim (HEK-293T), e para os fibroblastos murinos NIH/373 e L929, a concentração inibitória de 50% das células ( $IC_{50}$ ) para as células tumorais foi menor do que as observadas para as células não tumorais. Nos ensaios de triagem, a maior eficácia e seletividade do ExtTa foi encontrada contra as células de glioblastoma T98G e de câncer colorretal HCT116. O ExtTa é aproximadamente quatro vezes mais citotóxico para as essas células tumorais em relação às linhagens não tumorais. Além disso, quando comparado o índice de seletividade (IS) da doxorrubicina (DOX) com o do ExtTa, observou-se que o ExtTa foi mais seletivo que a DOX para todas as linhagens cancerígenas testadas. Foi feita a avaliação da combinação do tratamento do ExtTa com a DOX e com o quimioterápico 5-FU, e os resultados obtidos mostraram um possível potencial do ExtTa como adjuvante desses fármacos, atuando de forma sinérgica e permitindo a redução de dose nas linhagens de osteossarcoma Saos-2 e de câncer colorretal HCT116. A ação do ExtTa induz aumento da expressão gênica dos genes BCL-2 e MAPK1, e promove parada do ciclo celular na fase G0-G1. Em conjunto, os dados revelam para existência de compostos bioativos com efeitos citotóxicos no ExtTa com potencial para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer.

**Palavras-chave:** *Trichoderma asperelloides*; anticâncer; citotoxicidade; sinergismo.

## ABSTRACT

Cancer is a multifactorial disease that represents one of the main causes of global morbidity and mortality. Lack of response, development of resistance, occurrence of relapses, and adverse effects are frequent problems in the treatment that need to be overcome. The discovery of new antitumor substances for therapeutic alternatives is essential to improve efficacy and specificity, overcome resistance, and allow a more personalized approach. Plants and microorganisms are natural sources of active substances with pharmacological properties. This work aims to evaluate the cytotoxic effect of the crude ethanolic extract of the fungus *T. asperelloides* (ExtTa) on tumor cell lines and its interaction with chemotherapy drugs. It was observed, by MTT cytotoxicity assay, that ExtTa significantly reduced cell viability in human glioblastoma (T98G), breast cancer (MDA-MB-231), and lung cancer (A549) cell lines, and colorectal carcinoma (HCT116 and WiDr), osteosarcoma (Saos-2), melanoma (LB373) and fibrosarcoma (HT1080). Cytotoxicity was also observed for the 4T1 and SaI/N murine lines of breast adenocarcinoma and fibrosarcoma, respectively. The selectivity index (SI) of the ExtTa is greater to tumor cells is greater than to non-cancer human fibroblast (GM637) and kidney (HEK-293T) cells, and to murine NIH/373 and L929 fibroblasts, the 50% cell inhibitory concentration (IC50) for cells tumor cells was lower than those observed for non-cancer cells. The greatest cytotoxicity and selectivity of ExtTa was found against T98G and HCT116 colorectal glioblastoma cell lines. ExtTa is approximately four times more cytotoxic to these tumor cells than to non-cancer cell lines. Furthermore, when comparing the selectivity index (SI) of doxorubicin (DOX) with that of ExtTa, it was observed that ExtTa was more selective than DOX for all tested cancer lines. The combination of ExtTa treatment with DOX and the 5-Fluorouracil (5-FU) chemotherapy was evaluated. The results showed a potential use for the ExtTa as an adjuvant for these drugs, acting synergistically and allowing dose reduction in osteosarcoma lines Saos-2 and colorectal carcinoma HCT116. The treatment with the ExtTa upmodulated BCL-2 and MAPK1 gene expression and promoted cell cycle arrest in the G0-G1 phase. Taken together, our data reveal the existence of bioactive compounds with cytotoxic effects in ExtTa with potential for developing novel anticancer agents.

**Keywords:** *Trichoderma asperelloides*; anticancer; cytotoxicity; synergism.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação do câncer como causa de morte prematura em 2019 por país.....	21
Figura 2 - Representação de estruturas morfológicas de espécies de <i>Trichoderma</i> .....	30
Figura 3 - Esquema de diluição para otimização do ensaio de citotoxicidade.....	40
Figura 4 - Avaliação de viabilidade microbiana nas preparações do extrato do fungo <i>T. asperelloides</i> e diluição da doxorubicina.....	49
Figura 5 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular não tumoral de fibroblasto humano GM637.....	53
Figura 6 Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular não tumoral de rim embrionário humano HEK-293T.....	54
Figura 7 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular não tumoral de fibroblasto murino NIH/3T3.....	55
Figura 8 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular não tumoral de fibroblasto murino L929.....	56
Figura 9 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de glioblastoma humano T98G.....	57
Figura 10 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231.....	58
Figura 11 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de adenocarcinoma de mama murino 4T1.....	59
Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de carcinoma de pulmão humano A549.....	60
Figura 13 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de carcinoma colorretal HCT116.....	61
Figura 14 - Avaliação da citotoxicidade ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem de melanoma humano LB373.....	62
Figura 15 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de fibrossarcoma murino SaI/N.....	63
Figura 16 - Avaliação da citotoxicidade ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular fibrossarcoma humano HT1080.....	64
Figura 17 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de adenocarcinoma colorretal WiDr.....	65
Figura 18 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de osteossarcoma Saos-2.....	66
Figura 19 - Efeito da interação do ExtTa e DOX em células de osteossarcoma Saos-2.....	69
Figura 20 - Efeito da interação do ExtTa e DOX em células de adenocarcinoma mamário humano MDA-MB-231.....	71

Figura 21 - Efeito da interação do ExtTa e DOX em células de adenocarcinoma de mama murino 4T1 .....	72
Figura 22 - Efeito da interação do ExtTa e DOX em células de fibrossarcoma humano HT1080.....	73
Figura 23 - Efeito da interação do ExtTa com 5-FU em células de carcinoma colorretal HCT116 .....	74
Figura 24 - Efeito da interação do ExtTa com 5-FU em células de adenocarcinoma colorretal humano WiDr.....	76
Figura 25 - Análise da integridade do RNA total extraído das culturas celulares.....	77
Figura 26 - Controle da qualidade da transcrição reversa a partir do RNA total extraído das culturas das células T98G e HCT116 tratadas ou não com ExtTa .....	78
Figura 27 - Expressão gênica de BAX, BCL-2, MAPK1, mTOR, AKT, CDKN1A, MYC e EGF nas linhagens tumorais T98G e HCT116.....	79
Figura 28 - Análise do efeito do ExtTa sobre o ciclo celular da linhagem de glioblastoma humano T98G.....	80
Figura 29 - Análise do efeito do ExtTa sobre o ciclo celular a linhagem de carcinoma colorretal humano HCT116.....	81
Figura 30 - Fracionamento do extrato etanólico de Trichoderma asperelloides por cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC).....	82
Figura 31 - Espectros de FTIR para o ExtTa.....	83
Figura 32 - Espectros FTIR para as Frações do ExtTa.....	84

## APÊNDICE

Figura S 1 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular GM637.....	110
Figura S 2 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular HEK-293T .....	111
Figura S 3 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular NIH/3T3.....	112
Figura S 4- Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular L929.....	112
Figura S 5 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular T98G.....	114
Figura S 6 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular MDA-MB-231 .....	115
Figura S 7 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular 4T1 .....	115

Figura S 8 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular A549 .....	117
Figura S 9 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular HCT116 .....	118
Figura S 10 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular LB373 .....	119
Figura S 11 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular SaI/N .....	120
Figura S 12 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular HT1080 .....	122
Figura S 13 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular WiDr .....	122
Figura S 14 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular Saos-2 .....	123

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens celulares empregadas no estudo e suas características .....	36
Tabela 2 - Sequência dos iniciadores específicos para análise de expressão por RT-qPCR44	
Tabela 3 – Ensaio de concentração celular para ensaio de viabilidade na placa de 96 poços. .....	50
Tabela 4 - Avaliação da interferência do DMSO a 0,5% sobre a viabilidade celular .....	50
Tabela 5 - Valores da concentração inibitória média (IC50) estimada para as linhagens celulares tratadas com ExtTa e DOX .....	67
Tabela 6 – Índice de Seletividade (IS) do ExtTa e da DOX para as linhagens tumorais usando como referências as linhagens não tumorais .....	68
Tabela 7 - Avaliação do efeito combinatório do ExtTa e DOX na linhagem celular de osteosarcoma Saos-2 .....	69
Tabela 8 - Índice de redução de dose (DRI) para ExtTa e DOX para um determinado efeito de inibição na linhagem celular de osteossarcoma humano Saos-2 .....	70
Tabela 9 - Avaliação do efeito combinatório do extrato etanólico ExtTa e 5-FU na linhagem de carcinoma colorretal HCT116.....	74
Tabela 10 - Índice de redução de dose (DRI) para ExtTa e 5-FU para um determinado efeito de inibição na linhagem HCT116.....	75
Tabela 11 - Quantificação e estimativa da pureza dos RNAs extraídos das linhagens tumorais T98G e HCT116 .....	77
Tabela 12 - Atribuições das principais bandas de absorção identificadas nos espectros de FTIR do ExtTa e de suas frações.....	85

## APÊNDICE

Tabela S 1 - Valores da concentração inibitória (IC50) para as linhagens celulares tratadas com ExtTa e DOX .....	109
--	-----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase B
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
BCLINC	Banco de Células do Laboratório de Inflamação e Câncer do ICB/UFMG
BDA	Ágar Batata Dextrose
BSA	Albumina de soro bovino
CDKN1A	Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina A1
CI	Índice de Combinação ( <i>Combination Index</i> )
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
DMEM	<i>Dulbeccos's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DOX	Doxorrubicina
DRI	Índice de Redução de Dose
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
ExtTa	Extrato etanólico bruto do fungo <i>Trichoderma asperelloides</i>
Fa	Percentual de inibição ( <i>Affected fraction</i> )
FPLC	Cromatografia líquida rápida de proteínas
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
GHS	Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i>
HRPT1	Hipoxantina guanina fosfotilossil transferase
IC <sub>50</sub>	Concentração inibitória média
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IMDM	<i>Iscove's Modified Dulbecco's Medium</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
LD50	Dose Letal 50
LINC	Laboratório de Inflamação e Câncer do ICB/UFMG
MAPK1	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno

MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mTOR	Alvo da rapamicina em mamíferos
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
nM	Nanômetro
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PERK	RNA da proteína quinase
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfoinositida-3-quinase
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
RPMI 1640	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i>
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase seguida por PCR em tempo real
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
TRAIL	Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
U	Unidade
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
WHO	<i>World Health Organization</i>
5-FU	5-Fluorouracil
Ext5FU	Tratamento combinado do ExtTa com o 5-FU
ExtDOX	Tratamento combinado do ExtTa com a DOX

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
1.1	Câncer.....	20
1.2	Abordagens terapêuticas no câncer .....	23
1.2.1	Combinação de abordagens terapêuticas.....	25
1.3	Tratamentos derivados de fontes naturais .....	27
1.4	O gênero <i>Trichoderma</i> .....	28
1.4.1	<i>Trichoderma asperelloides</i> .....	29
2	JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA .....	32
3	OBJETIVO .....	32
3.1	Objetivos Específicos .....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Cultura de <i>Trichoderma asperelloides</i> e a preparação do extrato etanólico .....	33
4.2	Células .....	34
4.2.1	Expansão e criopreservação das linhagens celulares.....	35
4.2.2	Análise de contaminação por micoplasma das linhagens celulares .....	37
4.2.2.1	Extração de DNA.....	37
4.2.2.2	PCR para detecção de micoplasma.....	37
4.3	Ensaio de concentração celular para ensaio de viabilidade .....	38
4.4	Otimização do protocolo para avaliação de citotoxicidade .....	39
4.5	Avaliação do efeito citotóxico .....	40
4.6	Curvas dose-resposta e Cálculo do IC <sub>50</sub> .....	41

4.7	Análise CompuSyn.....	42
4.8	Análise do perfil de expressão gênica .....	42
4.8.1	Extração de RNA.....	42
4.8.2	Síntese de cDNA .....	43
4.8.3	Construção de análise dos iniciadores específicos .....	43
4.8.4	Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real .....	44
4.9	Avaliação do efeito biológico do extrato no ciclo celular.....	46
4.10	Caracterização do extrato .....	47
4.10.1	Determinação de proteínas totais.....	47
4.10.2	Fracionamento do extrato por Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas .....	47
4.10.3	Caracterização estrutural do ExtTa por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	47
4.11	Análises estatísticas .....	48
5	RESULTADOS .....	48
5.1	Obtenção do extrato etanólico de <i>T. asperelloides</i> .....	48
5.1.1	Caracterização do extrato .....	48
5.1.2	Viabilidade microbiana.....	49
5.2	Ensaio de determinação da concentração celular. ....	49
5.3	Otimização do ensaio de viabilidade.....	50
5.4	Avaliação do efeito citotóxico do ExtTa e da DOX sobre a viabilidade de células tumorais <i>in vitro</i> .....	51
5.5	Avaliação do tratamento combinado do ExtTa com os quimioterápicos DOX e 5-FU	68
5.6	Análise do perfil de expressão gênica .....	76

5.6.1	Extração de RNA.....	76
5.6.2	Avaliação da qualidade da transcrição reversa.....	78
5.6.3	Análise da expressão gênica.....	78
5.7	Avaliação do efeito do tratamento com o ExtTa sobre o ciclo celular.....	79
5.8	Fracionamento do ExtTa por FPLC.....	81
5.9	Caracterização estrutural do ExtTa por Espectroscopia na Absorção do Infravermelho .....	82
6	DISCUSSÃO.....	86
7	CONCLUSÃO.....	98
8	PERSPECTIVAS E PRÓXIMAS ETAPAS .....	98
	REFERÊNCIAS .....	99
	APÊNDICE .....	109
	ANEXO 1 .....	125
	ANEXO 2 .....	126

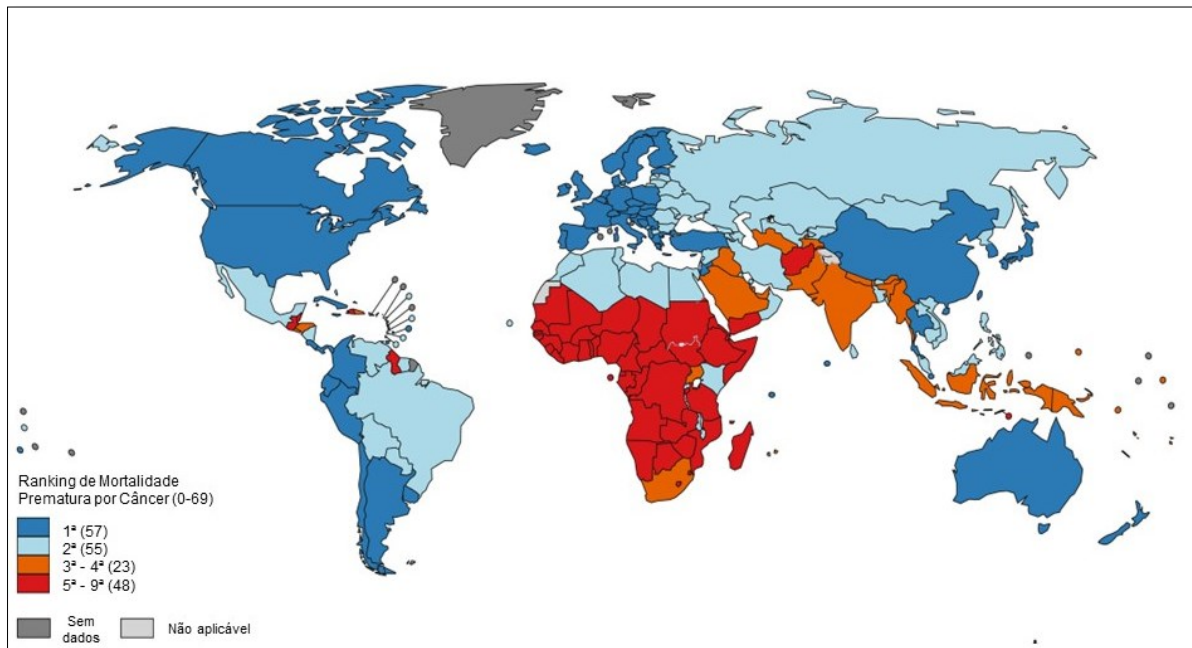
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

Dados da Organização Mundial de Saúde (WHO) apontam o câncer como uma das principais causas de mortalidade em todo o mundo. Globalmente, quase uma a cada seis mortes é causada por câncer. As estimativas apontam para um aumento de cerca de 70% do número de casos de câncer nas próximas duas décadas (Bray et al., 2018; Sung et al., 2021) o que faz com que esta doença seja um problema de saúde pública mundial. Em 2020, cerca de 9,9 milhões de mortes por câncer foram relatadas no banco de dados Global Cancer Observatory (GLOBOCAN).

O câncer pode acometer qualquer indivíduo, independente da classe social, econômica, religião, raça e região geográfica. O impacto econômico desta doença é muito significativo tanto em países ricos quanto em países de média e baixa renda. Embora a incidência de todos os tipos de câncer somados seja quase duas vezes maior em países desenvolvidos em comparação aos menos desenvolvidos (**Figura 1**), a taxa de mortalidade em decorrência da doença nos países ricos é apenas de 8% a 15% maior, evidenciando as distorções relacionadas à disponibilidade de serviços de saúde destinados ao diagnóstico e tratamento deste tipo de doença entre os países (Sung et al., 2021).

**Figura 1 - Classificação do câncer como causa de morte prematura em 2019 por país**



Os números de países representados em cada grupo de classificação são mostrados na legenda. Fonte: Organização Mundial da Saúde (Adaptado de Sung et al., 2021).

No mundo, os cânceres mais incidentes são de mama (11,7%), pulmão (11,4%), cólon e reto (10%) e próstata (7,3%) (Sung et al., 2021). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), as taxas de incidência ajustadas por idade, à exceção do câncer de pele não melanoma, tanto em homens (222/100 mil) quanto para mulheres (1860/100 mil) são consideradas intermediárias e compatíveis com as apresentadas para países em desenvolvimento. Estima-se, para o triênio de 2023 a 2025, que os tipos de câncer mais frequentes em mulheres serão: cânceres de pele não melanoma (32,7%), mama (20,3%), cólon e reto (6,5%) e colo do útero (4,7%). Em homens serão: cânceres de pele não melanoma (29,9%), próstata (21,0%), cólon e reto (6,4%) e pulmão (5,3%) (*Estimativa — Instituto Nacional de Câncer - INCA, n.d.*).

A incidência e mortalidade por câncer está aumentando no mundo, devido a elevação da taxa do envelhecimento populacional e ao estilo de vida atual, especialmente aos associados ao desenvolvimento socioeconômico. Cerca de um terço das mortes por câncer são em virtude do aumento da prevalência dos fatores de risco associados a má alimentação, consumo de alimentos processados contendo aditivos e conservantes, uso de tabaco, o aumento crescente do número de pessoas com alto índice de massa corporal, consumo de álcool, e sedentarismo (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2019; Sung et al., 2021).

O câncer resulta da transformação celular causada pela interação de fatores genéticos e agentes externos, denominados carcinogênicos. Exemplos incluem carcinógenos físicos como radiação ultravioleta e ionizante; carcinógenos químicos, como amianto, componentes da fumaça do tabaco, álcool, aflatoxina e arsênico; e carcinógenos biológicos, como infecções por certos vírus, como, HPV e vírus da hepatite, que são responsáveis por cerca de 30% dos casos de câncer em países de baixa e média renda (de Martel et al., 2020; Sung et al., 2021) .

Atualmente, é possível prevenir 30 a 50% dos casos de câncer ao evitar a exposição a fatores de risco e adotar estratégias baseadas em evidências comprovadas. Além disso, a morbimortalidade relacionada à doença pode ser reduzida através da detecção precoce e tratamento e cuidados adequados aos pacientes. O diagnóstico precoce e o tratamento apropriado também podem aumentar significativamente as chances e cura para muitos tipos de câncer (de Martel et al., 2020).

O câncer é um termo genérico para um grande grupo de doenças distintas que possuem diferentes características genéticas, celulares e teciduais, e que pode afetar qualquer órgão do corpo (Hanahan, 2022). Uma característica definidora do câncer é a rápida proliferação de células que perdem o controle normal do ciclo celular e que podem invadir além dos limites normais do tecido e metastatizar para outros órgãos. Metástases generalizadas são a principal causa de morte por câncer (Cragg & Pezzuto, 2016; Stratton et al., 2009). Entretanto, o câncer é uma doença multifatorial e os tumores não são apenas massas de células em proliferação desordenada, mas um complexo tecidual formado por diversos tipos celulares, que interagem entre si (Hanahan & Weinberg, 2011). Sendo assim, racionalizar as complexidades da biologia dos tumores envolve não só a identificação das características comuns observados nas células neoplásicas, mas também a compreensão das contribuições provenientes do microambiente associado ao tumor.

A carcinogênese é um processo lento, que se desenvolve através de múltiplas etapas que podem estender-se ao longo de várias décadas. Inicialmente, mediante um acúmulo de mutações, células saudáveis vão progressivamente adquirindo um conjunto de marcas específicas e características que podem transformá-las em células altamente malignas. Essas marcas são descritas por Hanahan (2022) como parâmetros conceituais amplos, definidores da biologia, genética e patogênese do câncer e envolvem todo o espectro de cânceres humanos. As oito características descritas compreendem as capacidades adquiridas para sustentar a sinalização proliferativa; evitar supressores de crescimento; resistir à morte celular; permitir a

imortalidade replicativa; induzir/acessar a vasculatura; ativar a invasão e metástase; reprogramar o metabolismo celular e evitar a destruição imunológica (Hanahan, 2022). O entendimento das bases moleculares do câncer é essencial para o desenvolvimento de metodologias antineoplásicas específicas que atendam a condição de cada tipo de doença (Corona et al., 2017; Lheureux et al., 2017).

## **1.2 Abordagens terapêuticas no câncer**

Devido a heterogeneidade intrínseca do câncer, há diferentes perfis de resposta às terapias, o que exige abordagens terapêuticas variadas com o objetivo de personalizar o tratamento para as necessidades específicas de cada paciente e tipo de câncer, maximizando assim as chances de sucesso terapêutico (Dagogo-Jack & Shaw, 2018; Hanahan, 2022).

Dentre as abordagens terapêuticas empregadas no tratamento das neoplasias estão a cirurgia, terapias-alvo (que usam moléculas para inibir vias de sinalização desreguladas no câncer), radioterapia, quimioterapia, o transplante de medula óssea e a imunoterapia (que visa fortalecer a resposta imune inata do paciente contra os tumores utilizando vários tipos de ferramentas, inclusive vacinas virais). Apesar dos recentes avanços terapêuticos e das inúmeras abordagens disponíveis na clínica hoje, são frequentemente observados falta de resposta aos tratamentos, desenvolvimento de resistência, recidivas e efeitos adversos (Dagogo-Jack & Shaw, 2018; Siegel et al., 2021)

A quimioterapia consiste na administração de medicamentos e substâncias químicas isoladamente ou em combinação que exercem sua ação de forma sistêmica. Na impossibilidade de cura, busca-se a utilização de tratamentos para controlar a doença, diminuindo o tamanho do tumor, e/ou a taxa de crescimento e a angiogênese. A quimioterapia pode ter objetivo também de palição, neste caso visando aliviar a dor, diminuir os sintomas e as condições médicas decorrentes da doença, prorrogando a expectativa e/ou preservando a qualidade de vida do paciente. Nestes casos, é realizada principalmente quando o câncer está em estágios avançados e não pode ser erradicado (Mollaei et al., 2021).

Embora a quimioterapia seja um tratamento amplamente utilizado na clínica e tenha trazido maior expectativa e qualidade de vida, frequentemente são observados efeitos adversos indesejados associados ao tratamento. Os fármacos utilizados em geral são pouco seletivos, pela semelhança entre as células tumorais e normais, causando, portanto, toxicidade para ambas, o que ocasiona, por exemplo, alterações hematológicas nos pacientes, e mais

tardiamente, efeitos tóxicos renais, hepáticos, cardíacos, no sistema nervoso entre outros. Dessa forma, a otimização desses fármacos e a descoberta de novos, é essencial para melhorar a eficácia e a seletividade (Dagogo-Jack & Shaw, 2018; Meredith & Dass, 2016).

Além disso, a resistência das células tumorais aos agentes antineoplásicos e a recorrência tumoral são as principais causas de insucesso no tratamento, observadas em casos de câncer metastático (Siegel et al., 2021). A resistência aos fármacos e a ocorrência de recidivas podem estar relacionadas a diversos mecanismos, como ao transporte ativo do medicamento através da membrana plasmática, alteração nas enzimas-alvo, modificações no metabolismo dos agentes quimioterápicos, aumento na capacidade de reparo do DNA e resistência das células à apoptose. Estas características indesejáveis motivam pesquisas contínuas em busca de novos compostos para terapias mais eficazes, que evitem recidivas, e que apresentem baixa ou nenhuma toxicidade para os pacientes oncológicos (Jamalzadeh et al., 2017).

Os agentes quimioterápicos são agrupados conforme seus mecanismos de ação, incluindo agentes alquilantes, antimetabólitos, antraciclina, inibidores da topoisomerase I e II, inibidores mitóticos e corticosteroides. Os agentes alquilantes causam danos ao DNA e interferem na divisão celular em várias fases do ciclo. Em contraste, os antimetabólitos análogos de estruturas dos ácidos nucleicos, são reconhecidos como bloqueadores da síntese dessas moléculas. As antraciclina dificultam a atividade de enzimas relacionadas à duplicação do DNA, mas seu uso é limitado devido ao risco de insuficiência cardíaca permanente, levando ao desenvolvimento de não-antraciclina para mitigar esses efeitos colaterais. Os inibidores da topoisomerase I e II impedem a atividade dessas enzimas, sendo que os inibidores da topoisomerase II aumentam os riscos de cânceres secundários, como a leucemia mieloide aguda. Inibidores mitóticos, derivados de plantas, interferem em diversas fases do ciclo celular, resultando no bloqueio da proliferação celular, embora possam causar danos acidentais ao sistema nervoso. Por fim, corticosteroides são prescritos para atenuar efeitos colaterais dos quimioterápicos, como náuseas, vômitos e reações alérgicas (Mollaei et al., 2021).

A DOX é uma antraciclina de amplo espectro comumente utilizada há muitos anos no tratamento de vários tipos de cânceres, como carcinomas, sarcomas e cânceres hematológicos. É prescrita principalmente para câncer de mama, bexiga, estômago, pulmão, ovários, tireoide e sarcoma de tecidos moles (Mollaei et al., 2021; Rivankar, 2014).

A atividade da DOX é complexa e não está completamente elucidada. Dentre os mecanismos de ação da DOX estão: intercalação ao DNA resultando na inibição da biossíntese de inúmeras macromoléculas; inibição do complexo topoisomerase II, interferindo na replicação do DNA; produção de radicais livres, que induzem danos ao DNA e à membrana celular, o que leva à parada do ciclo celular nas fases G1 e G2; indução de autofagia em resposta a danos no DNA; ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK); aumento na quantidade de Bax, um fator pró-apoptótico, e diminuição na concentração de Bcl-2, um agente antiapoptótico (Martín et al., 2021; Meredith & Dass, 2016; Rivankar, 2014).

Apesar de ser altamente eficaz, a aplicação clínica da DOX é restrita. Por não ser seletiva para as células cancerígenas causa toxicidade significativa que pode ocorrer durante como também anos após o tratamento. A lesão de tecidos não-alvo muitas vezes complica o tratamento do tumor, limitando as dosagens terapêuticas da DOX e diminuindo a qualidade de vida dos pacientes (Meredith & Dass, 2016; Tian et al., 2020).

A literatura mostra que o coração é o alvo principal da toxicidade da DOX mas, além da cardiotoxicidade, este fármaco apresenta toxicidade sistêmica aguda ou crônica associada, que afeta também o cérebro, os rins e o fígado (Carvalho et al., 2009; Rivankar, 2014). Há uma busca constante de estratégias potenciais para atenuar a toxicidade induzida pela DOX e para aumentar sua atividade antitumoral. Estudos mostram um papel determinante da concentração da DOX usada no tratamento no desdobramento de eventos biológicos celulares que levam à estase ou morte celular, e que mudanças e combinações no esquema terapêutico melhoraram sua eficácia (Carvalho et al., 2009; Martín et al., 2021; Meredith & Dass, 2016).

### **1.2.1 Combinação de abordagens terapêuticas**

Muitas vezes uma abordagem terapêutica isolada no tratamento do câncer apresenta resultados insatisfatórios, principalmente devido à heterogeneidade intrínseca das células que formam os tumores. Mesmo quando há uma resposta inicial ao tratamento, as células cancerígenas podem facilmente desenvolver resistência ao tratamento pela ativação emergente de vias compensatórias ou de desvio e o paciente pode apresentar recidivas. Portanto, o uso de terapias em combinação tem ganhado destaque por sua maior efetividade (Dagogo-Jack & Shaw, 2018; Mollaei et al., 2021; Zagidullin et al., 2019).

A descoberta de novos medicamentos, juntamente com a identificação de possíveis interações sinérgicas entre fármacos, representa um dos enfoques para fornecer tratamento

personalizado do câncer, sendo um dos maiores desafios enfrentados pelo sistema de saúde (Lawrence et al., 2014; Zagidullin et al., 2019).

No uso da modalidade de terapia combinada, a quimio, imuno e a radioterapia podem ser usadas tanto como neoadjuvantes, com o objetivo de diminuir o tamanho do tumor antes da cirurgia ou como adjuvantes após a cirurgia ou a radioterapia, com o intuito de destruir as possíveis células tumorais remanescentes e ajudar a controlar o risco de recorrência. (De Almeida et al., 2005; Urruticoechea et al., 2010).

A aplicação de quimioterápicos combinados parece aumentar as respostas à quimioterapia, até em cânceres multirresistentes, principalmente, utilizando fármacos que tenham como alvo vias moleculares distintas, atingindo, assim, várias cascatas de sinalização intracelulares e diferentes fases do ciclo celular. A ação sinérgica desses medicamentos não só melhora a eficiência da supressão tumoral, mas também permite a redução das doses dos medicamentos quimioterápicos, o que ajuda não só a reduzir o desenvolvimento de resistência (Dagogo-Jack & Shaw, 2018) como também controlar os efeitos adversos. Entretanto, esses tratamentos podem ser limitados pelos impactos antagônicos, variações na farmacocinética e farmacodinâmica. Portanto, além da prescrição correta da dosagem e cronograma da administração otimizado, são necessárias medidas específicas para selecionar quimioterapias personalizadas de acordo o estágio do câncer e as características de cada paciente, para alcançar a melhor resposta possível e efeitos adversos mínimos. A pesquisa contínua e o desenvolvimento de fármacos complementares eficazes são essenciais para avançar na personalização e oferecer melhores opções terapêuticas aos pacientes (Mollaei et al., 2021; Zagidullin et al., 2019).

A descoberta de combinações de drogas sinérgicas e mais eficazes é um processo trabalhoso e muitas vezes fortuito. Nos últimos anos, a identificação de terapias combinadas foi acelerada devido aos avanços na triagem de drogas de alto rendimento, que tem sido aplicada com sucesso, mas ainda são necessárias mais investigações empregando outras abordagens tais como ferramentas informáticas para gerenciamento e análise de dados em nível de sistemas (Zagidullin et al., 2019).

Embora associações de quimioterapias tenham exibido resultados decepcionantes em alguns casos, devido aos diversos obstáculos, respostas promissoras nas combinações para tratamento dos cânceres lançaram luz sobre o desenvolvimento de novos procedimentos para vários tipos de câncer (de Martel et al., 2020; Mollaei et al., 2021).

### 1.3 Tratamentos derivados de fontes naturais

Desde o surgimento dos primeiros medicamentos e compostos empregados no tratamento de doenças, reconhece-se a importância dos produtos naturais para o progresso da medicina. Ao longo da história, esses produtos têm desempenhado um papel crucial no combate a doenças humanas, sendo que vários deles, incluindo os antibióticos, foram descobertos de fontes naturais. A descoberta da penicilina, por exemplo, proveniente do fungo *Penicillium notatum*, teve um impacto transformador global (Sithranga Boopathy & Kathiresan, 2010). Dada a diversidade química desses produtos, que é intrinsecamente ligada à diversidade biológica e geográfica, o mundo inteiro pode ser explorado em busca de compostos bioativos através da bioprospecção (Demain & Vaishnav, 2011). Nas últimas décadas, foram feitos enormes esforços para isolar de microrganismos, plantas e outros organismos vivos novos produtos naturais com propriedades farmacológicas. Esses esforços levaram à descoberta de um painel de medicamentos anticâncer, sendo que destes, 60% são provenientes de fontes naturais e seus derivados (Demain & Vaishnav, 2011; Huang et al., 2021; Newman & Cragg, 2020).

Os fármacos obtidos de fontes naturais inspiram cientistas com a sua rica diversidade estrutural e complexidade. A maioria dos produtos naturais biologicamente ativos consiste em metabólitos secundários com estruturas complexas, como por exemplo, estereoisômeros, anéis concatenados e grupos funcionais reativos. Em alguns casos, o próprio produto natural é utilizado, enquanto em outros, os derivados feitos quimicamente ou biologicamente são as moléculas mais empregadas tais como vincristina, taxol e camptotecina. Os compostos com atividade antitumoral pertencem a várias classes estruturais, como antraciclina, enediinas, macrolídeos policetídeos, glicopeptídeos, entre outros. (Cragg & Pezzuto, 2016; Demain & Vaishnav, 2011).

Os fungos são uma fonte natural bem conhecida e valiosa de compostos bioativos de relevância terapêutica (Cragg & Pezzuto, 2016). A medicina chinesa e japonesa utiliza extratos fúngicos, compostos isolados de fungos, assim como o fungo inteiro em tratamentos antitumorais como auxiliares na cirurgia, radioterapia ou quimioterapia (Min et al., 2009; Wasser, 2014). Tanto polissacarídeos constituintes da parede celular quanto glicoproteínas isoladas de fungos já foram identificadas como apresentando atividade antineoplásica (Vetvicka & Vetvickova, 2018). Algumas destas moléculas exercem seus efeitos antitumorais ao modularem o sistema imune, estimulando macrófagos, células T e Células Natural-Killers

(Wasser, 2014), um exemplo são os beta-glucanas. Alguns metabólitos secundários, como a Cordicepina isolado de várias espécies do gênero de ascomiceto *Cordyceps*, mostraram efeito pró-apoptótico em linhagens celulares derivadas de tumores (Park et al., 2009; Wu et al., 2007)

O avanço tecnológico dos últimos anos aumentou nossa compreensão da biossíntese de produtos naturais. Juntamente com melhorias nas abordagens para isolamento, caracterização e síntese de produtos naturais, abriu uma nova era na investigação na academia e na indústria, viabilizando a identificação mais eficiente de compostos de interesse no tratamento de doenças, o que expandiu o número de pesquisas e identificação de extratos fúngicos ou compostos com potencial atividade anticancerígena, inclusive de espécies do gênero *Trichoderma* (Deng et al., 2013; Gao et al., 2021; Wasser, 2014; Zhang et al., 2021a).

#### 1.4 O gênero *Trichoderma*

As espécies do gênero *Trichoderma* são fungos filamentosos, de esporos verdes que se destacam devido à sua alta adaptabilidade a diversas condições ecológicas. É amplamente distribuído pelo globo terrestre, com predominância nas regiões tropicais. São fungos de vida livre comuns em diversos habitats, desde solo, atmosfera, madeira em decomposição, associado a raízes de plantas, ambientes marinhos (algas, sedimentos, esponjas, corais moles) e outros corpos frutíferos de fungos. As espécies desse gênero são conhecidas como colonizadores de sucesso de seus habitats, e tem uma variedade de interações com diferentes organismos. Uma vez estabelecidos, eles lançam sua potente maquinaria degradativa para a decomposição do substrato. Vários aspectos de espécies desse gênero foram estudados detalhadamente, como filogenia, mecanismos de defesa, e produção e secreção de enzimas (Schmoll & Schuster, 2010).

O gênero *Trichoderma* possui mais de 440 espécies, e tem uma longa história de uso nos ambientes agrícolas como biorreator industrial, biofertilizante e agente de biocontrole. As espécies de *Trichoderma* spp., incluindo *Trichoderma virens*, *Trichoderma atroviride* e *Trichoderma harzianum*, podem ter influência substancial na promoção do crescimento das plantas e na fotossíntese, na biorremediação de solos poluídos exercendo efeitos benéficos em plantas cultivadas além de aumentar a defesa das plantas contra patógenos invasores por produzirem metabólitos secundários com atividade antagônica contra um número considerável de bactérias, leveduras e fungos (Guo et al., 2023; Schmoll & Schuster, 2010). No Brasil o fungo *Trichoderma* spp. é usado no controle da *Moniliophthora perniciosa*, fitopatógeno causador da vassoura-de-bruxa que infecta o cacau (Loguercio et al., 2009) tendo sido utilizados

em formulações comerciais empregadas no controle biológico, como biofungicida, reduzindo assim o uso de fungicidas químicos (Woo et al., 2014).

Além das aplicações como controle biológico de patógenos em plantações, fungos do gênero *Trichoderma* têm atraído a atenção de pesquisadores devido à sua capacidade de produção de metabólitos com características estruturais químicas e atividades biológicas com potencial para aplicações farmacológicas: atividade microbicida, imunomodulatória e antitumoral (Abd El-Rahman et al., 2014; Lopes et al., 2020; Pokrovsky et al., 2013; Zhang et al., 2021b). A enzima L-lisina-alfa-oxidase é um dos compostos mais conhecidos isolados desse gênero e seu uso na clínica como antitumoral tem sido avaliado (Lukasheva et al., 2021; Pokrovsky et al., 2013). Também é descrito na literatura a atividade antineoplásica de tricotecenos produzidos pelas espécies *T. viride* e *T. harzianum* sobre linhagens tumorais (Gao et al., 2021; Lukasheva et al., 2021).

As substâncias bioativas derivadas de *Trichoderma* são conhecidas desde a década de 1930, com a descoberta da atividade antifúngica da gliotoxina. Entretanto, a compreensão dos princípios ativos e mecanismos relacionados, ainda é limitada. Estima-se mais de 1.000 compostos conhecidos produzidos por fungos do gênero *Trichoderma* (Guo et al., 2023; Zeilinger et al., 2016).

Nos últimos anos, foram identificados numerosos metabólitos secundários, derivados de *Trichoderma* incluindo pequenos peptídeos ativos (peptaibols), policetídeos, terpenos, alcaloides e esteroides. A produção dessas substâncias é dependente da espécie e até mesmo da cepa e nem todo o metabólito será biossintetizado por um determinado fungo em condições de laboratório, pois podem ser necessários estímulos desencadeantes específicos (Khan et al., 2020).

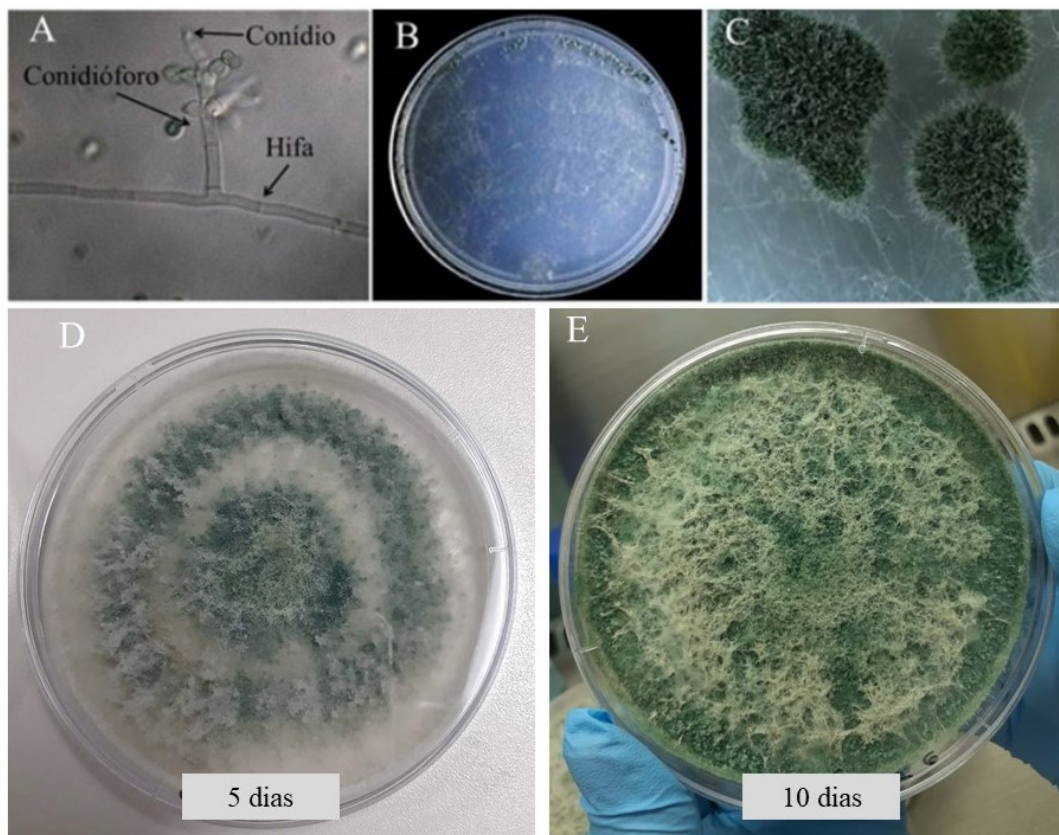
#### **1.4.1 *Trichoderma asperelloides***

*Trichoderma asperelloides* é um fungo que ainda não foi tão amplamente estudado como outros membros deste gênero, apesar de sua importância econômica na agricultura como biofungicida e por promover o desenvolvimento de plantas em vários tipos de cultivares (Chaparro et al., 2011; Watanabe et al., 2006). Como identificado por Samuels e colaboradores (2010), *T. asperelloides* é uma espécie críptica de *T. asperellum* (Samuels et al., 2010). As duas espécies são filogeneticamente irmãs, com a mesma morfologia, mas padrões moleculares e fisiológicos distintos. Essa espécie também já foi identificada anteriormente como *T.*

*harzianum*. Sua diferenciação das demais espécies do gênero só foi possível aliando-se técnicas moleculares às técnicas clássicas de micologia (Gortikov et al., 2022; Samuels et al., 2017)

*T. asperelloides*, como outras espécies do gênero, é um fungo filamentoso, ou seja, constituído por elementos multicelulares em forma de tubos denominados hifas, cujo conjunto forma o micélio. Apresenta hifas septadas, uma característica comum às espécies do Filo Ascomycota, ao qual o gênero *Trichoderma* pertence. A partir das hifas são formados os conidióforos e clamidósporos, estruturas envolvidas na reprodução assexuada e resistência a condições adversas, respectivamente. Os conidióforos formam esporos assexuais denominados conídios. Uma característica presente em muitas espécies do gênero *Trichoderma* é a criação de aglomerados densos compostos por hifas, conidióforos e conídios, dando origem a estruturas que se assemelham a tufo chamados de pústulas. Estas pústulas exibem uma variada gama de cores, indo do verde-escuro ao amarelo (**Figura 2**).

**Figura 2 - Representação de estruturas morfológicas de espécies de *Trichoderma***



A: Hifa e conidióforo; B: Micélio; C: Pústulas; D e E: Aspecto morfológico da cultura do fungo *T. asperelloides* em meio BDA, incubado em estufa seca a 28 °C após 5 dias (D) e 10 dias (E). Conídios (esporos) esverdeados e hifas apresentam cor branca (A-C) Fonte: Adaptado de Lucas Sales et al., 2020 (Diversidade Taxonômica e Identificação de *Trichoderma*, n.d.).(D-E) Fonte: Arquivo do LINC.

O único estudo disponível na literatura que reporta propriedades farmacológicas de *T. asperelloides* foi conduzido pela Dra Jane Lima dos Santos, da Universidade Estadual de Santa Cruz (Ilhéus) e uma das colaboradoras deste projeto. O estudo descreve propriedade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* ao extrato etanólico de *T. asperelloides*. Frações de baixo peso molecular promoveram alterações morfológicas na mitocôndria, bolsa flagelar e aumento de estruturas semelhantes a corpos lipídicos e acidocalcissomos nos parasitas (Lopes *et al.*, 2020).

