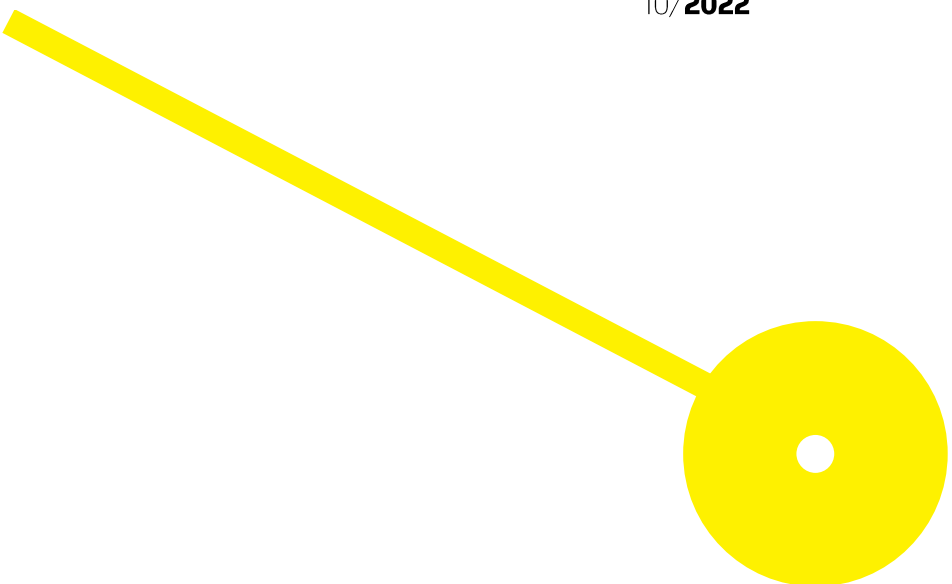




# Estudo do Efeito da Berberina em Cancro da Próstata: o Papel da SMYD3

Maria João Ribeiro Oliveira

10/2022





**Estudo do Efeito da Berberina em Cancro da Próstata: o Papel da SMYD3**

**Autor**

Maria João Ribeiro Oliveira

**Orientador(es)**

Prof. Doutora Regina Silva (Professora Coordenadora da Escola Superior de Saúde do

Instituto Politécnico do Porto (ESS|P.PORTO)

Prof. Doutora Filipa Vieira (Professora Coordenadora da ESS|P.PORTO)

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de **Mestre em Bioquímica em Saúde – Ramo/Área de Especialização em Bioquímica Clínica e Metabólica** pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.

## **Agradecimentos**

Esta dissertação permitiu-se concluir uma das etapas mais importantes da minha vida, o mestrado em Bioquímica em Saúde. Durante estes dois anos tive a oportunidade de mudar de cidade, conhecer novas pessoas e crescer pessoal e profissionalmente.

Às minhas orientadoras, Prof. Dra Regina Silva e Prof. Dra Filipa Vieira, agradeço por toda a orientação e pelo apoio ao longo destes meses. Foram meses complicados, com muitos imprevistos, mas sempre compreensíveis para comigo e prestáveis. Agradeço toda a aprendizagem que me transmitiram.

À Prof. Dra Mónica Vieira, pelo apoio, compreensão e disponibilidade durante este período.

À Prof. Cláudia Pinto, Prof. Joana Almeida e Prof. Sara Granja, pela disponibilidade, simpatia e ajuda de uma maneira ou outra.

À Dona Elizabete por toda a sua amabilidade e simpatia, por se disponibilizar sempre que era preciso. Aos restantes funcionários e seguranças por toda a simpatia e amabilidade, pela paciência durante os feriados e fins-de-semana.

Às minhas colegas de casa, Daniela e Marta, por todo o carinho, amabilidade, apoio e paciência durante os bons e maus momentos.

Ao meu grande amigo João Marques por estar sempre presente em todas as etapas importantes, fazer-me acreditar que tudo é possível e me apoiar sempre. Às minhas grandes amigas de longa data, Beatriz e Ângela, por estarem sempre presentes ao longo de todo o meu percurso universitário e por fazerem parte da minha vida. À minha grande amiga e colega Sara por me ter acompanhado nestes dois anos tendo feito parte deste percurso.

Ao Mickael pelo extremo apoio, força e motivação nesta reta final. Foi fundamental.

Um agradecimento especial aos meus pais e avó por todo o carinho, apoio e preocupação durante estes dois anos, em especial no último ano. À minha querida tia pelo extremo apoio e cuidado. Um obrigado a toda a minha família por estarem sempre presentes. Foram e são fundamentais neste meu caminho de vida.

Foi um prazer enorme realizar a minha dissertação no CISA, observar e apreender com todos aqueles que estiveram presentes no meu percurso.

## Resumo

O cancro da próstata é uma das neoplasias mais frequentes no homem. A maioria dos tumores responde a terapias antiandrogénicas, apesar de uma percentagem adquirir resistência, surgindo a necessidade de identificar novos alvos terapêuticos. A berberina, um composto natural, apresenta propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, podendo ser uma alternativa para o tratamento do cancro da próstata, visto poder inibir a SMYD3, já descrita como oncogene no cancro da próstata.

O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito da berberina no cancro da próstata e avaliar se o seu efeito é dependente da SMYD3.

Foram utilizadas linhas celulares de cancro de próstata, com e sem expressão de SMYD3, tratadas com diferentes doses de berberina, de forma a calcular o  $IC_{50}$  e determinar o impacto em estudos funcionais. A berberina mostrou efeito na viabilidade celular, reduzindo o número de células viáveis; na proliferação celular, causando a sua diminuição; na apoptose, induzindo-a; e na migração celular, retardando este processo. Foi ainda demonstrado que o efeito da berberina não é via SMYD3.

Este estudo aponta a berberina como potencial agente terapêutico em cancro da próstata em estadios inicial ou mais agressivo, com uma atuação independente da SMYD3.

**Palavras-chave:** Berberina, Cancro da Próstata, SMYD3.

## **Abstract**

Prostate cancer is one of the most frequent neoplasms in men. Most tumors respond to antiandrogen therapies, although a percentage acquire resistance, creating the need to identify new therapeutic targets. Berberine, a natural compound, has anti-inflammatory and anticancer properties, and may be an alternative for the treatment of prostate cancer, as it can inhibit SMYD3, already described as an oncogene in prostate cancer.

The present work aims to study the effect of berberine on prostate cancer and to assess whether its effect is dependent on SMYD3.

Prostate cancer cell lines, with and without SMYD3 expression, treated with different doses of berberine, were used to calculate the IC<sub>50</sub> and determine the impact in functional studies.

Berberine showed an effect on cell viability, reducing the number of viable cells; in cell proliferation, causing its decrease; in apoptosis, inducing it; and cell migration, delaying this process. It was further demonstrated that the effect of berberine is not via SMYD3.

This study points to berberine as a potential therapeutic agent in early or more aggressive prostate cancer, acting independently of SMYD3.

**Keywords:** Berberine, Prostate Cancer, SMYD3.

## Índice

1.	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Cancro da Próstata .....	1
1.1.1	Epidemiologia.....	3
1.1.2	Genética e epigenética do CP .....	5
1.1.2.1.	SMYD3.....	7
1.1.3	Rastreio e Diagnóstico.....	8
1.1.4	Tratamento.....	11
1.2	Estratégias terapêuticas para o Cancro da Próstata .....	11
1.2.1	Berberina como ferramenta terapêutica .....	12
1.2.2	Berberina e a SMYD3 .....	13
2.	OBJETIVOS .....	15
3.	MATERIAS E MÉTODOS.....	16
3.1	Cultura e manutenção de linhas celulares.....	16
3.2	Tratamento com a Berberina.....	17
3.3	Avaliação do efeito da berberina na viabilidade celular .....	18
3.4	Avaliação do efeito da berberina na proliferação celular.....	19
3.5	Avaliação do efeito da berberina na resistência à apoptose .....	20
3.6	Avaliação do efeito da berberina na migração celular .....	21
3.7	Análise estatística.....	21
4.	RESULTADOS .....	23
4.1	Efeito da berberina em linhas celulares do Carcinoma da Próstata.....	23
4.1.1	Efeito da berberina na viabilidade celular.....	24
4.1.2	Efeito da berberina na proliferação celular.....	25
4.1.3	Efeito da berberina na apoptose celular.....	27
4.1.4	Efeito da berberina na migração celular.....	28
4.2	Efeito da berberina dependente / independente de SMYD3 .....	30
5.	DISCUSSÃO .....	37
6.	CONCLUSÕES .....	43
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	44

## **Índice de Abreviaturas**

BSA – Albumina Sérica Bovina (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*)

CP – Cancro da Próstata

CPRC – Cancro da Próstata Resistente à Castração

CPRCm – Cancro da Próstata Resistente à Castração Metastático

DHT – 5 $\alpha$ -diidrotestosterona

EMT – Transição epitelial-mesenquimal (EMT, do inglês *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*),

IC<sub>50</sub> – Valor da concentração para obtenção da metade do valor de inibição máxima

ISUP – Sociedade Internacional de Patologia Urológica (do inglês *International Society of Urological Pathology*)

MMP – Metaloproteinases (do inglês *Matriz Metalloproteinases*)

MTH – Metiltransferases de Histonas

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide

PBS – Tampão Fosfato Salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*)

PET – Tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*)

PSA – Antígeno Específico da Próstata (do inglês, *Prostate Specific Antigen*)

RA – Recetor de Androgénio

SMYD3 – Proteína 3 contendo o domínio SET e MYND (do inglês *SET and Mynd domain-containing protein 3*)

TPA – Terapia de Privação de Androgénio

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema representativo da anatomia e histologia da próstata humana. Adaptado de (2).....	1
<b>Figura 2.</b> Incidência e mortalidade por cancro em Portugal. Dados de 2020 para o género masculino. Adaptado de (14).....	3
<b>Figura 3.</b> Mecanismos de regulação epigenética: metilação de DNA, microRNAs não codificantes e modificações de histonas. Adaptado de (1).....	6
<b>Figura 4.</b> Classificação de Gleason. A- classificação mediante a morfologia celular e padrão histológico da neoplasia malignas (grau 1 a 5). B - classificação de Gleason: somatório do grau dos dois padrões histológicos prevalentes na neoplasia maligna.....	9
<b>Figura 5.</b> Avaliação do efeito da dose de berberina na viabilidade das linhas celulares de cancro da próstata LNCaP e PC-3. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT às 72 horas após o tratamento com a berberina. O valor de IC <sub>50</sub> foi calculado a partir de cada curva relativa a um dado ensaio como indicado pela seta laranja.....	23
<b>Figura 6.</b> Avaliação do efeito da berberina na viabilidade das linhas celulares LNCaP e PC-3 através do ensaio MTT. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em ambas as linhas celulares tratadas com berberina versus com as respetivas não tratadas (veículo). * p<0,05; **** p<0,0001; a: veículo vs 30µM b: veículo vs 60µM. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes ± desvio padrão.....	24
<b>Figura 7.</b> Avaliação do efeito da berberina na proliferação celular das linhas celulares LNCaP e PC-3 às 72 horas após exposição, através do ensaio EdU Green Fluorescence. As imagens foram obtidas através da captura de imagens com microscópio ótico invertido Zeiss Axio Imager Z1 com a objetiva 10x e posterior ajuste de brilho e contraste. Seta sólida- células com morfologia normal em proliferação nuclear visível; Seta ponteadada- células mais pequenas de conteúdo com intensidade fluorescente homogéneo.....	25
<b>Figura 8.</b> Avaliação do efeito da berberina na proliferação celular das linhas celulares LNCaP e PC-3 através do ensaio EdU Green Fluorescence. A: imagens obtidas através da captura de imagens com microscópio ótico invertido Zeiss Axio Imager Z1 com a objetiva 10x e posterior ajuste com o threshold. B: quantificação de fluorescência e fluorescência/nº de células para cada linha celular. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em ambas as linhas celulares tratadas com berberina versus com as respetivas não tratadas (veículo). * p<0,05; **p<0,01; ****p<0,001; Dados apresentados com média de 2 ensaios independentes ± desvio padrão.....	26
<b>Figura 9.</b> Avaliação do efeito da berberina na apoptose celular das linhas celulares LNCaP e PC-3, 72 horas após exposição, através do ensaio APOPercentage. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na linha LNCaP tratada com berberina versus com a respetiva linha	