São relevantes e inéditos estudos que visem o aprofundamento de conhecimentos sobre as propriedades farmacológicas de compostos antitumorais oriundos deste fungo. Resultados preliminares do nosso grupo mostraram que o extrato etanólico de *T. asperelloides* (ExtTa) apresentou citotoxicidade para as células derivadas de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231 e MCF7) e murino (4T1) (Kunzmann, 2017 - dissertação). Os resultados deste estudo sinalizaram, portanto, de forma inédita, para a existência de compostos com potencial ação antitumoral no extrato etanólico de *T. asperelloides* e reforçaram a necessidade do aprofundamento dos estudos buscando identificar e isolar esses compostos com potencial farmacológico.

Neste estudo, investigamos o potencial antiproliferativo do ExtTa em diversas linhagens celulares provenientes de câncer. Notavelmente, em nosso estudo, comparamos o efeito biológico do ExtTa com a citotoxicidade da doxorubicina (DOX), um quimioterápico comumente utilizado na clínica para tratar uma ampla gama de cânceres. Analisamos também o efeito da combinação do ExtTa com os medicamentos DOX e 5-Fluorouracil (5-FU), outro quimioterápico comumente utilizado no tratamento de cânceres do aparelho digestivo, principalmente câncer colorretal. Além disso, iniciamos a caracterização da composição do ExtTa, bem como os possíveis mecanismos de ação da atividade biológica observada. Até onde sabemos, esta pesquisa é a exploração pioneira das propriedades anticâncer do *T. asperelloides*, lançando luz sobre seu potencial terapêutico inexplorado neste cenário.

## 2 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Devido a importância socioeconômica do câncer, uma doença que vem apresentando uma crescente incidência e mortalidade em todo o mundo, há a necessidade de disponibilização de novas terapias mais específicas e eficientes contra a heterogeneidade tumoral, que minimizem os efeitos adversos e tenham custo acessível. Considerando-se os estudos que mostram a presença de atividade microbicida, antiviral, imunomodulatória e antitumoral no extrato de fungos do gênero *Trichoderma* (*T. viride*, *T. harzianum* e *T. asperellum*), bem como os resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo que indicam ação citotóxica do extrato etanólico bruto de *T. asperelloides* sobre células de tumor de mama humano, justifica-se estudos visando avaliar o potencial do extrato etanólico do fungo *T. asperelloides* como fonte de compostos bioativos para uso clínico.

A hipótese deste projeto de pesquisa é a de que o extrato do fungo *T. asperelloides* é uma fonte em potencial de compostos bioativos com atividade antitumoral.

## 3 OBJETIVO

Avaliar o efeito citotóxico do extrato bruto do fungo *Trichoderma asperelloides* sobre células derivadas de diferentes tipos de tumores, analisar seu efeito em combinação com quimioterápicos, bem como caracterizar componentes presentes no extrato, e investigar os mecanismos relacionados à citotoxicidade.

### 3.1 Objetivos Específicos

- Testar a susceptibilidade de linhagens celulares derivadas de tumores humanos e murinos aos efeitos citotóxicos do extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* em comparação à do quimioterápico doxorrubicina;
- Calcular o índice de seletividade do extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* e da doxorrubicina pela comparação da concentração inibitória de 50% das células (IC<sub>50</sub>) obtido nas células tumorais com o obtido para as células não tumorais;
- Avaliar o efeito citotóxico da combinação do extrato do fungo *T. asperelloides* com os quimioterápicos doxorrubicina e 5-fluorouracil em diferentes concentrações;

- Analisar os efeitos do extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides*, sobre a expressão de genes envolvidos na apoptose, ciclo celular, angiogênese, proliferação, crescimento e sobrevivência celular;
- Avaliar os efeitos do extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides*, sobre o ciclo celular;
- Fracionar o extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* por cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC);
- Investigar a composição química do extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* e das frações por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR);

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Cultura de *Trichoderma asperelloides* e a preparação do extrato etanólico

As amostras do isolado de *Trichoderma asperelloides*, cepa LIBASP02 (Lopes et al., 2020), usadas neste trabalho estavam armazenadas no LINC em microtubos de 1,5 mL contendo solução de 50% de PBS e 50% de glicerol estéril e estocados a 4 °C. A utilização deste fungo nessa pesquisa científica foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) cadastrado com o número A5AF99F (ANEXO 1).

A obtenção do extrato foi realizada de acordo com Fukuzawa e colaboradores (Fukuzawa et al., 2008). Brevemente, 150 µl da suspensão contendo o fungo foram coletadas dos tubos de estoque do fungo em solução de 50% PBS + 50% glicerol e gotejadas no centro de placas de Petri de 24x24 cm, contendo 200 mL de meio Ágar Batata Dextrose - BDA (HiMedia). O fungo foi semeado por toda a placa pela técnica de esgotamento utilizando alça de Drigalski esterilizada. As placas foram, então, incubadas a 28 °C por 7 dias. Foram preparadas 16 placas de crescimento do fungo. Após o tempo de incubação, os esporos e micélio do fungo foram raspados com o auxílio de “*Cell scraper*” esterilizado e coletados em EtOH 95% (Merck), (25 mL/placa). A suspensão etanólica contendo o fungo foi homogeneizada, submetida à agitação em Vórtex por 1min e, posteriormente, em agitador orbital (Gerhardt) a 100 rpm por 24 horas. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 10.000 X g por 20 minutos

(centrífuga BR4i- Jouan). O sobrenadante foi transferido para um béquer e, posteriormente, alíquotas de 30 mL foram colocadas em tubos tipo Falcon de 50 mL previamente pesados. As alíquotas foram submetidas à liofilização. Após a liofilização, os tubos foram pesados novamente e a massa do extrato foi estimada. Finalmente, as amostras de extrato bruto (ExtTa) foram solubilizadas em DMSO 100% (Sigma) e mantidas a -20 °C até o momento do uso. Foram separadas 2 alíquotas da suspensão etanólica para fracionamento por cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC). Todo o processo de manipulação do fungo foi feito em cabine de segurança biológica Classe II tipo A (Veco).

Para confirmação da ausência de fungos e/ou bactérias viáveis no extrato, 20 µl de solução contendo 10 µl do extrato diluído em 10 µl PBS foi espalhado em meio BDA (HiMedia) por toda placa de Petri com alça Drigalski. Também foram inoculados 20 µl da solução de 10 µl de extrato e 10 µl de PBS em 10 mL de caldo tioglicolato. A solução de interesse foi despejada vagarosamente com o auxílio de pipeta descartável estéril, de modo que a solução ficasse distribuída igualmente por toda extensão do tubo de ensaio contendo o caldo. As placas envolvidas em plástico filme e viradas para baixo em temperatura ambiente bem como o tubo de ensaio com o caldo tioglicolato foram incubados em estufa seca a 37 °C, por 7 dias. O mesmo protocolo foi seguido na avaliação da viabilidade microbiológica no fármaco doxorrubicina (Sigma), e nos diluentes PBS e DMSO.

## 4.2 Células

Neste trabalho foram utilizadas as linhagens celulares humanas e murinas apresentadas na **Tabela 1**. Todas as células usadas foram provenientes do banco de células do Laboratório de Inflamação e Câncer da UFMG (LINC) onde são mantidas criopreservadas em nitrogênio líquido. A cultura das células foi realizada seguindo os protocolos específicos para cada linhagem, como apresentado na Tabela 1. Todos os meios de cultura utilizados foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 2mM de L-glutamina (Sigma) e 10 µg/mL de penicilina/estreptomicina (Sigma) e as células foram cultivadas em estufa a 37 °C com ambiente saturado em 5% de CO<sub>2</sub>. As culturas foram periodicamente observadas por microscopia de contraste de fase em microscópio biológico trinocular invertido com câmera fotográfica acoplada (Quimis-MOTCI).

#### 4.2.1 Expansão e criopreservação das linhagens celulares

No procedimento de descongelamento das linhagens de celulares, o criotubo contendo as células foi rapidamente descongelado em banho-maria a 37 °C e as células gotejadas em 6 mL de meio específico (Gibco), pré-aquecido a 37 °C, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 10 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina (Sigma) em garrafas de cultura com 25 cm<sup>2</sup> de superfície de crescimento (T25) (TPP). As garrafas foram incubadas em estufa a 37 °C com saturação de 5% de CO<sub>2</sub>. Após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído para remoção das células não aderidas e dos resíduos do crioprotetor DMSO (Sigma). Quando a monocamada celular atingia uma densidade aproximada de 80 a 95%, após descarte do meio de cultura e lavagem com tampão fosfato de sódio (PBS), as células eram tratadas com tripsina 0,25% - EDTA 0,53 mM (Gibco) por aproximadamente 1 minuto ou, até que, sob observação microscópica, fosse detectada a dissociação da monocamada. O procedimento era, então, interrompido imediatamente pela adição do meio de cultura e a suspensão celular era coletada. Uma alíquota da suspensão celular era utilizada para contagem e avaliação da viabilidade celular. A contagem das células viáveis foi efetuada em hemocítômetro de Neubauer, após o carregamento da câmara com a suspensão celular obtida após homogeneização das células suavemente com pipeta até obtenção de uma suspensão de células isoladas. Para a determinação do número de células viáveis foi utilizado o teste de exclusão vital de corante, que consiste na incubação de uma alíquota de células com solução de Azul de Tripán a 0,5% (Sigma), por cinco minutos a 37 °C. Células hípidas excluem o corante e as inviáveis ficam coradas em azul.

As células eram repicadas em novas garrafas de cultura com 75 cm<sup>2</sup> (T75) ou 150 cm<sup>2</sup> (T150) de área de crescimento numa proporção de 1:2 ou 1:3. Essa expansão se fez necessária para a obtenção de quantidade de células suficientes para o congelamento de, no mínimo, 10 criotubos contendo 2,0 milhões de células por criotubo de cada uma das linhagens. Esta estratégia foi adotada para que durante todo o projeto de pesquisa os ensaios pudessem ser realizados utilizando células em passagens próximas. Atingida a quantidade necessária de células, elas foram criopreservadas em 50 % de meio de cultura específico da célula e 50% de meio de congelamento (80% de SFB e 20% de DMSO) e incubadas em freezer -80 °C por 24 a 72 horas sendo, em seguida, estocadas em nitrogênio líquido para armazenamento em longo prazo. Após uma semana, um dos criotubos era descongelado, conforme o protocolo citado acima, para a certificação da eficiência do procedimento de criopreservação. Nos casos em que a viabilidade do congelamento não foi comprovada, nova expansão das células foi realizada.

**Tabela 1 - Linhagens celulares empregadas no estudo e suas características**

<b>LINHAGEM CELULAR</b>	<b>TIPO</b>	<b>TECIDO/ÓRGÃO DE ORIGEM</b>	<b>PASSAGEM</b>	<b>MEIO DE CULTURA</b>
<b>GM637</b>	Fibroblasto	Fibroblasto humano	15 - 18	DMEM + a. a.
<b>HEK-293T</b>	Embrionárias renais	Rim humano	04 - 08	DMEM
<b>L929</b>	Fibroblasto murino	Adiposo murino	04 - 08	DMEM
<b>NIH/3T3</b>	Fibroblasto murino	Fibroblasto embrionário murino	14 - 19	DMEM
<b>MDA-MB-231</b>	Adenocarcinoma de mama	Glândula mamária humana	31 - 34	RPMI 1640
<b>HT1080</b>	Fibrossarcoma	Tecido conjuntivo humano	05 - 08	DMEM
<b>LB373</b>	Melanoma	Pele humana	35 - 39	IMDM
<b>WIDR</b>	Adenocarcinoma colorretal	Cólon humano	7 - 10	DMEM + a. a.
<b>HCT116</b>	Carcinoma colorretal	Intestino grosso; Cólon humano	10 - 15	DMEM
<b>T98G</b>	Glioblastoma multiforme	Cérebro humano	9 - 15	DMEM + a. a.
<b>SAOS-2</b>	Osteossarcoma	Ossos humano	10 - 15	DMEM + a. a.
<b>A549</b>	Carcinoma de pulmão	Célula epitelial de pulmão humano	93 - 97	DMEM
<b>SAI/N</b>	Fibrossarcoma	Fibroblasto murino	6 - 10	IMDM
<b>4T1</b>	Adenocarcinoma de mama	Glândula mamária murina	67 - 71	RPMI 1640

a.a. (aminoácidos não essenciais)

## 4.2.2 Análise de contaminação por micoplasma das linhagens celulares

### 4.2.2.1 Extração de DNA

O gênero *Mycoplasma* é composto por bactérias que apresentam pequeno tamanho (0,3-0,8 µm) e ausência de parede celular. Embora sejam de difícil detecção, os micoplasmas são uma das principais fontes de contaminação de cultura de células, onde podem ocasionar alterações na morfologia celular, na taxa de proliferação e na estabilidade genética das células e, dessa forma, comprometer a confiabilidade dos resultados experimentais. Portanto, é imprescindível o teste para verificação de contaminação de qualquer linhagem de células por micoplasma antes do início e durante qualquer trabalho com as células de mamíferos. Para nos certificarmos de que não havia contaminação das linhagens celulares utilizadas nesse projeto, foi empregado um protocolo de reação em cadeia da polimerase (PCR) desenvolvido no LINC, que amplifica o gene do ácido ribonucleico ribossomal 16 S (rRNA) de *Mycoplasma sp.* O gene constitutivo que codifica para a Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT1) foi usado como controle interno da reação. A extração do DNA foi realizada de acordo com o protocolo de Peter W. Laird (Laird et al., 1991). Brevemente, a um pellet de células (2 milhões de células) foi acrescentado 0,5 mL de tampão de lise (100 mM Tris.HCl pH 8,5; 0,5 mM EDTA pH8,0; 0,2% SDS; 200 mM NaCl; 100 µg/mL de Proteinase K) e foi feita uma incubação a 37 °C por 3 horas sob agitação em Thermomixer (Eppendorff) a 600rpm. Posteriormente, foi adicionado 0,5 mL de isopropanol e, após a homogeneização do tubo por inversão até a formação do novelo de DNA, foi feita uma incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, agitando a cada 5 minutos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 10.000 RPM em centrífuga Eppendorff (5418) para precipitação do DNA, o sedimento foi lavado 2x com etanol 70% e centrifugado novamente pós cada lavagem. Após o descarte do sobrenadante, e completa evaporação do etanol, ao DNA foram acrescentados 40 µL de água Milli-Q autoclavada, o tubo foi incubado a 55 °C por 30-60 minutos, o DNA foi solubilizado e quantificado por espectrofotometria a 260 nm utilizando o equipamento Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

### 4.2.2.2 PCR para detecção de micoplasma

O DNA extraído foi utilizado como molde em reações de PCR para detecção do gene constitutivo das células e do micoplasma. Para detecção do rRNA 16S do gênero *Mycoplasma* foi utilizado o par de iniciadores descritos por Young e colaboradores em 2010: GPO-3: 5'-GGG.AGC.AAA.CAG.GAT.TTA.ATA.CCC.T-3' e MGSO: 5'-

TGC.ACC.ATC.TGT.CAC.TCT.GTT.AAC.CTC-3' (Young et al., 2010), que amplificam um fragmento de 270 pares de bases (pb) comum a 40 tipos de micoplasma de diferentes espécies (Van Kuppeveld, 1994). Como controle positivo da presença e integridade do DNA genômico, bem como de que não havia inibidores na reação, foram utilizados iniciadores específicos para amplificação do gene constitutivo *HPRT1*: *Forward* (Fw): 5' – CAG.ACA.CCT.GTC.ATG.CTA.ATA.A-3' e *Reverse* (Rv): 5'-AGT.TGA.GAG.ATC.ATC.TCC.ACC.A-3', que amplificam um fragmento de 409 pb do genoma das células murinas e 429 pb do genoma humano. Em cada reação de PCR foram utilizados: Tampão de PCR 1X (Gibco); 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Promega); 0,25 mM de mix de dNTP (Promega); 2% de BSA (Sigma-Aldrich); 2,0 μM cada iniciador; 0,05 U/μl da enzima Taq polimerase (Phoneutria); água ultrapura q.s.p. (quantidade suficiente para) 20 μL; e 1 μL contendo 200 ng de DNA como molde. Os parâmetros do termociclador (Applied Biosystems) foram: 95 °C por 5 minutos (1 ciclo); 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto (35 ciclos); 72 °C por 10 minutos (1 ciclo), para amplificação do gene *HPRT1*; e 95 °C por 5 minutos (1 ciclo); 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 45 segundos, 72 °C por 1 minuto (35 ciclos); 72 °C por 10 minutos (1 ciclo), para amplificação do gene do micoplasma. Os produtos da PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1,5% em TAE 1x corado com SYBR Safe (Thermo Scientific) e visualizados sobre luz ultravioleta (UV).

Os produtos amplificados por PCR foram fracionados eletroforéticamente em gel de agarose 1% em tampão TAE 1X e nenhuma banda correspondente à região do rRNA 16S de micoplasma (270 pb) a partir das linhagens utilizadas neste trabalho foi observada, apesar de apresentarem amplificação do gene *HRTP1* (409 pb genoma murino e 439 pb genoma humano). Os resultados indicam que havia DNA nas amostras utilizadas como molde nas reações de PCR, que não havia inibidores da reação e que as células estavam livres da contaminação por micoplasma.

### 4.3 Ensaio de concentração celular para ensaio de viabilidade.

As linhagens celulares foram contadas e plaqueadas em triplicata nas concentrações 0,5 x 10<sup>4</sup>; 1,0 x 10<sup>4</sup>; 1,5 x 10<sup>4</sup>; 2,0 x 10<sup>4</sup>; 2,5 x 10<sup>4</sup> células/poço - em placa de 96 poços com fundo chato (Nunc) contendo 100 μL de meio de cultura específico para cada linhagem e incubadas por 64 horas em estufa a 37 °C com ambiente saturado em 5% de CO<sub>2</sub>, a fim de monitoramento da confluência das culturas após as 16 horas necessárias para adesão celular e 48 horas de tratamento. Após o tempo de incubação, as culturas foram fotografadas em microscópio

biológico trinocular invertido com câmera acoplada (AE2000-Quimis-MOTCI). A concentração escolhida para realização do ensaio de viabilidade celular foi aquela em que a cultura, ao final do tempo estimado, atingiu aproximadamente 85 – 95% de confluência.

#### 4.4 Otimização do protocolo para avaliação de citotoxicidade

Foi consultado o banco de dados *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer*, para o estabelecimento de um ponto de partida sobre a dosagem do fármaco doxorrubicina (DOX) a ser usada para cada linhagem celular humana. Este banco tem informações sobre as características de diversas linhagens de células de câncer humano e rastreia centenas de compostos, fornecendo dados de resposta de fármacos e de marcadores genômicos de sensibilidade (<https://www.cancerrxgene.org/>). Artigos científicos também foram objetos de estudo para a consulta, no caso daquelas linhagens que não possuíam dados registrados no banco acima citado.

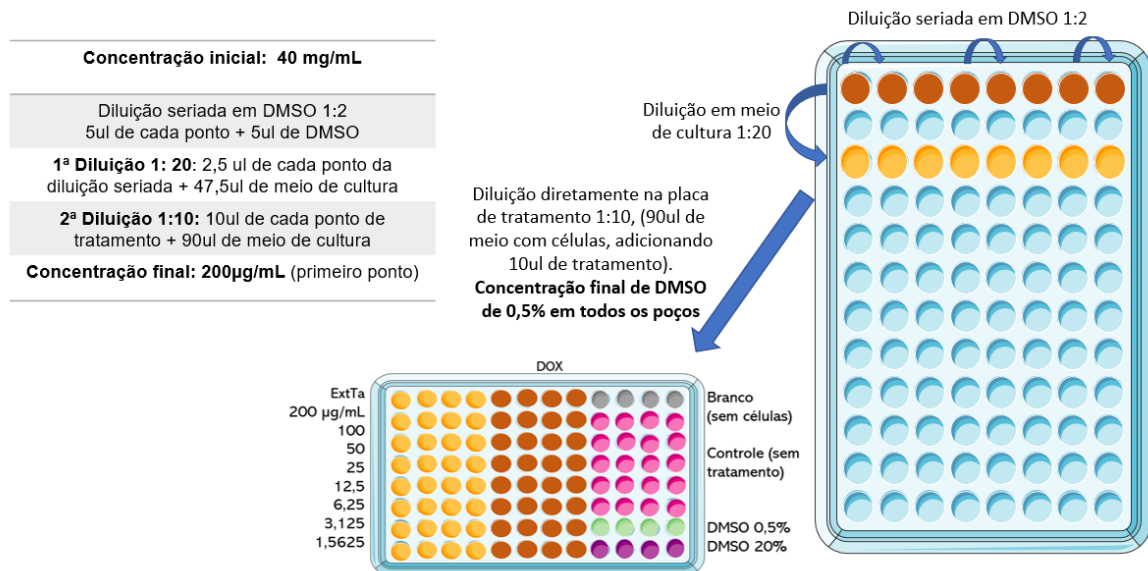
Para maior confiabilidade dos resultados, os ensaios foram realizados em quadruplicata técnica e, em pelo menos, triplicata biológica. Foram considerados como válidos os ensaios em que se obteve um resultado de até 30% de variabilidade entre os ensaios realizados.

Para evitar possíveis vieses no estudo relacionados à diferentes concentrações do diluente DMSO, foi realizada uma metodologia para que a concentração de DMSO fosse a mesma, independente do tratamento. Desta forma, todos os poços continham a mesma concentração de 0,5% de DMSO, concentração esta que foi verificada não ser tóxica para as células, não afetando, portanto, a viabilidade celular. Para tal, iniciou-se a diluição seriada do extrato e da doxorrubicina em DMSO a partir de uma concentração 200 vezes maior que a desejada para os pontos de tratamento. Posteriormente, ambos foram diluídos 20 vezes em meio de cultura específico para a linhagem celular, e por último foi feita uma diluição de 10 vezes, diretamente nos poços da placa de cultura de células, acrescentando 10 µL das 8 diferentes concentrações da diluição seriada na cultura de células contendo 90 µL de meio, conforme exemplificado no esquema da **Figura 4**.

Para todas as linhagens, a diluição inicial foi de 1:10 partindo de 800 µg/mL, e a partir dos primeiros resultados, a concentração inicial e a diluição seriada foram definidas de forma específica para cada linhagem, a fim de se obter dados que abrangessem mais pontos sobre a porção linear da curva, com pontos acima e abaixo da concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>). Também foram testadas todas as diluições do extrato em poços sem células com todos os

demais reagentes utilizados no ensaio de citotoxicidade para observar se haveria alguma reação cruzada entre os reagentes que pudesse gerar alguma diferença na absorbância.

**Figura 3 - Esquema de diluição para otimização do ensaio de citotoxicidade**



Exemplo de uma diluição seriada de 1:2 do ExtTa em DMSO com concentração final desejada de 200 µg/mL de ExtTa para o primeiro ponto de tratamento, e 0,5% de DMSO em todos os poços tratados.

#### 4.5 Avaliação do efeito citotóxico

A inibição do crescimento celular foi avaliada pelo ensaio de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide]. Trata-se de método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura a viabilidade celular por meio da atividade metabólica. Este ensaio é baseado na capacidade das desidrogenases mitocondriais de clivarem os anéis tetrazolium do corante MTT resultando na formação de cristais de formazan azuis (Stockert et al., 2018; van Meerloo et al., 2011).

As culturas celulares foram expostas a diluições em série do ExtTa e da DOX ou combinações dos dois tratamentos, a fim de avaliar o efeito citotóxico sobre as células. As linhagens celulares foram plaqueadas, conforme a concentração definida no ensaio piloto para cada linhagem, em quadruplicata, em 90 µL de meio específico contendo 10% de SBF em placas de 96 poços e, após 16 horas de incubação, 10 µL de cada tratamento, na concentração indicada, foram adicionados. Após 48 h de incubação, a cada poço foi adicionada uma solução de MTT (5 µg/µL; Sigma-Aldrich) em meio de cultura, e as culturas foram incubadas por 3 horas a 37 °C em estufa com atmosfera saturada com 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, o meio foi

removido, 100 µL do solvente (N' N' Dimetilformamida (Sigma) + SDS 10% (Affymetrix); 1:1 v/v) foram adicionados para solubilização dos cristais de formazan, e as placas foram incubadas por 2 h sob agitação. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 595 nm no equipamento *MULTISKAN SPECTRUM* (Thermo Scientific), sendo a intensidade da cor azul proporcional ao número de células viáveis na cultura. Poços que foram tratados com meio de cultura e DMSO 20%, foram utilizadas como controle de sobrevivência e de morte, respectivamente. Poços contendo apenas meio sem células foram utilizados como branco. A citotoxicidade foi avaliada pela relação entre a absorbância dos grupos tratados e o grupo controle, após a diferença do branco.

#### 4.6 Curvas dose-resposta e Cálculo do IC<sub>50</sub>

Para avaliar o potencial do extrato como agente antitumoral, foram considerados a concentração que inibe 50% das células (IC<sub>50</sub>) e o índice de seletividade (IS).

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT sendo os valores obtidos nos poços contendo as células que receberam tratamento normalizados com aqueles obtidos de poços contendo células não tratadas (controle) e dos quais foi subtraído o valor do branco (poços com meio de cultura sem células). Para tal, a seguinte fórmula foi empregada:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Média das absorbâncias do grupo tratado} - \text{média das absorbâncias do branco}}{\text{Média das absorbâncias do grupo controle} - \text{média das absorbâncias do branco}} \times 100$$

As linhagens celulares não tumorais GM637, HEK-293T, NIH-3T3 e L929 foram utilizadas para determinação do IS dos tratamentos. O IS é determinado com a seguinte equação (López-Lázaro, 2015):  $IS = \frac{IC_{50} \text{ linhagem não tumoral}}{IC_{50} \text{ linhagem tumoral}}$

Os valores obtidos foram utilizados para determinar o IC<sub>50</sub>, calculado com base na curva de dose-resposta sigmoide (inclinação variável), a partir da regressão não linear das curvas obtidas versus o log da concentração molar dos compostos testados utilizando-se a seguinte equação:  $Y = \text{Bottom} + [\text{Top} - \text{Bottom} + 10(\log IC_{50} - X) \times n_H]$  onde IC<sub>50</sub> é o ponto médio da curva,  $n_H$  é a inclinação,  $X$  é o logaritmo da concentração composta, e  $Y$  é a resposta (viabilidade celular). Os parâmetros *Top* e *Bottom* são platôs nas unidades do eixo Y. O software GraphPrism definiu a parte inferior como zero e a parte superior como 100% quando os dados foram ajustados a uma curva de inclinação variável.

## 4.7 Análise CompuSyn

As células MDA-MB-231, 4T1, Saos-2, HT1080, HCT116 foram tratadas com diferentes concentrações de ExtTa combinado com a DOX. A interação do ExtTa com 5-FU foi avaliada sobre as linhagens de câncer colorretal WiDr e HCT116. A citotoxicidade foi determinada pelo ensaio MTT após 48 h. O software CompuSyn (CompuSyn, Inc., Paramus, NJ, EUA) calcula um Índice de Combinação (CI) que atribui valores numéricos a ação de sinergismo, aditividade ou antagonismo entre compostos. O efeito combinatório de 8 combinações de doses diferentes de ExtTa, DOX ou 5-FU (diluições 1: 2, em uma proporção constante) foi calculado de acordo com o método Chou-Talalay Combination Index (Chou, 2006, 2010) com base na viabilidade celular avaliada pelo ensaio MTT. Para cada tratamento foi calculada a fração de células inibidas (Fa) em cada dose do tratamento ou da combinação. Fa = 0 significa que foi encontrado um efeito não inibitório; Fa = 1 significa que foi alcançado um efeito inibitório de 100%. O CI foi determinado automaticamente pelo software CompuSyn com base na equação do efeito mediano.  $CI < 1$  indica efeito sinérgico;  $CI = 1$  significa efeito aditivo, e quando  $CI > 1$  a interação é considerada antagônica. Além disso, o índice de redução de dose (DRI) foi calculado para avaliar se é possível reduzir a dosagem dos compostos para atingir o mesmo efeito inibitório em um cenário de combinação.  $DRI > 1$  representa a possibilidade de uma redução favorável da dose (Chou, 2010).

## 4.8 Análise do perfil de expressão gênica

### 4.8.1 Extração de RNA

O RNA das células foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Sigma) de acordo com as recomendações do fabricante. Foi utilizado 250  $\mu$ L de TRIzol por poço da placa de 24 poços. A quantificação do RNA total, bem como sua pureza, foi verificada por espectrofotometria no comprimento de onda de 260 nm usando o NanoDrop® (Thermo scientific). A contaminação do RNA total por proteínas foi estimada pela razão entre as absorvâncias 260/280 nm e a razão 260/230 forneceu a estimativa da contaminação do RNA por fenol, polissacarídeo e sais. Foram considerados RNAs com pureza aceitável os que apresentaram valores da razão 260/280 de aproximadamente 2,0 e da razão 260/230 entre 1,8 e 2,2. A integridade do RNA total foi verificada através de fracionamento eletroforético de 400 ng de cada amostra em gel de agarose 1% corado com SYBR® Safe (Invitrogen) e observado sobre a luz ultravioleta (UV). Foram

considerados de boa integridade as amostras nas quais as bandas correspondentes ao RNA ribossomal (rRNA) 28S apresentavam o dobro ou pelo menos a mesma intensidade das bandas correspondentes ao rRNA 18S e que não apresentassem um perfil de arraste na corrida.

#### 4.8.2 Síntese de cDNA

Para síntese do cDNA, 2 µg do RNA total de cada amostra foram submetidos à transcrição reversa (RT) utilizando iniciadores oligodT (Invitrogen) 0,5 µg/mL. A qualidade do cDNA sintetizado foi aferida pela amplificação, por PCR, do gene constitutivo da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) utilizando os iniciadores Fw: CTCTCTGCTCCTCTGTTC e Rv: GATGATGACCCTTTTGGCTC. Os parâmetros utilizados para as reações de PCR foram: 95 °C/5' – 1ciclo (desnaturação); 95 °C/30" (desnaturação), 55 °C 45" (anelamento), 72 °C/1' (extensão) – 35 ciclos; 72°C/10' – 1 ciclo (extensão). O produto da amplificação foi avaliado por fracionamento eletroforético em gel de agarose 1% em TAE 1X corado com SYBR® Safe (Invitrogen) e observado sobre a luz UV. Foram consideradas de boa qualidade as amostras que apresentavam amplificação da banda de 434 pb sem sinais de inibição da reação.

#### 4.8.3 Construção de análise dos iniciadores específicos

Inicialmente, foi realizada uma busca no NCBI (National Center for Biotechnology Information) pela sequência nucleotídica do transcrito. A sequência encontrada foi submetida a uma análise de similaridade por alinhamento através do algoritmo BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool) para identificar as diferentes isoformas, assim como o grau de similaridade entre as sequências. Vários critérios foram utilizados para a construção dos iniciadores incluindo anelamento presente em todas as isoformas em junção de éxon com o intuito de se evitar amplificação de DNA genômico, formação de estruturas secundárias, conteúdo GC e temperatura de melting (TM). Em seguida, os iniciadores selecionados foram submetidos à análise empregando o programa Oligoanalyzer (Integrated DNA Technologies, IDT), de forma a escolher aqueles que atendessem os parâmetros estabelecidos.

A padronização da eficiência de amplificação dos iniciadores para os transcritos dos genes alvos foi feita com base na inclinação da curva (slope) de diluições seriadas (1:10, 1:100 e 1:1000) de cDNA de células cuja expressão era sabidamente positiva para cada gene alvo.

Nos ensaios, foram utilizadas as concentrações (pmol/ $\mu$ l) dos iniciadores que apresentavam valores de inclinação variando de -3,1 a -3,6 (110- 90% de eficiência, respectivamente). Um segundo critério foi a análise da curva de dissociação, onde foram selecionadas as condições que favoreciam a formação de um único pico de amplificação verificando os critérios citados para a otimização.

#### 4.8.4 Avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real

A expressão gênica foi avaliada por RT-PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), utilizando o cDNA previamente sintetizado a partir do RNA extraído das células. Foram utilizados os pares de iniciadores específicos para cada gene, conforme descrito na Tabela 2.

**Tabela 2 - Sequência dos iniciadores específicos para análise de expressão por RT-qPCR**

ID	Sequência	Tamanho amplicon	Slope	Eficiência	Iniciadores [pmol]
<b>BCL2</b>	AGG ATA ACG GAG GCT GGG AT	106 pb	-3,31	100%	10
	CAG GGC CAA ACT GAG CAG AG				
<b>MYC</b>	GTA GTG GAA AAC CAG CAG CC	109 pb	-3,36	99%	10
	TCG TCG CAG TAG AAA TAC GG				
<b>CDKN1A</b>	CAG ACC AGC ATG ACA GAT TTC TAC	69 pb	-3,39	97%	10
	CGG ATT AGG GCT TCC TCT TG				
<b>mTOR</b>	TGG GGT TTA GGT CAG TGG GA	96 pb	-2,656	97%	5
	CAG TGC CAG CAC AGC TCT AT				
<b>MAPK1</b>	CGC CGA AGC ACC ATT CA TCT GAG CCC TTG TCC TGA	135 pb	-2,737	97%	5
	GCG TTC CTC TTA GCC CAG TA				
<b>EGF</b>	AAT GGT TGT GGT CCT GAA GC	100 pb	-3,278	102%	5

<b>AKT</b>	AAC ACC TTC ATC ATC CGC	85 pb	-2,745	97%	15
	TG				
	ACT CCT CCC GCT CCT CA				
<b>GAPDH</b>	ACC CAC TCC TCC ACC TTT	103 pb	-3,495	93%	10
	GA				
	CTG TTG CTG TAG CCA AAT				
<b>BAX</b>	GCC CTT TTG CTT CAG GGT	121 pb	-3,33	100%	10
	TTC				
	TGA GAC ACT CGC TCA GCT				
	TC				

Para a RT-qPCR foi utilizado o sistema de fluorescência SYBR Green Master Mix (Applied Technologies) e a plataforma QuantStudio 3 Real Time PCR System (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific).

Para padronização das reações, foram feitas curvas de diluição seriadas do cDNA de amostras que sabidamente expressam os genes supracitados utilizando iniciadores cujas concentrações variaram de 5 a 20 pmol/ $\mu$ L. As reações tiveram sua eficiência (E) calculada utilizando a Equação 1, onde o *slope* é o decaimento da curva de diluição.

#### Equação 1 - Cálculo de eficiência de amplificação

$$E = \left[ \left( 10^{-\frac{1}{slope}} \right) - 1 \right] \cdot 100$$

Foram consideradas padronizadas aquelas condições que apresentaram eficiência de amplificação na faixa de 90 - 110% e com um pico único nas curvas de dissociação. Para todos os genes, foi utilizado um programa de ciclagem universal: 50 °C/2' – 1 ciclo; 95 °C/10' – 1 ciclo; 95 °C/15" e 60 °C/1' – 40 ciclos.

A curva de dissociação foi obtida empregando os seguintes parâmetros no termociclador: 95 °C 15', 60 °C 15' e 95 °C 15'.

A análise da expressão gênica foi feita utilizando uma diluição 1:10 de amostras de cDNA das células tratadas e controle, empregando o método de quantificação relativa normalizada para um gene de expressão constitutiva *GAPDH* e a fórmula proposta por Pfaffl (Equação 2), onde R é a expressão relativa normalizada, Ealvo é a eficiência de amplificação

dos iniciadores do gene de interesse,  $E_{ref}$  é a eficiência de amplificação dos iniciadores do gene de referência e  $C_q$  é o ciclo de quantificação (Pfaffl, 2001).

#### **Equação 2 - Cálculo da expressão relativa normalizada utilizando um gene calibrador**

$$R = \frac{E_{alvo}^{\Delta Cq_{alvo}} (\text{calibrador-amostra})}{E_{ref}^{\Delta Cq_{ref}} (\text{calibrador-amostra})}$$

#### **4.9 Avaliação do efeito biológico do extrato no ciclo celular**

As alterações resultantes do tratamento com o ExtTa nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2/M) foram avaliadas pelo método de Nicoletti e colaboradores (Nicoletti et al., 1991). As células foram plaqueadas, em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células por poço em 400  $\mu\text{L}$  de meio), e incubadas por 16 horas a 37 °C em estufa com atmosfera saturada de 5% de  $\text{CO}_2$ . As células foram, então, incubadas com meio contendo 10% de SFB e ExtTa. A dose de ExtTa usada no tratamento foi calculada com base na concentração de  $\text{IC}_{50}$  das linhagens tumorais T98G e HCT116 (18  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), durante os períodos de 24 h e 48 h, à 37 °C a 5% de  $\text{CO}_2$ . Após o período de tratamento, o sobrenadante da cultura foi coletado, as células foram lavadas com PBS (200  $\mu\text{L}$ ), que também foi coletado. As células foram tripsinizadas (100  $\mu\text{L}$  de tripsina 0,25% - EDTA 0,53 mM - Gibco) e ressuspendidas com 200  $\mu\text{L}$  de meio de cultura, após a homogeneização, todo o conteúdo foi transferido para tubos de 1 mL e centrifugados a 400 X g durante 7 minutos em microcentrífuga (Denver Instrument Company, USA). O sobrenadante foi aspirado e ao precipitado de células foram acrescentados 300  $\mu\text{L}$  de uma solução fluorocrômica hipotônica (HFS), contendo 50 mg/mL de iodeto de propídeo - IP (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) e 0,1% de triton X-100 (Sigma, Saint Louis, Missouri USA) em citrato de sódio a 0,1% (Sigma, Saint Louis, Missouri USA). As amostras foram incubadas por 2 h a 4 °C e posteriormente foi feita a análise por citometria de fluxo (BD FACSCan™ - BECTON DICKINSON pertencente ao Laboratório de Citometria do ICB-UFMG). Os resultados foram analisados através do software FlowJo VX (FlowJo, LLC and Illumina, Inc.)

## **4.10 Caracterização do extrato**

### **4.10.1 Determinação de proteínas totais**

A quantificação do conteúdo proteico do extrato foi feita como uma etapa prévia ao fracionamento na coluna de filtração molecular. A quantificação foi realizada utilizando-se o método de Bradford (MM, 1976), que envolve a ligação de Coomassie Brilliant Blue G-250 à proteína. A ligação do corante à proteína causa uma mudança no máximo de absorção do corante de 465 para 595 nm, e este aumento da absorção em 595 nm é monitorado (Thermo Scientific, 2010; Olson, 2016). O conteúdo proteico foi estimado utilizando-se como referência a curva de calibração da proteína albumina de soro bovino (BSA) (USBiological, BSA Fraction V. Low Salt, USA) preparada, em duplicata, usando diluições seriadas de 1:2 a partir de 1 mg/mL em água. Após subtrair a média do branco nas leituras, foi feita a média das triplicatas técnicas do ExtTa, e a absorbância das concentrações foi comparada com a absorbância da curva padrão de BSA.

### **4.10.2 Fracionamento do extrato por Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas**

Para a separação das frações por Cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) a suspensão etanólica dos extratos foi concentrada em liofilizador K105 (LIOTOP). Após secagem, o extrato foi solubilizado em 20  $\mu$ mol Tris-HCl (Affymetrix) em pH 8,0. Em seguida, a solução foi submetida à cromatografia utilizando uma coluna de filtração molecular superose TM 12 10/300 GL (GE LifeSciences) acoplada ao equipamento FPLC (Pharmacia biotec, modelo LKB PUMP p500). O monitoramento das frações eluídas foi realizado na região do ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm. O fracionamento foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) com a colaboração do técnico Jamil Silvano de Oliveira. As frações coletadas foram liofilizadas, solubilizadas em DMSO 100% (Sigma) e estocadas em freezer a -20 °C.

### **4.10.3 Caracterização estrutural do ExtTa por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

A caracterização estrutural do ExtTa e de suas frações foi feita a partir da espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FTIR). A análise foi realizada a partir das amostras liofilizadas, utilizando-se um Espectrofotômetro IRPrestige-21, da marca Shimadzu, sob as

seguintes condições: 30 varreduras na faixa de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ . Para tratar os dados obtidos foram utilizados os softwares IRsolution e Origin8. Essa caracterização foi feita em colaboração com a doutora Patrícia Santiago de Oliveira Patricio que coordena o Laboratório Intechlab do Departamento de Química do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais (CEFET/MG) e a doutoranda Ingrid Amélia, orientada por ela.

#### 4.11 Análises estatísticas

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade foram expressos como média de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada utilizando-se o GraphPad Prism 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram estimados a partir da análise de regressão não linear utilizando as equações “*Dose-response curves – Inhibitor*” e, posteriormente, escolhendo as equações “*log (inibitor) vs. response – variable slope (four-parameteres)*” ou “*log (inibitor vc. normalized response – variable slope)*”, dependendo disposição dos dados e simetria da curva, para a escolha da equação. A significância estatística foi definida em  $p < 0,05$ , as comparações foram analisadas utilizando-se o teste estatístico de t de *Student*.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Obtenção do extrato etanólico de *T. asperelloides*

O extrato etanólico de *T. asperelloides* foi obtido a partir de suspensão contendo hifas e esporos do fungo cultivado em meio BDA por 7 dias em etanol 95%, conforme descrito anteriormente. O extrato bruto do fungo foi denominado ExtTa.

Ao todo, após a liofilização, foram obtidos 2,05 g de extrato bruto. Destes 1,7 g foram solubilizados em 8,4 mL de DMSO 100%, para melhor conservação do extrato e tratamento das linhagens celulares com o extrato bruto, e 0,4 g foi solubilizado em 3 mL de Tris-HCl pH 8,0, para o fracionamento por FPLC.

#### 5.1.1 Caracterização do extrato

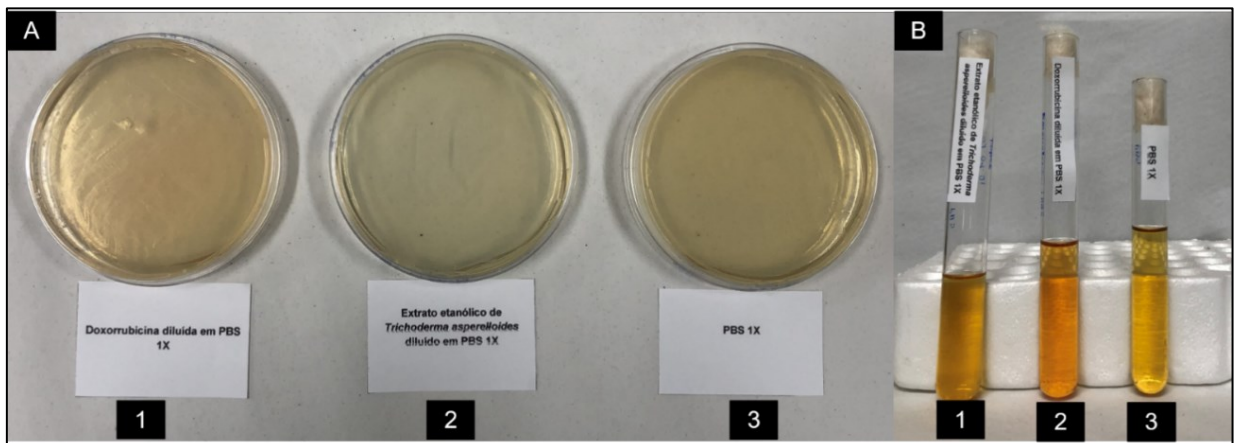
A quantificação de proteínas é frequentemente necessária antes do processamento de amostras de proteínas para isolamento, separação e análise por técnicas cromatográficas, eletroforéticas e imunoquímicas. A dosagem de proteínas totais presentes no extrato total foi feita utilizando-se o método de Bradford. O resultado das dosagens indicou que o ExtTa possui

aproximadamente 2% de conteúdo proteico. Foram obtidos 40,58 mg de proteínas totais no extrato (ExtTa), na concentração de 4,28 mg/mL de proteína no extrato solubilizado em DMSO e 2,12 mg/mL de proteína no extrato solubilizado em Tris-HCl (3 mL, 349 mg totais). A discrepância na concentração de proteína observada deve-se ao fato de que as amostras em Tris-HCl estavam mais diluídas (Tabela 3).