celular não tratada (veículo). **** $p < 0,0001$ . Dados apresentados com média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão. ....	28
<b>Figura 10.</b> Efeito da berberina na migração celular na LNCaP e PC-3. As imagens foram fotografadas com o microscópio ótico invertido utilizando o programa LAZ EZ. As linhas escuras são representação da área inicial do rasgo.....	29
<b>Figura 11.</b> Efeito da berberina na migração celular na LNCaP e PC-3. Foram observadas diferenças significativas na linha celular LNCaP, após 48 horas de exposição à berberina. **: $p < 0,01$ . Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão. ....	30
<b>Figura 12.</b> Avaliação do efeito da berberina na viabilidade das linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc através do ensaio MTT. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em ambas as linhas celulares tratadas com berberina versus com as respectivas não tratada (veículo). a: veículo PC-3 vs veículo PC-3 sh-sc; b: 30 $\mu$ M PC-3 vs 30 $\mu$ M PC-3 sh-sc; c: 60 $\mu$ M PC-3 vs 30 $\mu$ M PC-3 sh-sc. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão. ....	30
<b>Figura 13.</b> Avaliação do efeito da berberina na proliferação celular das linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc através do ensaio EdU Green Fluorescence. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em ambas as linhas celulares tratadas com berberina versus com as respectivas não tratada (veículo). a: veículo PC-3 vs veículo PC-3 sh-sc; b: 30 $\mu$ M PC-3 vs 30 $\mu$ M PC-3 sh-sc; c: 60 $\mu$ M PC-3 vs 30 $\mu$ M PC-3 sh-sc. Dados apresentados com média de 2 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão.....	31
<b>Figura 14.</b> Avaliação do efeito da berberina na apoptose celular das linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc através do ensaio APOPercentage. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão. ....	32
<b>Figura 15.</b> Avaliação do efeito da berberina na migração celular das linhas celulares PC3- e PC-3 sh-sc através do ensaio de migração celular. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão.....	33
<b>Figura 16.</b> Avaliação do efeito da berberina na viabilidade das linhas celulares PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3 através do ensaio MTT. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em ambas as linhas celulares tratadas com berberina versus as respectivas linhas celulares não tratadas (veículo). b 24h: $p < 0,05$ 30 $\mu$ M PC-3 sh-sc vs 30 $\mu$ M PC-3; b 48: $p < 0,0001$ 30 $\mu$ M PC-3 sh-sc vs 30 $\mu$ M PC-3; c: 48h: $p < 0,01$ 60 $\mu$ M PC-3 sh-sc vs 60 $\mu$ M PC-3 sh-smyd3.....	34
<b>Figura 17.</b> Avaliação do efeito da berberina na proliferação celular das linhas celulares PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3 através do ensaio EdU Green Fluorescence. A: imagens obtidas através da captura de imagens com microscópio ótico invertido Zeiss Axio Imager Z1 com a objetiva 10x e posterior ajuste com o threshold. B: quantificação de fluorescência e fluorescência/nº de células para cada linha celular. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão.....	34

<b>Figura 18.</b> Avaliação do efeito da berberina na apoptose celular das linhas celulares PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3 através do ensaio APOPercentage. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão. ....	35
<b>Figura 19.</b> Efeito da berberina na migração celular na PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes $\pm$ desvio padrão. ....	36

## **Índice de Tabelas**

<i>Tabela 1. Subtipos de cancros da próstata e a sua origem celular. Adaptado de (2, 5, 9, 10). .....</i>	<i>2</i>
<i>Tabela 2. Registo das condições em que foram realizados os ensaios funcionais: concentração de células por poço de cada linha celular para um dado ensaio; e altura a que foi realizado o ensaio após adição de berberina. ....</i>	<i>18</i>
<i>Tabela 3. Valores da concentração para obtenção da metade do valor de inibição máxima (<math>IC_{50}</math>) relativos às linhas celulares de cancro da próstata em estudo. Os valores <math>IC_{50}</math> correspondem à média dos valores de <math>IC_{50}</math> obtidos em 3 ensaios independentes realizados para cada linha celular. ....</i>	<i>24</i>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Cancro da Próstata

A próstata é uma glândula do aparelho reprodutor masculino localizada entre a bexiga e a pélvis do homem e tem como função a produção de sémen regulada por hormonas esteroides, como os androgénios (1-4). Os androgénios têm uma relação direta com o desenvolvimento da próstata e com a sua homeostasia. A próstata sintetiza e secreta várias moléculas não peptídicas, como o colesterol e lipídios, e moléculas proteicas. Uma das principais proteínas secretada é o antígeno específico da próstata (PSA, do inglês *Prostate Specific Antigen*), sendo a proteína mais importante do líquido do sémen (3).