### 5.1.2 Viabilidade microbiana

Uma vez que o extrato e a doxorrubicina seriam usados para tratamento de células em cultura, fez-se importante testar se o processo de extração e a solubilização em DMSO haviam sido de fato eficientes para eliminar formas de vida associadas à preparação, de forma a se evitar o carreamento de contaminação para a cultura de células. Conforme mostrado na **Figura 4**, não houve crescimento microbiano em nenhuma das amostras analisadas o que atesta que as amostras não estavam contaminadas por fungos ou bactérias, e que poderiam ser utilizados sem carrear contaminações para unidade de cultura de células.

**Figura 4 - Avaliação de viabilidade microbiana nas preparações do extrato do fungo *T. asperelloides* e diluição da doxorrubicina**



A DOX e o ExtTa diluídos em PBS 1x foram incubados em BDA (A) e caldo tioglicolato (B), a 28 °C e 37 °C, respectivamente, durante 7 dias, juntamente com o controle contendo apenas PBS 1x (A.3; B.3). Não foi observado crescimento em nenhum dos meios de cultura em nenhuma das amostras analisadas.

### 5.2 Ensaio de determinação da concentração celular.

A fim de definir quais tipos celulares seriam mais susceptíveis à citotoxicidade do extrato bruto, realizamos uma triagem com linhagens celulares humanas e murinas provenientes de diferentes tipos de tecidos neoplásicos. Para otimizar o ensaio, previamente, foi realizado um ensaio piloto para definir o número ideal de cada tipo celular a ser plaqueado de forma a obter-

se, aproximadamente, 95% de confluência após as 64 horas do ensaio de viabilidade (16 horas para aderência da cultura celular mais 48 h de tratamento). As células foram contadas e plaqueadas na placa de 96 poços em 100 µL de meio, em 5 diferentes concentrações:  $0,5 \times 10^4$ ,  $1,0 \times 10^4$ ,  $1,5 \times 10^4$ ,  $2,0 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$  células/poço. A **Tabela 3** mostra o número de células considerado ideal para os ensaios determinado para cada uma das linhagens celulares.

**Tabela 3 – Ensaio de concentração celular para ensaio de viabilidade na placa de 96 poços.**

Linhagem celular	Número de células ideal para os ensaios*
GM637	$1,5 \times 10^4$
HEK-293T	$1,5 \times 10^4$
NIH/3T3	$0,5 \times 10^4$
L929	$0,5 \times 10^4$
T98G	$1,5 \times 10^4$
MDA-MB-231	$1,5 \times 10^4$
4T1	$1,0 \times 10^4$
A549	$1,5 \times 10^4$
HCT116	$1,0 \times 10^4$
LB373	$1,0 \times 10^4$
SaI/N	$1,0 \times 10^4$
HT1080	$1,0 \times 10^4$
WiDr	$2,0 \times 10^4$
Saos-2	$2,0 \times 10^4$

\*concentração de células/poço de placa de 96 poços

### 5.3 Otimização do ensaio de viabilidade

O solvente tanto do extrato quanto da doxorrubicina foi DMSO 100%. Para avaliar a citotoxicidade do solvente foi analisada a viabilidade das células nos poços tratados apenas com o meio de cultura e os tratados com meio acrescido de DMSO na concentração final de 0,5%. Não foi observada interferência do DMSO a 0,5% sobre a viabilidade de nenhuma das células utilizadas neste projeto, como mostrado na **Tabela 5**, em que não houve diferença estatisticamente significativa entre a média da absorbância dos poços com ou sem DMSO 0,5%.

**Tabela 4 - Avaliação da interferência do DMSO a 0,5% sobre a viabilidade celular**

Linhagem celular	Sem tratamento*	DMSO 0,5%*	P**
GM637	0,240	0,247	0,119
HEK-293T	0,522	0,463	0,304
NIH/3T3	0,328	0,353	0,403
L929	0,549	0,530	0,822
T98G	0,501	0,537	0,232
MDA-MD-231	0,537	0,535	0,916
4T1	0,372	0,388	0,609
A549	0,380	0,391	0,827

<b>HCT116</b>	0,562	0,537	0,382
<b>LB373</b>	0,481	0,506	0,167
<b>Sal/N</b>	0,458	0,446	0,453
<b>HT1080</b>	0,362	0,374	0,460
<b>WiDr</b>	0,519	0,526	0,820
<b>Saos-2</b>	0,234	0,220	0,080

ensaio realizado em quadruplicata técnica; média das absorvâncias obtidas no espectrofotômetro, leitura de 595nm. \*\*p value, unpaired t test. GraphPad Prism 8.0.1.

Para avaliar possíveis interferências na absorvância resultante da interação entre diferentes concentrações do ExtTa e os reagentes utilizados na reação, realizou-se a leitura de oito concentrações distintas do ExtTa (800 a 6,25 µg/mL). Essas leituras foram comparadas com aquelas dos poços que continham apenas meio de cultura. A média das absorvâncias de 0,05nm foi determinada para todos os poços, tanto para o ExtTa sem células quanto para os poços contendo apenas meio de cultura. Os resultados indicaram que não houve reação cruzada dos reagentes do ensaio com o ExtTa.

#### **5.4 Avaliação do efeito citotóxico do ExtTa e da DOX sobre a viabilidade de células tumorais *in vitro***

O efeito citotóxico do ExtTa e da DOX foram avaliados através da determinação da concentração inibitória de 50% das células (IC<sub>50</sub>).

As **Figuras 5 a 18** correspondem aos resultados apresentados como a média de três experimentos independentes. Foram realizadas replicatas até que, pelo menos, três experimentos fossem obtidos nos quais os valores de IC<sub>50</sub> com apresentassem variação de até 30% entre eles. Os dados de todos os ensaios realizados são apresentados no APÊNDICE nas **Figuras S1 a S14**.

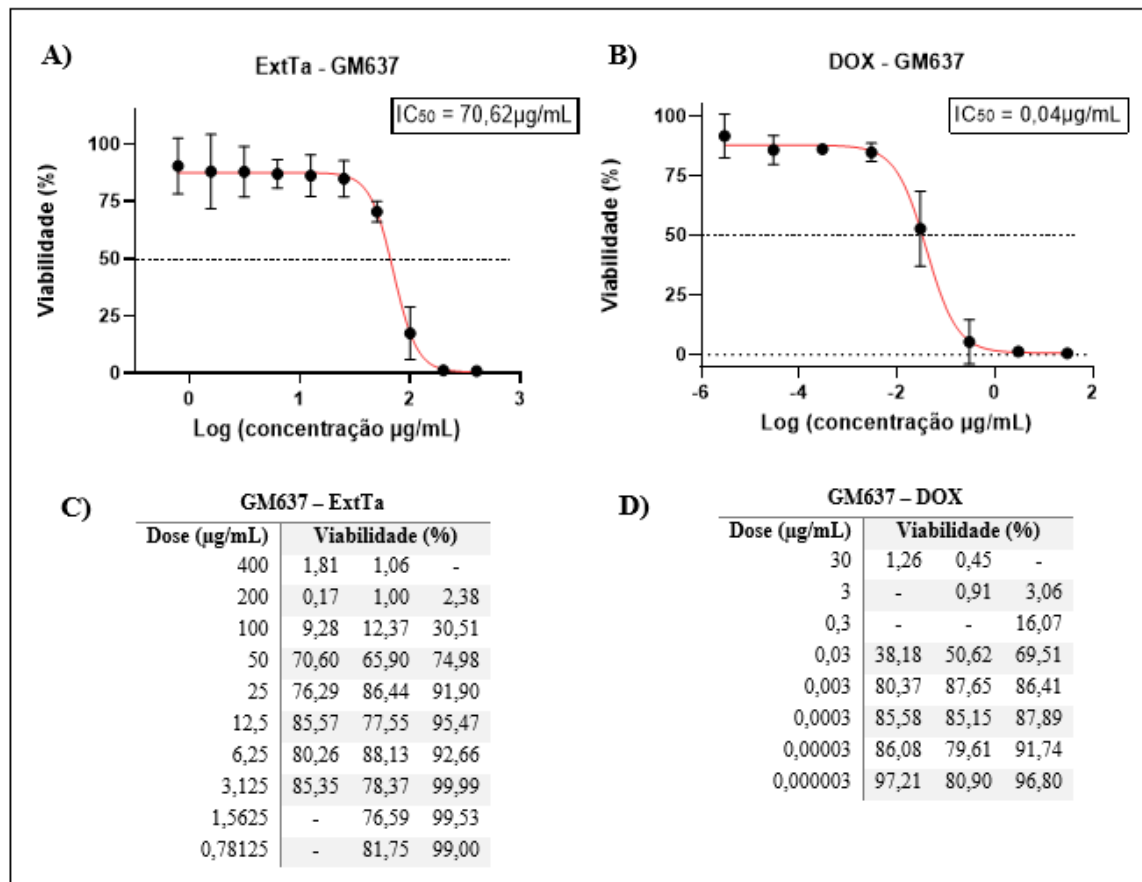
Os resultados indicaram que o tratamento com o extrato do fungo apresentou citotoxicidade de uma maneira dependente da dose. O ExtTa apresentou citotoxicidade para as linhagens não tumorais GM637, HEK-293T, NIH/3T3 e L929, sendo os valores de IC<sub>50</sub> médio encontrados de 70,62, 53,82, 47,70 e 53,67 µg/mL, respectivamente. Entretanto, as células tumorais foram bem mais sensíveis à atividade citotóxica do ExtTa do que as células não tumorais: T98G (IC<sub>50</sub> médio de 17,78 µg/mL) **Figura 9**, MDA-MB-231 (IC<sub>50</sub> = 39,32 µg/mL) **Figura 10**, 4T1 (IC<sub>50</sub> = 35,53 µg/mL) **Figura 11**, A549 (IC<sub>50</sub> = 62,43 µg/mL) **Figura 12**, HCT116 (IC<sub>50</sub> = 17,97 µg/mL) **Figura 13**, LB373 (IC<sub>50</sub> = 37,71 µg/mL) **Figura 14**, Sal/N (IC<sub>50</sub> = 55,62 µg/mL) **Figura 15**, HT1080 (IC<sub>50</sub> = 25,52 µg/mL) **Figura 16**, WiDr (IC<sub>50</sub> = 26,05 µg/mL) **Figura S13** e Saos-2 (IC<sub>50</sub> = 25,59 µg/mL) **Figura S14**. Foi observado que das linhagens

tumorais, as células T98G (glioblastoma) e HCT116 (adenocarcinoma de cólon) foram as mais sensíveis a ação citotóxica do ExtTa, e as linhagens A549 e SaI/N apresentaram susceptibilidade semelhante à apresentada pelas células não tumorais.

Na avaliação de citotoxicidade da DOX para as linhagens não tumorais, foi observado que as células GM637 ( $IC_{50} = 0,04 \mu\text{g/mL}$ ), HEK-293T ( $IC_{50} = 0,37 \mu\text{g/mL}$ ), NIH/3T3 ( $IC_{50} = 0,01 \mu\text{g/mL}$ ) e L929 ( $IC_{50} = 0,03 \mu\text{g/mL}$ ), são sensíveis a ação citotóxica. Nas linhagens tumorais o tratamento com a DOX apresentou os seguintes valores de  $IC_{50}$  médio: T98G ( $IC_{50} = 13,88 \mu\text{g/mL}$ ), MDA-MB-231 ( $IC_{50} = 0,42 \mu\text{g/mL}$ ), 4T1 ( $IC_{50} = 0,34 \mu\text{g/mL}$ ), A549 ( $IC_{50} = 0,40 \mu\text{g/mL}$ ), HCT116 ( $IC_{50} = 0,51 \mu\text{g/mL}$ ), LB373 ( $IC_{50} = 3,45 \mu\text{g/mL}$ ), SaI/N ( $IC_{50} = 0,29 \mu\text{g/mL}$ ), HT1080 ( $IC_{50} = 0,04 \mu\text{g/mL}$ ), WiDr ( $IC_{50} = 0,19 \mu\text{g/mL}$ ) e Saos-2 ( $IC_{50} = 0,18 \mu\text{g/mL}$ ) (**Tabela 5 e Figuras 5 a 18**). Assim, foi constatado que as linhagens não tumorais GM637, NIH/3T3 e L929 apresentaram maior sensibilidade à DOX, como também a linhagem tumoral HT1080. Foi observado também que as linhagens T98G e LB373 são resistentes a ação citotóxica deste fármaco.

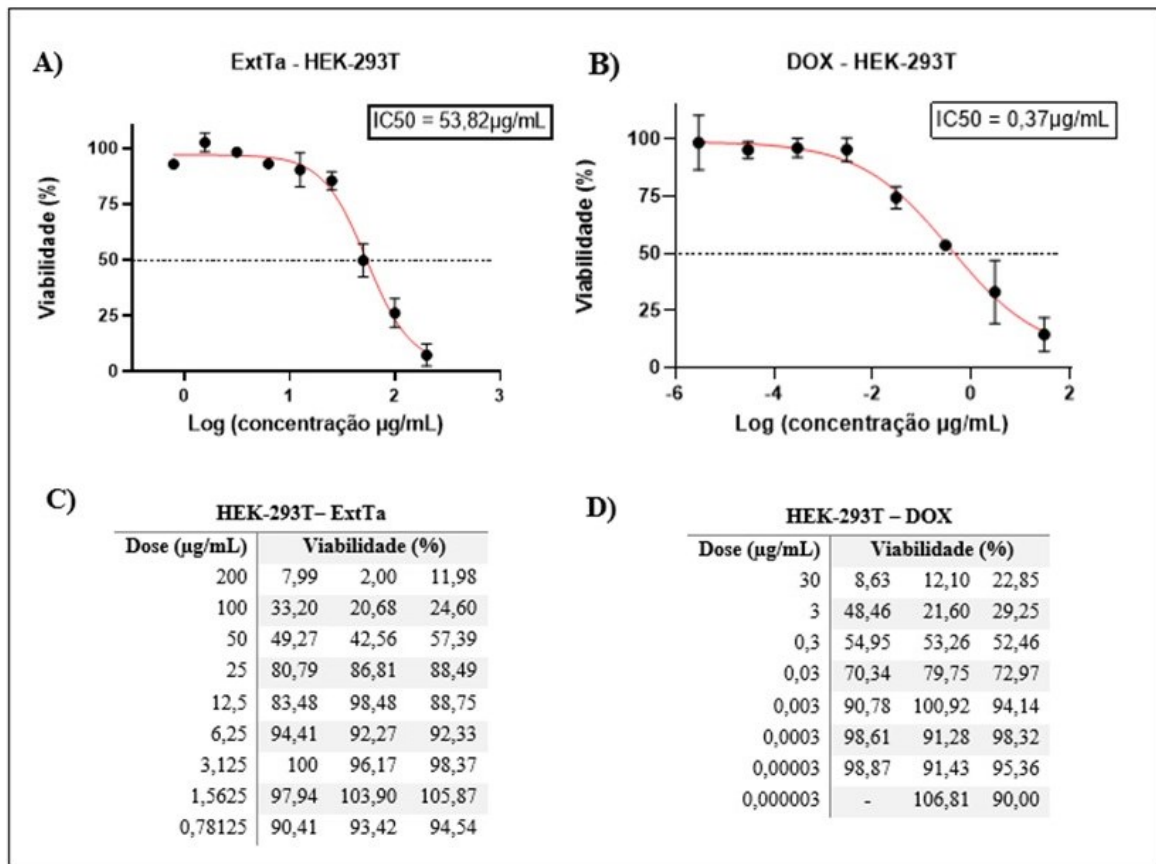
No tratamento das linhagens WiDr e Saos-2 com a DOX, o  $IC_{50}$  estimado em cada ensaio apresentou variações, e não foram obtidos três ensaios com resultados que apresentassem no máximo 30% de diferença da média aritmética entre eles, critério considerado como requisito para admissão no estudo, mesmo após a realização de cinco ensaios independentes para cada linhagem (**Figuras S13 e S14**). Dessa forma, os dados das replicatas dos ensaios para essas linhagens tumorais são apresentados separadamente nas **Figuras 17 e 18**. O  $IC_{50}$  médio estimado para as próximas análises para essas linhagens foi obtido utilizando os dados dos dois ensaios independentes que apresentaram valores do  $IC_{50}$  similares (**Tabela 5**).

**Figura 5 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular não tumoral de fibroblasto humano GM637**



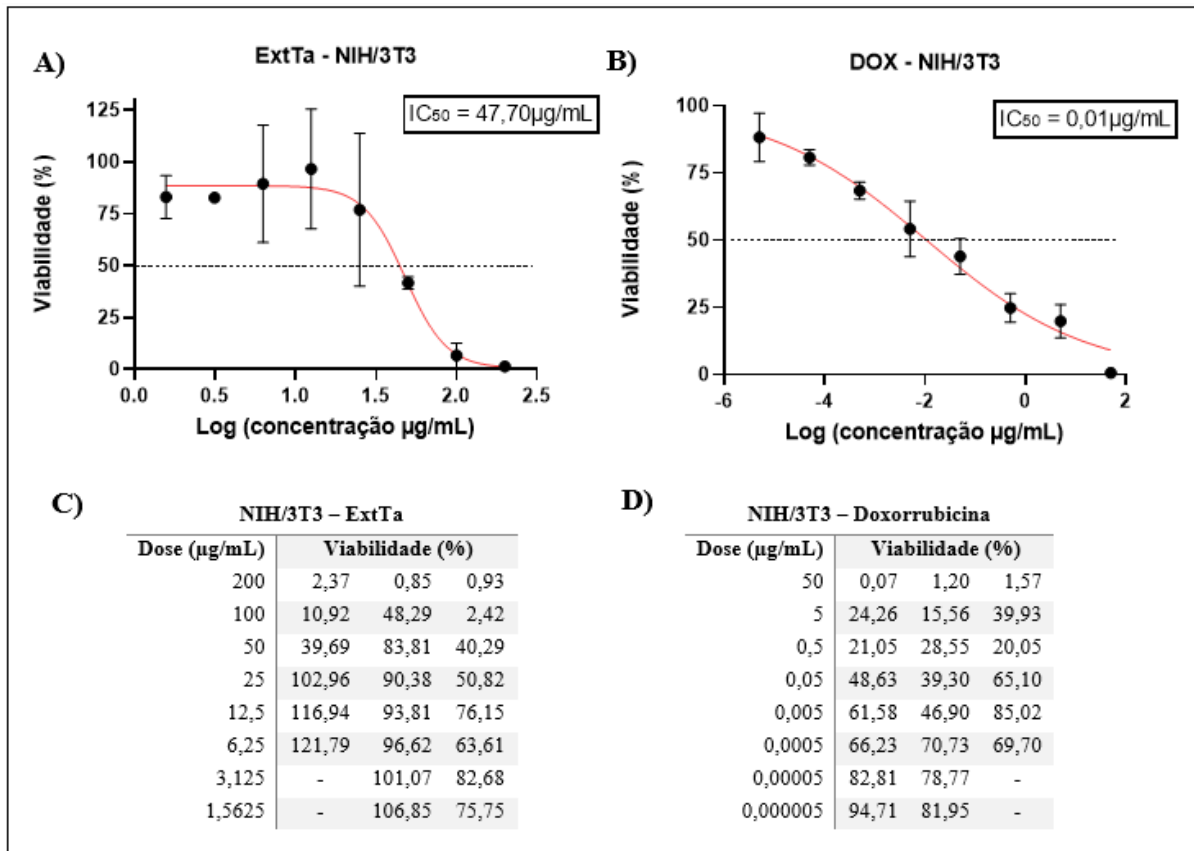
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 6 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular não tumoral de rim embrionário humano HEK-293T**



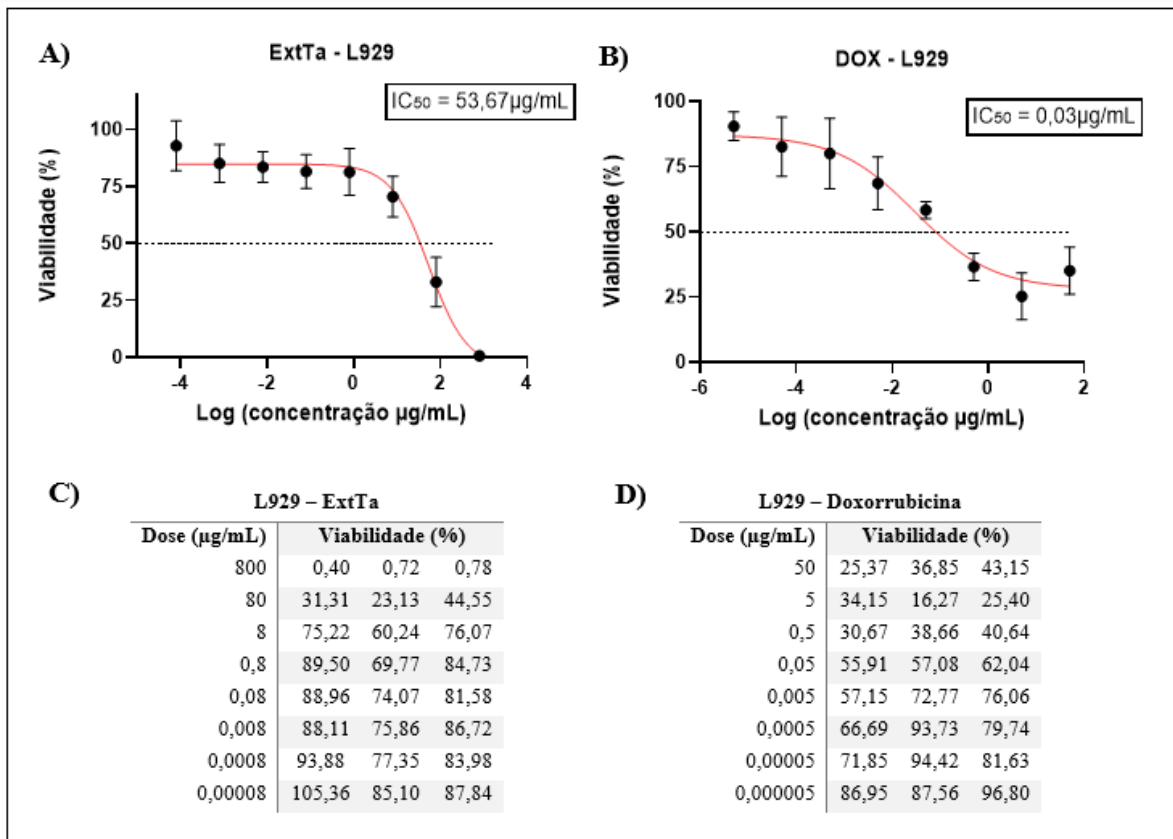
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 7 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular não tumoral de fibroblasto murino NIH/3T3**



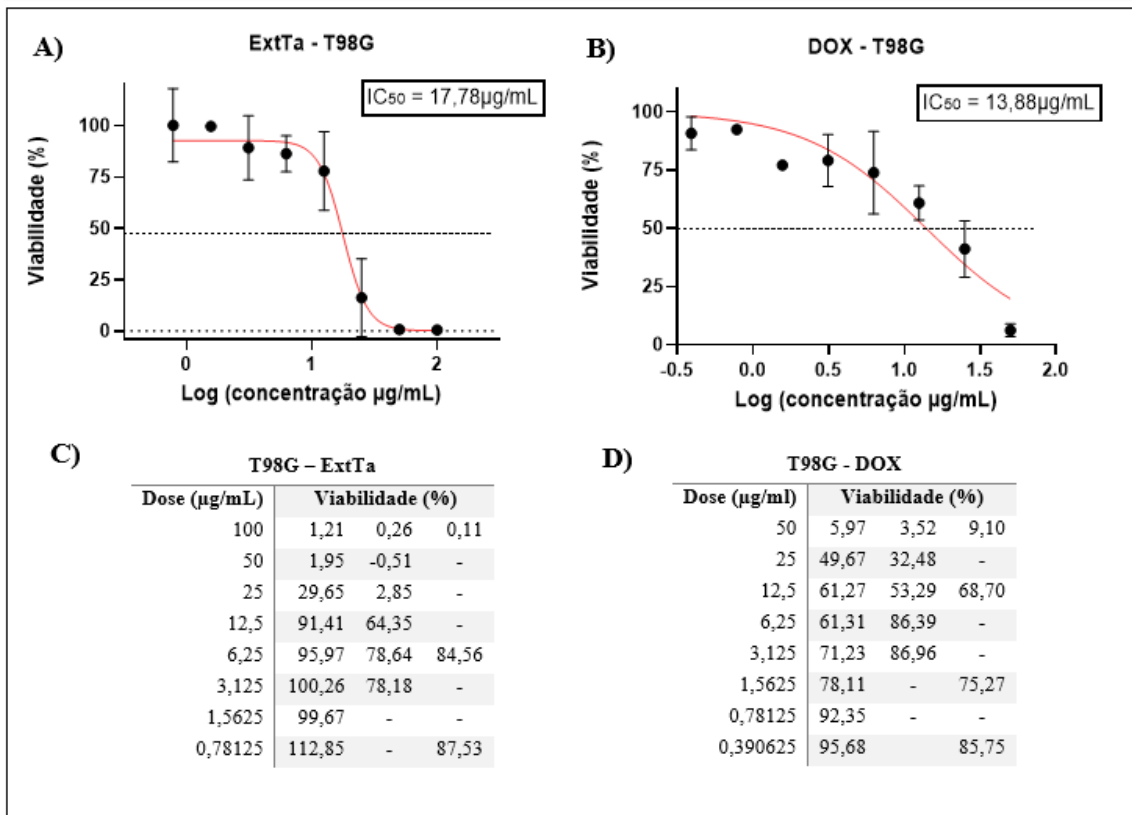
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 8 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular não tumoral de fibroblasto murino L929**



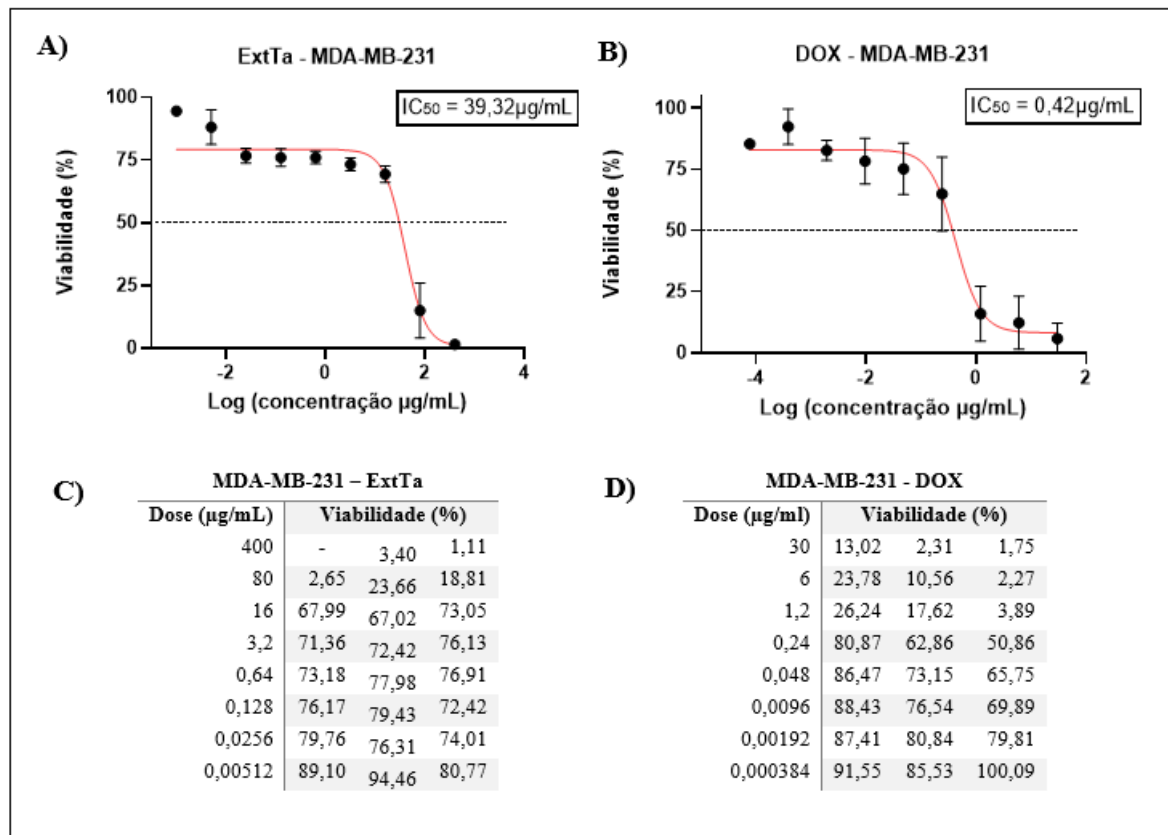
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 9 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de glioblastoma humano T98G**



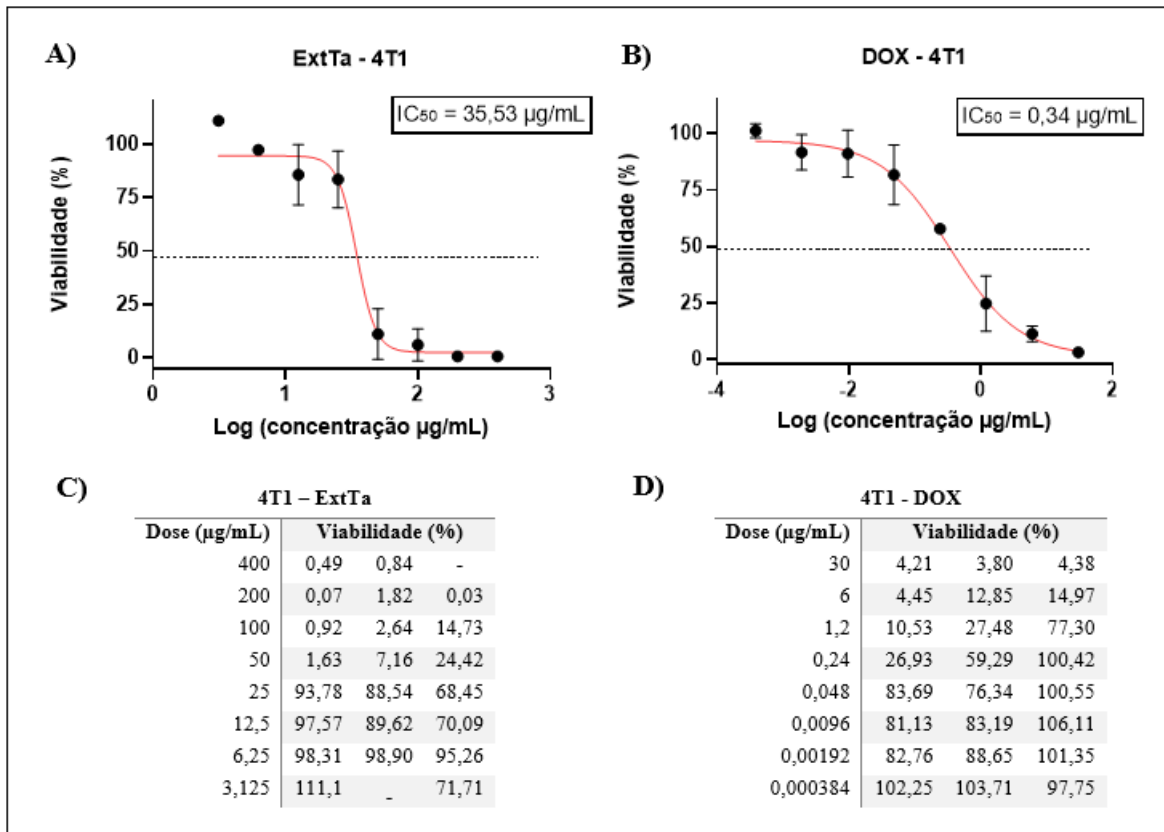
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 10 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MDA-MB-231**



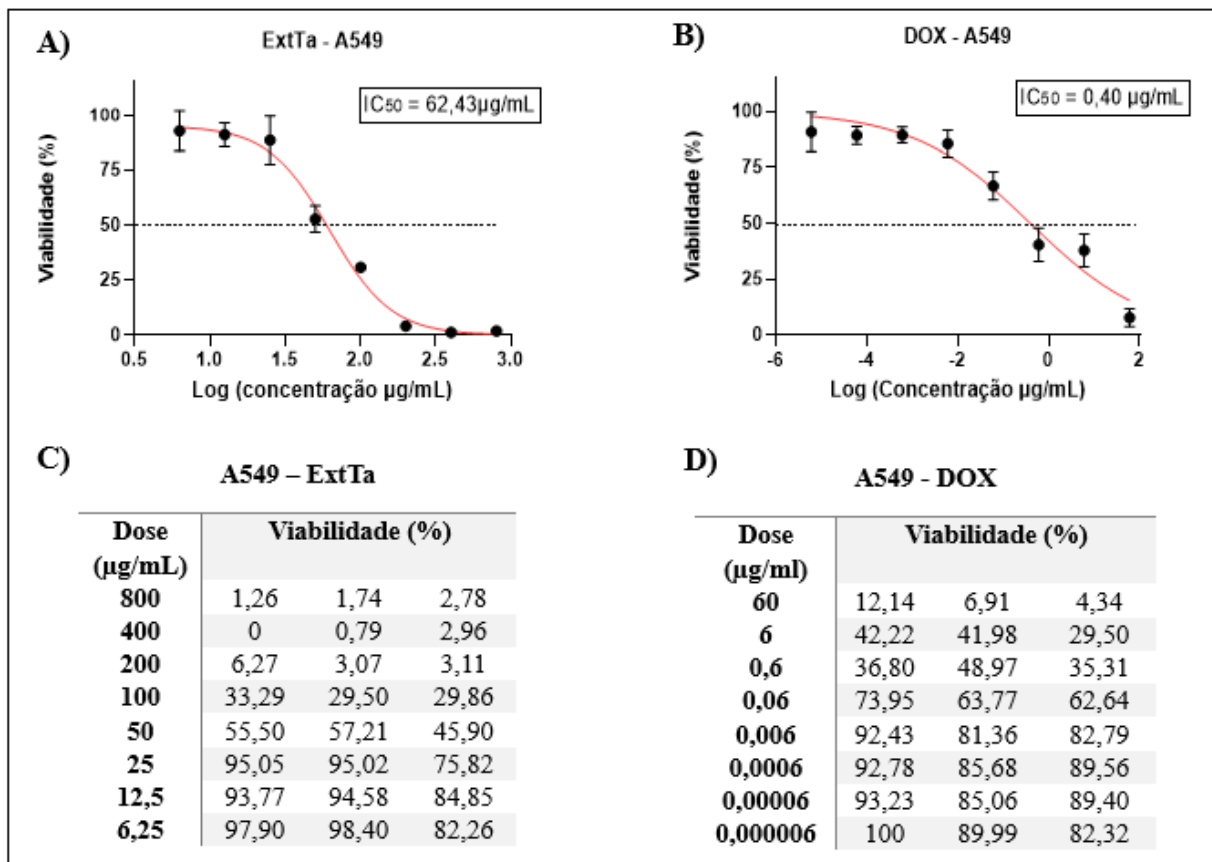
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 11 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de adenocarcinoma de mama murino 4T1**



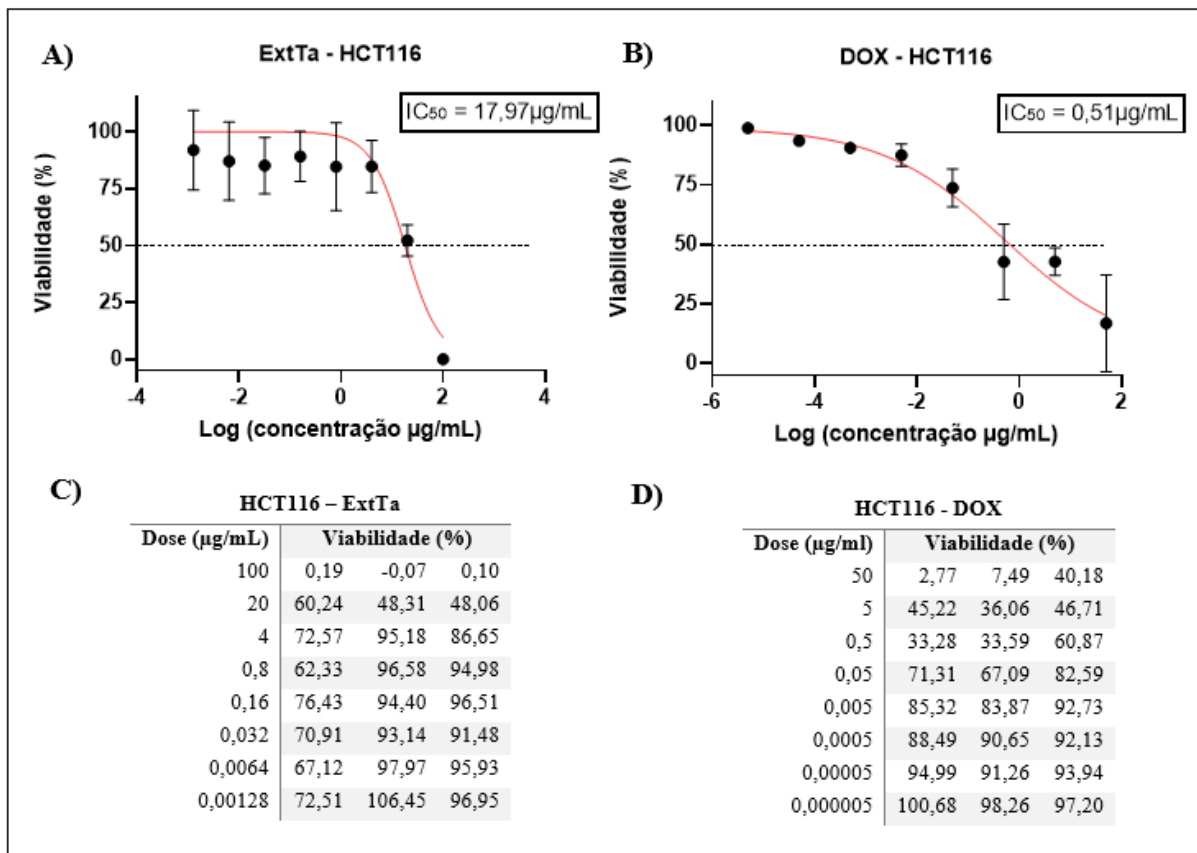
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 12 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de carcinoma de pulmão humano A549**



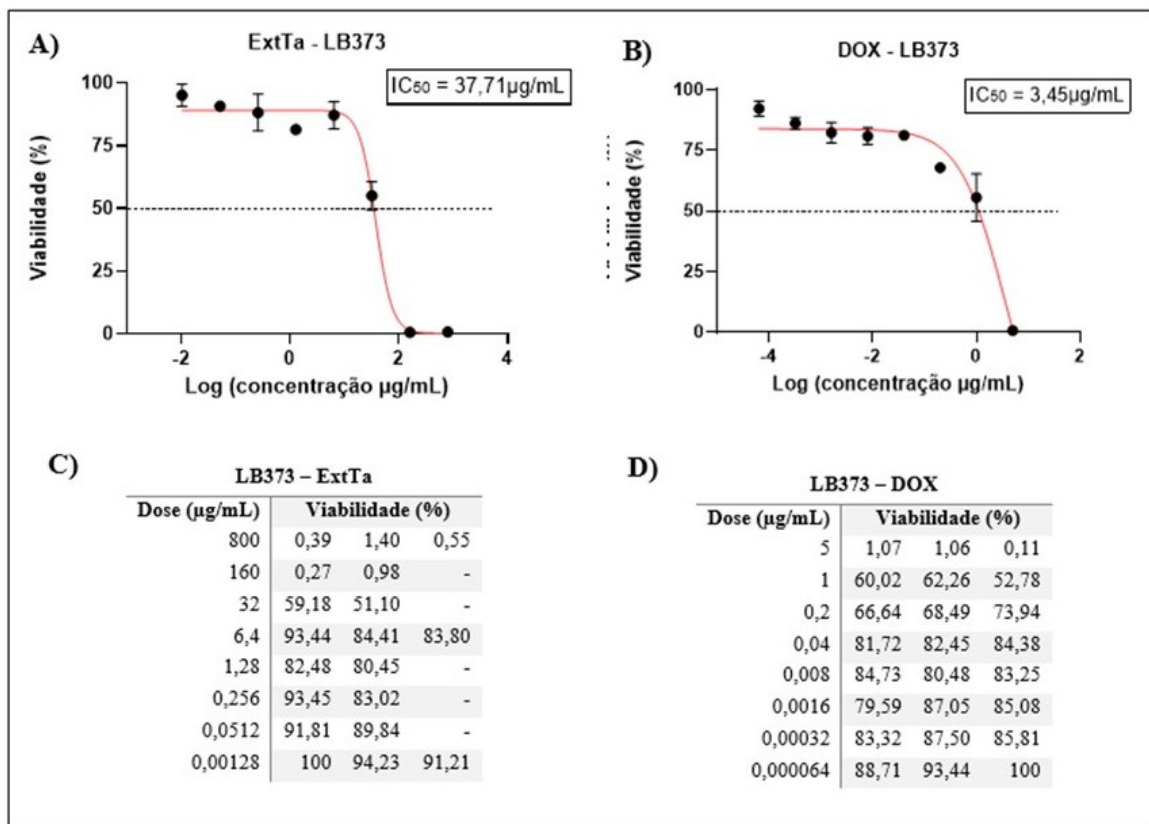
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 13 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de carcinoma colorretal HCT116**



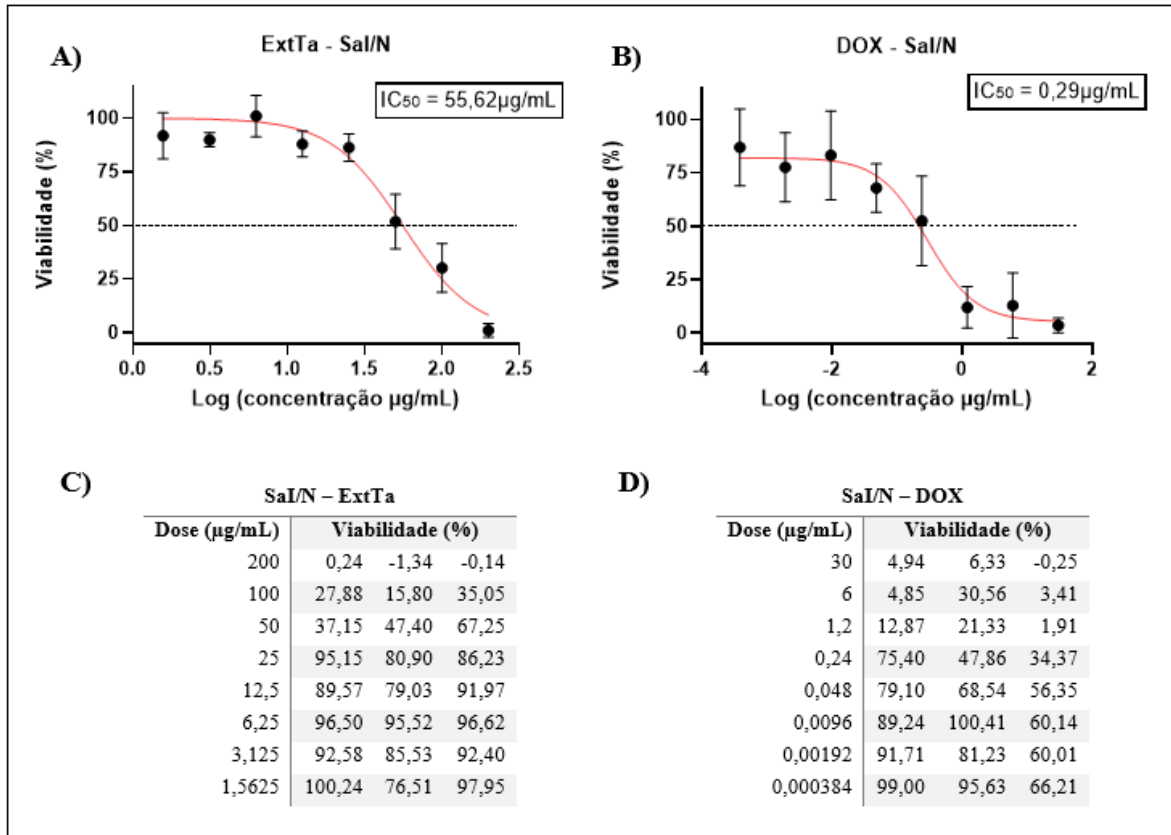
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 14 - Avaliação da citotoxicidade ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem de melanoma humano LB373**



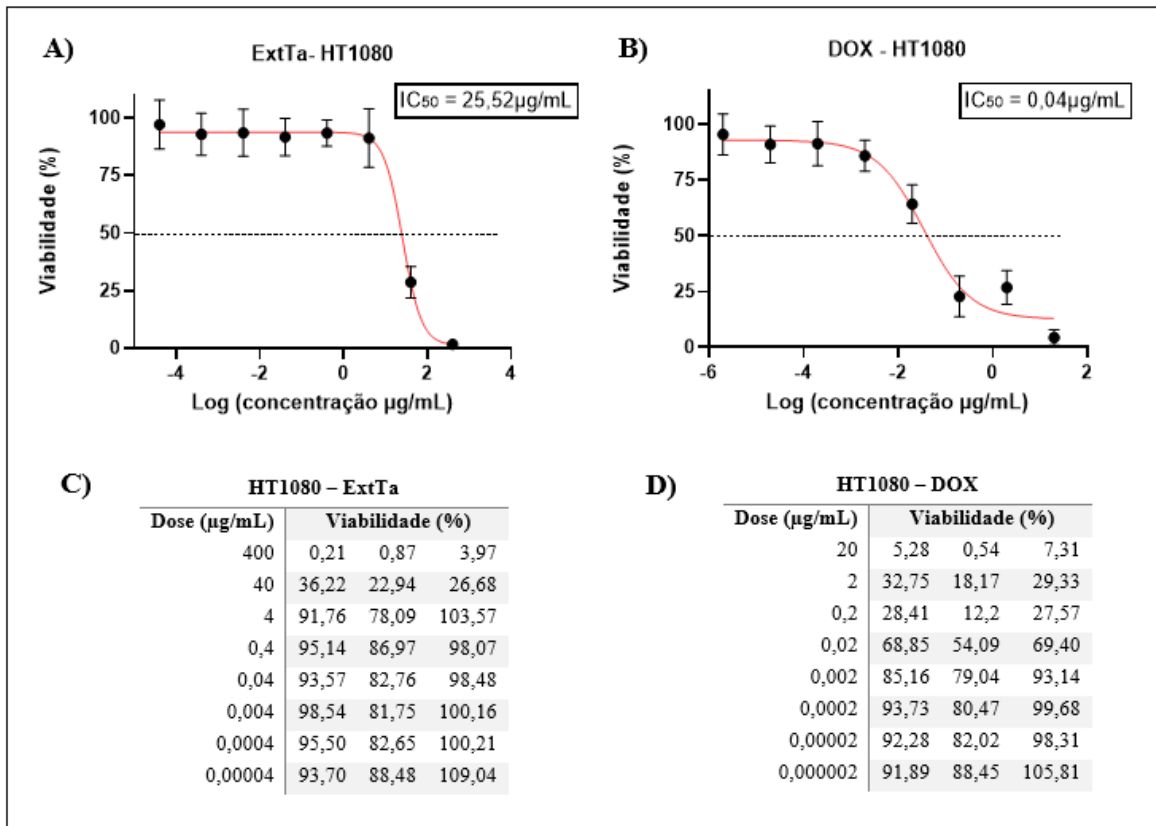
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 15 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de fibrossarcoma murino SaI/N**



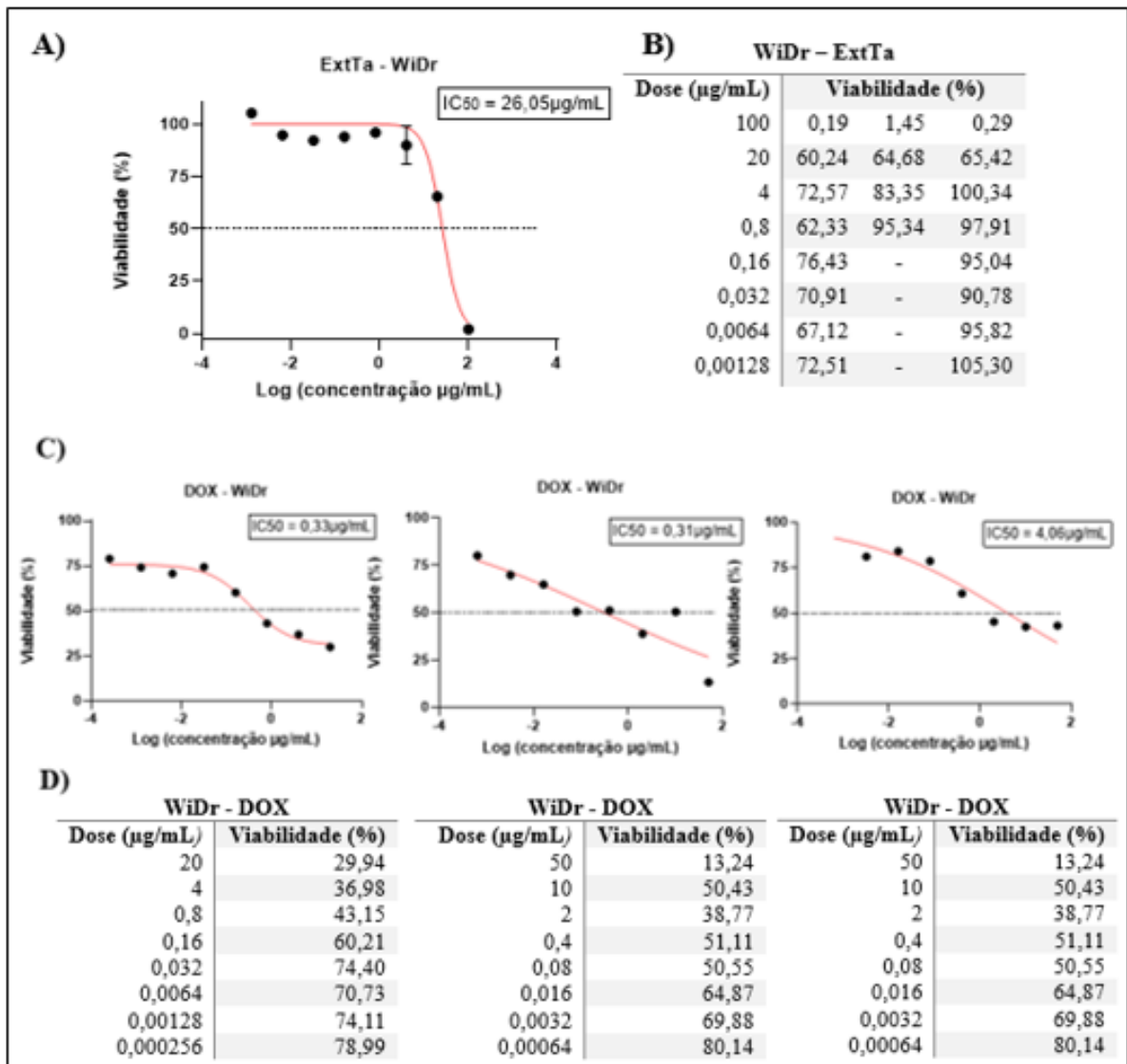
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade após os tratamentos em diferentes concentrações (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura 16 - Avaliação da citotoxicidade ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular fibrossarcoma humano HT1080**



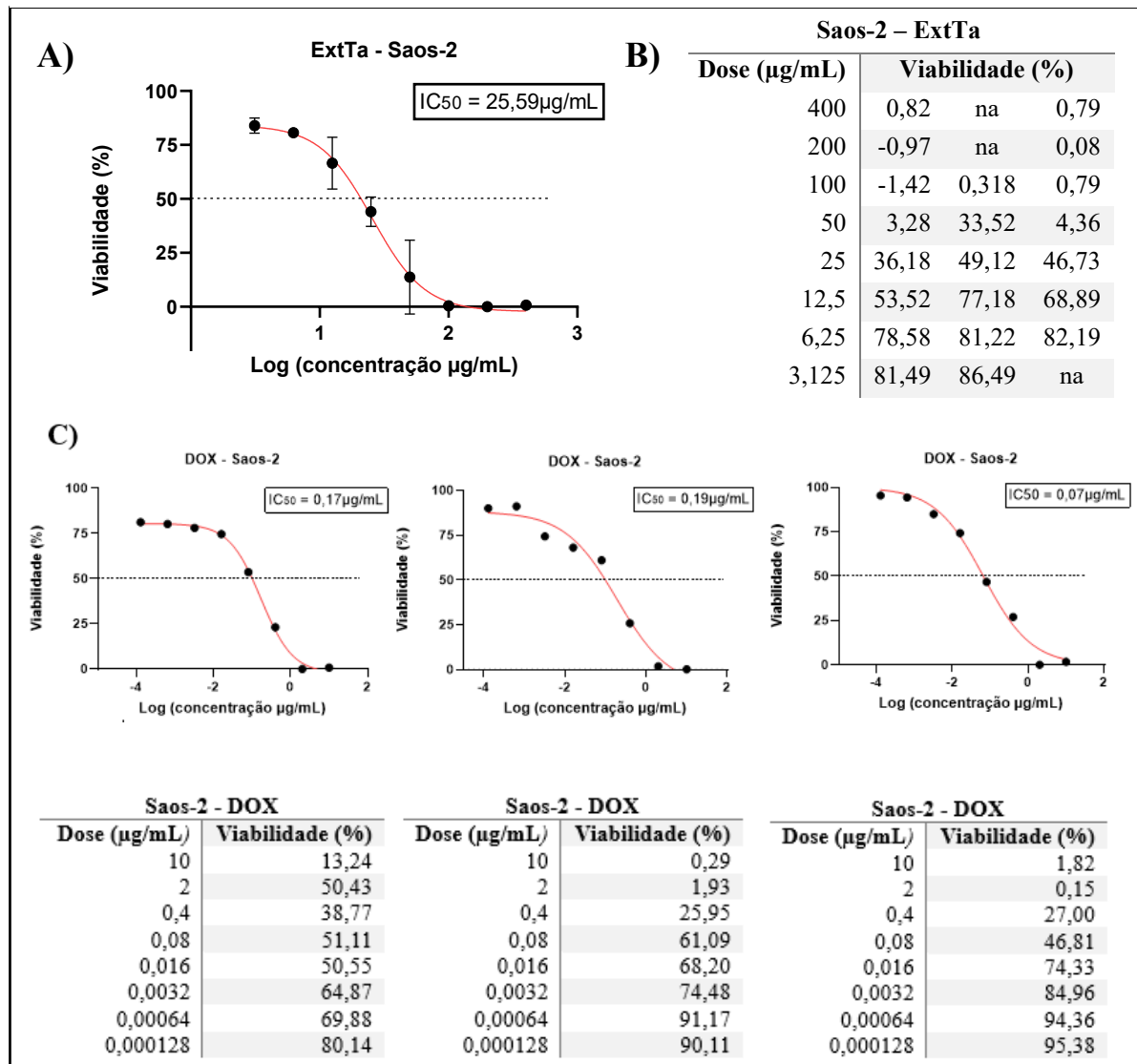
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) e da DOX (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular, (C e D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

Figura 17 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de adenocarcinoma colorretal WiDr



Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 cálculo de  $IC_{50}$  da DOX (C). Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade (D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência

**Figura 18 - Avaliação da citotoxicidade do ExtTa e do fármaco DOX sobre a linhagem celular de osteossarcoma Saos-2**



Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular (B), avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 cálculo de  $IC_{50}$  da DOX (C). Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade (D). Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Tabela 5 - Valores da concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) estimada para as linhagens celulares tratadas com ExtTa e DOX**

LINHAGEM CELULAR	TIPO CELULAR	IC <sub>50</sub> médio (µg/mL)	
		ExtTa	DOX
GM637	Não tumoral humana	70,62	0,04
HEK-293T	Não tumoral humana	53,82	0,37
NIH/3T3	Não tumoral murina	47,70	0,01
L929	Não tumoral murina	53,67	0,03
T98G	Glioblastoma humano	17,78	13,88
MDA-MD-231	Adenocarcinoma de mama humano	39,32	0,42
4T1	Adenocarcinoma de mama murino	35,53	0,34
A549	Carcinoma de pulmão humano	62,43	0,40
HCT116	Carcinoma colorretal humano	17,97	0,51
LB373	Melanoma	37,71	3,45
HT1080	Fibrossarcoma humano	25,52	0,04
SaI/N	Fibrossarcoma murino	55,62	0,29
WiDr	Adenocarcinoma colorretal humano	26,05	0,19
Saos-2	Osteossarcoma humano	25,59	0,18

O Índice de seletividade (IS), determinado pela razão entre a IC<sub>50</sub> da linhagem celular não tumoral em relação à tumoral, representa quantas vezes o tratamento é mais citotóxico para a linhagem tumoral em relação à linhagem não tumoral. O IS foi calculado para as linhagens tumorais utilizando como base o IC<sub>50</sub> médio do ExtTa das linhagens não tumorais GM637 (70,62 µg/mL), HEK-293T (53,82 µg/mL), NIH/3T3 (53,82 µg/mL), e L929 (55,67 µg/mL). Foi observado que o ExtTa é aproximadamente 2 vezes mais citotóxico para as linhagens Saos-2, 4T1, MDA-MB-231, LB373, HT1080, e 3 a 4 vezes mais citotóxico para as linhagens T98G e HCT116 em relação às linhagens não tumorais. As linhagens A549 e SaI/N foram as menos sensíveis à citotoxicidade do ExtTa e não foi observada seletividade dependente da dose para essas células tumorais (**Tabela 6**).

Na avaliação do IS da DOX utilizou-se as mesmas linhagens normais como referência e com base o IC<sub>50</sub> médio estimado nos ensaios de citotoxicidade: GM637 (0,04 µg/mL), HEK-293T (0,37 µg/mL), NIH/3T3 (0,01 µg/mL), e L929 (0,03 µg/mL). Neste estudo, a DOX foi seletiva apenas para a linhagem HT1080 quando comparada com a linhagem não tumoral HEK-293T, sendo 9,25 vezes mais citotóxica para essa linhagem tumoral do que para as células não tumorais (**Tabela 6**).

**Tabela 6 – Índice de Seletividade (IS) do ExtTa e da DOX para as linhagens tumorais usando como referências as linhagens não tumorais**

**ÍNDICE DE SELETIVIDADE (IS\*)**

Linhagens não tumorais	GM637		HEK-293T		NIH/3T3		L929	
	Tratamento							
Linhagem tumoral	ExtTa	DOX	ExtTa	DOX	ExtTa	DOX	ExtTa	DOX
<b>T98G</b>	3,97	0,00	3,03	0,03	2,68	0,00	3,13	0,00
<b>MDA-MB-231</b>	1,80	0,09	1,37	0,88	1,21	0,02	1,42	0,07
<b>4T1</b>	1,99	0,12	1,51	1,09	1,34	0,03	1,57	0,09
<b>A549</b>	1,13	0,10	0,86	0,93	0,76	0,03	0,89	0,08
<b>HCT116</b>	3,93	0,08	2,99	0,72	2,65	0,02	3,10	0,06
<b>LB373</b>	1,87	0,00	1,43	0,12	1,26	0,00	1,48	0,00
<b>SaI/N</b>	1,27	0,14	0,97	1,28	0,86	0,03	1,00	0,10
<b>HT1080</b>	2,77	1,00	2,11	9,25	1,87	0,25	2,18	0,75
<b>WiDr</b>	2,71	0,21	2,07	1,95	1,83	0,05	2,14	0,16
<b>Saos-2</b>	2,76	0,22	2,10	2,05	1,86	0,06	2,17	0,17

IS = razão entre o IC<sub>50</sub> das células não tumorais e as células tumorais

### **5.5 Avaliação do tratamento combinado do ExtTa com os quimioterápicos DOX e 5-FU**

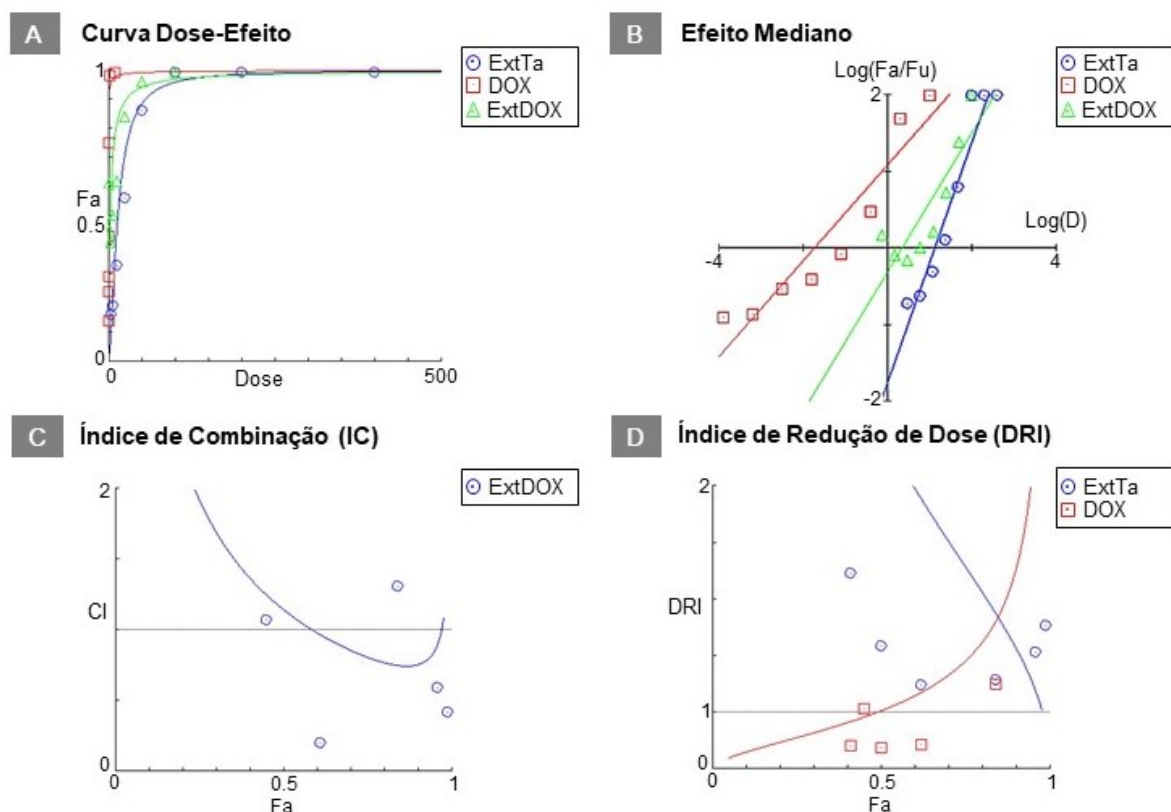
Com base na citotoxicidade induzida pelos compostos isolados e pela determinação do IC<sub>50</sub> de cada tratamento em cada linhagem, selecionamos algumas linhagens tumorais mais sensíveis ao ExtTa para avaliação da natureza de sua interação com quimioterápicos. O efeito combinatório de ExtTa e DOX na linhagem celular de osteossarcoma Saos-2 foi representado graficamente na **Figura 19** através de curvas dose-efeito (Painel A), efeito mediano (Painel B), gráficos CI (Painel C) e índice de redução de dose (Painel D). O co-tratamento do ExtTa com DOX provou ser eficaz e significativamente diferente do ExtTa e DOX isoladamente na linhagem celular Saos-2, os efeitos sinérgicos mais significativos foram observados na concentração mais baixa dos compostos e em concentrações mais altas (**Figura 19 e Tabela 7**). Também foi observada redução da dose favorável para a linhagem Saos-2 tratadas com o ExtTa em todos os níveis de efeito, e redução da DOX do Fa de 0,45 a 0,97 (**Tabela 8**). Estes resultados confirmam que a combinação com ExtTa permitiria um aumento do efeito quimioterapêutico da DOX, o que poderia ser interessante, uma vez que a eficácia foi mantida, para redução dos efeitos secundários indesejados da DOX.

**Tabela 7 - Avaliação do efeito combinatório do ExtTa e DOX na linhagem celular de osteosarcoma Saos-2**

ExtTa ( $\mu\text{g/mL}$ )	DOX ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fa	CI	Conclusão
0,781	0,006	0,61	0,20203	Sinergismo
1,562	0,112	0,45	1,06995	Antagonismo
3,125	0,224	0,41	2,75892	Antagonismo
6,250	0,450	0,50	3,14533	Antagonismo
12,500	0,900	0,62	3,04077	Antagonismo
25,000	0,180	0,84	1,31011	Antagonismo
50,000	0,360	0,96	0,59225	Sinergismo
100,000	0,720	0,99	0,41492	Sinergismo

ExtTa: extrato etanólico de *T. asperelloides*; 5-FU: 5-Fluorouracil; Fa: percentual de inibição celular; CI: índice de combinação

**Figura 19 - Efeito da interação do ExtTa e DOX em células de osteossarcoma Saos-2**



Gráficos gerados pelo software CompuSyn. (A) Curva Dose-Efeito; (B) Gráfico de efeito mediano. Foi calculada a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) do fármaco. A interceptação do eixo x ( $\text{logD}$ ) representa a dose de efeito médio de  $IC_{50}$ . (C) Índice de combinação (CI);  $CI < 1$ ,  $= 1$  e  $> 1$  indica efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos, respectivamente; (D) Índice de redução de dose (DRI).  $DRI > 1$  redução favorável da dose;  $DRI = 1$  sem redução de dose  $DRI < 1$  redução de dose não favorável. Fa: percentual de inibição celular; ExtTa: Extrato Etanólico de *T. asperelloides*; DOX: doxorubicina; ExtDOX: tratamentos combinados de Extrato Etanólico de *T. asperelloides* e doxorubicina.

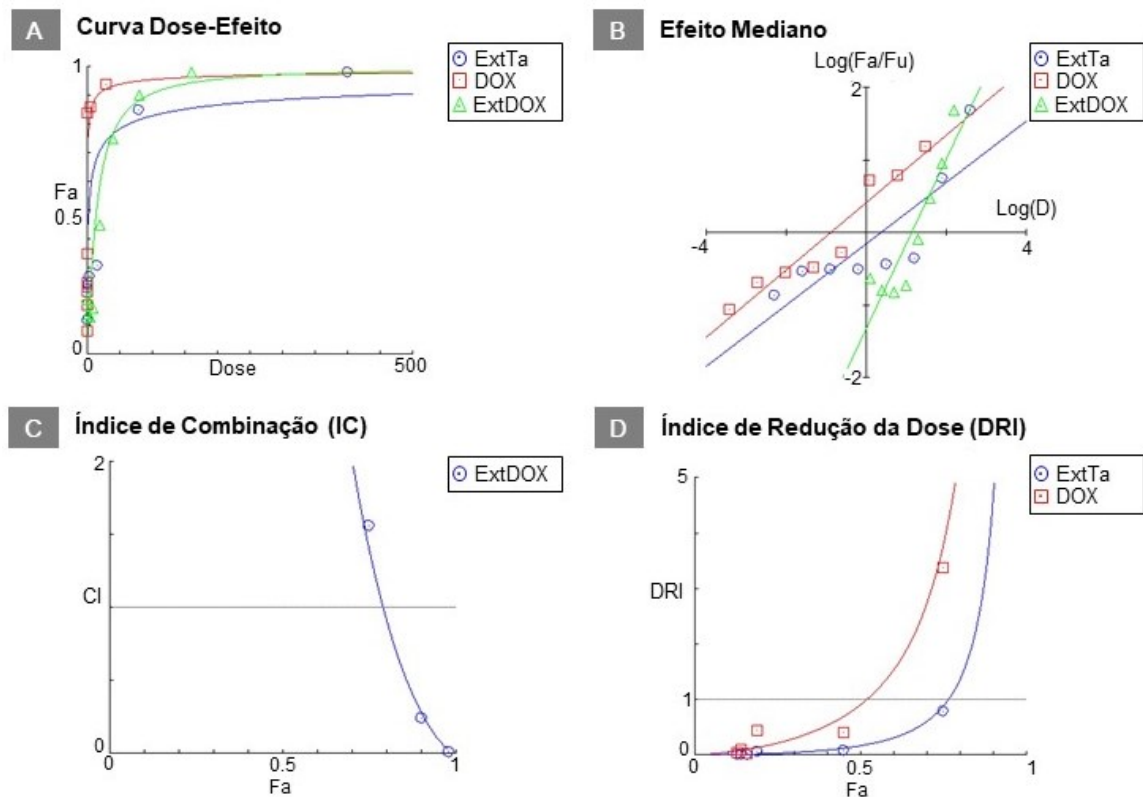
**Tabela 8 - Índice de redução de dose (DRI) para ExtTa e DOX para um determinado efeito de inibição na linhagem celular de osteossarcoma humano Saos-2**

Fa	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )		DRI*	
	ExtTa	DOX	ExtTa	DOX
<b>0,05</b>	2,085	1,64E-4	23,3384	0,25480
<b>0,10</b>	3,355	5,46E-4	16,4666	0,37234
<b>0,15</b>	4,503	0,00115	13,2686	0,47090
<b>0,20</b>	5,621	0,00202	11,2777	0,56197
<b>0,25</b>	6,750	0,00321	9,86060	0,65034
<b>0,30</b>	7,921	0,00481	8,76919	0,73883
<b>0,35</b>	9,159	0,00694	7,88295	0,82959
<b>0,40</b>	10,493	0,00980	7,13502	0,92459
<b>0,45</b>	11,954	0,01362	6,48457	1,02588
<b>0,50</b>	13,582	0,01882	5,90478	1,13589
<b>0,55</b>	15,433	0,02601	5,37682	1,25770
<b>0,60</b>	17,581	0,03617	4,88665	1,39549
<b>0,65</b>	20,141	0,05102	4,42301	1,55529
<b>0,70</b>	23,290	0,07370	3,97601	1,74636
<b>0,75</b>	27,330	0,11048	3,53593	1,98398
<b>0,80</b>	32,821	0,17560	3,09163	2,29594
<b>0,85</b>	40,966	0,30775	2,62774	2,73998
<b>0,90</b>	54,991	0,64840	2,11741	3,46528
<b>0,95</b>	88,477	2,16060	1,49395	5,06371
<b>0,97</b>	124,104	5,08757	1,16564	6,63253

\*Valores calculados em pontos experimentais. DRI: índice de redução de dose; ExtTa: extrato etanólico de *T. asperelloides*; DOX: doxorubicina; Fa: percentual de inibição celular.

Na avaliação do tratamento simultâneo do ExtTa e DOX obre a linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231, o sinergismo entre ExtTa e DOX foi observado apenas em altas doses, sem indicação de redução favorável da dose (Figura 20).

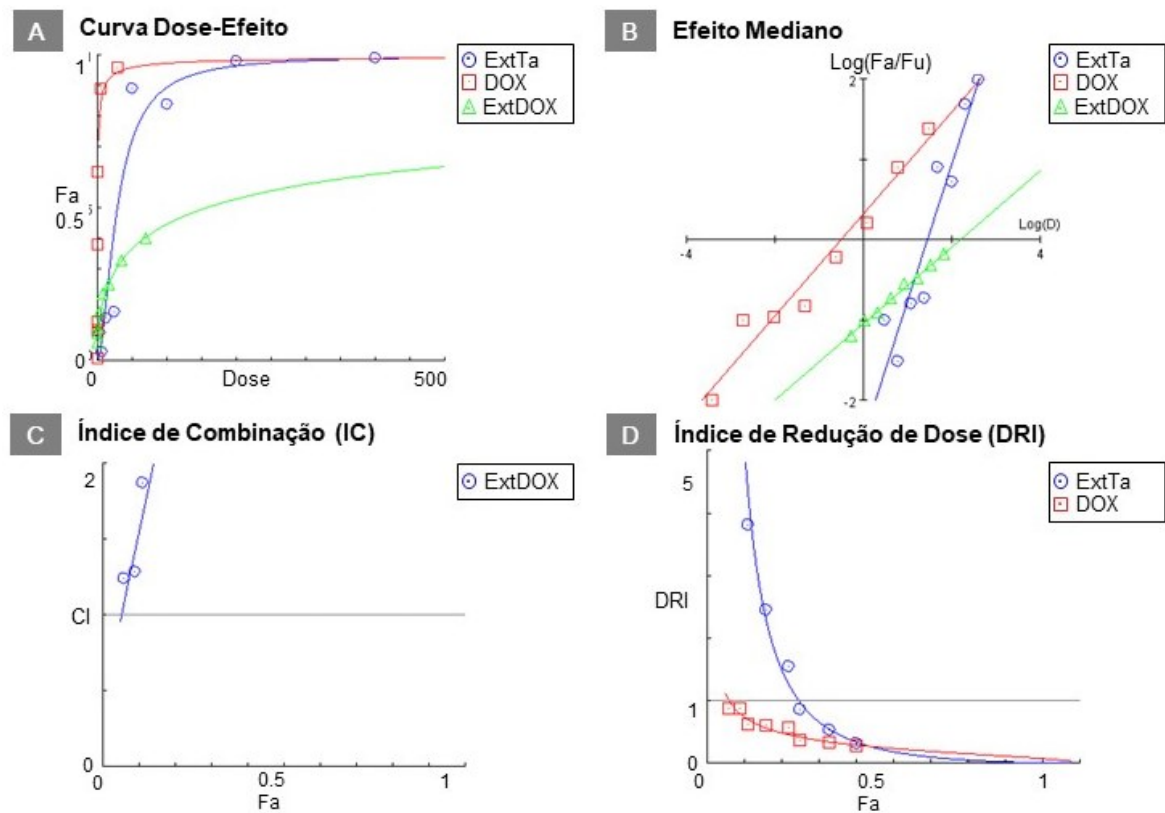
**Figura 20 - Efeito da interação do ExtTa e DOX em células de adenocarcinoma mamário humano MDA-MB-231**



Gráficos gerados pelo software CompuSyn. (A) Curva Dose-Efeito; (B) Gráfico de efeito mediano. Foi calculada a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) do fármaco. A interceptação do eixo x (logD) representa a dose de efeito médio de  $IC_{50}$ . (C) Índice de combinação (CI);  $CI < 1$ ,  $= 1$  e  $> 1$  indica efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos, respectivamente; (D) Índice de redução de dose (DRI).  $DRI > 1$  redução favorável da dose;  $DRI = 1$  sem redução de dose  $DRI < 1$  redução de dose não favorável. Fa: percentual de inibição; ExtTa: Extrato Etanólico de *T. asperelloides*; DOX: doxorubicina; ExtDOX: tratamentos combinados de Extrato Etanólico de *T. asperelloides* e doxorubicina.

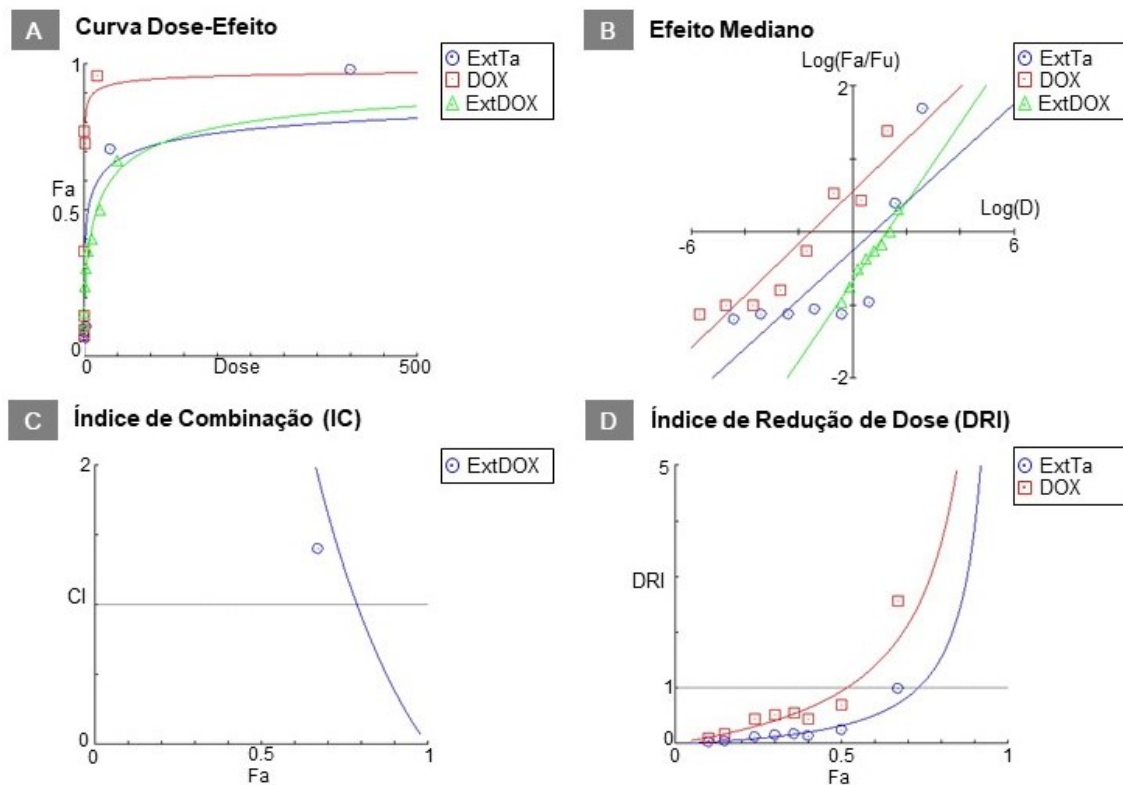
Na avaliação quantitativa da ação do tratamento simultâneo do ExtTa com a DOX sobre a linhagem de adenocarcinoma de mama murino 4T1, foi observado efeito antagônico em todas as concentrações analisadas, e redução de dose favorável apenas para o ExtTa em nível de inibição baixo (**Figura 21**). Também foi encontrado efeito antagonista quando ExtTa e DOX foram utilizados combinados no tratamento da linhagem celular de fibrossarcoma HT1080 (**Figura 22**). Neste caso, a combinação foi menos eficaz na indução de citotoxicidade do que cada composto isolado em todas as doses testadas.

**Figura 21 - Efeito da interação do ExtTa e DOX em células de adenocarcinoma de mama murino 4T1**



Gráficos gerados pelo software CompuSyn. (A) Curva Dose-Efeito; (B) Gráfico de efeito mediano. Foi calculada a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) do fármaco. A interceptação do eixo x ( $\log D$ ) representa a dose de efeito médio de  $IC_{50}$ . (C) Índice de combinação (CI);  $CI < 1$ ,  $= 1$  e  $> 1$  indica efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos, respectivamente; (D) Índice de redução de dose (DRI).  $DRI > 1$  redução favorável da dose;  $DRI = 1$  sem redução de dose  $DRI < 1$  redução de dose não favorável. Fa: percentual de inibição celular; ExtTa: Extrato Etanólico de *T. asperelloides*; DOX: doxorubicina; ExtDOX: tratamentos combinados de Extrato Etanólico de *T. asperelloides* e doxorubicina.

**Figura 22 - Efeito da interação do ExtTa e DOX em células de fibrossarcoma humano HT1080**



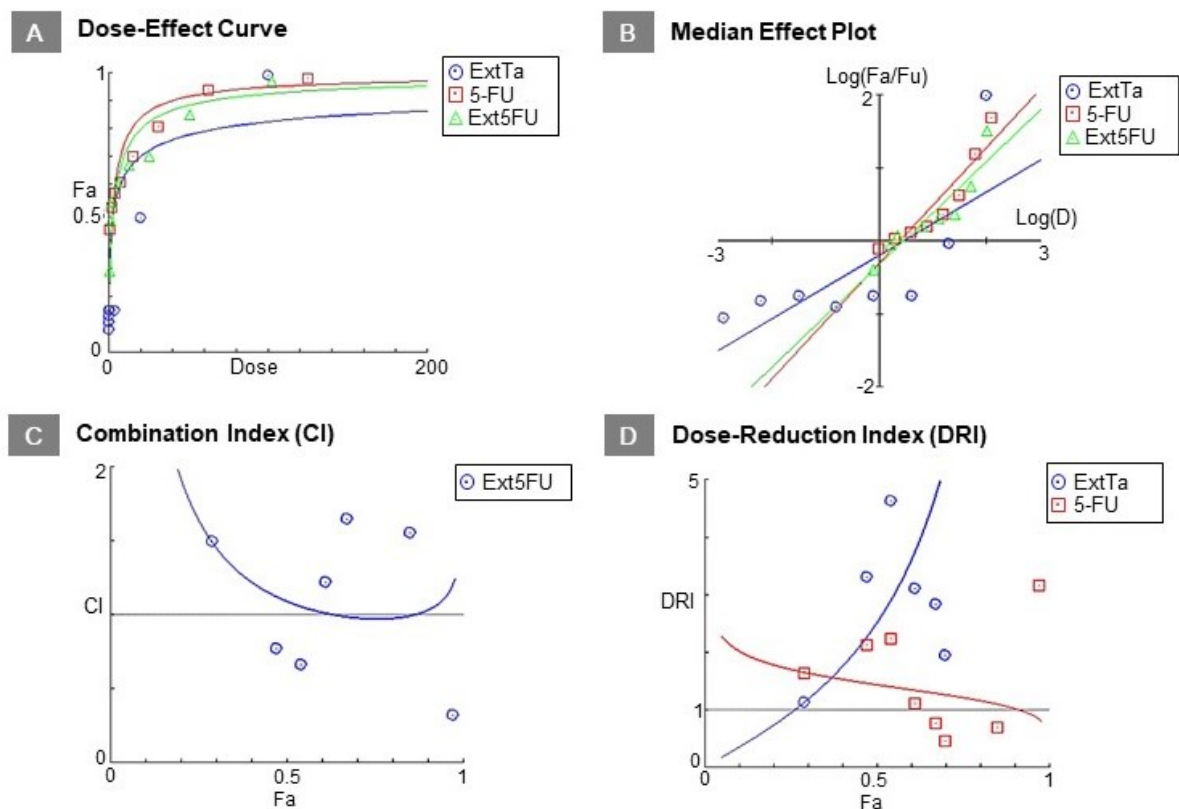
Gráficos gerados pelo software CompuSyn. (A) Curva Dose-Efeito; (B) Gráfico de efeito mediano. Foi calculada a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) do fármaco. A interceptação do eixo x ( $\log D$ ) representa a dose de efeito médio de  $IC_{50}$ . (C) Índice de combinação (CI);  $CI < 1$ ,  $= 1$  e  $> 1$  indica efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos, respectivamente; (D) Índice de redução de dose (DRI).  $DRI > 1$  redução favorável da dose;  $DRI = 1$  sem redução de dose;  $DRI < 1$  redução de dose não favorável. Fa: percentual de inibição celular; ExtTa: Extrato Etanólico de *T. asperelloides*; DOX: doxorubicina; ExtDOX: tratamentos combinados de Extrato Etanólico de *T. asperelloides* e doxorubicina.

Em seguida, investigamos se ExtTa e 5-FU poderiam agir sinergicamente para suprimir a viabilidade das células das linhagens de câncer colorretal HCT116 e WiDr. Para células HCT116 de carcinoma colorretal observamos uma ação sinérgica do ExtTa e do 5-FU (**Figura 23, Painel C**). O índice de combinação indicou ação sinérgica para combinações de doses específicas (**Tabela 9**). Além de produzir um efeito citotóxico mais elevado em comparação com os compostos isolados, a combinação de ExtTa com 5-FU apresentou valores de DRI que indicam redução de dose para ambos os compostos para Fa de 0,3 para 0,90 (**Figura 23, Painel D**). Como resultado, os valores de  $IC_{50}$  de cada medicamento em combinação diminuíram 2,53 e 1,44 vezes para ExtTa e 5-FU, respectivamente (**Tabela 10**).

**Tabela 9 - Avaliação do efeito combinatório do extrato etanólico ExtTa e 5-FU na linhagem de carcinoma colorretal HCT116**

ExtTa ( $\mu\text{g/mL}$ )	5-FU ( $\mu\text{g/mL}$ )	Fa	CI	Conclusão
0,32	0,49	0,29	1,49333	Antagonismo
0,63	0,98	0,47	0,77004	Sinergismo
1,25	1,95	0,54	0,66478	Sinergismo
2,50	3,90	0,61	1,22185	Antagonismo
5,00	7,81	0,67	1,64750	Antagonismo
10,00	15,63	0,70	2,68580	Antagonismo
20,00	31,25	0,85	1,55373	Antagonismo
40,00	62,50	0,97	0,32131	Sinergismo

**Figura 23 - Efeito da interação do ExtTa com 5-FU em células de carcinoma colorretal HCT116**



Gráficos gerados pelo software CompuSyn. (A) Curva Dose-Efeito; (B) Gráfico de efeito mediano. Foi calculada a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) do fármaco. A interceptação do eixo x ( $\log D$ ) representa a dose de efeito médio de  $IC_{50}$ . (C) Índice de combinação (CI);  $CI < 1$ ,  $= 1$  e  $> 1$  indica efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos, respectivamente; (D) Índice de redução de dose (DRI).  $DRI > 1$  redução favorável da dose;  $DRI = 1$  sem redução de dose  $DRI < 1$  redução de dose não favorável. Fa: percentual de inibição celular; ExtTa: Extrato Etanólico de *T. asperelloides*; 5-FU: 5-fluorouracil; Ext5FU: tratamentos combinados de Extrato Etanólico de *T. asperelloides* e 5-fluorouracil.

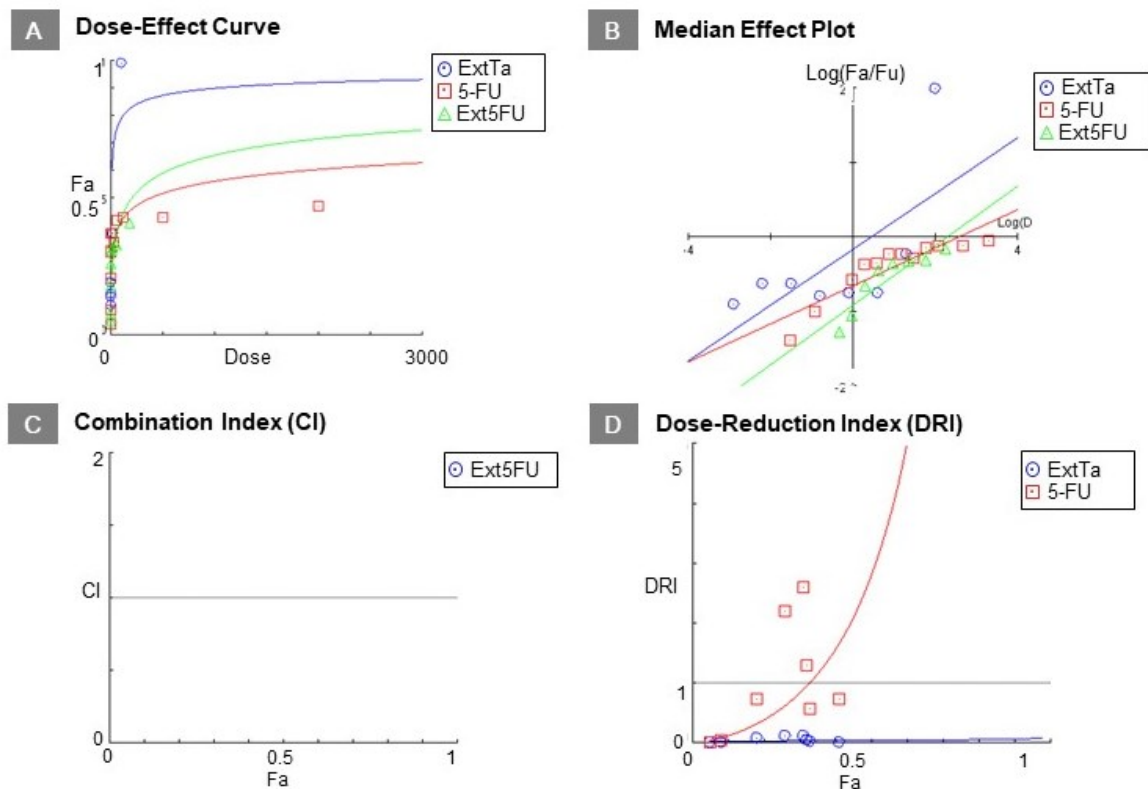
**Tabela 10 - Índice de redução de dose (DRI) para ExtTa e 5-FU para um determinado efeito de inibição na linhagem HCT116**

Fa	Dose ( $\mu\text{g/mL}$ )		DRI*	
	ExtTa	5-FU	ExtTa	DOX
0,05	0,003	0,060	0,18530	2,26633
0,10	0,018	0,155	0,35959	2,01921
0,15	0,051	0,277	0,54210	1,87991
0,20	0,114	0,430	0,73841	1,78141
0,25	0,222	0,619	0,95314	1,70396
0,30	0,395	0,849	1,19125	1,63906
0,35	0,668	1,132	1,45869	1,58226
0,40	1,09	1,482	1,76305	1,53090
0,45	1,751	1,918	2,11437	1,48321
0,50	2,778	2,470	2,52645	1,43793
0,55	4,410	3,181	3,01884	1,39403
0,60	7,067	4,118	3,62041	1,35061
0,65	11,554	5,390	4,37582	1,30676
0,70	19,542	7,186	5,35820	1,26148
0,75	34,853	9,864	6,69674	1,21343
0,80	67,589	14,176	8,64416	1,16067
0,85	150,705	21,989	11,7745	1,09986
0,90	437,196	39,394	17,7507	1,02398
0,95	2.442,140	101,029	34,4475	0,91233
0,97	8.305,070	197,454	55,2120	0,84038

\*Valores calculados em pontos experimentais. DRI: índice de redução de dose; ExtTa: extrato etanólico de *T. asperelloides*; 5-FU: fluorouracil; Fa: percentual de inibição celular.