A próstata é uma glândula do aparelho reprodutor masculino localizada entre a bexiga e a pélvis do homem e tem como função a produção de sémen regulada por hormonas esteroides, como os androgénios (Figura 1)(1, 4).

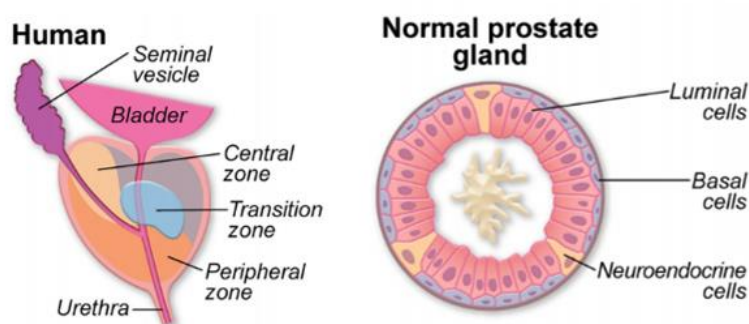


Figura 1. Esquema representativo da anatomia e histologia da próstata humana. Adaptado de (2).

As células luminiais expressam o recetor de androgénio (RA), sendo estimuladas a produzir e secretar proteínas, como o PSA. As células basais encontram-se entre a lâmina basal e as células luminiais e expressam níveis baixos de RA, enquanto as células neuroendócrinas, que se encontram localizadas na camada de células basais, não expressam RA, mas expressam marcadores neuroendócrinos, como a cromogranina (1). Além destes tipos celulares presentes no parênquima, estão presentes outros tipos de células no estroma como os fibroblastos, células endoteliais e células do sistema imunológico que influenciam o comportamento da próstata (1).

As patologias mais frequentes da próstata são a hiperplasia benigna da próstata, a prostatite e o cancro da próstata (CP) (1, 5-7). Mediante a histologia, o cancro da próstata pode ser classificado em diferentes subtipos, dependendo da origem celular (Tabela 1), sendo o adenocarcinoma da próstata o subtipo mais comum e frequente no homem (8).

**Tabela 1.** Subtipos de câncros da próstata e a sua origem celular. Adaptado de (1, 4, 8, 9).

Tipo de cancro	Adenocarcinoma da próstata	Carcinoma pavimentoso	Tumor neuroendócrino	Sarcoma da próstata
Origem celular	Células luminais da próstata	Células basais que revestem o parênquima da próstata	Células neuroendócrinas da próstata	Células dos tecidos moles (músculo e nervos) que envolvem a próstata

Assim como em outras neoplasias, o CP é caracterizado por uma proliferação anormal de células, sendo um tumor clinicamente heterogéneo, ou seja, em alguns indivíduos o CP pode ter um crescimento lento ou indolente enquanto em outros pode crescer de forma progressiva e rápida.

A transformação neoplásica da próstata começa com uma alteração intraepitelial da próstata, caracterizada por uma proliferação das células luminais. Esta lesão pode progredir para um adenocarcinoma, caracterizado por um fenótipo luminal, que se pode tornar num carcinoma invasivo (1). Para tal, as células cancerígenas proliferam e ocupam a camada das células basais e adquirem determinadas características que lhes permite invadir lâmina basal, migrar para o estroma e, por conseguinte, invadir os vasos sanguíneos, migrando para os locais distantes onde se podem instalar e proliferar, originando metástases (1).

O CP invasivo pode disseminar via corrente sanguínea metastizando para os ossos, fígado e pulmão sendo o osso o local eleito de metastização (1). No osso, o crescimento tumoral leva a uma invasão do tecido ósseo por tecido metastático causando dor intensa, hipercalcemia e fraturas frequentes (1, 2).

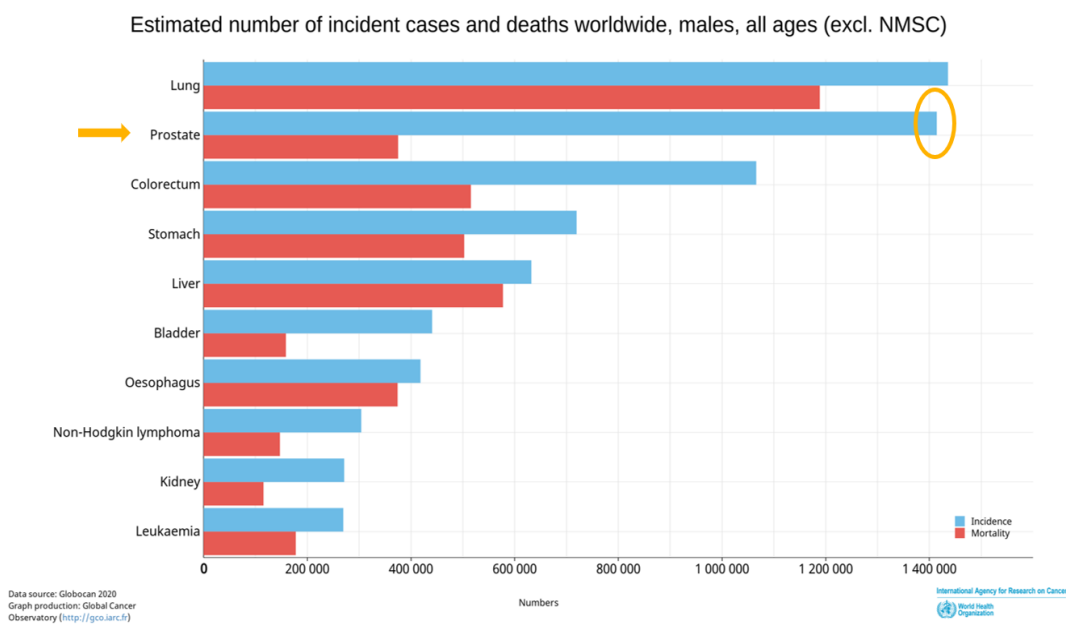
O CP avançado localizado dependente da sinalização pelo RA, pode responder bem à terapia de privação de androgénios (TPA), podendo o tratamento ser total ou parcialmente eficaz, isto é, pode ocorrer a remissão total do tumor ou, durante a terapia, o tumor pode ganhar resistência ao tratamento, tornando-se num cancro independente de androgénios e mais agressivo, sendo designado por cancro da próstata resistente à castração (CPRC). Este tipo de cancro pode progredir para cancro da próstata resistente à castração metastático (CPRCm) (1, 2, 10).