Para todas as concentrações testadas, o tratamento combinado do ExtTa com 5-FU apresentou antagonismo na linhagem de adenocarcinoma colorretal HCT116. Ao avaliar o DRI, observamos que para essa combinação há redução de dose favorável apenas para o fármaco 5-FU em níveis baixos de Fa (**Figura 24**).

**Figura 24 - Efeito da interação do ExtTa com 5-FU em células de adenocarcinoma colorretal humano WiDr**



Gráficos gerados pelo software CompuSyn. (A) Curva Dose-Efeito; (B) Gráfico de efeito mediano. Foi calculada a concentração inibitória média ( $IC_{50}$ ) do fármaco. A interceptação do eixo x ( $\log D$ ) representa a dose de efeito médio de  $IC_{50}$ . (C) Índice de combinação (CI);  $CI < 1$ ,  $= 1$  e  $> 1$  indica efeitos sinérgicos, aditivos e antagônicos, respectivamente; (D) Índice de redução de dose (DRI).  $DRI > 1$  redução favorável da dose;  $DRI =$  sem redução de dose  $DRI < 1$  redução de dose não favorável. Fa: percentual de inibição celular; ExtTa: Extrato Etanólico de *T. asperelloides*; 5-FU: 5-fluorouracil; Ext5FU: tratamentos combinados de Extrato Etanólico de *T. asperelloides* e 5-fluorouracil.

## 5.6 Análise do perfil de expressão gênica

### 5.6.1 Extração de RNA

Após as 48h de exposição ao ExtTa o RNA total das linhagens de glioblastoma T98G e de carcinoma colorretal HCT116 foi extraído pelo método TRIzol. A quantificação e análise da pureza foi avaliada por espectrofotometria e estão apresentados na Tabela 11.

**Tabela 11 - Quantificação e estimativa da pureza dos RNAs extraídos das linhagens tumorais T98G e HCT116**

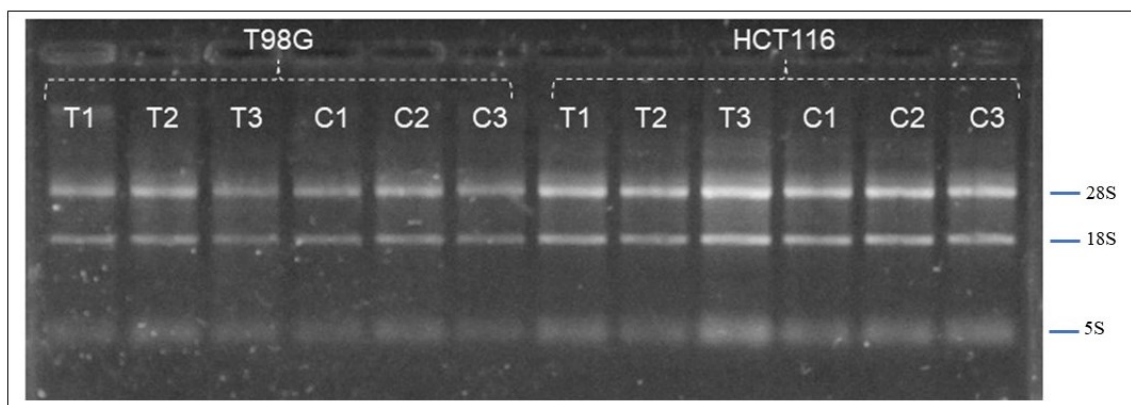
ID da amostra	Concentração de RNA ng/ $\mu$ L	260/280	260/230
T98G T1	287,3	2,0	2,1
T98G T2	325,5	2,0	2,1
T98G T3	438,3	2,0	2,2
T98G C1	167,1	2,0	1,3
T98G C2	400	2,0	2,1
T98G C3	444	2,0	1,8
HCT116 T1	808,9	2,0	2,2
HCT116 T2	606,7	2,1	2,0
HCT116 T3	600,5	2,1	2,0
HCT116 C1	696,5	2,0	2,2
HCT116 C2	1092,3	2,1	2,0
HCT116 C3	809,9	2,0	2,2

T = tratado com ExtTa C= Controle

Como apresentado na Tabela 11, os RNAs apresentaram valores da razão 260/280 e 260/230 dentro dos parâmetros de pureza aceitáveis.

Os RNAs totais extraídos também foram analisados quanto à integridade. O fracionamento eletroforético de uma alíquota de 400 ng de RNA total em gel de agarose 1% corado com SYBR safe demonstrou que os RNAs estavam íntegros (Figura 25), pois foi possível visualizar as bandas dos rRNAs 18S e 28S, sendo que a banda 28S tinha aproximadamente a mesma ou o dobro de intensidade da banda do 18S.

**Figura 25 - Análise da integridade do RNA total extraído das culturas celulares**

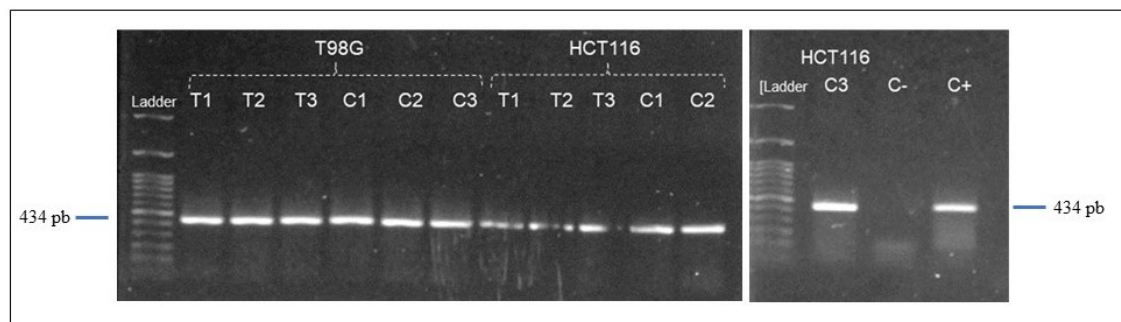


O RNA total extraído das culturas celulares T98G e HCT116 (400 ng de cada amostra) foi fracionado eletroforéticamente em gel de agarose 1% em TAE 1X corado com SBYR safe e fotografado (UVP /MultiDox-It Digital Imaging System w/M-20 Transilluminator). T1, T2 e T3 correspondem às células tratadas com o ExtTa e C1, C2 e C3 às amostras não tratadas (controle).

### 5.6.2 Avaliação da qualidade da transcrição reversa

Atestada a qualidade e integridade dos RNAs totais extraídos, eles foram utilizados como molde em reações de transcrição reversa. A qualidade da reação de transcrição reversa foi avaliada por amplificação por PCR do gene constitutivo GAPDH. Dessa forma, esperávamos que, se a síntese da reação tivesse sido eficiente e não houvesse a presença de inibidores nas amostras, ocorreria amplificação com intensidade semelhante a partir do cDNA em todas as amostras. Quando avaliamos eletroforicamente a qualidade do cDNA pela amplificação por PCR deste gene, observamos bandas de intensidade qualitativamente semelhantes (**Figura 26**).

**Figura 26 - Controle da qualidade da transcrição reversa a partir do RNA total extraído das culturas das células T98G e HCT116 tratadas ou não com ExtTa**



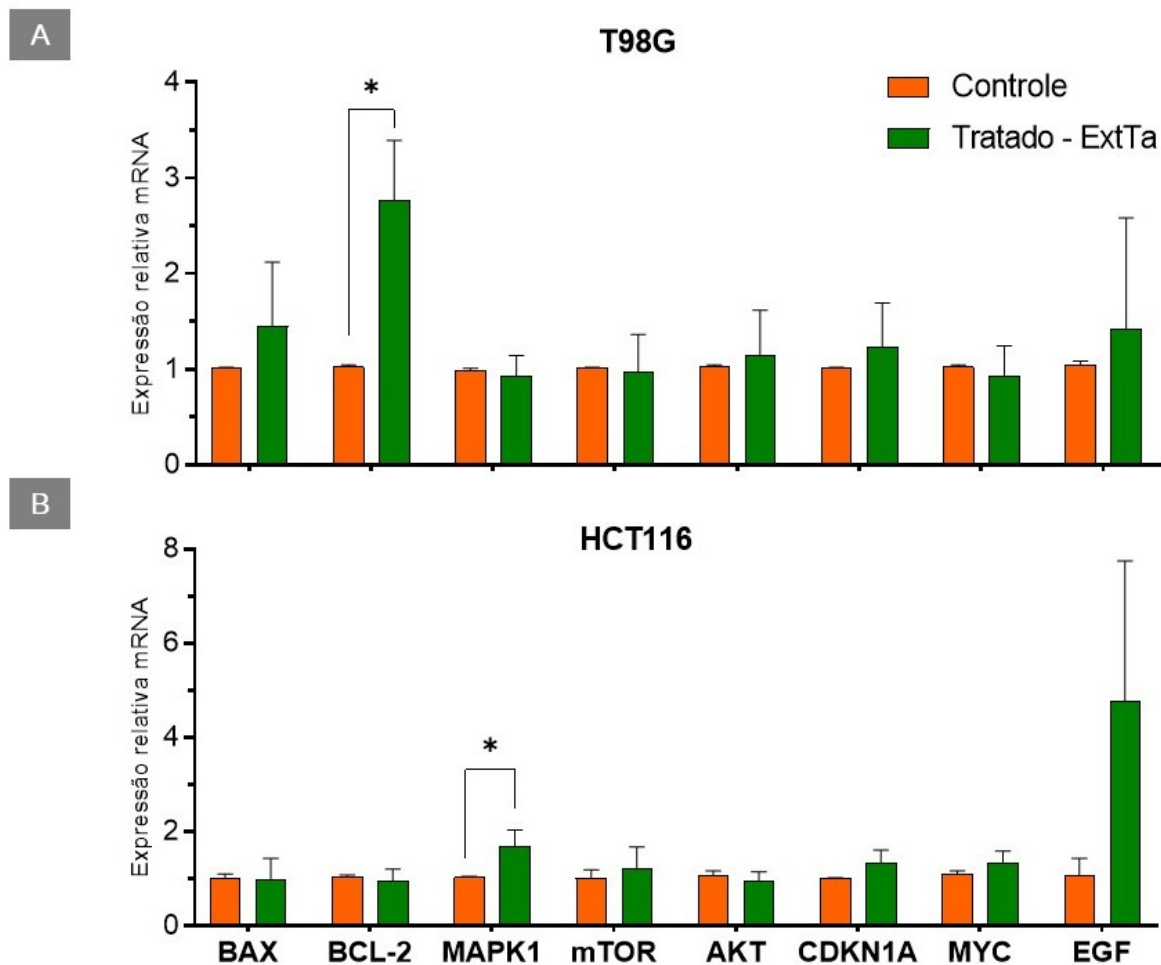
O RNA total das amostras foi extraído pelo método TRIzol e uma alíquota de 2 µg do RNA total foi utilizado como molde em reações de transcrição reversa. A qualidade do cDNA sintetizado foi avaliada por amplificação do gene constitutivo *GAPDH* por PCR. O produto da reação foi fracionado eletroforicamente em gel de agarose 1% corado com SYBR safe. Tamanho da banda observada: 434 pares de base. Canaleta Ladder: Marcador de peso molecular Ladder 100 bp; T: amostras de células tratadas com ExtTa; C: amostra controle. Canaleta C-: Controle negativo; Canaleta C+: Controle positivo.

### 5.6.3 Análise da expressão gênica

Utilizando os cDNAs sintetizados, foram realizadas reações de qPCR para avaliar a expressão gênica de *GAPDH*, *BAX*, *BCL-2*, *mTOR*, *AKT*, *MAPK1*, *CDKN1A*, *EGF* e *MYC* utilizando iniciadores específicos. As sequências dos iniciadores específicos são mostradas na **Tabela 2** do tópico 4.8.2.

Como é possível observar na **Figura 27**, um aumento da expressão do gene *BCL-2* na linhagem T98G e do gene *MAPK1* na linhagem HCT116 foi encontrado nos grupos tratados com o ExtTa.

**Figura 27 - Expressão gênica de BAX, BCL-2, MAPK1, mTOR, AKT, CDKN1A, MYC e EGF nas linhagens tumorais T98G e HCT116**



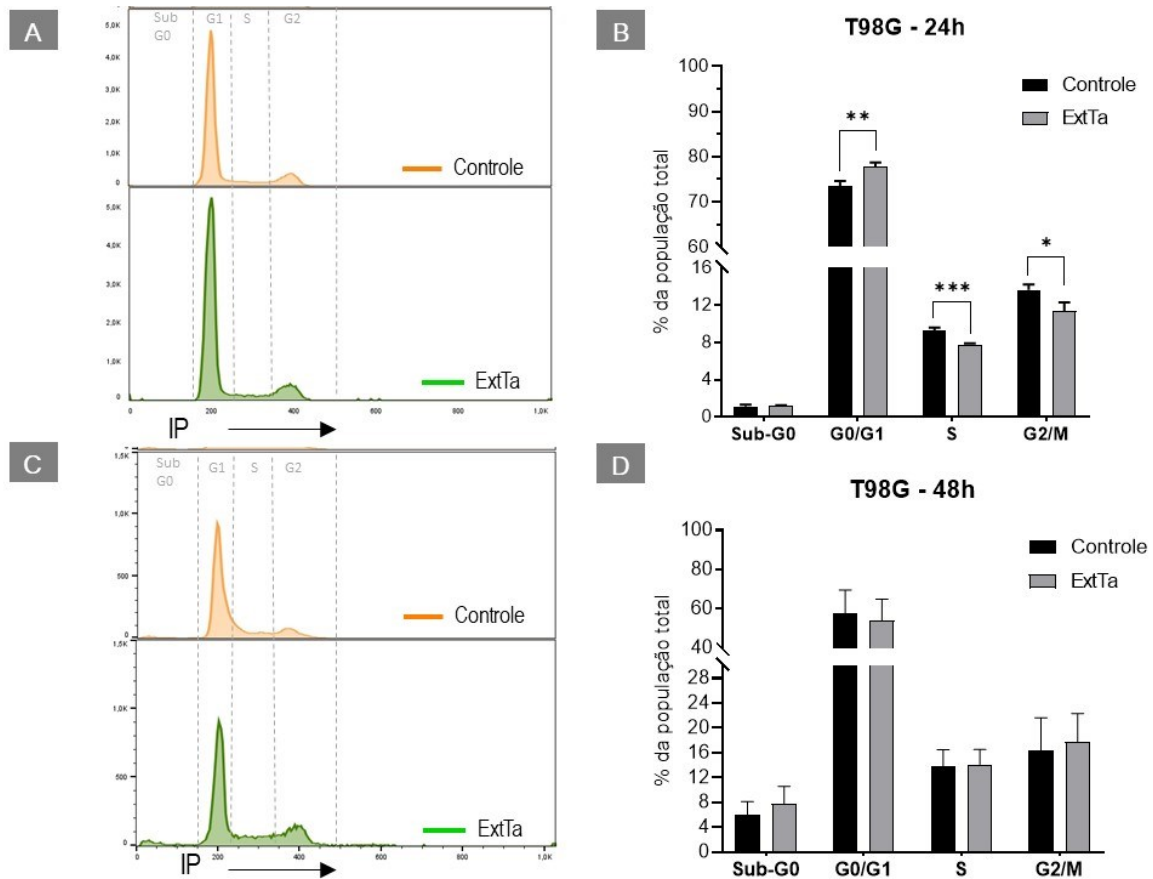
O RNA total das células T98G e HCT116 tratadas com ExtTa ou não (controle) foi extraído e usado para síntese de cDNA que foi utilizado como molde em reações de PCR em tempo real usando iniciadores específicos para amplificação dos genes BAX, BCL-2, MAPK1, mTOR, AKT, CDKN1A, MYC e EGF. O gene *GAPDH* foi utilizado como normalizador. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para aferir o índice de normalidade das amostras e como todas apresentaram uma distribuição normal, os dados foram analisados utilizando Multiple t teste – on per row, no software GraphPrism 8.0.1.

### 5.7 Avaliação do efeito do tratamento com o ExtTa sobre o ciclo celular

A influência do tratamento com o extrato de *T. asperelloides* sobre o ciclo celular foi avaliada nos tempos de 24 e 48 h, em triplicata, nas células das linhagens T98G e HCT116. Foi observado que nas células de glioblastoma T98G o tratamento com o ExtTa pelo período de 24 h levou a um aumento do número de células em G0-G1 ( $p < 0,01$ ), ao mesmo tempo que reduziu de forma significativa as células na fase S ( $p < 0,001$ ) e na fase G2/M do ciclo celular (**Figura 28, Painel B**). No entanto, após o período de 48 h, não foi observada diferença significativa

entre o grupo de células T98G tratadas com o extrato e as células controle (**Figura 28, Painel D**).

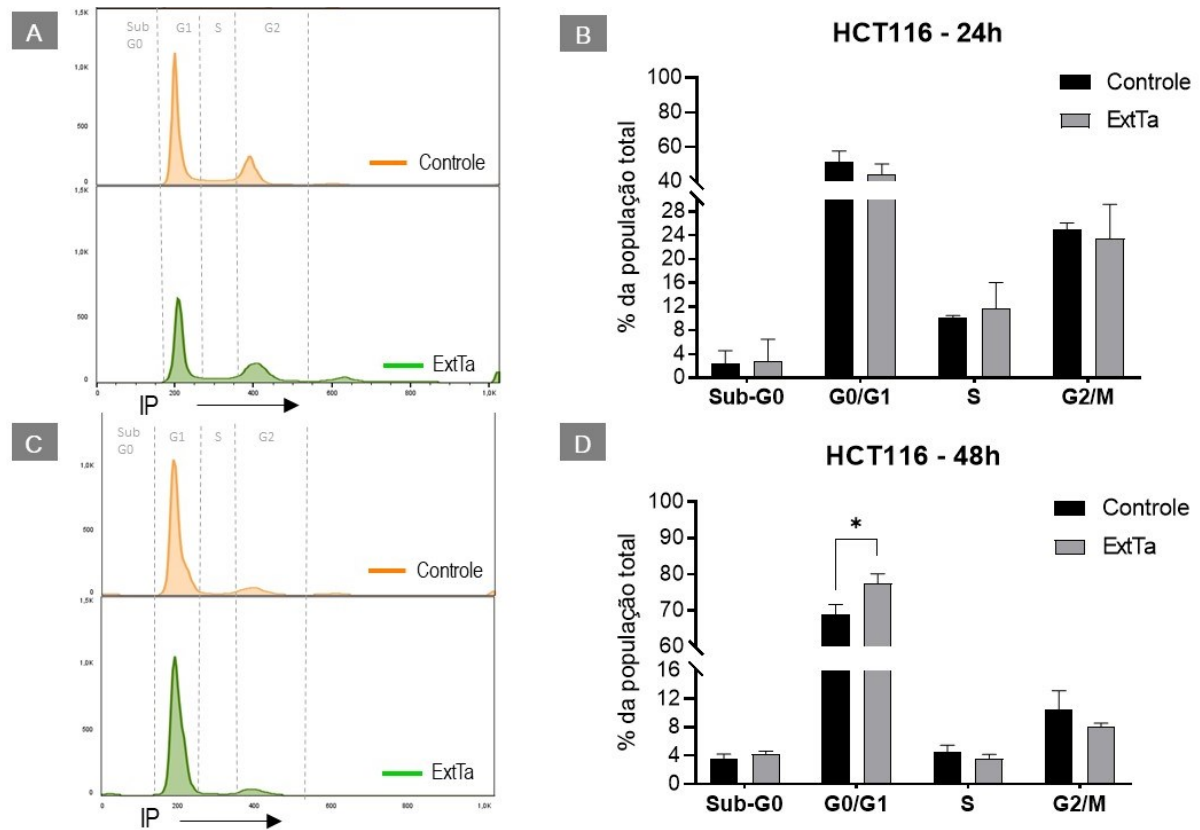
**Figura 28 - Análise do efeito do ExtTa sobre o ciclo celular da linhagem de glioblastoma humano T98G**



A linhagem T98G foi exposta ao tratamento com o ExtTa (18 $\mu$ g/mL) ou não (controle) por 24 (Painéis A e B) e 48 h (Painéis C e D). Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, marcadas com IP e foi realizada a leitura em citômetro de fluxo. Painéis A e C: mostram os histogramas representativos gerados pelo software FlowJo 10 de cada tempo grupo e tempo de tratamento. Painéis B e D: análise comparativa dos grupos em triplicatas técnicas no GraphPrism 8.0.1 (t teste Student). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

Na linhagem HCT116 não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas fases do ciclo celular entre o grupo tratado por 24 h e o grupo controle (**Figura 29, Painel B**). Na avaliação após 48 h de exposição ao ExtTa observou-se uma maior população, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ), de células na fase G0/G1 no grupo tratado em relação ao grupo controle. Entretanto, a redução nas fases S e G2/M não foi significativa (**Figura 29, Painel D**).

**Figura 29 - Análise do efeito do ExtTa sobre o ciclo celular a linhagem de carcinoma colorretal humano HCT116**



A linhagem HCT116 foi exposta ao tratamento com o ExtTa (18ug/mL) ou não (controle) por 24 (Painéis A e B) e 48 h (Painéis C e D). Após o tratamento, as células foram tripsinizadas, marcadas com IP e foi realizada a leitura em citômetro de fluxo. Painéis A e C: mostram os histogramas representativos gerados pelo software FlowJo 10 de cada tempo grupo e tempo de tratamento. Painéis B e D: análise comparativa dos grupos em triplicatas técnicas pelo GraphPrism 8.0.1 (t teste Student). \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .

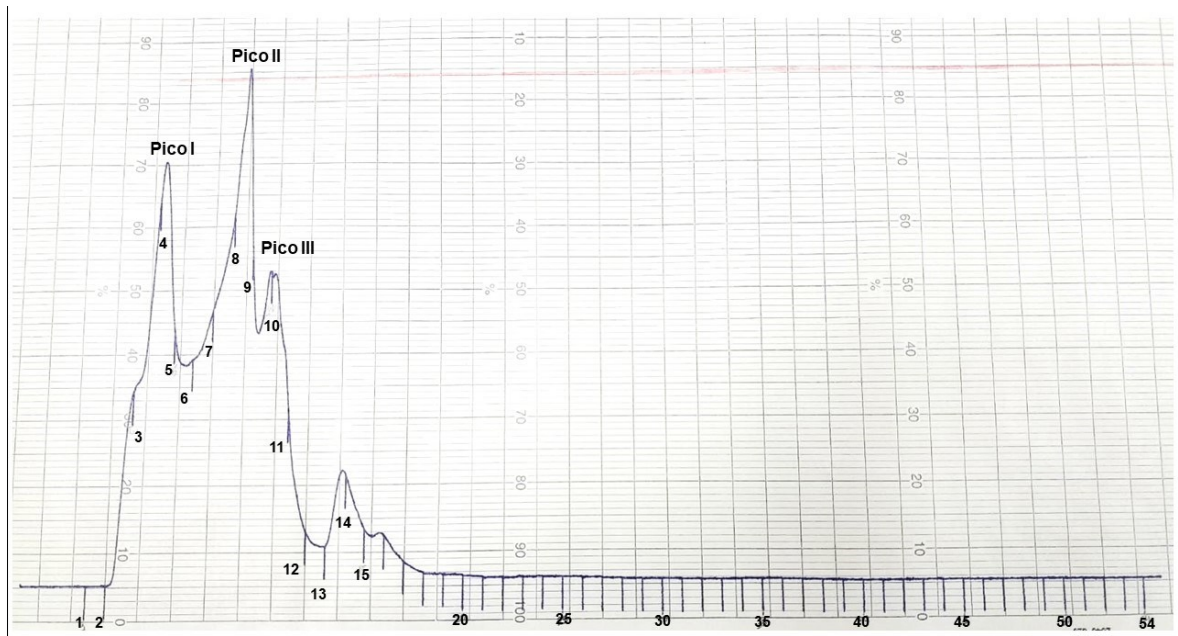
Os resultados desses ensaios parecem indicar que ExtTa está interferindo no ciclo celular das linhagens tumorais, através da promoção da parada nas fases G0-G1. Os dados indicam que o tempo necessário para o efeito do ExtTa sobre o ciclo celular pode ser diferente dependendo do tipo de célula tumoral.

## 5.8 Fracionamento do ExtTa por FPLC

Cromatografia líquida rápida de proteínas (FPLC) é um comumente utilizado para separar biomacromoléculas, principalmente proteínas, de acordo com o tamanho, em processos de separação biológica com baixa pressão e alta capacidade (Xia et al., 2012). O fracionamento do extrato por FPLC resultou em 54 frações com perfil cromatográfico, conforme mostrado na **Figura 30**. As frações obtidas por FPLC do extrato se encontram em uma faixa de massa molecular que varia entre aproximadamente 4 e 41kDa. As frações que apresentaram maior

conteúdo molecular foram as frações de 3 a 15. Pelo perfil cromatográfico do extrato, tais frações se encontram organizadas em três grandes picos.

**Figura 30 - Fracionamento do extrato etanólico de *Trichoderma asperelloides* por cromatografia líquida rápida de proteína (FPLC)**



O ExtTa foi separado com base no tamanho molecular por cromatografia líquida de fase rápida (FPLC) utilizando uma coluna de filtração molecular superose TM 12 10/300 GL (GE LifeSciences) acoplada ao equipamento FPLC (Pharmacia biotec, modelo LKB PUMP p500). O perfil obtido apresenta frações com maior conteúdo de proteínas nas frações de 3 a 15. Foram obtidas 54 frações, em uma faixa de massa molecular que varia entre aproximadamente 41 e 4 kDa.

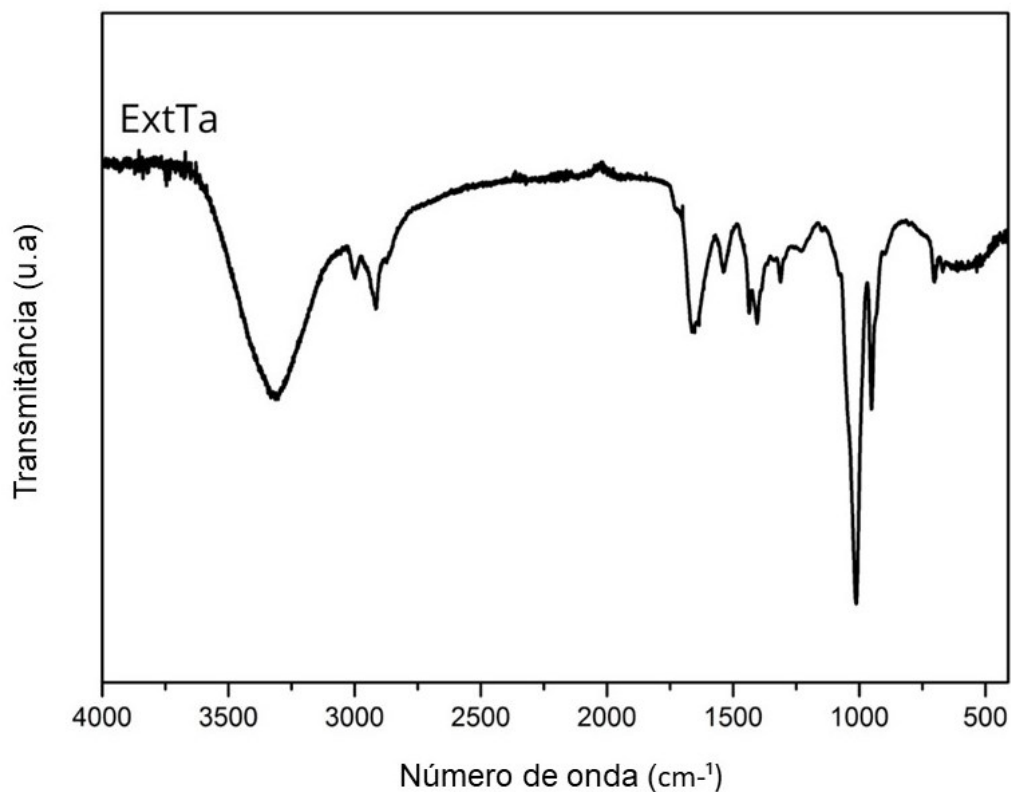
### 5.9 Caracterização estrutural do ExtTa por Espectroscopia na Absorção do Infravermelho

A FTIR é uma técnica que permite obter informações sobre a estrutura dos constituintes de compostos orgânicos, possibilitando o reconhecimento de grupos funcionais aos quais pertencem. Neste trabalho, a FTIR foi realizada para identificar as bandas características presentes no ExtTa e nas frações 1 a 21, 31, 41 e 51.

O espectro de FTIR derivado da amostra do extrato (**Figura 31**), apresenta bandas características associadas a grupamentos químicos presentes na estrutura de proteínas e carboidratos. Observa-se uma banda na região de  $3.600$  a  $3.200$   $\text{cm}^{-1}$ , centradas em torno de  $3.316$   $\text{cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento da ligação O-H do grupo hidroxila ( $\nu$ O-H), comumente identificadas na estrutura dos carboidratos. Bandas de menor intensidade, centradas em torno de  $2.997$   $\text{cm}^{-1}$  e  $2.916$   $\text{cm}^{-1}$ , podem ser atribuídas à vibração de estiramento da ligação  $\nu$ C-H, presentes tanto em proteínas quanto em carboidratos. Em  $1.650$   $\text{cm}^{-1}$  observa-se bandas de

absorção relacionadas às vibrações de estiramento das ligações C=O ( $\nu$ C=O) (Ferro et al., 2019; Y. Ji et al., 2020). Em  $1.540\text{ cm}^{-1}$ , observam-se bandas de absorção relacionadas às vibrações de estiramento N-H de ligações peptídicas ( $\nu$ N-H). Além disso, bandas de absorção em  $1.100\text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas ao estiramento da ligação C-O-C em polissacarídeos ( $\nu$ C-O) (Ferro et al., 2019). As bandas de absorção em torno de  $700$  e  $533\text{ cm}^{-1}$ , podem ser atribuídas às deformações da ligação C-H fora do plano ( $\delta$ C-H) presente no anel e deformação da ligação N-H ( $\delta$ N-H), respectivamente (Y. Ji et al., 2020).

**Figura 31 - Espectros de FTIR para o ExtTa**

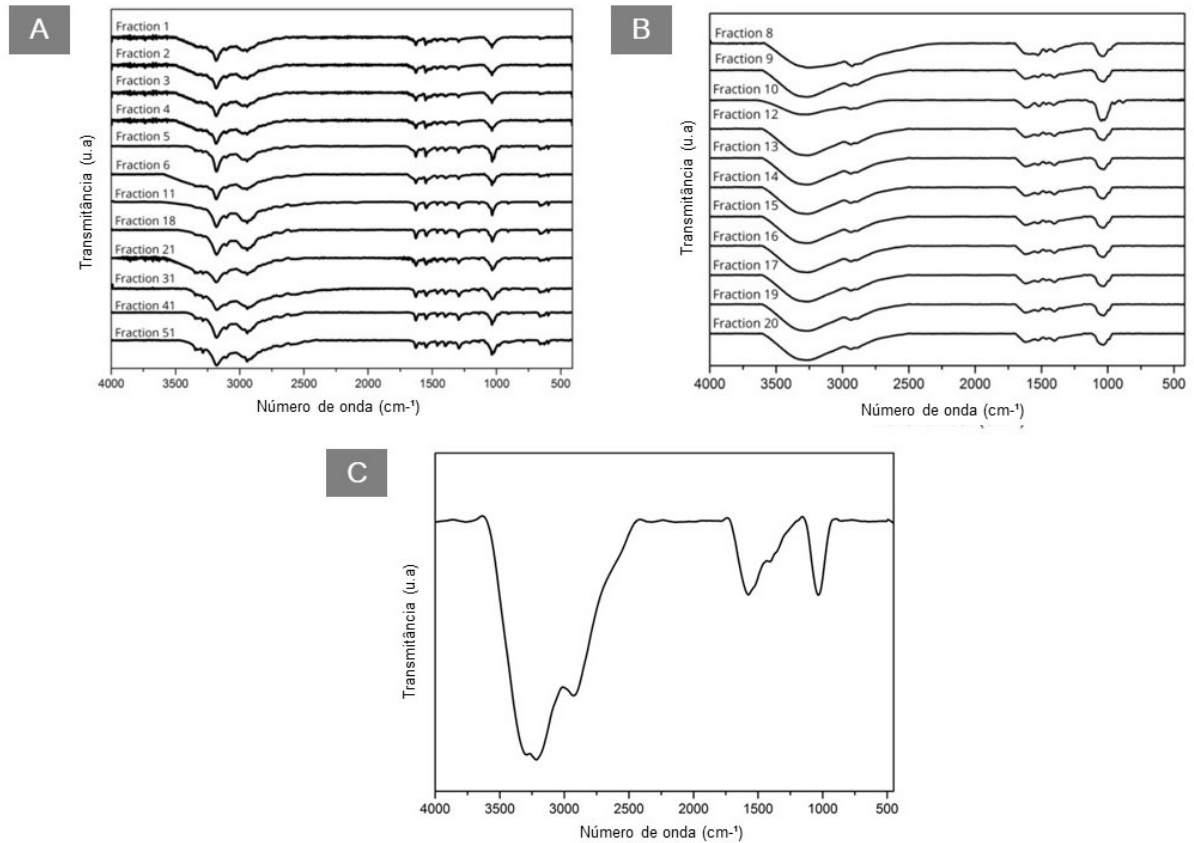


A caracterização estrutural do extrato bruto a partir da espectroscopia de absorção na região do infravermelho-FTIR. Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda de  $4.000$  a  $400\text{ cm}^{-1}$  (Espectrofotômetro IRPrestige-21 – Shimadzu)

Na caracterização das frações obtidas por FPLC (**Figura 32**), foi observado que os espectros de FTIR das frações podem ser divididos em dois grupos: Grupo A, composto pelas frações 1, 2, 3, 4, 5, 6, 11, 18, 21, 31, 41 e 51 (**Figura 32, Painel A**), que se assemelham a proteínas e, portanto, provavelmente possuem um teor mais elevado de compostos semelhantes entre si, denominados composto A. Por outro lado, o Grupo B, formado pelas frações 8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 19 e 20 (**Figura 32, Painel B**), possui características semelhantes a carboidratos, sugerindo a presença predominante de compostos identificados como composto

B nesse grupo. A fração 7 (**Figura 32, Painel C**) parece apresentar uma constituição química intermediária entre os compostos A e B.

**Figura 32 - Espectros FTIR para as Frações do ExtTa**



A caracterização estrutural das frações do ExtTa fracionadas por FPLC, a partir da espectroscopia de absorção na região do infravermelho-FTIR. Os espectros foram obtidos na faixa de número de onda (wavenumber) de 4.000 a 400 cm<sup>-1</sup> (Espectrofotômetro IRPrestige-21 – Shimadzu). Painel A: frações caracterizadas pela presença de proteínas. Painel B: frações caracterizadas pela presença de carboidratos. Painel C: fração 7, com constituição química intermediária, com presença de proteínas e carboidratos.

A Tabela 12 apresenta as principais bandas presentes no composto A e composto B e suas atribuições.

**Tabela 12 - Atribuições das principais bandas de absorção identificadas nos espectros de FTIR do ExtTa e de suas frações**

<b>Material</b>	<b>Número de onda (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Tipo de vibração</b>
<i>ExtTa</i>	3.600 a 3.200	Estiramento da ligação O-H da hidroxila ( $\nu$ O-H)
	2.997 e 2.916	Estiramento da ligação C-H ( $\nu$ C-H)
	1.650	Estiramentos da ligação C=O ( $\nu$ C=O)
	1.540	Estiramentos da ligação N-H ( $\nu$ N-H)
	1.100	Estiramentos da ligação C-O ( $\nu$ C-O)
	700	Deformações da ligação C-H fora ( $\delta$ C-H)
	533	Deformações da ligação N-H ( $\delta$ N-H).
<i>Grupo A</i>	3.300-3.060	Estiramento da ligação N-H ( $\nu$ N-H)
	2.932	Estiramento da ligação C-H ( $\nu$ C-H)
	1.627	Estiramentos da ligação C=O ( $\nu$ C=O)
	1.545	Estiramentos da ligação N-H ( $\nu$ N-H)
	1.402	Estiramento da ligação C-O ( $\nu$ C-O)
	1.035	Estiramentos da ligação C-N ( $\nu$ C-N)
	660	Deformações da ligação C-H fora ( $\delta$ C-H)
590	deformação da ligação N-H ( $\delta$ N-H).	
<i>Grupo B</i>	3.600 a 3.200	Estiramento da ligação O-H da hidroxila ( $\nu$ O-H)
	2.934 e 2.885	Estiramento da ligação C-H ( $\nu$ C-H)
	1.630	Estiramentos da ligação C=O ( $\nu$ C=O)
	1.589 e 1.521	Estiramentos da ligação N-H ( $\nu$ N-H)
	1.010	Estiramento da ligação C-O ( $\nu$ C-O)

Nos espectros das frações do Grupo A podem ser identificadas bandas de absorção de sobrepostas em 3.181 cm<sup>-1</sup> e 3.103 cm<sup>-1</sup>, referentes às vibrações de estiramento da ligação N-H ( $\nu$ N-H). Bandas centradas em torno de 2.932 cm<sup>-1</sup>, podem ser atribuídas à vibração de estiramento da ligação  $\nu$ C-H. Em 1.627 cm<sup>-1</sup>, observam-se bandas de absorção relacionadas às vibrações de estiramento das ligações C=O ( $\nu$ C=O), que estão presentes na estrutura química das frações. Em 1.545 cm<sup>-1</sup>, verificam-se bandas de absorção relacionadas às vibrações de estiramento N-H de ligações peptídicas ( $\nu$ N-H) (Ferro et al., 2019). Além disso, em torno de 1.402 cm<sup>-1</sup>, há uma banda de absorção referente ao estiramento da ligação  $\nu$ C-O cm<sup>-1</sup> em grupos amida (Y. Ji et al., 2020). Em 1035cm<sup>-1</sup> observa-se uma banda de absorção relacionada ao estiramento da ligação C-N presente em grupos amida. Também são notadas bandas de absorção em torno de 660 cm<sup>-1</sup> referentes às deformações da ligação C-H ( $\delta$ C-H) e a deformação da ligação N-H ( $\delta$ N-H) em 590 cm<sup>-1</sup>.

No espectro das frações do grupo B podem ser observadas bandas de absorção na região de 3.600 a 3.200 cm<sup>-1</sup>, com máximo em torno de 3.255 cm<sup>-1</sup>, referente ao estiramento da ligação O-H do grupo hidroxila ( $\nu$ O-H). Bandas em torno de 2.934 cm<sup>-1</sup> e 2.885 cm<sup>-1</sup> podem ser atribuídas à vibração de estiramento da ligação  $\nu$ C-H. Em 1.010 cm<sup>-1</sup>, observa-se a presença de

bandas de absorção relacionadas às vibrações de estiramento das ligações  $\nu$ C-O de carboidratos.

Para a fração 7, observa-se uma mistura de compostos presentes nos grupos A e B, com bandas em torno de  $3200\text{ cm}^{-1}$  referentes ao estiramento da ligação O-H do grupo hidroxila ( $\nu$ O-H). Bandas de menor intensidade, centradas em torno de  $2.945\text{ cm}^{-1}$ , podem ser atribuídas à vibração de estiramento da ligação  $\nu$ C-H. Em  $1.630\text{ cm}^{-1}$ , observam-se bandas de absorção relacionadas às vibrações de estiramento das ligações C=O ( $\nu$ C=O). Em  $1.589\text{ cm}^{-1}$  e  $1.521\text{ cm}^{-1}$  observam-se bandas de absorção relacionadas às vibrações de estiramento N-H de ligações peptídicas ( $\nu$ N-H). Além disso, em  $1.033\text{ cm}^{-1}$  são identificadas bandas de absorção relacionadas às vibrações de estiramento das ligações  $\nu$ C-O de carboidratos.

Essa pesquisa já possui depósito de patente no Instituto Nacional da Propriedade Industrial sob o nº BR 102021009949-6 A2 (ANEXO 2). Data do depósito: 21/05/2021; Data da publicação nacional: 06/12/2022.

## 6 DISCUSSÃO

O câncer representa um desafio global para a saúde e, apesar da existência de mais de uma centena de agentes quimioterápicos, a busca por novos medicamentos é essencial para melhorar a eficácia, minimizar efeitos colaterais indesejáveis e combater a resistência e recorrência da doença. A busca por fármacos eficazes, acessíveis e mais específicos visa aprimorar a qualidade de vida dos pacientes. Nesse contexto, a pesquisa farmacêutica concentra seus esforços em explorar fontes naturais, dada a rica diversidade de compostos bioativos que oferecem. Nesse cenário, os fungos do gênero *Trichoderma* têm despertado especial interesse (Gao et al., 2021; Guo et al., 2023).

Este estudo teve como objetivo avaliar a existência de atividade antitumoral no extrato etanólico do fungo *T. asperelloides* (ExtTa). A citotoxicidade do ExtTa foi analisada em um painel de dez células tumorais diferentes. O ExtTa mostrou ser citotóxico para todas as linhagens tumorais testadas, apresentando maior seletividade em comparação com a DOX. Verificamos uma ação sinérgica quando combinado com a DOX e 5-FU em linhagens celulares de osteossarcoma e colorretal, além de uma redução favorável na dose dos medicamentos. Além disso, iniciamos a investigação do possível mecanismo relacionado à citotoxicidade, como também a caracterização e isolamento de compostos do ExtTa.

O uso de extratos com fins medicinais não é algo novo (Gyllenhaal et al., 2012), e de fato há várias formas de se obter extratos de plantas e microrganismos, usando uma infinidade de substâncias, como, por exemplo, acetato de etila, água, etanol e metanol. O etanol é uma ótima substância para obtenção de extratos por ser considerado um bom solvente de compostos iônicos, ser polar, ser miscível em água e em muitos outros compostos orgânicos, incluindo ácido acético e acetona, e, por possuir uma extremidade apolar, também interage com substâncias apolares (Abubakar & Haque, 2020). Além disso, em estudo previamente realizado por colaboradores de nosso grupo (Lopes et al., 2020), foi mostrado que o extrato etanólico de *T. asperelloides* apresentou uma ação leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. amazonenses* indicando a presença de compostos biologicamente ativos nesta preparação.