O CPRC é uma doença agressiva, caracterizada por uma diminuição da expressão de RA ou até mesmo a ausência de expressão de RA, designado também por CP independente de androgénios. Os androgénios, que sinalizam através do RA, são necessários para o desenvolvimento da próstata e para a sua função normal. A ação androgénica funciona através de um eixo que envolve a síntese de testosterona no testículo, o seu transporte para os tecidos-alvo e a sua conversão pela 5 $\alpha$ -reductase num metabolito mais ativo, a 5 $\alpha$ -diidrotestosterona (DHT). A testosterona e DHT exercem efeitos biológicos através da ligação ao RA, induzindo a sua atividade transcricional.

Aproximadamente 80–90% dos CP numa fase inicial, apresentam um crescimento dependente da sinalização pelos androgénios, sendo a terapia mais comumente utilizada a TPA que causa uma redução substancial dos níveis de androgénios séricos e, conseqüentemente, não ocorre sinalização via RA, não havendo o estímulo para o crescimento (2, 11). Esta terapia leva a uma diminuição dos níveis séricos de PSA, sendo esta uma forma de monitorizar o tratamento. Contudo, quando o CP deixa de responder à TPA há uma diminuição dos níveis séricos de PSA, podendo ser um fator de confundimento ao nível da eficácia da terapia. Este tipo de tumor para além de deixar de responder à TPA perde também a expressão de RA, sendo bastante agressivo e até fatal (12).

### 1.1.1 Epidemiologia

Em Portugal assistiu-se a um aumento do número de casos de CP no ano de 2020 comparativamente ao registado em 2018, tornando-se, a nível nacional, o cancro com maior incidência em indivíduos do sexo masculino (Figura 2) (13).



**Figura 2.** Incidência e mortalidade por cancro em Portugal. Dados de 2020 para o género masculino. Adaptado de (14).

A incidência e taxa de mortalidade do CP varia muito, dependendo da localização geográfica e do nível sociodemográfico/desenvolvimento do país (14, 15). Num país com um nível sociodemográfico alto, um paciente com 79 anos tem uma probabilidade de 1 em 6 em ser diagnosticado com CP, enquanto num país com um nível sociodemográfico baixo, a probabilidade é de 1 em 47. Estes dados podem ser influenciados pela taxa de diagnóstico e de rastreio que é realizada em cada país, como por exemplo através da medição dos níveis de PSA no sangue (15). A título de exemplo, nos Estados Unidos, no início da utilização dos níveis de PSA no sangue como ferramenta para o rastreio do CP, a incidência do CP disparou consideravelmente. Contudo, o aumento da incidência do CP não é devido apenas ao rastreio

através dos níveis de PSA, mas também de outros fatores, uma vez que em países da Ásia, como o Japão, ou Países da Europa Ocidental, verificou-se um aumento da incidência do CP antes de se iniciar o uso dos níveis de PSA no sangue como forma de rastreio, dados que sugerem o envolvimento de outros fatores como o ambiente e o estilo de vida (14, 15).

Atualmente, é sabido da existência de vários fatores de risco que levam a um aumento da incidência do CP, que podem ter influência no início da carcinogênese, na progressão do cancro, no aparecimento da doença metastática ou mesmo na morte. Os principais fatores de risco são a idade, a etnia, historial familiar e, mais recentemente descoberto, a predisposição genética (3, 15). A idade é o principal fator de risco para o desenvolvimento de CP. Este tipo de cancro é raramente diagnosticado em indivíduos com idade inferior a 40 anos. Devido ao CP ter comportamento indolente, isto é ser um cancro de crescimento lento, a sua incidência aumentou substancialmente com o aumento da esperança média de vida da população, sendo, por este motivo, o aparecimento de sintomas tardio. Atualmente, a maioria dos CP são diagnosticados nos homens com idades compreendidas entre os 50 e 65 anos, devido ao rastreio (15).

Relativamente à etnia, está descrito que homens de descendência africana têm uma maior probabilidade de morrer por CP comparativamente a homens de outra etnia (14). Até ao momento ainda não está esclarecido esta evidência, sendo sugerido que a probabilidade de morrer por CP é devido às condições e ao acesso à saúde, mas também a um risco genético aumentado (15). O risco familiar também pode ter influência no desenvolvimento do CP (15). Indivíduos que têm um familiar com CP têm um risco 2 a 3 vezes maior de lhes ser diagnosticado um CP do que um indivíduo que não tem familiares com CP. Indivíduos com mais do que um familiar com CP, têm um risco de 9 vezes superior de desenvolver esta patologia. Adicionalmente, a morte de um familiar por CP leva a um risco mais elevado de morrer por CP em comparação com um indivíduo diagnosticado com CP sem história familiar (15).