A triagem de novos medicamentos anticâncer é frequentemente realizada por meio de estudos *in vitro* e, normalmente, com linhagens de células cancerígenas cultivadas em monocamada (Kitaeva et al., 2020). Dessa forma, para investigar a citotoxicidade do ExtTa contra linhagens tumorais humanas e murinas, foi realizada uma triagem utilizando, inicialmente, 10 tipos celulares (**Tabela 1**). Na escolha das linhagens tumorais foi considerada a inclusão de células derivadas de tumores de diferentes origens embrionárias e de diferentes tecidos, e células tanto humanas quanto murinas, com o intuito de empregá-las em futuros estudos *in vivo* usando os camundongos como modelos.

Como base nos resultados do ensaio MTT, verificou-se que o ExtTa possui efeitos citotóxicos dependentes da concentração para todas as linhagens testadas. Foi observado que altas concentrações do ExtTa são necessárias para a ação citotóxica nas linhagens não tumorais como evidenciado no ensaio com a linhagem de fibroblasto humano GM637, que apresentou IC<sub>50</sub> de 70,62 µg/mL. Comparativamente com as demais células cancerígenas, foi constatado que as linhagens tumorais A549 e SaI/N são as que necessitam de concentrações mais elevadas do ExtTa para exercer sua ação citotóxica. As linhagens de glioblastoma (T98G) e de carcinoma colorretal (HCT116) foram as mais sensíveis à citotoxicidade do ExtTa revelando que o ExtTa tem uma capacidade substancial de reduzir a viabilidade desses tipos celulares.

Com esses resultados concluímos que a sensibilidade ao ExtTa é dependente do tipo da linhagem celular e que a variação encontrada na inibição do crescimento celular pode ser devido a especificidade do tecido de origem, das diferentes mutações presentes em cada linhagem e dos componentes do extrato. Neste contexto, são justificáveis estudos que busquem, por exemplo, responder quais os mecanismos relacionados aos efeitos biológicos observados no tratamento com o ExtTa. Exemplificando, no glioblastoma a via fosfoinositida-3-quinase

(PI3K)/proteína quinase B (AKT)/alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR) e a via de p53 estão frequentemente alteradas nesse tipo de tumor. Outras vias que estão alteradas no carcinoma colorretal também podem ser fontes de investigação, como a via proteína quinase ativada por AMP (AMPK)/RNA da proteína quinase (PERK)/fator de iniciação eucariótica 2 alfa (eIF-2 $\alpha$ ) e outras relacionadas à apoptose, como o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), que podem ser vias envolvidas nos mecanismos de ação que tornam a linhagem susceptível ao ExtTa ou não (Le Rhun et al., 2019; Qiu et al., 2022).

Os resultados obtidos até agora são animadores visto que, o ExtTa mostrou atividade citotóxica contra o glioblastoma, um tipo de câncer altamente agressivo caracterizado por células capazes de infiltrar todo o cérebro, sendo um dos tumores mais agressivos que ocorrem em humanos (Bryukhovetskiy et al., 2018; Goldsmith, 2019). Apesar dos tratamentos atuais que envolvem a remoção cirúrgica do tumor primário seguida de radiação pós-cirúrgica e a subsequente administração de quimioterapia, os resultados geralmente são insatisfatórios, não apresentando melhora significativa nas estatísticas de sobrevida de pacientes portadores deste tipo de tumor (Le Rhun et al., 2019; Osuka & Van Meir, 2017).

Um dos tratamentos recentemente promissores para o glioblastoma foi delineado por Goldsmith (2019). Esse método envolve a combinação de dois procedimentos cirúrgicos: a ressecção do tumor utilizando 5-aminovolumétrico e a inserção de um omento no cérebro dos pacientes afetados por esse tipo de câncer. Embora Goldsmith (2019) destaque a relevância desses tratamentos, seu estudo ressalta a necessidade premente do desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (Goldsmith, 2019). Além disso, nossos dados *in vitro* sugerem a importância de investigar o impacto do ExtTa no desenvolvimento dos tumores de glioblastoma *in vivo*.

Outro achado promissor neste estudo foi a ação citotóxica seletiva do ExtTa contra células HCT116 do carcinoma colorretal humano. O carcinoma colorretal é um dos tumores malignos mais frequentes e de alto risco de morte em todo o mundo, representando 10,2% de todos os novos diagnósticos de câncer e 9,2% para mortalidade, sendo a segunda causa de morte por câncer entre as mulheres, com taxa média de sobrevivência de 55% (Bray et al., 2018; Siegel et al., 2015).

Atualmente, existem vários tipos de terapia para o câncer colorretal, incluindo o quimioterápico 5-FU combinado ao irinotecano (Hare et al., 2013). No entanto, mesmo os avanços significativos nos últimos anos nos medicamentos anticancerígenos para o câncer colorretal, as células tumorais frequentemente desenvolvem resistências múltiplas à

quimioterapia, resultando em recidivas ou tornando as terapias disponíveis predominantemente paliativas para muitos pacientes (Martín et al., 2021; Qiu et al., 2022). Portanto, novos medicamentos ou combinações são necessárias para aumentar a eficácia dos agentes quimioterápicos, prevenir a progressão e reduzir a mortalidade por esta doença.

A fim de comparar a ação de um quimioterápico já utilizado na clínica com o ExtTa, foi feita a investigação dos efeitos da doxorubicina (DOX) *in vitro* em todas as linhagens celulares deste estudo. Como outros quimioterápicos, a DOX não é seletiva para as células cancerígenas, apresentando efeitos colaterais graves, como a cardiotoxicidade, o que é uma grande preocupação durante a terapia, limitando seu uso devido a sua toxicidade (Carvalho et al., 2009; Meredith & Dass, 2016; Rivankar, 2014). Neste trabalho, foram utilizadas oito concentrações para avaliar os efeitos citotóxicos de DOX no painel de células escolhidas. Três das quatro células não tumorais testadas neste estudo, são sensíveis a DOX apresentando valores de IC<sub>50</sub> entre 0,01 e 0,04 µg/mL. Essas concentrações foram menores do que as encontradas para a maioria das linhagens tumorais analisadas em nosso estudo. A linhagem não tumorigênica de rim embrionário humano HEK-293T foi a que se mostrou menos sensível à DOX dentre as linhagens não tumorais testadas. As linhagens de glioblastoma T98G e de melanoma LB373 mostraram ser resistentes a atividade da DOX. Esse resultado não é inesperado, visto que a DOX é ineficiente no tratamento desses tipos de tumores, não sendo usada na terapia para esses tipos de câncer. Porém, há estudos promissores que objetivam reduzir a resistência intrínseca do melanoma a DOX utilizando esse quimioterápico combinado com outras drogas (Licarete et al., 2020; Salvador et al., 2021).

Neste estudo, observou-se também, que a linhagem de fibrossarcoma HT1080 foi a mais sensível a ação da DOX, dentre as linhagens tumorais avaliadas. Apesar da DOX ser um dos tratamentos de primeira linha para o fibrossarcoma, os estudos relatam o caráter altamente agressivo desse tipo tumoral, sua baixa taxa de resposta à quimioterapia e a alta taxa de recorrências tumorais, ressaltando a importância da investigação de novas estratégias de tratamento para esse tipo de câncer (Bao et al., 2014).

Nesta triagem inicial, optamos por utilizar apenas a DOX como quimioterápico de referência. Entretanto, é importante avançar os estudos testando a ação do ExtTa em comparação com fármacos mais direcionados para o tratamento dos tumores que originaram as linhagens celulares avaliadas, como Dacarbazina para as linhagens de melanoma e a Temozolomida para avaliação as linhagens de glioblastoma.

Como as células tumorais são muito parecidas com as células normais do paciente, apesar de desejável, é um desafio a descoberta de substâncias antitumorais com especificidade apenas para as células tumorais sem afetar as células não tumorais (Indrayanto et al., 2021; Jamalzadeh et al., 2017).

O Índice de seletividade (IS) é um parâmetro amplamente utilizado para avaliar se há diferença na nocividade de um composto para as células não tumorais e tumorais em ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Ele basicamente expressa o quanto mais citotóxico o composto é para as células tumorais em comparação com as não tumorais (Indrayanto et al., 2021; Romero-Arguelles et al., 2022). As linhagens celulares não tumorais utilizadas deste estudo são as frequentemente utilizadas para triagens de drogas (Cannella et al., 2020; Hu et al., 2018; Schwarz et al., 2008; Thonemann et al., 2002). É considerado um resultado significativo quando um composto antitumoral é, pelo menos, duas vezes mais seletivo para as células tumorais em comparação com as células não tumorais (Suffness, M. and Pezzuto). Nossos resultados indicaram que o tratamento com o ExtTa comprometeu, de forma seletiva, a viabilidade de alguns tipos de células tumorais: T98G, MDA-MB-231, 4T1, HCT116, WiDr e Saos-2. A citotoxicidade do ExtTa exibiu seletividade de aproximadamente 2 vezes para as linhagens de adenocarcinoma de mama (MDA-MB-231 e 4T1), adenocarcinoma colorretal (WiDr), de osteossarcoma (Saos-2), de melanoma (LB373) e de fibrossarcoma (HT1080) e foi ainda mais seletiva para as células de glioblastoma (T98G) e carcinoma colorretal (HCT116), com o IS de 3 a 4, o que representa que para essas linhagens o ExtTa pode ser quatro vezes mais citotóxico para as células tumorais do que para as células não tumorais.

Esses IS encontrados são similares a índices encontrados em outros estudos que identificaram compostos com promissora atividade antitumoral (Badisa et al., 2009; Musa et al., 2010). No estudo de Tritipmongkol e colaboradores, por exemplo, o extrato de *Kaempferia galanga* Linn. e seu composto ativo foram avaliados sobre células de colangiocarcinoma e os IS obtidos variaram de 1,78 a 4,44 (Tritipmongkol et al., 2020). Como as células cancerosas são extremamente parecidas com outras células, os IS de agente antitumorais promitentes são bem menores que os encontrados para drogas usadas no tratamento de outros tipos de doenças causadas por microrganismos, por exemplo (Kaiser et al., 2015; Rocha et al., 2013). Dessa forma, nossos resultados indicam o potencial uso deste extrato em futuros testes clínicos.

Para comparar a seletividade do ExtTa com um quimioterápico utilizado na clínica, foi avaliado o IS no tratamento com a DOX para mesmas linhagens. Neste estudo, a DOX apresentou valores de IS próximos a zero para a maioria das células tumorais em comparação

com as células não tumorigênicas, o que significa que esse fármaco foi mais citotóxico para as células normais do que para cancerígenas. A DOX foi seletiva apenas para a linhagem HT1080 quando comparada com a linhagem não tumoral de rim HEK-293T.

Ao comparar a seletividade do ExtTa com a DOX, foi observado que, mesmo quando o IS para o ExtTa era menor que 1, ele foi mais seletivo que a DOX, como observado para as linhagens A549 e SaI/N, demonstrando que o ExtTa foi mais seletivo que a DOX mesmo nas linhagens menos sensíveis a sua ação, destacando seu possível papel no combate à multirresistência. Esses resultados são motivadores, porque uma das características esperadas de um novo agente antitumoral é sua capacidade de eliminar as células tumorais sendo menos agressivo para as outras células e com um IS superior à de fármacos já utilizados na clínica, o que pode resultar em um medicamento com menos efeitos adversos.

A resistência a medicamentos anticancerígenos é um processo complexo que resulta, por exemplo, no desenvolvimento de caminhos alternativos para ativação do crescimento, nas mudanças na farmacologia celular, mudanças regulatórias que alteram caminhos de diferenciação e/ou alterações na fisiologia local do câncer, como suprimento de sangue, comportamento de células vizinhas e resposta do sistema imunológico. Esses mecanismos específicos são facilitados pelas marcas intrínsecas do câncer, como heterogeneidade da massa tumoral, redundância de caminhos promotores de crescimento, aumento da taxa de mutação, reprogramações epigenéticas, e a variação dinâmica do comportamento tumoral no tempo e no espaço (Gottesman et al., 2016; Hanahan, 2022).

Além dessa resistência ao tratamento, que é frequentemente observada, a baixa seletividade das drogas antitumorais, resultando em efeitos adversos, é uma das razões para emprego de terapias multimodais. Isso visa encontrar combinações de medicamentos que apresentem uma seletividade maior para as células tumorais do que para as células normais. Além disso, essa abordagem é uma forma de lidar com a heterogeneidade presente nos tumores (Gottesman et al., 2016; Zagidullin et al., 2019).

Como tornar o tratamento do câncer mais personalizado e mais eficaz continua sendo um dos grandes desafios do sistema de saúde. As combinações de fármacos sinérgicos multidirecionados podem fornecer respostas clínicas eficazes e sustentadas (Lawrence et al., 2014; Zagidullin et al., 2019). Com este intuito, foram avaliados os efeitos da combinação do ExtTa com a DOX nas linhagens tumorais de adenocarcinoma de mama MDA-MB-231 e 4T1, de osteossarcoma Saos-2 e de fibrossarcoma HT1080. É importante destacar que nem toda

relação entre duas moléculas com ação citotóxica será sinérgica. Os mecanismos de morte celular induzidos por moléculas citotóxicas frequentemente apresentam semelhanças, e algumas proporções entre essas moléculas podem resultar na inibição desse processo, ao passo que outras podem potencializá-lo. Além disso, deve-se ater a quais proporções a combinação gera ganho de atividade (Chou, 2006).

Em nossos resultados, o tratamento simultâneo com ExtTa e DOX revelou ação citotóxica sinérgica na linhagem osteossarcoma Saos-2, sugerindo que essa combinação poderia potencializar o efeito quimioterápico da DOX. Além disso, observou-se uma redução favorável da dose ( $DRI > 1$ ) conforme mostrado na Figura 19d, permitindo uma redução de até 6,63 vezes na dose de DOX (**Tabela 8**). Dessa forma, é possível alcançar o mesmo efeito citotóxico com uma concentração menor de DOX quando associado ao ExtTa. Considerando que a administração cumulativa de DOX, o quimioterápico de eleição no tratamento do osteossarcoma, está associada a efeitos tóxicos, especialmente cardiotoxicos, essa redução de dose pode proporcionar benefícios significativos. Assim, nossos dados apontam o potencial uso do ExtTa como adjuvante na quimioterapia do osteossarcoma baseada em DOX, promovendo uma abordagem terapêutica mais seletiva e eficaz, com redução de efeitos adversos indesejáveis e recorrência tumoral (Chou, 2006; Kazantseva et al., 2022).

Apesar de o 5-FU ser um agente anticâncer importante no tratamento do câncer colorretal, a resistência a medicamentos e os efeitos adversos associados à dose restrita limitam a eficácia do tratamento e conseqüentemente a qualidade de vida dos pacientes (Onar et al., 2023). Com o objetivo de desenvolver uma estratégia inovadora para enfrentar esse desafio, investigamos a combinação do ExtTa com o 5-FU nas linhagens de câncer colorretal HCT116 e WiDr. Quando o 5-FU foi coadministrado com o ExtTa, sua atividade citotóxica nas células HCT116 aumentaram significativamente em comparação com o uso isolado, conforme indicado pelos CI encontrados (**Tabela 10 e Figura 23**). Essa combinação também resultou numa redução favorável na dose de cada composto. Ao potencializar a eficácia terapêutica dos agentes convencionais por meio de combinação, é possível alcançar resultados positivos, como manter ou ampliar a eficácia sem causar toxicidade devido à redução da dose, como também atingir os diferentes tipos de células tumorais que compõe o tumor, impedindo ou retardando a resistência à terapia. Esses resultados corroboram a ideia de que uma abordagem terapêutica combinada com o ExtTa representa uma estratégia promissora para diminuir a dosagem terapêutica de agentes quimioterápicos de agentes quimioterápicos (Crystal et al., 2014; Dagogo-Jack & Shaw, 2018).

Com o objetivo de investigar preliminarmente quais os mecanismos moleculares subjacentes à resposta citotóxica observadas nas linhagens tumorais, foi realizada uma avaliação por RT-qPCR da expressão de um painel de genes após o tratamento com o ExtTa nas linhagens de glioblastoma T98G e carcinoma colorretal HCT116. Para análise, foram escolhidos genes alvos frequentemente alterados nas células tumorais e estão associados a várias vias de sinalização celular e processos biológicos que desempenham papéis cruciais na apoptose (BAX e BCL-2), na proliferação e sobrevivência celular (MAPK1, mTOR, AKT e MYC), no ciclo celular e controle de proliferação (CDKN1A), nos fatores de crescimento e sinalização celular (EGF). Os resultados mostram que a expressão do gene anti-apoptótico BCL-2 aumentou como resultado do tratamento com o ExtTa na linhagem T98G. Os genes BCL-2 e BAX são conhecidos como reguladores da apoptose, com BAX promovendo e BCL-2 inibindo esse processo. O equilíbrio entre esses genes é crucial para determinar a sobrevivência ou morte celular. Um aumento de BAX e/ou diminuição na expressão de BCL-2 podem favorecer a morte celular programada, o que é desejável no tratamento do câncer (Qian et al., 2022).

O aumento observado em BCL-2 após o tratamento pode ser influenciado por vários fatores, tendo implicações distintas como uma resposta adaptativa que ativa vias de sobrevivência para evitar a apoptose, a seleção de variantes resistentes que expressam níveis mais altos de BCL-2, ou até mesmo devido a variações experimentais.

Os dados revelaram também que o tratamento com o ExtTa na linhagem HCT116 regulou positivamente os níveis de expressão de MAPK1. Este gene, também conhecido como ERK2, desempenha um papel na via de sinalização MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), que está envolvida no controle do crescimento celular, diferenciação e sobrevivência. O aumento da expressão de genes pertencentes a essa via pode estar correlacionado com o desenvolvimento e progressão do câncer (D. Ji et al., 2018).

A ativação da expressão do gene MAPK1 pode estar associada a diversas causas. Se o tratamento envolver inibidores da via MAPK, as células podem desenvolver resistência, manifestando um aumento na expressão de MAPK1 para superar a inibição e assegurar a sobrevivência. Outro possível mecanismo relacionado é a compensação adaptativa, que surge pela inibição de outros genes na via MAPK, culminando em um aumento na expressão de MAPK1. Além disso, a variabilidade intrínseca na biologia das células tumorais pode resultar em diferentes respostas.

Apesar da relevância desta primeira investigação sobre o possível mecanismo de ação, que identificou alterações na expressão gênica influenciadas pelo tratamento, sabemos que a regulação pós-transcricional e as modificações proteicas podem desempenhar um papel importante na resposta celular. Dessa forma, é necessário replicar os experimentos e validar funcionalmente essas alterações, verificando seu impacto real nas vias biológicas e sobre a proliferação celular,

Frequentemente, as vias biológicas são reguladas por uma rede complexa de genes inter-relacionados, destacando a importância de uma análise abrangente que inclua um conjunto mais amplo de genes para compreender de forma extensiva o mecanismo de ação em questão.

Além disso, é fundamental considerar essas limitações e reconhecer a necessidade de testes adicionais para validar e expandir as descobertas. Analisar o impacto do tratamento por outros ensaios, como ensaios de apoptose e estresse oxidativo, análise de proteínas, e avaliação de alterações morfológicas, podem oferecer uma perspectiva mais completa, superando as limitações inerentes ao estudo inicial. Essas abordagens adicionais são cruciais para permitir uma identificação de alvos moleculares específicos dos efeitos do tratamento e garantir a robustez e generalização dos resultados obtidos.

Para prosseguir na investigação do mecanismo pelo qual o tratamento com o ExtTa exerce efeito citotóxico, realizou-se uma análise do ciclo celular. O ciclo celular eucariótico compreende quatro fases sequenciais: G1, S, G2 e M. Durante a replicação celular, a duplicação do DNA ocorre na fase S, enquanto a segregação dos cromossomos e a divisão celular acontecem na fase M. As fases G1 e G2 proporcionam à célula tempo para crescer e duplicar organelas. A intérfase engloba as fases G1, S e G2. Durante as fases G1 e G2, a célula monitora o ambiente para garantir condições favoráveis antes de prosseguir para as fases S e M. A fase G1 é crítica, pois as células podem atrasar o ciclo ou entrar em estado de quiescência (G0) se as condições não forem ideais (Alberts et al., 2002). Checkpoints do ciclo celular são mecanismos bioquímicos que asseguram a fidelidade na replicação, reparo e divisão celular, permitindo pausas temporárias para reparo de danos, dissipação de estresse ou disponibilidade de fatores essenciais. A sinalização desses checkpoints pode também induzir à morte celular programada se o dano for irreparável. Defeitos nesses checkpoints podem resultar em mutações genéticas, danos cromossômicos e aneuploidia, contribuindo para a carcinogênese. Inibidores como os da família INK4, por exemplo, atuam nos checkpoints de ciclo celular, especialmente

na fase G1, sendo genes supressores de tumor cruciais, cujas mutações de perda de função podem desencadear carcinogênese (Pietenpol & Stewart, 2002).

A análise do efeito do ExtTa no ciclo celular da linhagem T98G indicou um aumento de células na fase G0/G1 e uma diminuição de células nas fases S e G2/M em comparação com o controle, após 24 horas (**Figura 28**). Esses achados sugerem uma possível interrupção do ciclo celular na fase G0/G1, indicando a ativação dos checkpoints para avaliação, possivelmente desencadeando sinalização para a via de morte celular programada e levando as células à apoptose. Esses resultados são promissores, considerando a importância biológica do ciclo celular na regulação da proliferação celular. A desregulação do ciclo celular está fortemente relacionada à transformação maligna, tornando as substâncias direcionadas à inibição do processo mitótico uma área de pesquisa anticâncer amplamente explorada.

Em conexão com isso, notou-se que o ExtTa aparenta promover parada no ciclo celular das células HCT116 após 48 horas, evidenciando um aumento significativo na porcentagem de células na fase G0/G1 de 68,73% do grupo controle para 77,4% no grupo tratado. No entanto, ao contrário do que foi observado na linhagem T98G, não foram identificadas diferenças estatísticas nas fases S e G2/M, como visto anteriormente.

É importante salientar que, após 48 horas de tratamento com ExtTa na linhagem T98G e 24 horas na linhagem HCT116, não foram registrados efeitos sobre as fases do ciclo celular em comparação com o grupo não tratado. Este padrão sugere que o tempo necessário para que o tratamento exerça efeito no ciclo celular pode variar entre essas linhagens celulares. Para esclarecer se de fato ocorre a parada no ciclo celular, são necessários mais experimentos, incluindo a replicação deste estudo e a avaliação do impacto em diferentes concentrações e períodos de exposição. Além disso, é crucial investigar se a morte celular induzida é por apoptose ou por outro mecanismo, utilizando diferentes marcadores.

Embora esses dados sejam preliminares e careçam de confirmação, eles se revelam promissores, dado o aumento significativo das células na fase G0/G1. Essa eficaz parada nessa fase do ciclo pode ser benéfica para conter a proliferação descontrolada, especialmente em células que possam apresentar anormalidades genéticas ou outros sinais de transformação maligna. Essa descoberta pode, portanto, oferecer alternativas para desenvolvimento de estratégias terapêuticas interessantes para inibir o crescimento tumoral e induzir a morte de células tumorais, embora seja necessário realizar mais investigações para validar esses achados preliminares.

Concomitantemente a este trabalho, nossa equipe conduziu estudos para avaliar a toxicidade aguda oral *in vivo* do ExtTa, buscando determinar uma dose eficaz para testes, bem como investigar a segurança da administração do ExtTa em camundongos (Pereira, 2023 – dissertação). Os resultados do ensaio de toxicidade oral aguda *in vivo* confirmaram que a LD50 do ExtTa está situada entre 300 a 2.000 mg/kg, classificando o ExtTa na categoria 4 do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Substâncias Químicas (GHS). Essa classificação indica que o ExtTa apresenta um baixo potencial de risco de toxicidade. Adicionalmente, Izabela Pereira também demonstrou em sua dissertação que o ExtTa é eficaz na inibição do crescimento do tumor de mama induzido pela inoculação de células 4T1 em camundongos, apresentando-se como uma alternativa menos prejudicial à saúde e ao bem-estar dos animais quando comparada à DOX (Pereira, 2023 – dissertação).

Todos esses achados enfatizam a importância de dar continuidade à investigação e à identificação dos componentes ativos presentes no ExtTa que são responsáveis pela atividade antitumoral observada em nossos resultados. Com base nessas considerações, estudos direcionados para a identificação da substância ativa responsável pelo efeito observado, bem como a sua purificação, permitirão uma exploração mais aprofundada do mecanismo de ação, farmacologia e toxicidade. Essa abordagem possibilitará uma compreensão mais abrangente da ação citotóxica do ExtTa. Adicionalmente, o isolamento e purificação do(s) componente(s) ativo(s) também possibilitará eliminar as possíveis variações decorrentes das distintas preparações do extrato bruto que podem ser responsáveis por variações na sua atividade.

Para iniciar essa caracterização e isolamento, foi feita a quantificação de proteínas do extrato bruto e foi observado que 2% do ExtTa é composto de proteína. Em seguida, o ExtTa foi fracionado por FPLC. Essa técnica é geralmente utilizada na purificação de polímeros a partir de misturas complexas. A cromatografia líquida apresenta uma fase líquida móvel e uma fase estacionária, que pode apresentar uma resina composta por esferas de agarose com diferentes ligantes, dependendo do tipo de afinidade utilizada para a purificação, podendo ser baseada no tamanho das macromoléculas, hidrofobicidade, distribuição de cargas, fase reversa ou cromatográfica (Niessen et al., 2006).

O resultado do fracionamento com base no tamanho molecular por FLPC, gerou 54 frações em uma faixa de massa molecular variando entre, aproximadamente, 41 e 4 kDa. Essas frações serão utilizadas em estudos futuros na avaliação de citotoxicidade nas linhagens que apresentarem maior sensibilidade ao extrato bruto na triagem inicial deste estudo. Esse

fracionamento é importante para as próximas etapas de identificação e purificação do possível composto com o princípio ativo presente.

A análise do espectro de FTIR (Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier) é valiosa para identificação de grupos funcionais específicos, proporcionando uma visão detalhada da composição química de uma amostra. Ao examinar o espectro resultante do extrato bruto, evidencia-se uma complexidade molecular que inclui a presença de proteínas, carboidratos e polissacarídeos.

Na análise mais detalhada das frações do ExtTa, observou-se uma distinção nítida entre dois grupos. Um destes grupos exibe bandas que sugerem a presença de proteínas e grupos amida, enquanto o outro revela vibrações de estiramento indicativas de compostos ricos em carboidratos. A notável separação dessas frações em categorias distintas ressalta a capacidade da técnica FTIR em discernir entre diferentes classes de moléculas na amostra. A fração 7, por sua vez, apresenta uma mistura dessas estruturas químicas, revelando a coexistência de bandas características tanto de proteínas quanto de carboidratos. Essa dualidade sugere uma complexidade molecular única nessa fração, com implicações significativas para aplicações potenciais. Esses resultados proporcionarão prosseguimento no processo de pesquisa para identificar em quais frações específicas se encontra o composto com atividade citotóxica no extrato bruto, simplificando assim o subsequente isolamento desse(s) componente(s).

Esses resultados são particularmente encorajadores, especialmente à luz da busca por novos agentes quimioterápicos. A ênfase na investigação de moléculas maiores, como proteínas, é respaldada por sua capacidade de ação mais específica, minimizando potenciais efeitos indesejáveis. A rica diversidade química evidenciada no espectro FTIR do extrato e suas frações ressalta o potencial desses compostos para desdobrar propriedades terapêuticas valiosas, destacando a importância desses resultados no contexto da pesquisa farmacêutica (Basak et al., 2022).

Nossa equipe de pesquisa está atualmente direcionando seus esforços para avançar na caracterização, isolamento e purificação dos compostos ativos responsáveis pela atividade antitumoral. Utilizando uma variedade de abordagens, como Cromatografia de Permeação em Gel (GPC), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectroscopia de Massa (MS), buscamos obter informações detalhadas sobre a composição bioquímica do extrato. Essas técnicas avançadas nos permitirão aprofundar nossa compreensão dos compostos presentes e aprimorar nosso conhecimento sobre seu potencial terapêutico.

## 7 CONCLUSÃO

O ExtTa apresenta citotoxicidade seletiva contra as linhagens celulares derivadas de glioblastoma e carcinoma colorretal T98G e HCT116 além de efeito sinérgico com quimioterápicos já usados na clínica sobre as linhagens de osteossarcoma Saos-2 e carcinoma colorretal HCT116, e pode representar uma fonte importante de nova(s) molécula(s) com atividade antitumoral, candidatas para o desenvolvimento de abordagens terapêuticas antitumorais, ampliando as opções de tratamento e combinações de quimioterápicos. Esta descoberta pode contribuir não apenas para redução de doses e sintomas adversos indesejáveis, mas também à otimização da eficácia global dos tratamentos, proporcionando avanços significativos no enfrentamento do câncer.

## 8 PERSPECTIVAS E PRÓXIMAS ETAPAS

Os estudos com o gênero *Trichoderma* para aplicação clínica são recentes e, portanto, a identificação e caracterização dos compostos provenientes destes fungos são limitados e ainda estão sendo elucidados. Nosso grupo é o primeiro a mostrar atividade antitumoral em compostos proveniente de preparações oriundas da espécie *Trichoderma asperelloides*. Considerando os resultados obtidos, várias perspectivas poderão advir dos resultados obtidos desta pesquisa, como:

- Descoberta de novas moléculas candidatas isoladas do extrato do fungo *Trichoderma asperelloides* com atividade biológica antitumoral para serem testadas em ensaios pré-clínicos;
- Possibilidade de melhoramento das propriedades farmacológicas das novas moléculas identificadas a partir do extrato fúngico empregando-se ferramentas de bioinformática estrutural aplicada a modelagem e desenho de drogas terapêuticas para gerar produtos de interesse na área da saúde humana e animal;
- Geração de dados científicos inéditos que contribuirão na área tanto da busca de novas moléculas antitumorais quanto na caracterização de fungos do gênero *Trichoderma* que resultarão em produção de artigo de qualidade internacional a ser publicado em revista científica;

Para alcançar essas perspectivas, as próximas abordagens experimentais do nosso grupo serão:

- Testar a susceptibilidade das linhagens celulares de glioblastoma e carcinoma colorretal aos efeitos citotóxicos das frações ExtTa, pelo método MTT, e calcular o IS das frações, como também comparar a ação dessas frações com a citotoxicidade e a seletividade para células tumorais com quimioterápicos utilizados na clínica;
- Caracterizar a composição e a estrutura molecular dos componentes presentes no ExtTa por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN);
- Isolar, identificar e purificar por eletroforese em gel, espectrometria de massa e abordagens de bioinformática, os possíveis princípios ativos presentes nas frações do ExtTa que apresentarem efeito citotóxico com seletividade para as células tumorais;
- Testar a susceptibilidade das linhagens celulares de glioblastoma e carcinoma colorretal às frações aos efeitos citotóxicos dos princípios ativos isolados das frações que apresentaram maior citotoxicidade e calcular o IS dessas moléculas que apresentarem efeitos citotóxicos;
- Caracterizar os mecanismos de ação relacionado a citotoxicidade e as vias de sinalização envolvidas nos efeitos biológicos observados do ExtTa, das frações e dos princípios ativos isolados;
- Avaliar o potencial efeito antitumoral do ExtTa e dos princípios ativos isolados *in vivo* induzindo tumores de glioblastoma e carcinoma colorretal em camundongos, em diferentes doses e vias de administração.

## REFERÊNCIAS

- Abd El-Rahman, A. A. E. M., El-Shafei, S. M. A. E. A., Ivanova, E. V., Fattakhova, A. N., Pankova, A. V., El-Shafei, M. A. E. A., El-Morsi, E. M. A. E. F., & Alimova, F. K. (2014). Cytotoxicity of *Trichoderma* spp. cultural filtrate against human cervical and breast cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP*, *15*(17), 7229–7234. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.17.7229>
- Abubakar, A. R., & Haque, M. (2020). Preparation of Medicinal Plants: Basic Extraction and Fractionation Procedures for Experimental Purposes. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, *12*(1), 1–10. [https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS\\_175\\_19](https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS_175_19)
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *An Overview of the Cell Cycle*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>

- Badisa, R. B., Darling-Reed, S. F., Joseph, P., Cooperwood, J. S., Latinwo, L. M., & Goodman, C. B. (2009). Selective Cytotoxic Activities of Two Novel Synthetic Drugs on Human Breast Carcinoma MCF-7 Cells. *Anticancer Research*, 29(8), 2993. [/pmc/articles/PMC2885965/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2885965/)
- Bao, Q., Niess, H., Djafarzadeh, R., Zhao, Y., Schwarz, B., Angele, M. K., Jauch, K. W., Nelson, P. J., & Bruns, C. J. (2014). Recombinant TIMP-1-GPI inhibits growth of fibrosarcoma and enhances tumor sensitivity to doxorubicin. *Targeted Oncology*, 9(3), 251–261. <https://doi.org/10.1007/S11523-013-0294-5>
- Basak, D., Arrighi, S., Darwiche, Y., & Deb, S. (2022). Comparison of Anticancer Drug Toxicities: Paradigm Shift in Adverse Effect Profile. *Life*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/LIFE12010048>
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- Bryukhovetskiy, I., Ponomarenko, A., Lyakhova, I., Zaitsev, S., Zayats, Y., Korneyko, M., Eliseikina, M., Mischenko, P., Shevchenko, V., Sharma, H. S., Sharma, A., & Khotimchenko, Y. (2018). Personalized regulation of glioblastoma cancer stem cells based on biomedical technologies: From theory to experiment (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 42(2), 691. <https://doi.org/10.3892/IJMM.2018.3668>
- Cannella, V., Altomare, R., Leonardi, V., Russotto, L., Di Bella, S., Mira, F., & Guercio, A. (2020). In Vitro Biocompatibility Evaluation of Nine Dermal Fillers on L929 Cell Line. *BioMed Research International*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8676343>
- Carvalho, C., Santos, R., Cardoso, S., Correia, S., Oliveira, P., Santos, M., & Moreira, P. (2009). Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. *Current Medicinal Chemistry*, 16(25), 3267–3285. <https://doi.org/10.2174/092986709788803312>
- Chaparro, A. P., Carvajal, L. H., Orduz, S., Chaparro, A. P., Carvajal, L. H., & Orduz, S. (2011). Fungicide tolerance of *Trichoderma asperelloides* and *T. harzianum* strains. *Agricultural Sciences*, 2(3), 301–307. <https://doi.org/10.4236/AS.2011.23040>
- Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological Reviews*, 58(3), 621–681. <https://doi.org/10.1124/PR.58.3.10>
- Chou, T. C. (2010). Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Research*, 70(2), 440–446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947/655517/P/DRUG-COMBINATION-STUDIES-AND-THEIR-SYNERGY>
- Corona, S. P., Sobhani, N., Ianza, A., Roviello, G., Mustacchi, G., Bortul, M., Zanconati, F., & Generali, D. (2017). Advances in systemic therapy for metastatic breast cancer: future perspectives. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, 34(7). <https://doi.org/10.1007/S12032-017-0975-5>

- Cragg, G. M., & Pezzuto, J. M. (2016). Natural Products as a Vital Source for the Discovery of Cancer Chemotherapeutic and Chemopreventive Agents. *Medical Principles and Practice*, 25(Suppl 2), 41. <https://doi.org/10.1159/000443404>
- Crystal, A. S., Shaw, A. T., Sequist, L. V., Friboulet, L., Niederst, M. J., Lockerman, E. L., Frias, R. L., Gainor, J. F., Amzallag, A., Greninger, P., Lee, D., Kalsy, A., Gomez-Caraballo, M., Elamine, L., Howe, E., Hur, W., Lifshits, E., Robinson, H. E., Katayama, R., ... Engelman, J. A. (2014). Patient-derived Models of Acquired Resistance Can Identify Effective Drug Combinations for Cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 346(6216), 1480. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1254721>
- Dagogo-Jack, I., & Shaw, A. T. (2018). Tumour heterogeneity and resistance to cancer therapies. *Nature Reviews. Clinical Oncology*, 15(2), 81–94. <https://doi.org/10.1038/NRCLINONC.2017.166>
- De Almeida, V. L., Leitão, A., Barrett Reina, L. D. C., Montanari, C. A., Donnici, C. L., & Lopes, M. T. P. (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, 28(1), 118–129. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000100021>
- de Martel, C., Georges, D., Bray, F., Ferlay, J., & Clifford, G. M. (2020). Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *The Lancet. Global Health*, 8(2), e180–e190. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(19\)30488-7](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(19)30488-7)
- Demain, A. L., & Vaishnav, P. (2011). Natural products for cancer chemotherapy. *Microbial Biotechnology*, 4(6), 687–699. <https://doi.org/10.1111/J.1751-7915.2010.00221.X>
- Deng, Q., Yu, X., Xiao, L., Hu, Z., Luo, X., Tao, Y., Yang, L., Liu, X., Chen, H., Ding, Z., Feng, T., Tang, Y., Weng, X., Gao, J., Yi, W., Bode, A. M., Dong, Z., Liu, J., & Cao, Y. (2013). Neoalbacanol induces energy depletion and multiple cell death in cancer cells by targeting PDK1-PI3-K/Akt signaling pathway. *Cell Death & Disease*, 4(9), e804. <https://doi.org/10.1038/CDDIS.2013.324>
- Estimativa — Instituto Nacional de Câncer - INCA*. (n.d.). Retrieved November 7, 2023, from <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941–1953. <https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Ferro, L., Gojkovic, Z., Gorzsás, A., & Funk, C. (2019). Statistical Methods for Rapid Quantification of Proteins, Lipids, and Carbohydrates in Nordic Microalgal Species Using ATR–FTIR Spectroscopy. *Molecules* 2019, Vol. 24, Page 3237, 24(18), 3237. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24183237>
- Fukuzawa, M., Yamaguchi, R., Hide, I., Chen, Z., Hirai, Y., Sugimoto, A., Yasuhara, T., & Nakata, Y. (2008). Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of *Ganoderma lucidum* (Reishi Houshi) to its anti-tumor activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 31(10), 1933–1937. <https://doi.org/10.1248/BPB.31.1933>

- Gao, Y., Miles, S. L., Dasgupta, P., Rankin, G. O., Cutler, S., & Chen, Y. C. (2021). Trichodermin Induces G0/G1 Cell Cycle Arrest by Inhibiting c-Myc in Ovarian Cancer Cells and Tumor Xenograft-Bearing Mice. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9). <https://doi.org/10.3390/IJMS22095022>
- Goldsmith, H. S. (2019). Potential improvement of survival statistics for glioblastoma multiforme (WHO IV). *Surgical Neurology International*, 10(123). <https://doi.org/10.25259/SNI-185-2019>
- Gortikov, M., Yakubovich, E., Wang, Z., López-Giráldez, F., Tu, Y., Townsend, J. P., & Yarden, O. (2022). Differential Expression of Cell Wall Remodeling Genes Is Part of the Dynamic Phase-Specific Transcriptional Program of Conidial Germination of *Trichoderma asperelloides*. *Journal of Fungi*, 8(8). <https://doi.org/10.3390/JOF8080854/S1>
- Gottesman, M. M., Lavi, O., Hall, M. D., & Gillet, J. P. (2016). Toward a Better Understanding of the Complexity of Cancer Drug Resistance. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 56, 85–102. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-PHARMTOX-010715-103111>
- Guo, Q., Shi, L., Wang, X., Li, D., Yin, Z., Zhang, J., Ding, G., & Chen, L. (2023). Structures and Biological Activities of Secondary Metabolites from the *Trichoderma* genus (Covering 2018–2022). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71, 13612–13632. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.3C04540>
- Gyllenhaal, C., Kadushin, M. R., Southavong, B., Sydara, K., Bouamanivong, S., Xaiveu, M., Xuan, L. T., Hiep, N. T., Hung, N. V., Loc, P. K., Dac, L. X., Bich, T. Q., Cuong, N. M., Ly, H. M., Zhang, H. J., Franzblau, S. G., Xie, H., Riley, M. C., Elkington, B. G., ... Soejarto, D. D. (2012). Ethnobotanical approach versus random approach in the search for new bioactive compounds: Support of a hypothesis. *Pharmaceutical Biology*, 50(1), 30–41. <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.634424>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2011.02.013>
- Hare, J. I., Neijzen, R. W., Anantha, M., Dos Santos, N., Harasym, N., Webb, M. S., Allen, T. M., Bally, M. B., & Waterhouse, D. N. (2013). Treatment of colorectal cancer using a combination of liposomal irinotecan (Irinophore C<sup>TM</sup>) and 5-fluorouracil. *PloS One*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0062349>
- Hu, J., Han, J., Li, H., Zhang, X., Liu, L. L., Chen, F., & Zeng, B. (2018). Human Embryonic Kidney 293 Cells: A Vehicle for Biopharmaceutical Manufacturing, Structural Biology, and Electrophysiology. *Cells, Tissues, Organs*, 205(1), 1–8. <https://doi.org/10.1159/000485501>
- Huang, M., Lu, J. J., & Ding, J. (2021). Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. *Natural Products and Bioprospecting*, 11(1), 5–13. <https://doi.org/10.1007/S13659-020-00293-7/FIGURES/4>

- Indrayanto, G., Putra, G. S., & Suhud, F. (2021). Validation of in-vitro bioassay methods: Application in herbal drug research. *Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology*, 46, 273–307. <https://doi.org/10.1016/BS.PODRM.2020.07.005>
- Jamalzadeh, L., Ghafouri, H., Aghamaali, M., & Sariri, R. (2017). Induction of Apoptosis in Human Breast Cancer MCF-7 Cells by a Semi-Synthetic Derivative of Artemisinin: A Caspase-Related Mechanism. *Iranian Journal of Biotechnology*, 15(3), 157. <https://doi.org/10.15171/IJB.1567>
- Ji, D., Zhang, L., Zhu, Q., Bai, Y., Wu, Y., & Xu, Y. (2018). Discovery of potent, orally bioavailable ERK1/2 inhibitors with isoindolin-1-one structure by structure-based drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 164, 334–341. <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.12.040>
- Ji, Y., Yang, X., Ji, Z., Zhu, L., Ma, N., Chen, D., Jia, X., Tang, J., & Cao, Y. (2020). DFT-Calculated IR Spectrum Amide I, II, and III Band Contributions of N-Methylacetamide Fine Components. *ACS Omega*, 5(15), 8572–8578. [https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.9B04421/ASSET/IMAGES/LARGE/AO9B04421\\_0004.JPEG](https://doi.org/10.1021/ACSOMEGA.9B04421/ASSET/IMAGES/LARGE/AO9B04421_0004.JPEG)
- Kaiser, M., Mäser, P., Tadoori, L. P., Ioset, J. R., Brun, R., & Sullivan, D. J. (2015). Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. *PLoS ONE*, 10(8). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0135556>
- Kazantseva, L., Becerra, J., & Santos-Ruiz, L. (2022). Oridonin enhances antitumor effects of doxorubicin in human osteosarcoma cells. *Pharmacological Reports*, 74(1), 248. <https://doi.org/10.1007/S43440-021-00324-1>
- Khan, R. A. A., Najeeb, S., Hussain, S., Xie, B., & Li, Y. (2020). Bioactive Secondary Metabolites from *Trichoderma* spp. against Phytopathogenic Fungi. *Microorganisms*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8060817>
- Kitaeva, K. V., Rutland, C. S., Rizvanov, A. A., & Solovyeva, V. V. (2020). Cell Culture Based in vitro Test Systems for Anticancer Drug Screening. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/FBIOE.2020.00322>
- Kunzmann, B. G. Avaliação do efeito biológico do extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* sobre as células tumorais humanas. Dissertação de mestrado 2017.
- Laird, P. W., Zijderveld, A., Linders, K., Rudnicki, M. A., Jaenisch, R., & Berns, A. (1991). Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Research*, 19(15), 4293. <https://doi.org/10.1093/NAR/19.15.4293>
- Lawrence, M. S., Stojanov, P., Mermel, C. H., Robinson, J. T., Garraway, L. A., Golub, T. R., Meyerson, M., Gabriel, S. B., Lander, E. S., & Getz, G. (2014). Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. *Nature* 2014 505:7484, 505(7484), 495–501. <https://doi.org/10.1038/nature12912>
- Le Rhun, E., Preusser, M., Roth, P., Reardon, D. A., van den Bent, M., Wen, P., Reifenberger, G., & Weller, M. (2019). Molecular targeted therapy of glioblastoma. *Cancer Treatment Reviews*, 80. <https://doi.org/10.1016/J.CTRV.2019.101896>