A pré-disposição genética para o CP também tem sido estudada como um potencial fator para o seu desenvolvimento, tendo sido identificados mais de 105 *loci* de risco para o CP, sendo, desta forma, explicada cerca de um terço da herdabilidade (1, 15).

Para além destes fatores de risco, existem outros que estão relacionados com um avanço progressivo e fatal do CP, como por exemplo a obesidade e a alteração de peso constante (15). Alguns estudos mostram que o aumento de peso está associado a várias desregulações no organismo, afetando a regulação hormonal, levando a um aumento dos níveis de insulina assim como de citocinas inflamatórias e diminuindo os níveis de hormonas sexuais (15-17).

### 1.1.2 Genética e epigenética do CP

O desenvolvimento e progressão do CP ocorrem por uma acumulação de alterações genéticas e epigenéticas na célula que posteriormente resultam na inativação de genes supressores tumorais e na ativação de oncogenes, assim como de outros genes envolvidos em processos que conferem vantagem às células cancerígenas.

Durante o processo de carcinogênese, ocorre uma acumulação de alterações genéticas e epigenéticas nas células em transformação que levam à inativação ou à não expressão de genes supressores tumorais, assim como à ativação de proto-oncogenes ou à sobre-expressão de oncogenes (1). No processo de progressão tumoral, a acumulação de novas mutações gênicas e de alterações epigenéticas nas células cancerígenas levam ao aparecimento de novos clones celulares tumorais com diferentes características, que lhes permitem sobreviver a meios adversos como em situações de hipóxia, e terapias, entre outros (1). Todo este processo ocorre quer na carcinogênese da próstata quer na progressão do tumor assim como para o aparecimento da doença metastática (1, 18). Alguns genes que já foram identificados como sendo genes que estão recorrentemente alterados no cancro primário da próstata, são TP53, FOXA1, PTEN, ERG, RA, MYC, BRAC2, ATM, Smad4, BRAF e SPOP (19). De entre estes genes, salientam-se os oncogenes, como o BRAF e *constitutively active myristoylate* AKT1 os genes supressores tumorais, como Pten, Smad4 e TP53, e os genes envolvidos na reparação de DNA como BRCA2 e ATM, todos envolvidos no CP (19). Estudos *in vitro* têm ajudado muito na avaliação do papel de certas mutações genéticas assim como de alterações epigenéticas. A título de exemplo, um estudo realizado *in vitro* demonstrou que os oncogenes AKT1 e MYC têm influência na progressão de CP através da desregulação de várias vias metabólicas relacionadas, bem como do metabolismo lipídico (20). Por sua vez, a inativação de genes supressores tumorais nas células basais e nas células luminais estão envolvidos, também, no processo de desenvolvimento de adenocarcinoma da próstata (1, 19).

Recentemente foram identificados novos genes mutado no CP, através do recurso a ferramentas computacionais, como por exemplo os genes BCOR, FRG1B, GABRA6 e LRP1B (19). Também se encontram alteradas diversas vias no CP como a via de RA, PI3K-PTEN, WNT e a via de reparação do DNA (1, 8).

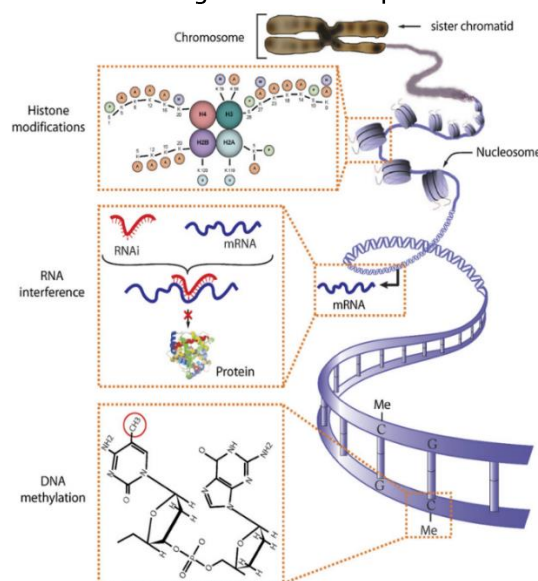
Para além dos genes associados ao CP, têm sido identificados diversos *locis* de suscetibilidade associados ao CP, como por exemplo o polimorfismo do nucleótido único associado ao risco (SNP rs339331) que aumenta a ligação de HOXB1 ao gene RFX6, levando a um aumento da sua expressão. Este gene, RFX6, está correlacionado à progressão de CP e à metastização (21). Está descrito na literatura a existência de mutações em genes cuja proteína faz parte integrante de vias de sinalização intracelulares, como por exemplo RA, PI3K-PTEN e o WNT, assim como de sistemas de reparação de erros no DNA (21).

Recentemente, foi associado ao desenvolvimento e progressão do CP eventos epigenéticos. Um fenômeno epigenético é definido como um fenótipo hereditário em que não ocorre mudança na sequência genética. Uma interrupção nos processos epigenéticos pode levar a uma transformação de células normais em células tumorais (22).

O código epigenético é composto por modificações químicas no DNA e nas histonas. Estas modificações envolvem interações entre as ligações de DNA, RNA, proteínas e outras macromoléculas que sinalizam mudanças na função e organização do genoma, sendo consideradas marcas epigenéticas (22, 23).

Para ocorrer a ativação do processo de transcrição é necessário o gene estar acessível, principalmente a sua região promotora para interação com os fatores de transcrição e a RNA polimerase. Para o gene se tornar acessível é necessário ativar um mecanismo que leve a uma diminuição da intensidade das interações do DNA. Para que isto ocorra são necessárias várias enzimas e proteínas das quais se incluem os modificadores de cromatina como a acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação e sumoilação, que promovem a modificação das histonas em resíduos de aminoácidos específicos, mais precisamente a cauda das histonas (24).