- Lheureux, S., Denoyelle, C., Ohashi, P. S., De Bono, J. S., & Mottaghy, F. M. (2017). Molecularly targeted therapies in cancer: a guide for the nuclear medicine physician. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, *44*(Suppl 1), 41–54. <https://doi.org/10.1007/S00259-017-3695-3>
- Licarete, E., Rauca, V. F., Luput, L., Drotar, D., Stejerean, I., Patras, L., Dume, B., Toma, V. A., Porfire, A., Gherman, C., Sesarman, A., & Banciu, M. (2020). Overcoming Intrinsic Doxorubicin Resistance in Melanoma by Anti-Angiogenic and Anti-Metastatic Effects of Liposomal Prednisolone Phosphate on Tumor Microenvironment. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(8). <https://doi.org/10.3390/IJMS21082968>
- Loguercio, L. L., de Carvalho, A. C., Niella, G. R., De Souza, J. T., & Pomella, A. W. V. (2009). Selection of *Trichoderma stromaticum* isolates for efficient biological control of witches' broom disease in cacao. *Biological Control*, *51*(1), 130–139. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCONTROL.2009.06.005>
- Lopes, D. de S., Santos, U. R. dos, Dos Anjos, D. O., Silva Júnior, L. J. C. da, Paula, V. F. de, Vannier-Santos, M. A., Silva-Jardim, I., Castro-Gomes, T., Pirovani, C. P., & Lima-Santos, J. (2020). Ethanolic Extract of the Fungus *Trichoderma asperelloides* Induces Ultrastructural Effects and Death on *Leishmania amazonensis*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 306. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00306/FULL>
- López-Lázaro, M. (2015). Two preclinical tests to evaluate anticancer activity and to help validate drug candidates for clinical trials. *Oncoscience*, *2*(2), 91. <https://doi.org/10.18632/ONCOSCIENCE.132>
- Lukasheva, E. V., Babayeva, G., Karshieva, S. S., Zhdanov, D. D., & Pokrovsky, V. S. (2021). L-Lysine  $\alpha$ -Oxidase: Enzyme with Anticancer Properties. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, *14*(11). <https://doi.org/10.3390/PH14111070>
- Martín, M. J., Azcona, P., Lassalle, V., & Gentili, C. (2021). Doxorubicin delivery by magnetic nanotheranostics enhances the cell death in chemoresistant colorectal cancer-derived cells. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, *158*, 105681. <https://doi.org/10.1016/J.EJPS.2020.105681>
- Meredith, A. M., & Dass, C. R. (2016). Increasing role of the cancer chemotherapeutic doxorubicin in cellular metabolism. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, *68*(6), 729–741. <https://doi.org/10.1111/JPHP.12539>
- Min, Z., Jian, H., Xing, X., & Holman, C. D. A. J. (2009). Dietary intakes of mushrooms and green tea combine to reduce the risk of breast cancer in Chinese women. *International Journal of Cancer*, *124*(6), 1404–1408. <https://doi.org/10.1002/IJC.24047>
- MM, B. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*(1–2), 248–254. <https://doi.org/10.1006/ABIO.1976.9999>
- Mollaei, M., Hassan, Z. M., Khorshidi, F., & Langroudi, L. (2021). Chemotherapeutic drugs: Cell death- and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? *Translational Oncology*, *14*(5). <https://doi.org/10.1016/J.TRANON.2021.101056>

- Musa, M. A., Badisa, V. L. D., Latinwo, L. M., Waryoba, C., & Ugochukwu, N. (2010). In Vitro Cytotoxicity of Benzopyranone Derivatives with Basic Side Chain Against Human Lung Cell Lines. *Anticancer Research*, 30(11), 4613. /pmc/articles/PMC3766355/
- Newman, D. J., & Cragg, G. M. (2020). Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products*, 83(3), 770–803.  
[https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.9B01285/SUPPL\\_FILE/NP9B01285\\_SI\\_009.PDF](https://doi.org/10.1021/ACS.JNATPROD.9B01285/SUPPL_FILE/NP9B01285_SI_009.PDF)
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F., & Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 139(2), 271–279.  
[https://doi.org/10.1016/0022-1759\(91\)90198-O](https://doi.org/10.1016/0022-1759(91)90198-O)
- Niessen, W. M. A., Manini, P., & Andreoli, R. (2006). Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 25(6), 881–899. <https://doi.org/10.1002/MAS.20097>
- Onar, O., Telkoparan-Akillilar, P., & Yildirim, O. (2023). Clitocybe nebularis extract and 5-fluorouracil synergistically inhibit the growth of HT-29 colorectal cancer cells by inducing the S phase arrest. *3 Biotech*, 13(2), 1–11. <https://doi.org/10.1007/S13205-023-03471-9/FIGURES/5>
- Osuka, S., & Van Meir, E. G. (2017). Overcoming therapeutic resistance in glioblastoma: the way forward. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(2), 415–426.  
<https://doi.org/10.1172/JCI89587>
- Park, S. C., Yoo, H. S., Park, C., Cho, C. K., Kim, G. Y., Kim, W. J., Lee, Y. W., & Choi, Y. H. (2009). Induction of apoptosis in human lung carcinoma cells by the water extract of *Panax notoginseng* is associated with the activation of caspase-3 through downregulation of Akt. *International Journal of Oncology*, 35(1), 121–127.  
[https://doi.org/10.3892/ijo\\_00000320](https://doi.org/10.3892/ijo_00000320)
- (PDF) *Diversidade Taxonômica e Identificação de Trichoderma*. (n.d.). Retrieved November 18, 2023, from
- Pereira, I. J. Avaliação do efeito anticâncer do extrato etanólico do fungo *Trichoderma asperelloides* em modelo de câncer de mama. Dissertação de mestrado 2023.
- Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45. PMID: 11328886; PMCID: PMC55695.
- Pietenpol, J. A., & Stewart, Z. A. (2002). Cell cycle checkpoint signaling: Cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology*, 181–182, 475–481. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(02\)00460-2](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(02)00460-2)
- Pokrovsky, V. S., Treshalina, H. M., Lukasheva, E. V., Sedakova, L. A., Medentzev, A. G., Arinbasarova, A. Y., & Berezov, T. T. (2013). Enzymatic properties and anticancer activity of L-lysine  $\alpha$ -oxidase from *Trichoderma cf. aureoviride* Rifai BKMF-4268D. *Anti-Cancer Drugs*, 24(8), 846–851. <https://doi.org/10.1097/CAD.0B013E328362FBE2>

- Qian, S., Wei, Z., Yang, W., Huang, J., Yang, Y., & Wang, J. (2022). The role of BCL-2 family proteins in regulating apoptosis and cancer therapy. *Frontiers in Oncology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FONC.2022.985363>
- Qiu, Y., Li, C., Zhang, B., & Gu, Y. (2022). Bixin Prevents Colorectal Cancer Development through AMPK-Activated Endoplasmic Reticulum Stress. *BioMed Research International*, *2022*. <https://doi.org/10.1155/2022/9329151>
- Rivankar, S. (2014). An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, *10*(4), 853–858. <https://doi.org/10.4103/0973-1482.139267>
- Rocha, M. N., Nogueira, P. M., Demicheli, C., De Oliveira, L. G., Da Silva, M. M., Frézard, F., Melo, M. N., & Soares, R. P. (2013). Cytotoxicity and In Vitro Antileishmanial Activity of Antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) Complexes of Lapachol. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, *2013*. <https://doi.org/10.1155/2013/961783>
- Romero-Arguelles, R., Romo-Sáenz, C. I., Morán-Santibáñez, K., Tamez-Guerra, P., Quintanilla-Licea, R., Orozco-Flores, A. A., Ramírez-Villalobos, J. M., Tamez-Guerra, R., Rodríguez-Padilla, C., & Gomez-Flores, R. (2022). In Vitro Antitumor Activity of Endophytic and Rhizosphere Gram-Positive Bacteria from *Ibervillea sonorae* (S. Watson) Greene against L5178Y-R Lymphoma Cells. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *19*(2), 894. <https://doi.org/10.3390/IJERPH19020894>
- Salvador, D., Bastos, V., & Oliveira, H. (2021). Hyperthermia Enhances Doxorubicin Therapeutic Efficacy against A375 and MNT-1 Melanoma Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(1). <https://doi.org/10.3390/IJMS23010035>
- Samuels GJ, Ismaiel A, Bon MC, De Respinis S, Petrini O. *Trichoderma asperellum sensu lato consists of two cryptic species*. *Mycologia*. 2010 Jul-Aug;102(4):944-66. doi: 10.3852/09-243. PMID: 20648760.
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M. C., De Respinis, S., & Petrini, O. (2017). *Trichoderma asperellum sensu lato consists of two cryptic species*. [Http://Dx.Doi.Org/10.3852/09-243](http://Dx.Doi.Org/10.3852/09-243), *102*(4), 944–966. <https://doi.org/10.3852/09-243>
- Schmoll, M., & Schuster, A. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *87*(3), 787–799. <https://doi.org/10.1007/S00253-010-2632-1>
- Schwarz, S. B., Schaffer, P. M., Kulka, U., Ertl-Wagner, B., Hell, R., & Schaffer, M. (2008). The effect of radio-adaptive doses on HT29 and GM637 cells. *Radiation Oncology*, *3*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/1748-717X-3-12/TABLES/4>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *71*(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21654>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, *65*(1), 5–29. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21254>

- Sithranga Boopathy, N., & Kathiresan, K. (2010). Anticancer drugs from marine flora: an overview. *Journal of Oncology*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/214186>
- Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L., & Blázquez-Castro, A. (2018). Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochemica*, 120(3), 159–167. <https://doi.org/10.1016/J.ACTHIS.2018.02.005>
- Stratton, M. R., Campbell, P. J., & Futreal, P. A. (2009). The cancer genome. *Nature*, 458(7239), 719–724. <https://doi.org/10.1038/NATURE07943>
- Suffness, M. and Pezzuto, J.M. (1991) *Methods in Plant Biochemistry Assays for Bioactivity. Methods in Plant Biochemistry. In Hostettmann, 6th Edition, Academic Press, London, 71-33. - References - Scientific Research Publishing.* (n.d.). Retrieved November 20, 2023, from <https://www.scirp.org/%28S%28351jmbntvnsjt1aadkposzje%29%29/reference/referencepapers.aspx?referenceid=3005994>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/CAAC.21660>
- Thonemann, B., Schmalz, G., Hiller, K. A., & Schweikl, H. (2002). Responses of L929 mouse fibroblasts, primary and immortalized bovine dental papilla-derived cell lines to dental resin components. *Dental Materials*, 18(4), 318–323. [https://doi.org/10.1016/S0109-5641\(01\)00056-2](https://doi.org/10.1016/S0109-5641(01)00056-2)
- Tian, Z., Yang, Y., Yang, Y., Zhang, F., Li, P., Wang, J., Yang, J., Zhang, P., Yao, W., & Wang, X. (2020). High cumulative doxorubicin dose for advanced soft tissue sarcoma. *BMC Cancer*, 20(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S12885-020-07663-X/FIGURES/3>
- Tritripmongkol, P., Plengsuriyakarn, T., Tarasuk, M., & Na-Bangchang, K. (2020). In vitro cytotoxic and toxicological activities of ethanolic extract of *Kaempferia galanga* Linn. and its active component, ethyl-p-methoxycinnamate, against cholangiocarcinoma. *Journal of Integrative Medicine*, 18(4), 326–333. <https://doi.org/10.1016/J.JOIM.2020.04.002>
- Urruticochea, A., Alemany, R., Balart, J., Villanueva, A., Vinals, F., & Capella, G. (2010). Recent advances in cancer therapy: an overview. *Current Pharmaceutical Design*, 16(1), 3–10. <https://doi.org/10.2174/138161210789941847>
- van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., & Cloos, J. (2011). Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 731, 237–245. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5\\_20](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_20)
- Vetvicka, V., & Vetvickova, J. (2018). Glucans and cancer: Comparison of commercially available  $\beta$ -glucans – part IV. *Anticancer Research*, 38(3), 1327–1333. <https://doi.org/10.21873/anticanres.12355>

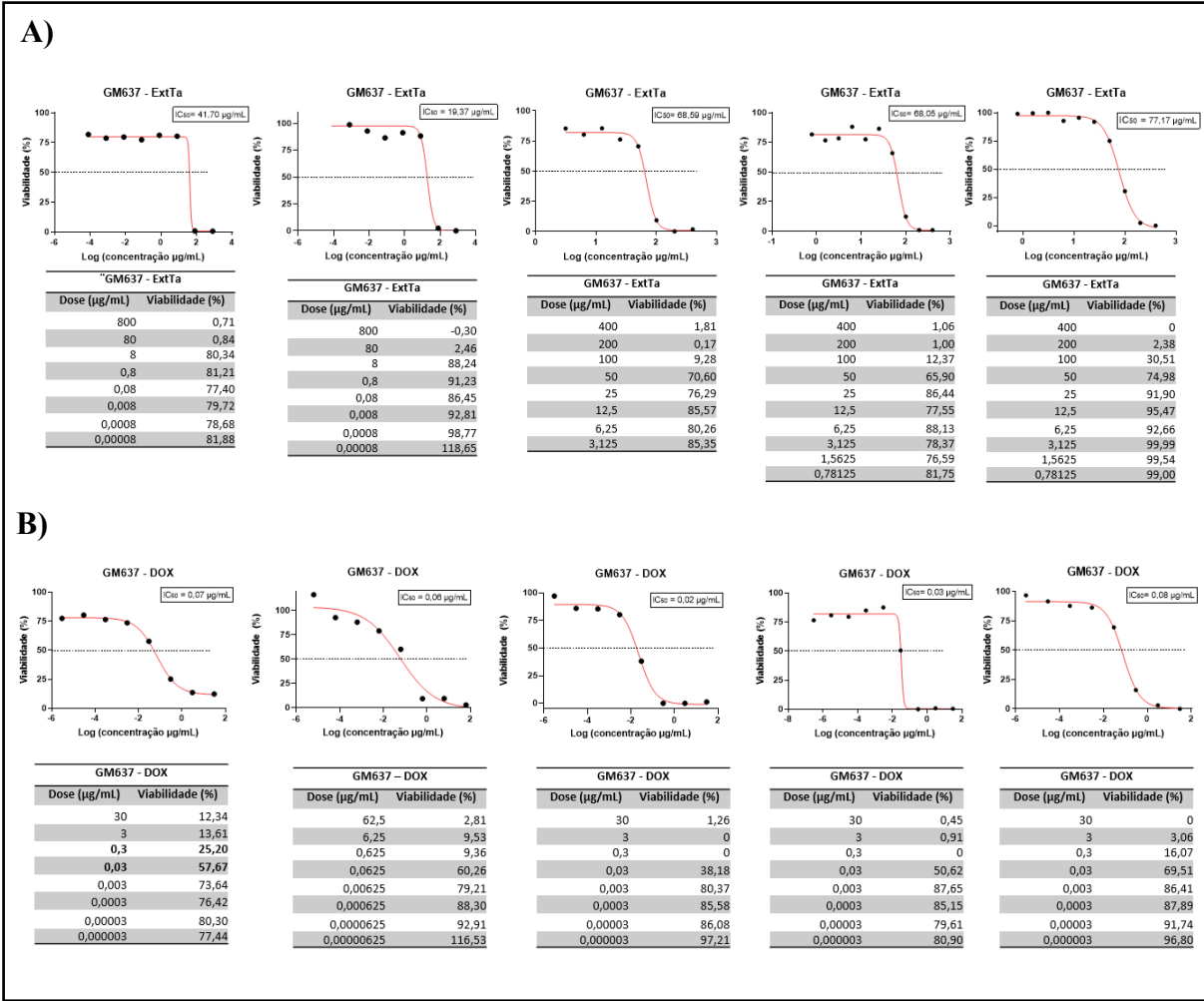
- Wasser, S. P. (2014). Medicinal mushroom science: Current perspectives, advances, evidences, and challenges. *Biomedical Journal*, *37*(6), 345–356. <https://doi.org/10.4103/2319-4170.138318>
- Watanabe, S., Kato, H., Kumakura, K., Ishibashi, E., & Nagayama, K. (2006). Properties and biological control activities of aerial and submerged spores in *Trichoderma asperellum* SKT-1. *Journal of Pesticide Science*, *31*(4), 375–379. <https://doi.org/10.1584/JPESTICS.G06-09>
- Woo, S. L., Ruocco, M., Vinale, F., Nigro, M., Marra, R., Lombardi, N., Pascale, A., Lanzuise, S., Manganiello, G., & Lorito, M. (2014). Trichoderma-based Products and their Widespread Use in Agriculture. *The Open Mycology Journal*, *8*(1), 71–126. <https://doi.org/10.2174/1874437001408010071>
- Wu, W. C., Hsiao, J. R., Lian, Y. Y., Lin, C. Y., & Huang, B. M. (2007). The apoptotic effect of cordycepin on human OEC-M1 oral cancer cell line. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *60*(1), 103–111. <https://doi.org/10.1007/S00280-006-0354-Y>
- Xia, H., Jin, X., Wu, P., & Zheng, Z. (2012). Porous ceramic/agarose composite adsorbents for fast protein liquid chromatography. *Journal of Chromatography. A*, *1223*, 126–130. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2011.12.050>
- Young, L., Sung, J., & Masters, J. R. (2010). Detection of Mycoplasma in cell cultures. *Nature Protocols*, *5*(5), 929–934. <https://doi.org/10.1038/NPROT.2010.43>
- Zagidullin, B., Aldahdooh, J., Zheng, S., Wang, W., Wang, Y., Saad, J., Malyutina, A., Jafari, M., Tanoli, Z., Pessia, A., & Tang, J. (2019). DrugComb: an integrative cancer drug combination data portal. *Nucleic Acids Research*, *47*(W1), W43–W51. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKZ337>
- Zeilinger, S., Gruber, S., Bansal, R., & Mukherjee, P. K. (2016). Secondary metabolism in Trichoderma – Chemistry meets genomics. *Fungal Biology Reviews*, *30*(2), 74–90. <https://doi.org/10.1016/J.FBR.2016.05.001>
- Zhang, J. L., Tang, W. L., Huang, Q. R., Li, Y. Z., Wei, M. L., Jiang, L. L., Liu, C., Yu, X., Zhu, H. W., Chen, G. Z., & Zhang, X. X. (2021a). Trichoderma: A Treasure House of Structurally Diverse Secondary Metabolites With Medicinal Importance. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.723828>
- Zhang, J. L., Tang, W. L., Huang, Q. R., Li, Y. Z., Wei, M. L., Jiang, L. L., Liu, C., Yu, X., Zhu, H. W., Chen, G. Z., & Zhang, X. X. (2021b). Trichoderma: A Treasure House of Structurally Diverse Secondary Metabolites With Medicinal Importance. *Frontiers in Microbiology*, *12*. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.723828>

## APÊNDICE

**Tabela S 1 - Valores da concentração inibitória (IC<sub>50</sub>) para as linhagens celulares tratadas com ExtTa e DOX**

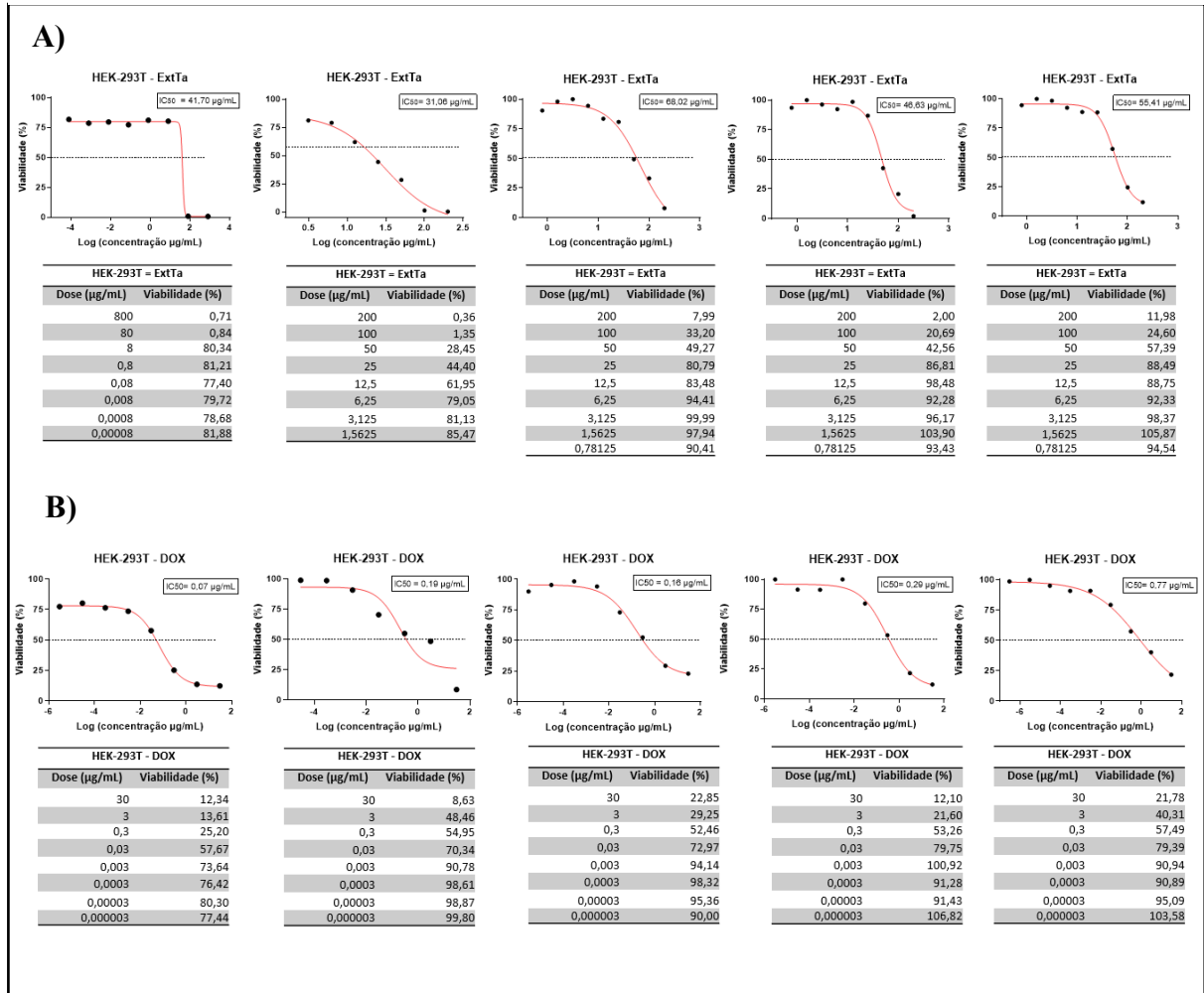
LINHAGEM CELULAR	RESULTADOS IC <sub>50</sub> (µg/mL)											
	1°		2°		3°		4°		5°		6°	
	ExtTa	DOX	ExtTa	DOX	ExtTa	DOX	ExtTa	DOX	ExtTa	DOX	ExtTa	DOX
Saos-2	73,48	0,54	19,23	0,01	19,34	0,07	24,07	0,19	63,88	0,17	na	na
T98G	14,80	4,75	55,62	11,74	15,43	12,82	20,17	17,19	na	na	na	na
WiDr	15,74	5,29	6,67	0,33	21,78	4,06	33,89	12,52	26,88	0,31	47,97	28,74
Sal/N	159,50	0,55	34,62	0,47	43,34	0,11	65,28	0,15	56,89	0,26	68,07	0,26
NIH/3T3	40,30	na	30,53	0,01	33,07	0,02	48,72	0,25	na	na	na	na
4T1	72,00	0,02	44,88	0,34	35,33	0,57	31,86	0,25	59,46	0,13	39,32	0,24
HCT116	11,01	0,54	3,84	0,97	1,31	0,35	25,72	0,12	19,24	0,25	17,49	0,28
L929	48,46	0,17	27,95	0,15	15,25	0,04	113,10	0,03	42,92	0,08	35,42	0,04
MDA-MD-293	18,46	0,59	29,11	0,54	44,98	0,21	47,22	0,47	64,54	0,77	na	na
HT-1080	12,79	0,08	30,17	0,05	20,94	0,03	27,57	0,04	na	na	na	na
LB373	17,03	0,07	40,09	0,16	35,67	2,61	73,18	1,64	37,07	6,04	36,19	6,15
A549	102,30	0,11	64,39	0,53	42,24	0,02	62,36	0,43	60,07	0,38	39,74	0,08
GM637	41,70	0,07	19,37	0,06	68,59	0,02	68,05	0,03	77,17	0,08	na	na
HEK-293T	41,70	0,07	31,06	0,19	68,02	0,16	46,49	0,29	55,41	0,77	na	na

**Figura S 1 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular GM637**



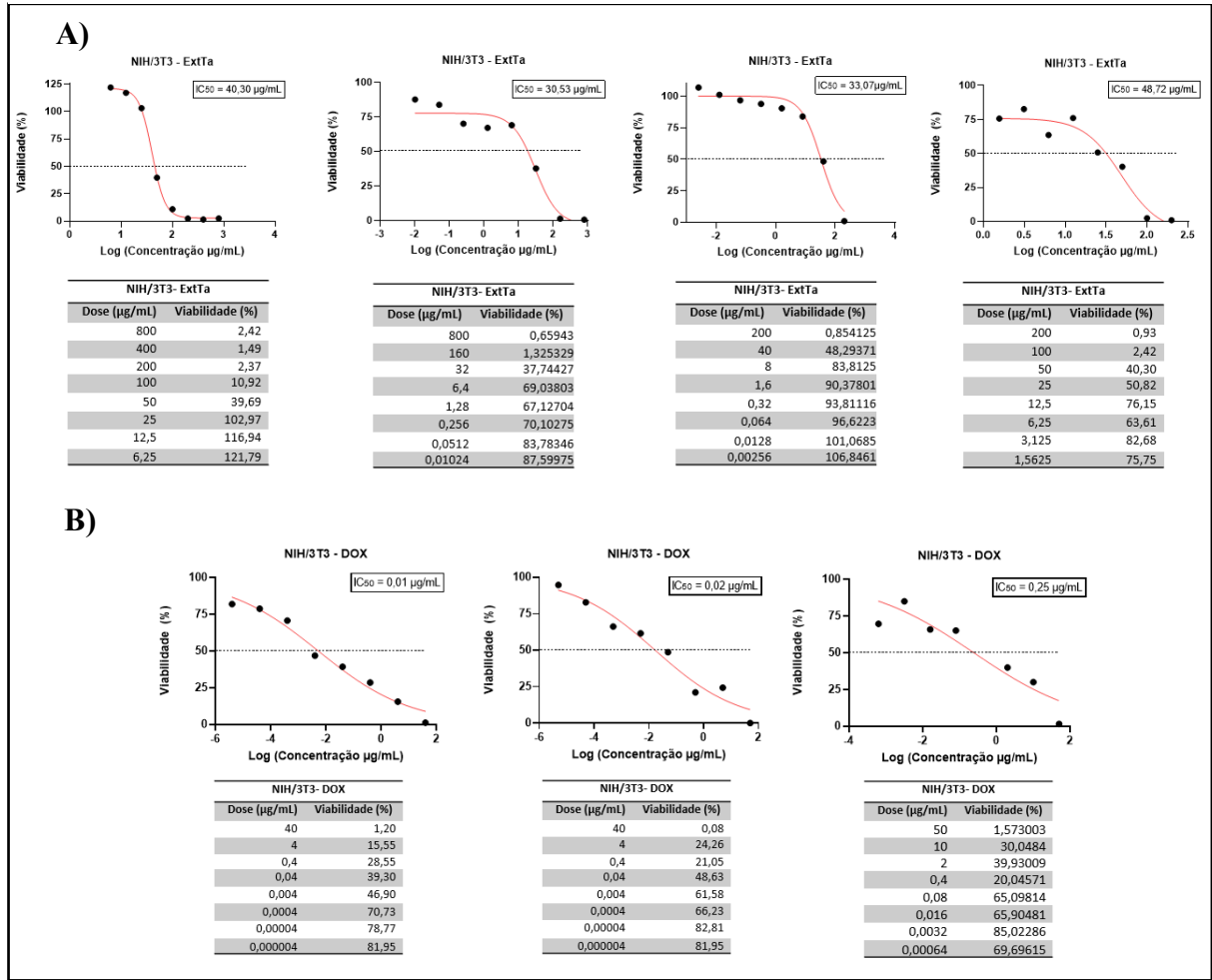
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura S 2 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular HEK-293T**



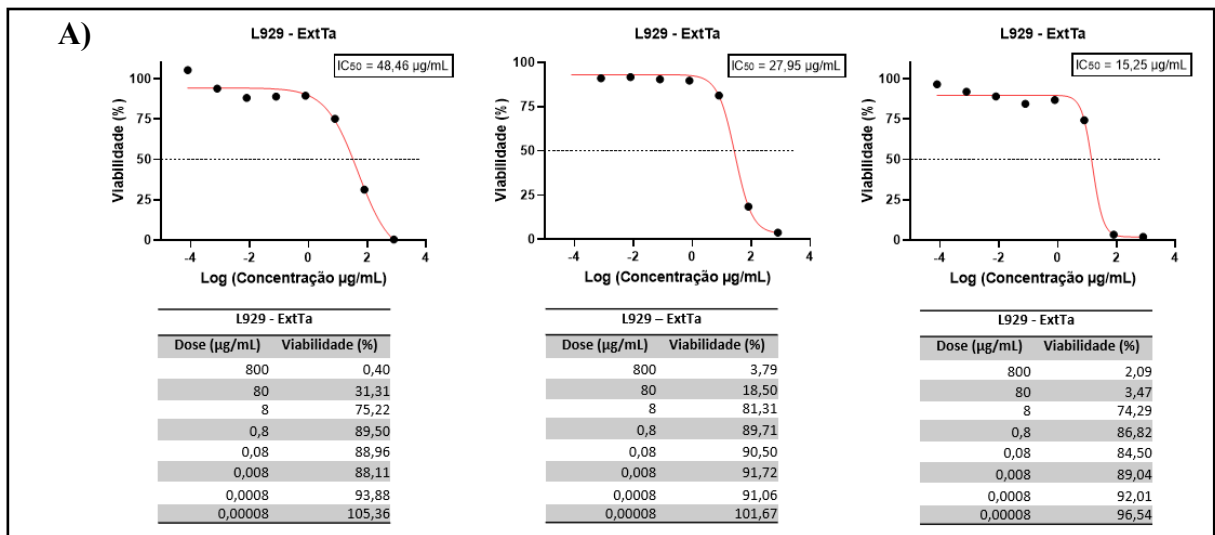
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

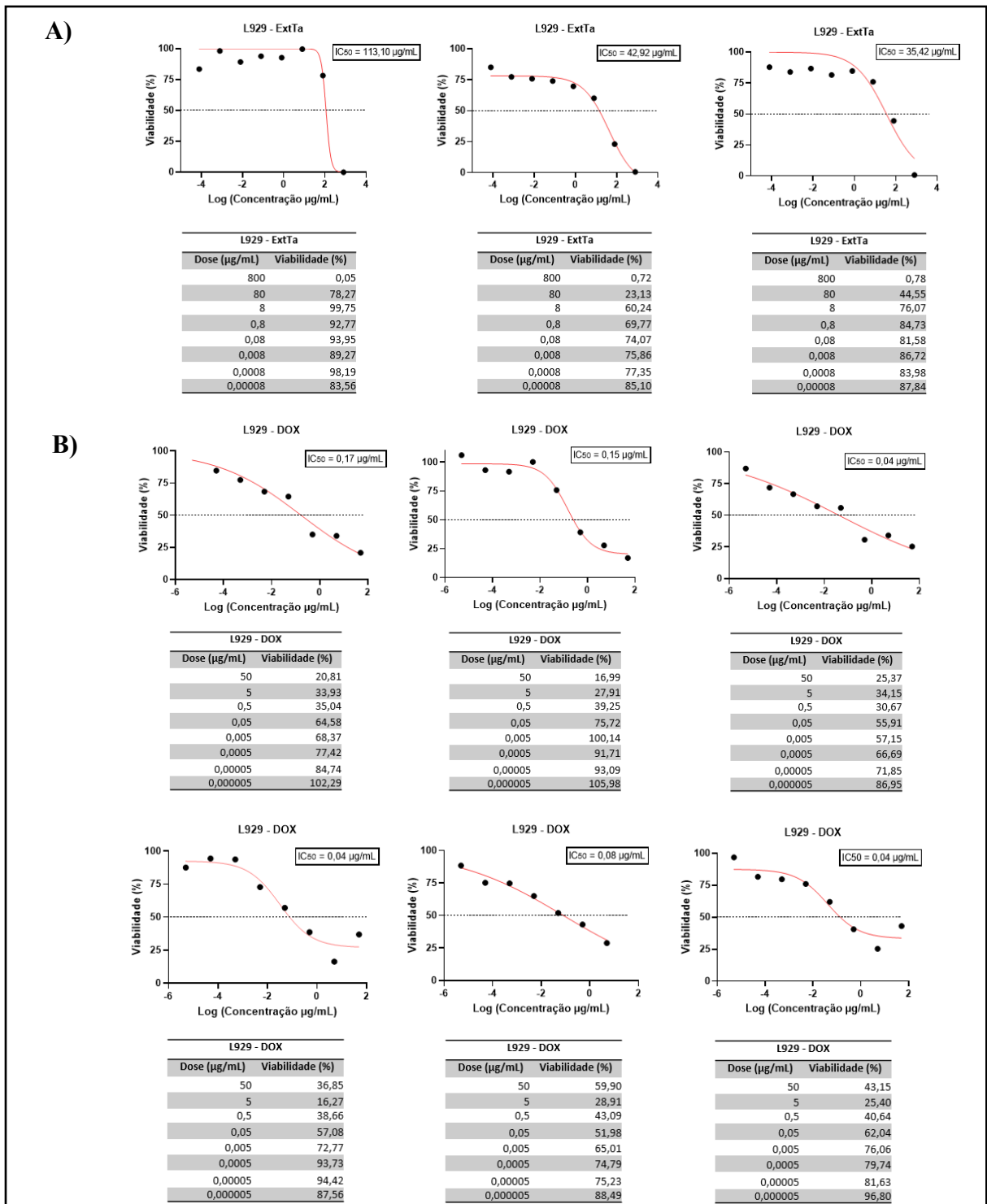
**Figura S 3 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular NIH/3T3**



Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

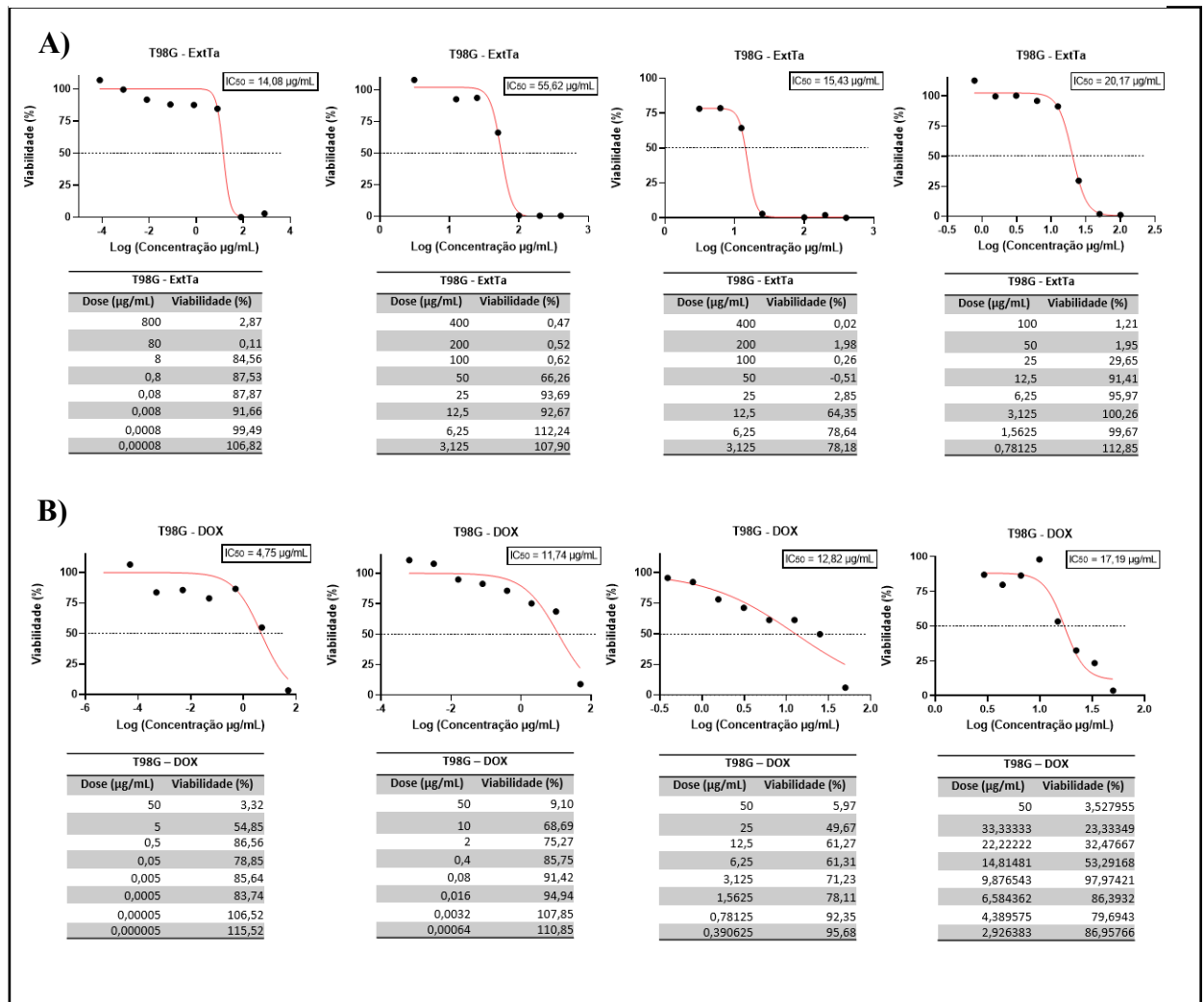
**Figura S 4- Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular L929**





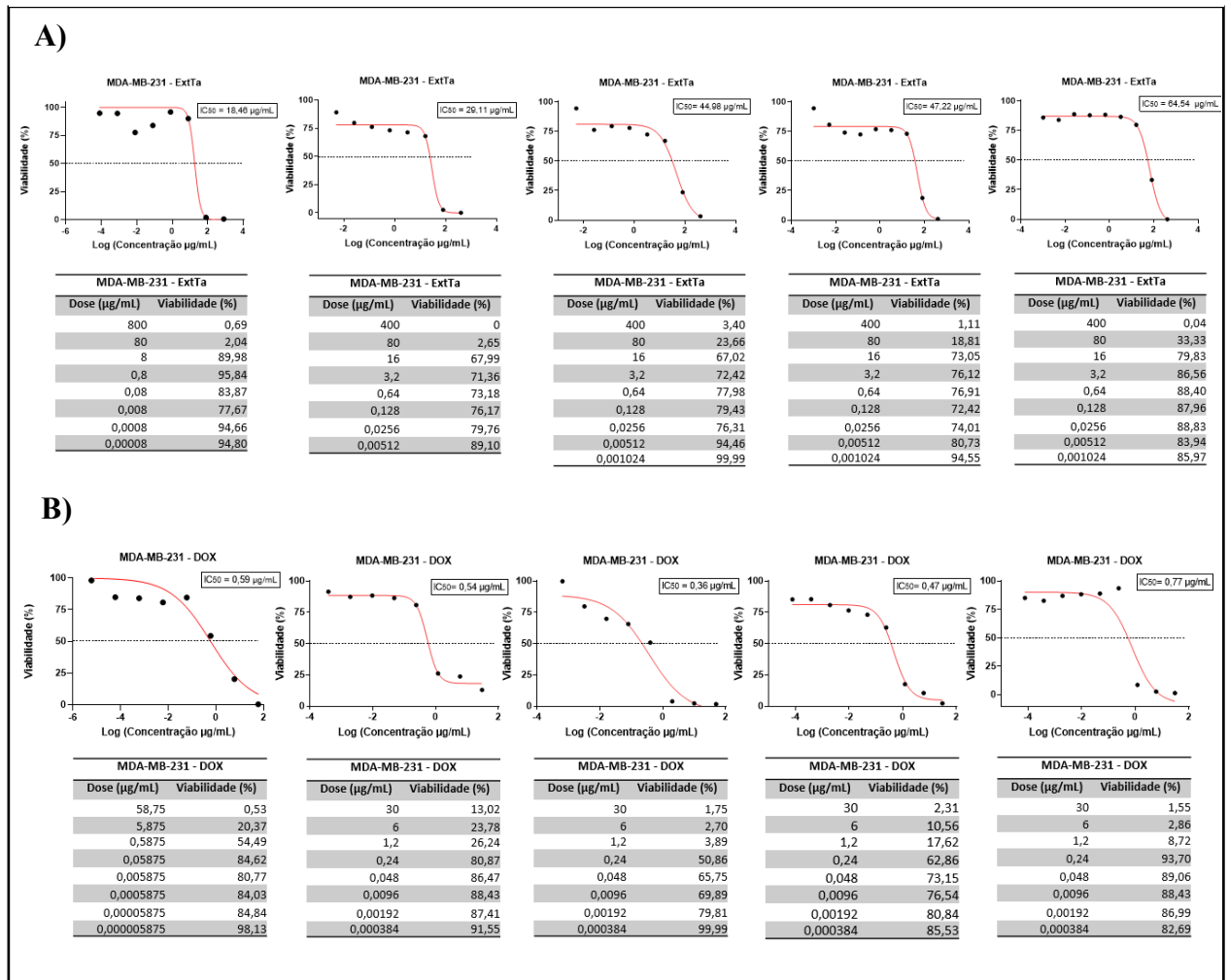
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura S 5 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular T98G**



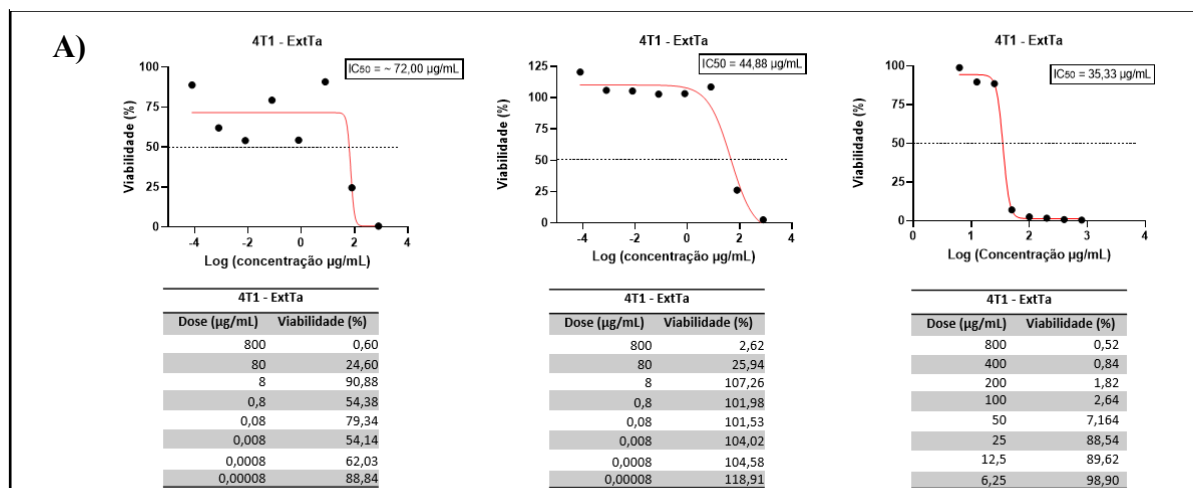
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