O conjunto das modificações “escrevem” o “código das histonas” que posteriormente condiciona como um gene específico será transcrito. Este código é lido por proteínas, os leitores, que traduzem esse código para um estado específico da cromatina: estado ativo, que permite a transcrição de genes, ou estado reprimido, que impede a transcrição de genes (22, 23, 25). Esta maquinaria epigenética é fundamental para a estrutura da cromatina e para a transcrição gênica, tendo como base três mecanismos principais (Figura 3): metilação do DNA, modificações covalentes das histonas e RNAs não codificantes. Estas modificações são consideradas marcas epigenéticas, podendo ser reguladores chaves nas vias relacionadas com a carcinogênese e conseqüentemente um alvo terapêutico (22, 26).



**Figura 3.** Mecanismos de regulação epigenética: metilação de DNA, microRNAs não codificantes e modificações de histonas. Adaptado de (1).

Um mecanismo epigenético que ocorre associado ao cancro é a modificação da marca das histonas. Uma alteração na modificação das histonas é a sua metilação que é realizada por metiltransferases de histonas (MTH) que requerem diferentes famílias de enzimas dependentes de resíduos de lisina ou de arginina (25). Estas enzimas desempenham um papel muito importante na alteração da cromatina que, por sua vez, regula a replicação de DNA e a expressão génica (27). Dependendo do resíduo alvo e do estado de metilação (mono, di ou trimetilado), a MTH pode regular positiva ou negativamente a transcrição genética (24). Em células malignas, a desregulação de MTHs está associada a alterações no controlo pós-traducional de proteínas celulares que afetam as vias de sinalização (22, 23, 28). Está descrito que a metilação de H3K27, denotada por H3K27me, está associada à repressão da cromatina, assim como a metilação de H3K9 (25). Por outro lado, a metilação de H3K4 está associada à cromatina aberta e, conseqüentemente, à transcrição ativa (22). Diversos estudos demonstram um aumento da expressão de MTHs no CP, sendo a mais estudada a EZH2, a principal proteína catalítica responsável pela metilação do resíduo H3K27 (29). Uma mutação no gene EZH2 está associada ao desenvolvimento do cancro, estando esta mutação presente no estado mais agressivo da doença (22, 29). Entre as MTHs, a mais recentemente estudada é proteína 3 que contém o domínio SET e MYND (SMYD3, do inglês *SET and Mynd domain-containing protein 3*) (23).

### **1.1.2.1. SMYD3**

A SMYD3 é uma di e tri-metiltransferase dos resíduos de H3K4, H4K5 e H4K20, e tem um papel importante na metilação de histonas e proteínas não-histónicas (23). A SMYD3 tem um papel fundamental na regulação da transcrição uma vez que leva à regulação da transcrição de vários genes e à metilação de proteínas não histonas (23). Alguns estudos mostram que a SMYD3 tem a capacidade de reprimir genes supressores tumorais e promover oncogenes, como N-myc, demonstrando contribuir para a carcinogénese do CP e de outros tipos de cancro como o mieloma múltiplo (23, 25, 27, 30). Esta enzima pode estar localizada no núcleo, mas também no citoplasma podendo metilar proteínas do citoplasma ou da membrana celular (23).

Em células normais, a não expressão de SMYD3 mostra não ser essencial para o desenvolvimento, sobrevivência ou proliferação das células (23). Contudo, uma expressão elevada da SMYD3 causa um aumento do crescimento celular que pode interferir positivamente com ativação de genes que codificam proteínas integrantes de vias envolvidas na transformação maligna e migração celular (31, 32).

Vários estudos *in vitro* utilizando linhas celulares cancerígenas têm mostrado que a SMYD3 tem uma expressão elevada em diversos tipos de cancro como no cancro colorretal, da mama, fígado e da próstata (28, 33-35). Adicionalmente, a sua expressão elevada tem sido associada a estadios agressivos (28, 33). Um estudo realizado por Alessia Peserico *et al* em cancro colorretal mostrou que

a inibição da SMYD3, por ação de um inibidor de metiltransferase de histonas (BCI-121), leva a uma diminuição do crescimento celular visto pelos níveis baixos de H3K4me2/3 e H4K5me (35).

No CP foi demonstrado uma associação positiva da expressão de SMYD3 a tumores mais agressivos devido à sua atividade enzimática de metiltransferase, capaz de manter o fenótipo maligno e promover a proliferação de células malignas (33, 35), sendo sugerido a sua utilização como biomarcador para a agressividade tumoral (35, 36).

Estudos *in vitro* com linhas celulares de células cancerígenas da próstata humana mostrou que o silenciamento da SMYD3 leva a uma diminuição do fenótipo maligno das células tumorais demonstrando um potencial alvo terapêutico para o CP (35). Efeitos similares foram obtidos por outros investigadores através da inibição da SMYD3 usando outras linhas celulares tumorais, como do cancro da próstata, pulmão e ovário (28, 35).

### **1.1.3 Rastreo e Diagnóstico**

O CP, na maioria das vezes, é um cancro de crescimento lento, indolor, em que os sintomas podem ocorrer tardiamente. Alguns dos sintomas que ocorrem são a dor óssea, fraturas ósseas patológicas, insuficiência renal, e uma possível perda de peso (7).

Devido ao comportamento indolente do CP nas suas fases iniciais, o rastreo do cancro da próstata é de extrema importância pois permite identificar os indivíduos do sexo masculino que se encontram numa fase precoce de desenvolvimento do CP, fase onde é possível intervir para uma cura.