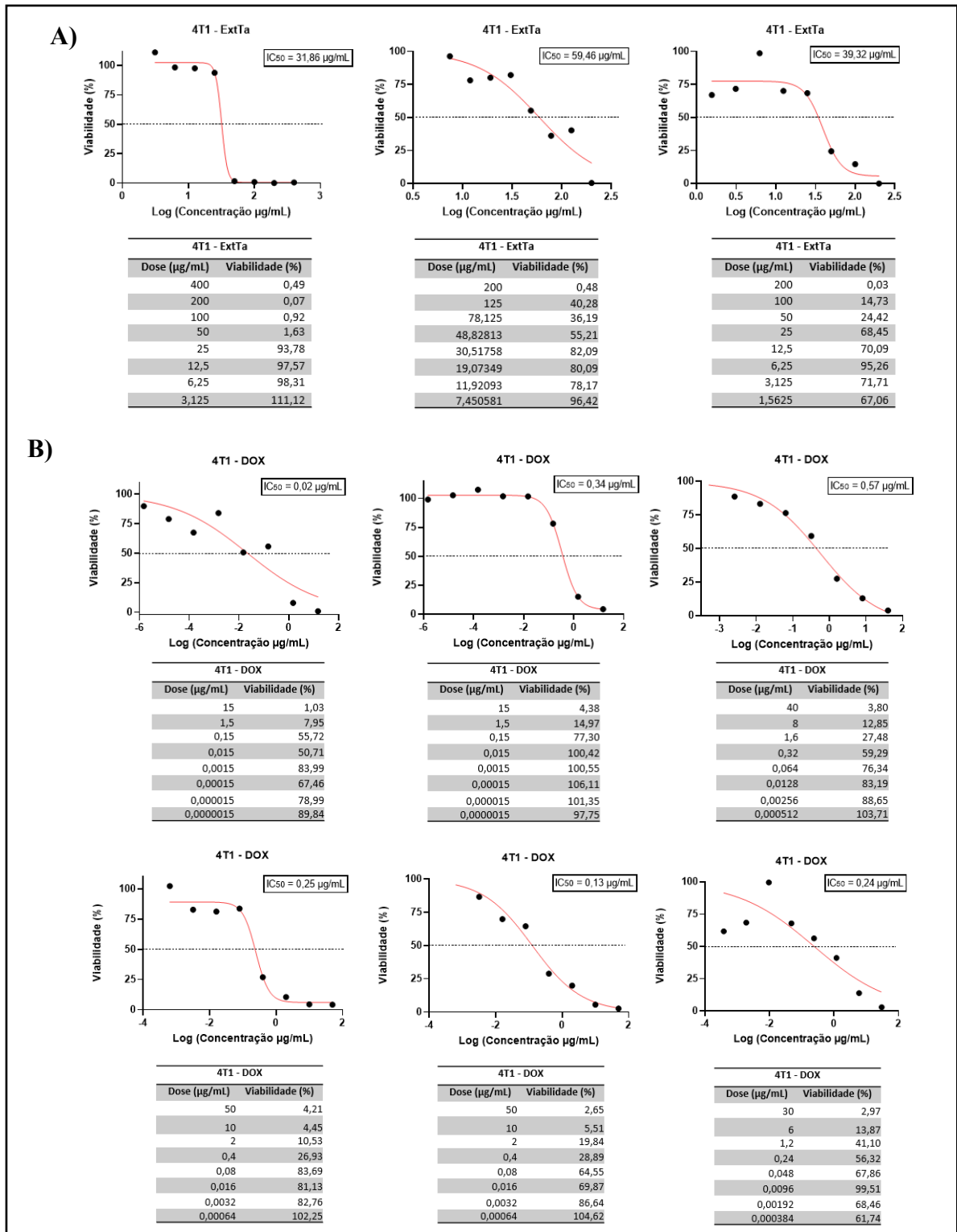
**Figura S 6 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular MDA-MB-231**



Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

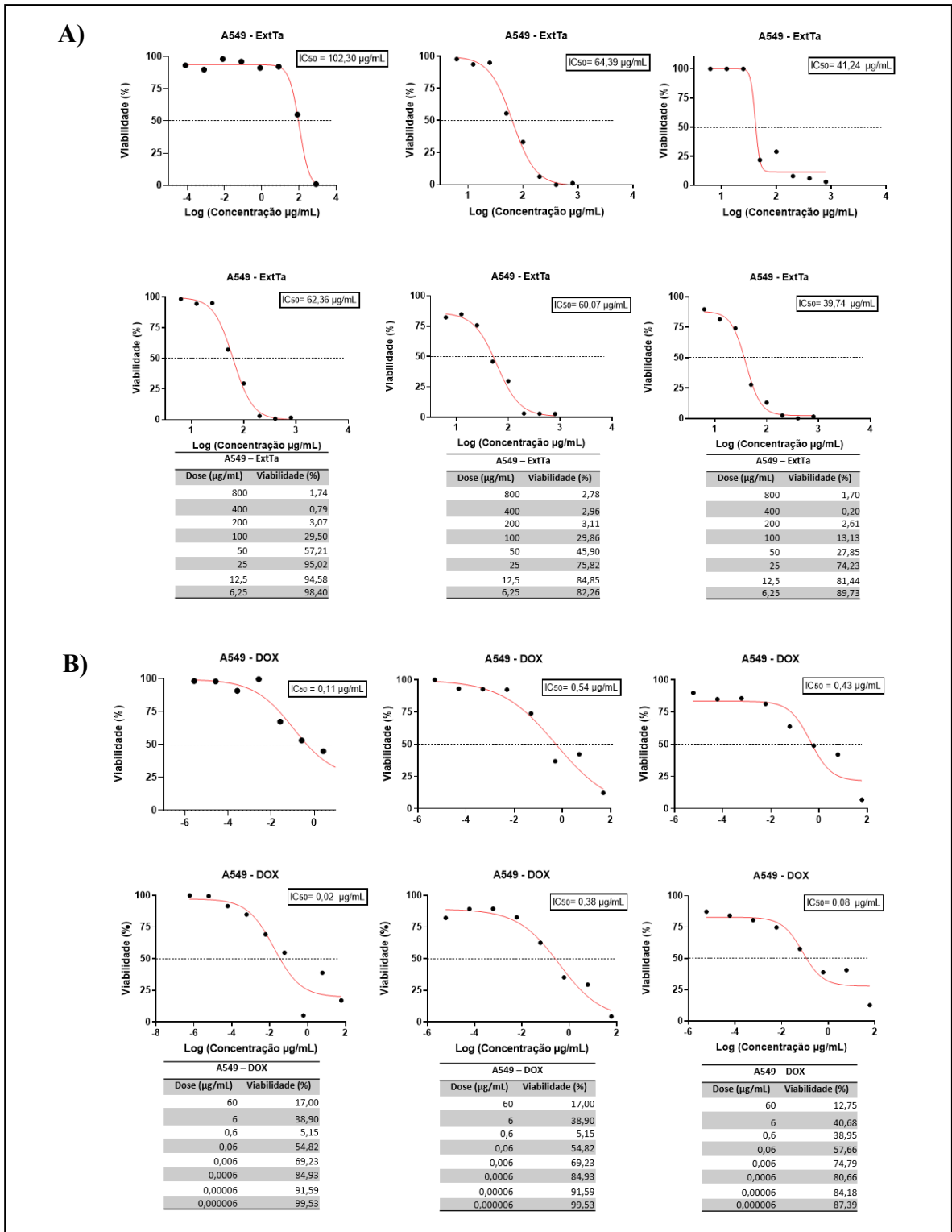
**Figura S 7 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular 4T1**





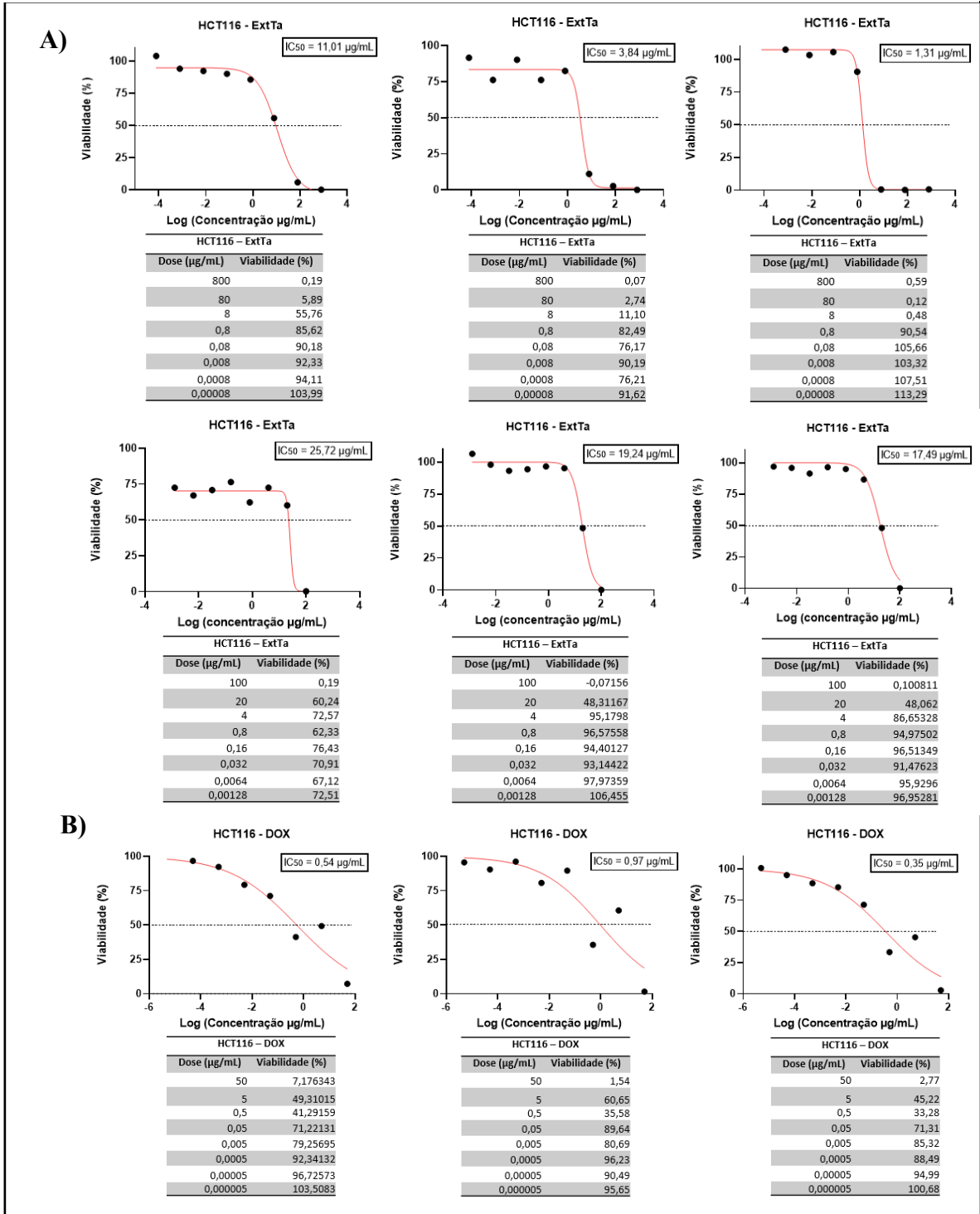
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

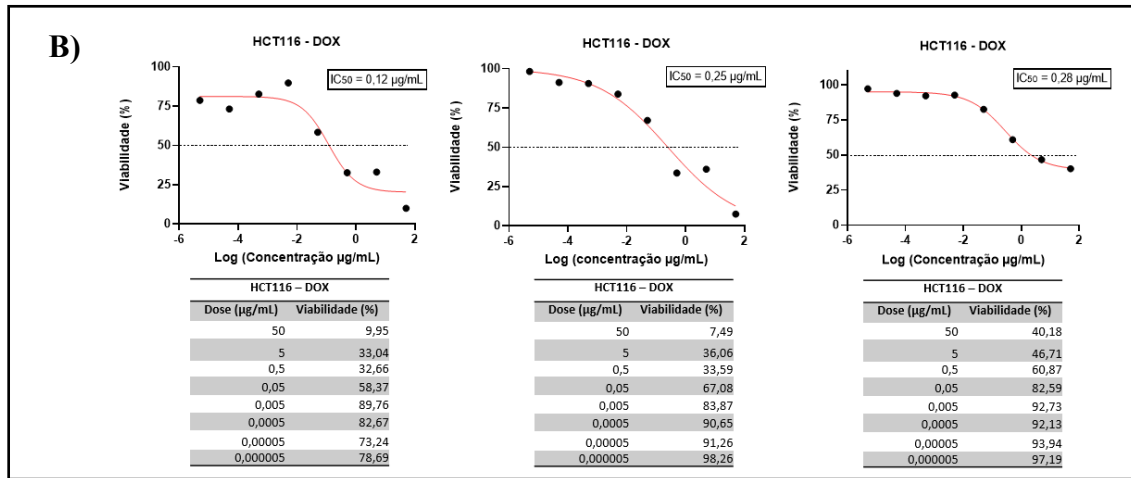
**Figura S 8 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular A549**



Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

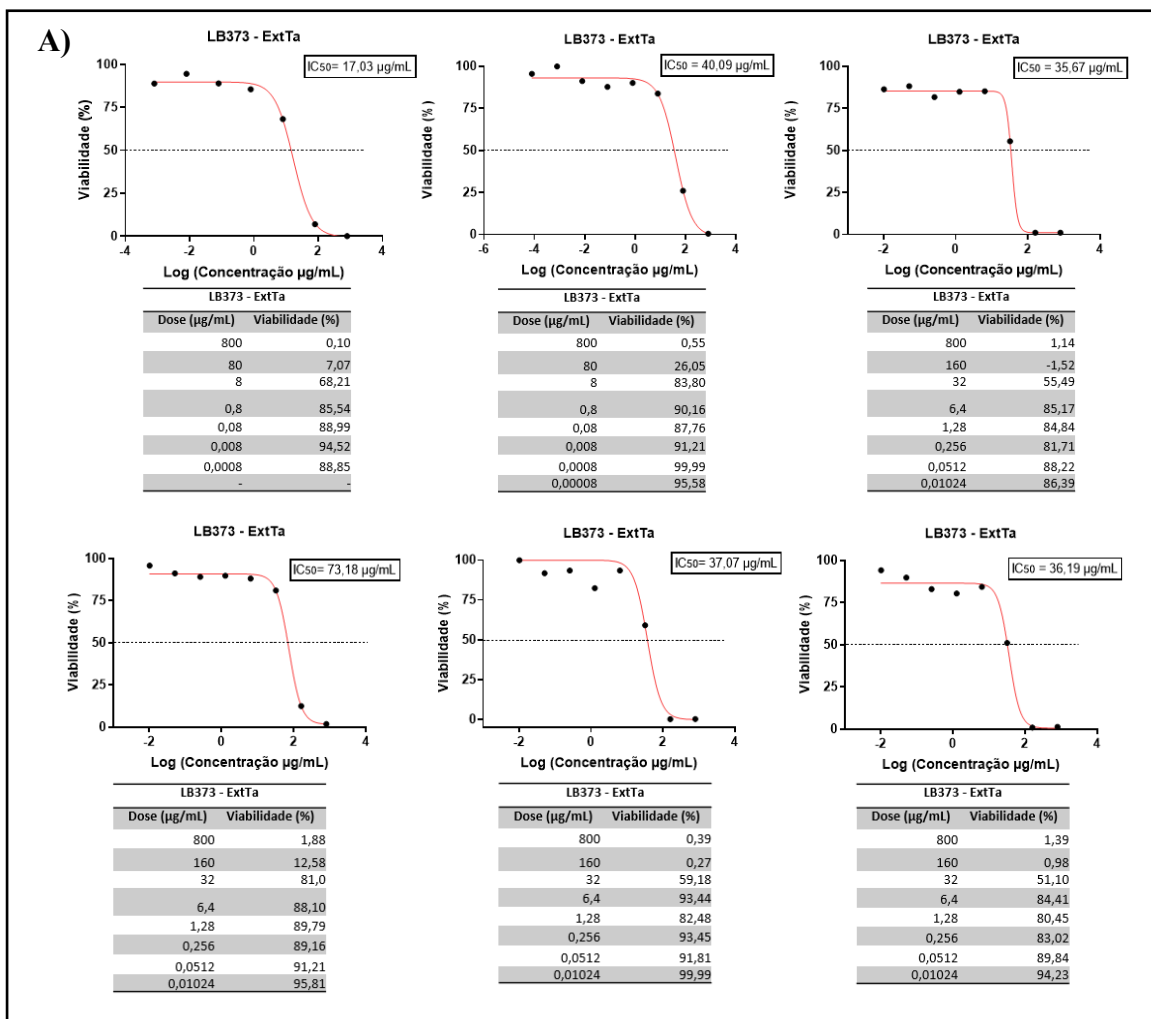
**Figura S 9 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular HCT116**

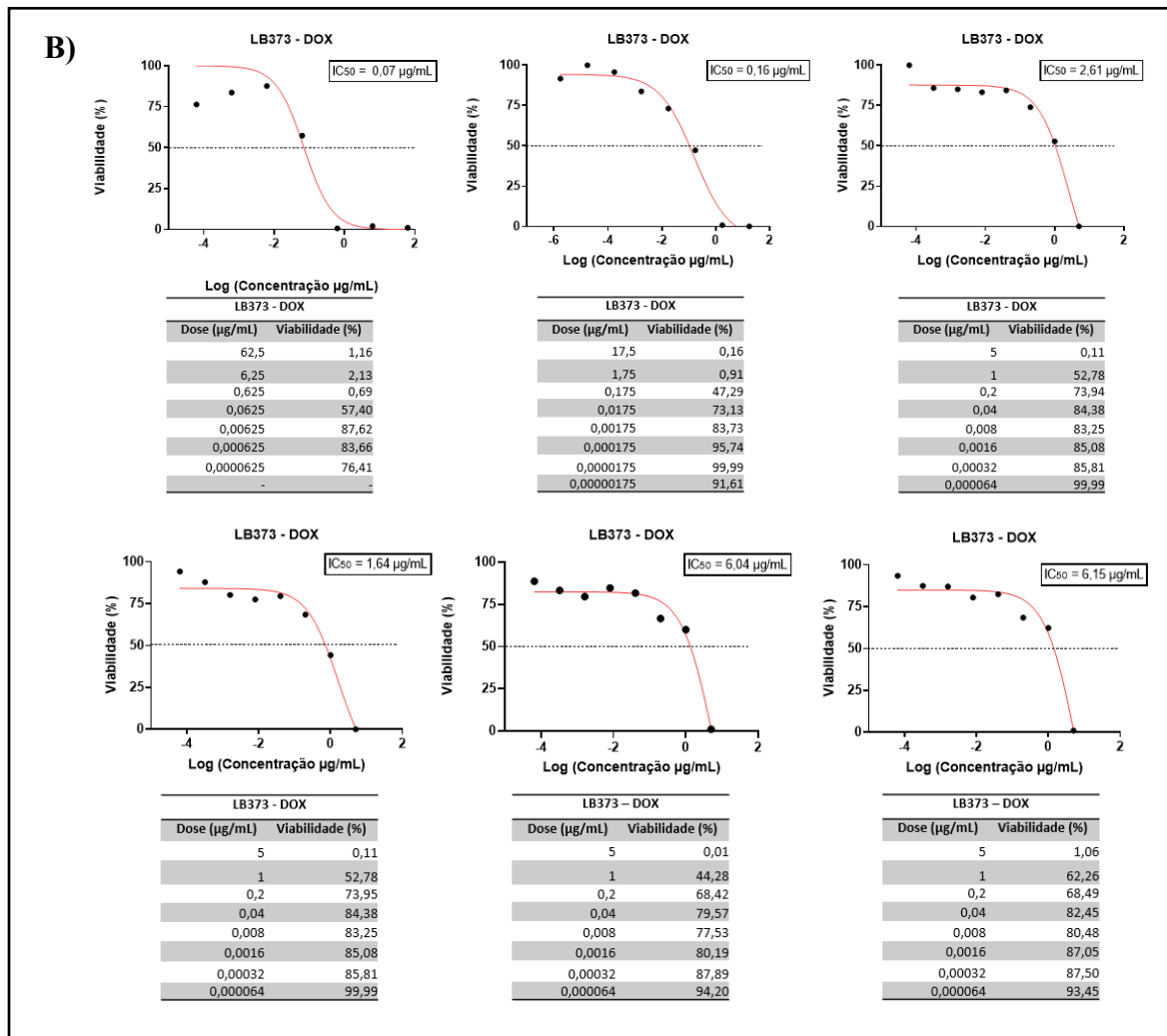




Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

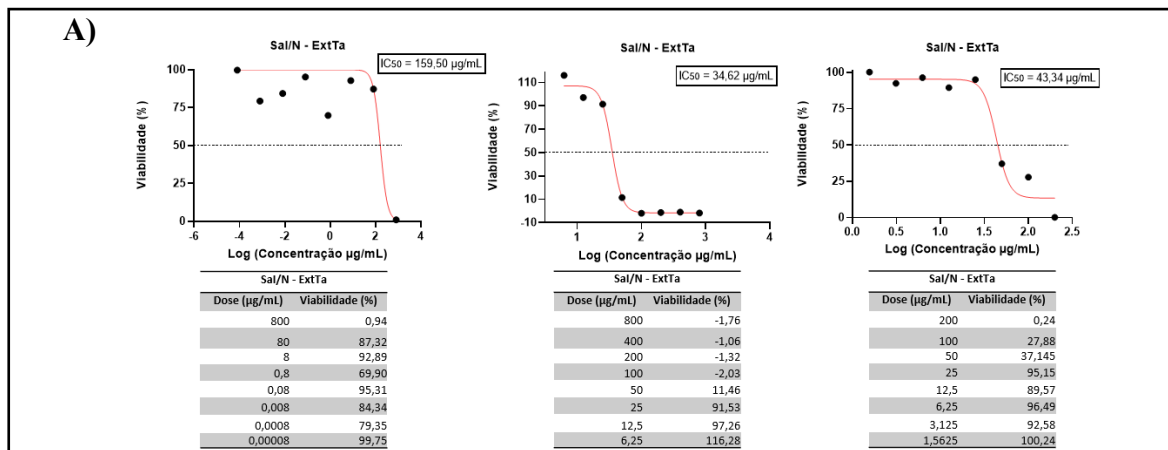
**Figura S 10 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular LB373**

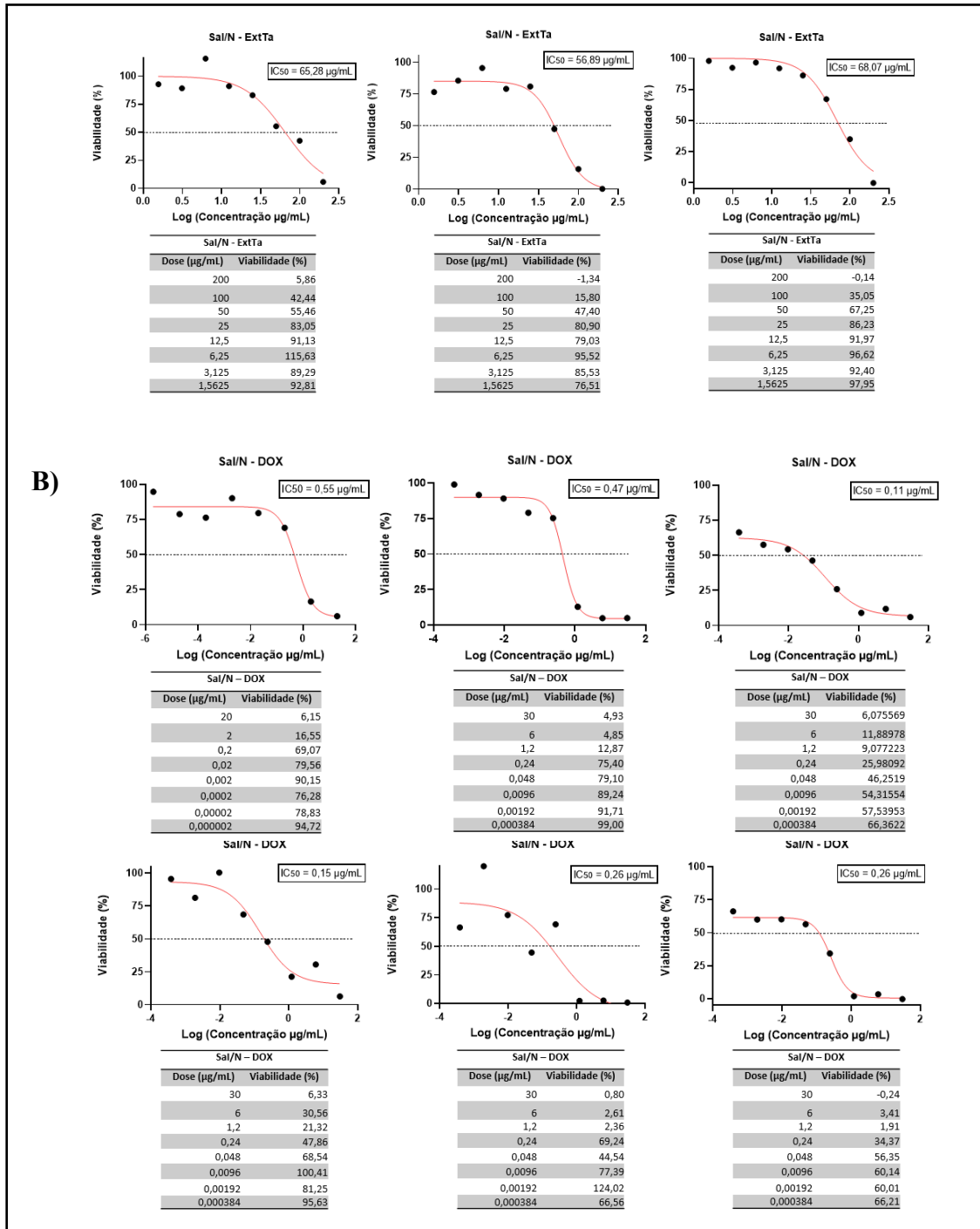




Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

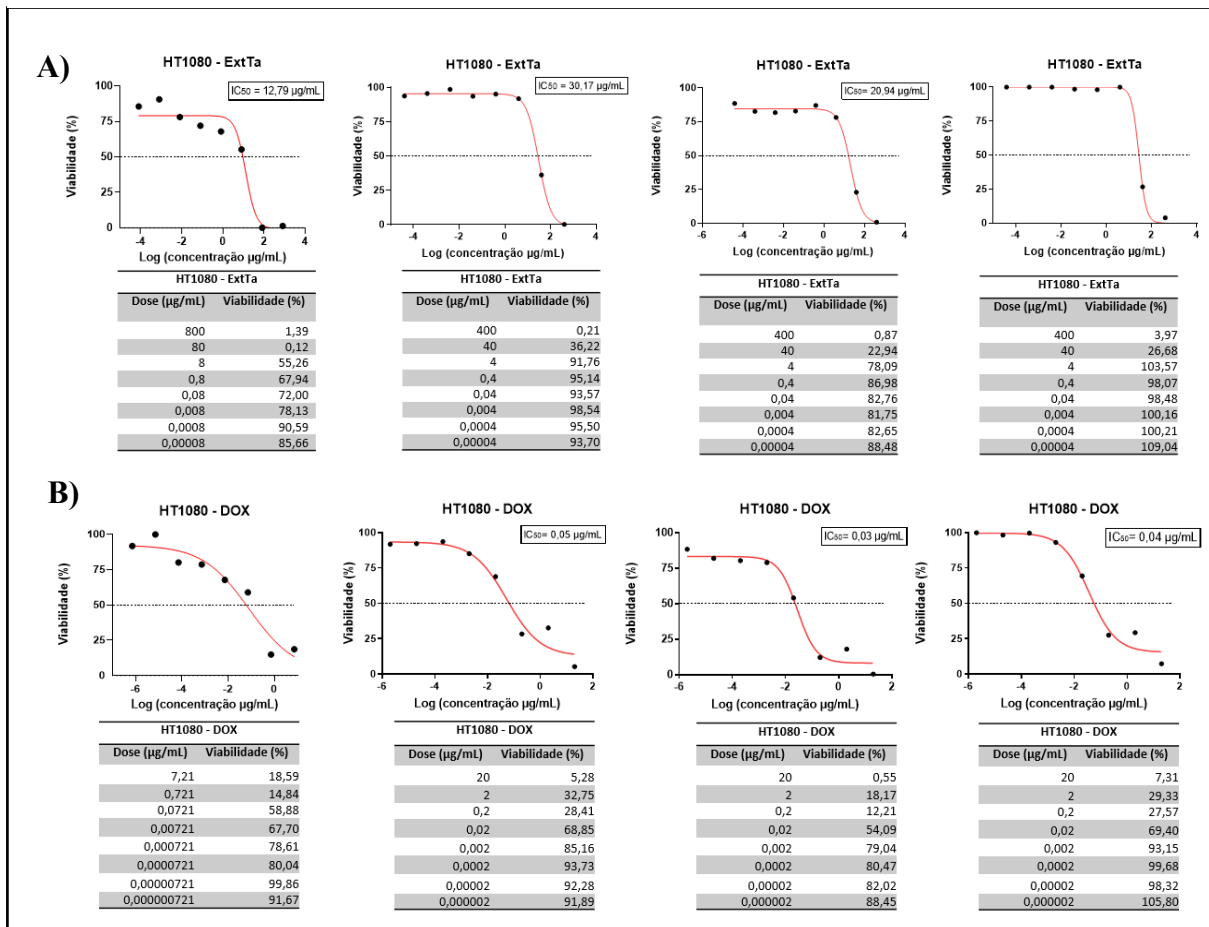
**Figura S 11 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular SaI/N**





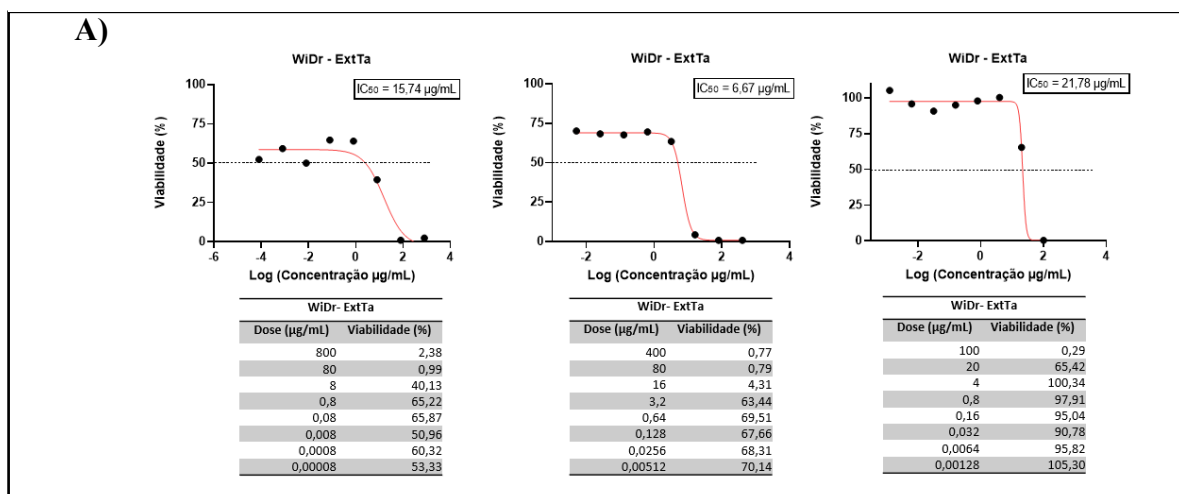
Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

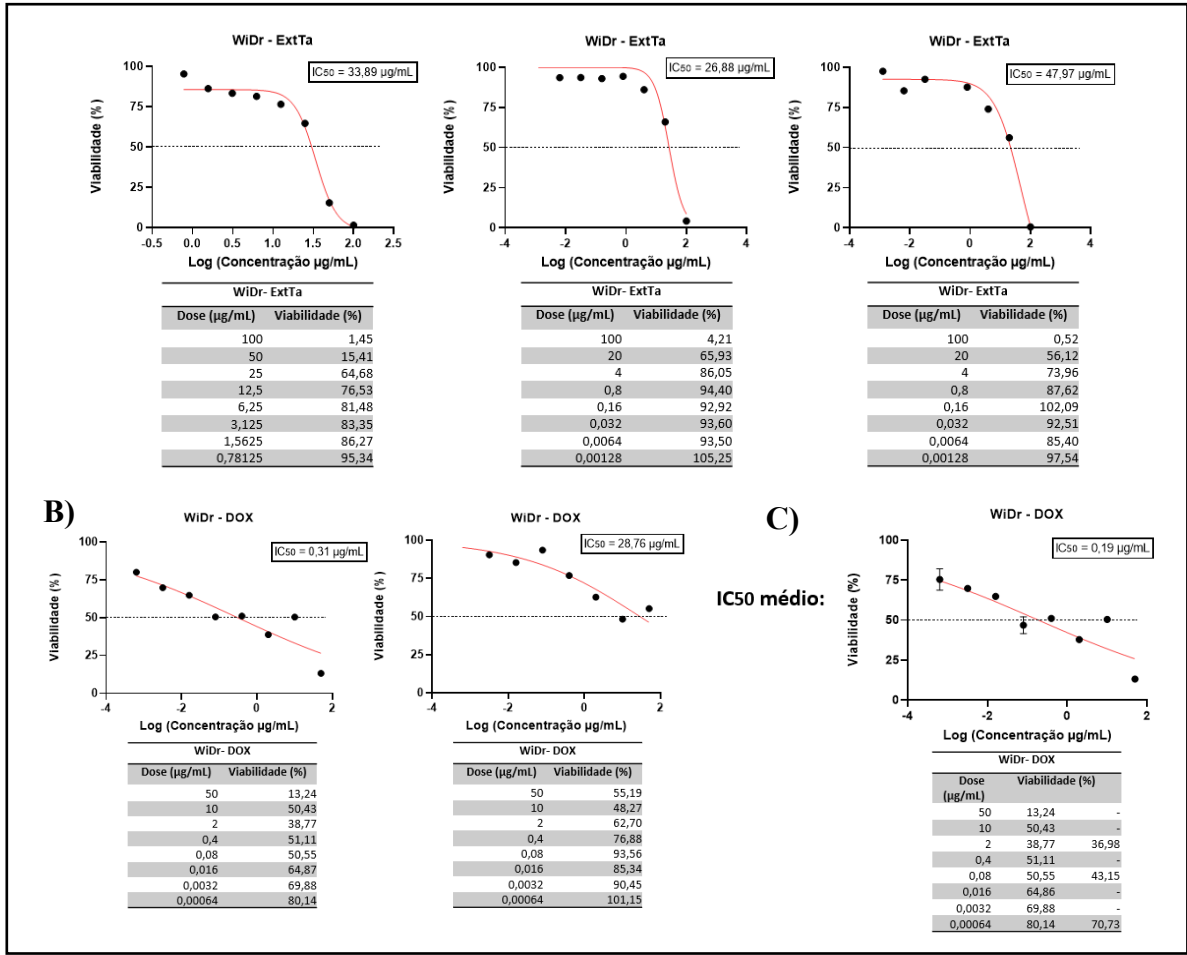
**Figura S 12 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular HT1080**



Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

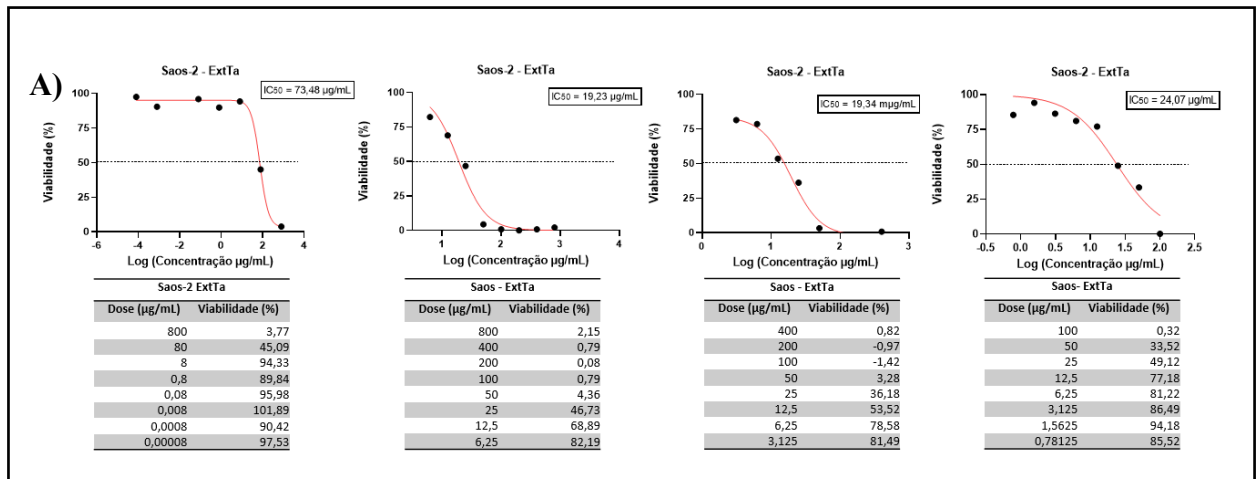
**Figura S 13 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular WiDr**

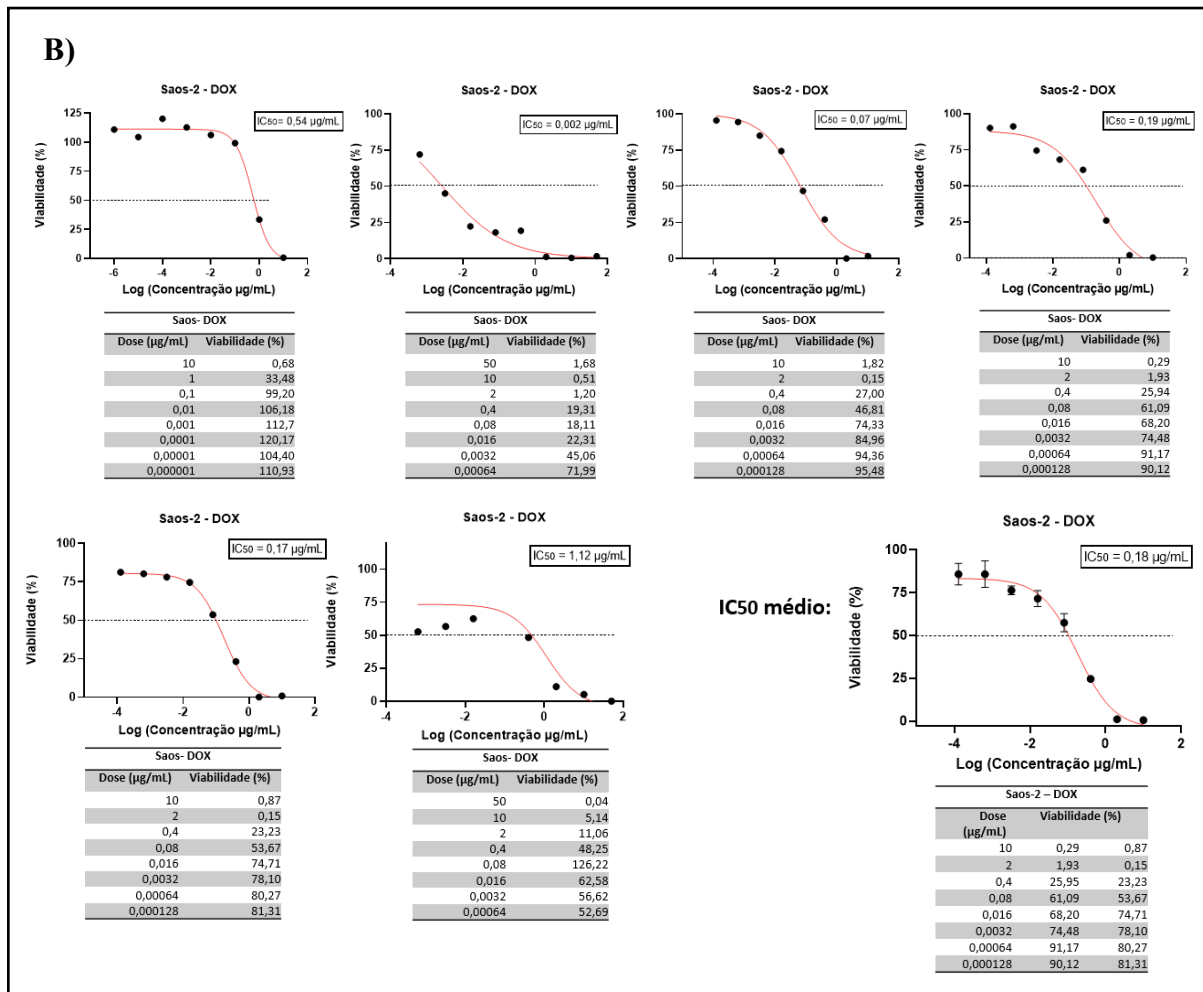




Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B). Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de IC<sub>50</sub> média dos ensaios (Painel C). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

**Figura S 14 - Replicatas dos ensaios de citotoxicidade do ExtTa e da DOX para a linhagem celular Saos-2**





Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  do ExtTa (Painel A) da DOX (Painel B) Curvas de dose-resposta de inibição obtidas pelo GraphPrism 8.0.1 para cálculo de  $IC_{50}$  média dos ensaios (Painel C). Barras de erro: desvio padrão. Dados brutos da viabilidade encontrada nos ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular. Avaliação de citotoxicidade em triplicata biológica pelo método de MTT por 48 h. Células sem tratamento (apenas com o meio de cultura) foram utilizadas como controle de sobrevivência.

## ANEXO 1



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Certidão**

**Cadastro nº A5AF99F**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A5AF99F**  
 Usuário: **Universidade Federal de Minas Gerais**  
 CPF/CNPJ: **17.217.985/0001-04**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie**

**Trichoderma asperelloides**

Título da Atividade: **Efeito Antitumoral do Extrato Etanólico do fungo Trichoderma asperelloides**

**Equipe**

<b>Adriana Abalen Martins Dias</b>	<b>Universidade Federal de Minas Gerais</b>
<b>Jane Lima dos Santos</b>	<b>Universidade Estadual de Santa Cruz</b>
<b>Tiago Antônio de Oliveira Mendes</b>	<b>Universidade Federal de Viçosa</b>

**Parceiras Nacionais**

**40.738.999/0001-95 / Universidade Estadual de Santa Cruz**  
**25.944.455/0001-96 / Universidade Federal de Viçosa**

**Resultados Obtidos**

**Outros resultados**

Data do Cadastro: **10/05/2021 12:03:10**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **20:21** de **14/02/2022**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**

## ANEXO 2



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021009949-6 A2



(22) Data do Depósito: 21/05/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 06/12/2022

---

(54) **Título:** USO DO EXTRATO BRUTO E DE PEPTÍDEOS DO FUNGO TRICHODERMA ASPERELLOIDES PARA MEDICAMENTOS ANTICÂNCER

(51) **Int. Cl.:** A61K 38/08; A61K 36/06; A61P 35/00.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS; UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV; UNIVERSIDADE ESTADUAL DE SANTA CRUZ - UESC.

(72) **Inventor(es):** ADRIANA ABALEN MARTINS DIAS; BÁRBARA GOMES KUNZMANN; FLÁVIA IVAIR SANTIAGO DE OLIVEIRA; ANA CAROLINA RODRIGUES DE OLIVEIRA; VALÉRIA NAYARA GOMES MENDES DE OLIVEIRA; ANA FLÁVIA BRÁZ; MARLIETE CARVALHO DA COSTA; JAMIL SILVANO DE OLIVEIRA; TIAGO ANTÔNIO DE OLIVEIRA MENDES; JANE LIMA DOS SANTOS; UENER RIBEIRO DOS SANTOS.

(57) **Resumo:** USO DO EXTRATO BRUTO E DE PEPTÍDEOS DO FUNGO TRICHODERMA ASPERELLOIDES PARA MEDICAMENTOS ANTICÂNCER. A presente tecnologia trata do uso do extrato bruto do fungo *Trichoderma asperelloides* e de quatro peptídeos isolados desse extrato para produção de medicamentos para tratamento contra o câncer de mama.