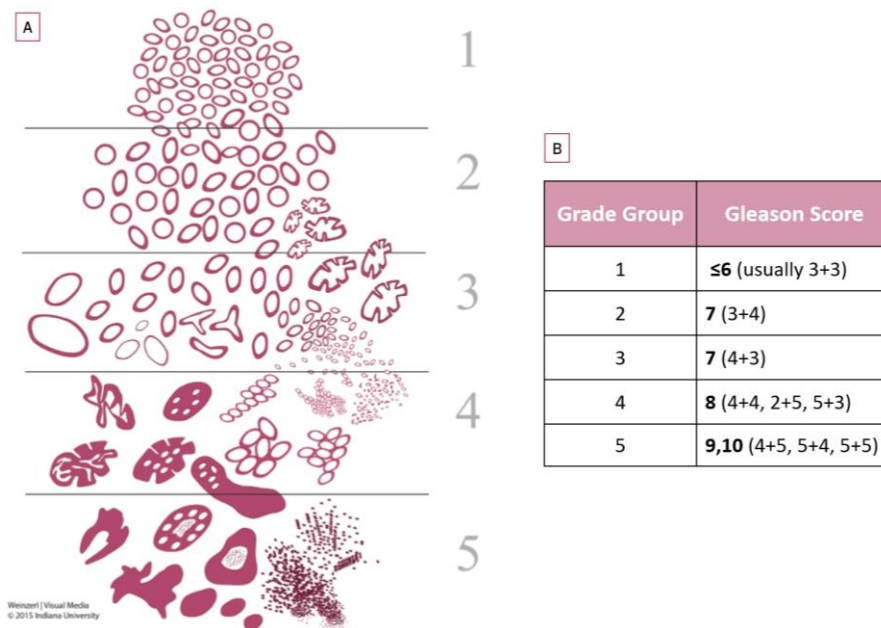
O rastreo do CP é efetuado através da quantificação dos níveis de PSA no sangue dos homens com uma idade igual ou superior aos 50 anos. Quando existe risco familiar o rastreo é realizado a partir dos 45 anos (37, 38).

O PSA é uma glicoproteína produzida pelas glândulas da próstata e tem como função promover a mobilidade dos espermatozoides, entre outras (38, 39). Esta proteína entra no soro através do vazamento do líquido extracelular da próstata normal. Em caso de CP, os níveis séricos de PSA encontram-se elevados (acima de 3ng/mL) devido à próstata perder a sua estrutura glandular normal (39). Contudo, os níveis PSA podem estar aumentados não devido a CP, mas devido à presença de uma hiperplasia benigna da próstata ou a uma prostatite, sendo importante realizar uma consulta com o urologista onde é efetuado o toque retal e prescrito outros exames imagiológicos complementares (39, 40).

O toque retal é um exame importante pois permite avaliar a morfologia da próstata, o seu tamanho, consistência, mobilidade, presença de nódulos e a sensibilidade (41). Os resultados deste exame, juntamente com a análise do PSA, podem dar indícios de uma patologia que deverá ser confirmada com exames imagiológicos, como a ecografia prostática, ou biópsia (42, 43). Em casos mais graves, a ecografia pode ser realizada juntamente com uma biópsia por agulha com a finalidade de realizar um

exame anatomopatológico. Se o resultado indicar CP, recorre-se à classificação de Gleason para efetuar o diagnóstico (7, 42, 43). Quando o CP se encontra em níveis avançados, recorre-se à ressonância magnética e/ou tomografia por emissão de positrões (PET, do inglês *Positron Emission Tomography*) que permite avaliar se há metastização (7, 37, 42).

A classificação de Gleason foi criada há mais de 50 anos pela Sociedade Internacional de Patologia Urológica (ISUP, do inglês *International Society of Urological Pathology*), tendo por base as características celulares e histológicas das amostras, sendo bastante importante para identificação do grau em que se encontra o cancro e também ajuda o médico a recomendar que tipo de tratamento necessita o paciente (18, 44). Em 2014, realizou-se uma reunião de ISUP para discussão do melhoramento da classificação de Gleason para uma melhor prática clínica (Figura 4). Foram realizadas recomendações relativamente ao padrão das células observado pelo patologista e a sua posterior classificação de Gleason. Para além disso, foi indicado que a classificação de Gleason teria início no número 6, grau 1 (3+3), pois refletia um comportamento indolente do tumor. Foi ainda discutido a classificação de Gleason 7 onde o padrão 4 deveria ser evidenciado (45).



**Figura 4.** Classificação de Gleason. A- classificação mediante a morfologia celular e padrão histológico da neoplasia malignas (grau 1 a 5). B - classificação de Gleason: somatório do grau dos dois padrões histológicos prevalentes na neoplasia maligna.

A classificação varia entre 6 e 10, sendo 6 risco baixo, 7 um risco intermédio, e de 8 a 10 alto risco. Esta classificação é feita pela pontuação dada de acordo com os dois graus mais prevalentes observados pelo patologista, o grau mais predominante e o segundo grau mais predominante (18).

A arquitetura apresentada pelas células malignas é classificada em 5 graus, sendo atribuído um grau maior à medida que estas células se diferenciam da arquitetura normal na próstata, como demonstrado na Figura 4A.. As células de grau 1 equivalem a células normais da próstata (mais diferenciadas), enquanto as células de grau 5 são consideradas células de alto grau que sofrem diversas mutações perdendo a arquitetura glandular típica deste órgão. Por exemplo, se o grau mais comum for o 3 e o segundo mais comum for o 4, a pontuação será 7. Contudo, se o grau mais comum for o 4 e o segundo mais comum for o 3, temos uma pontuação final igual a 7 mas com um tumor considerado mais agressivo (18, 46). A classificação final é feita pela soma das pontuações (Figura 4B). Caso seja observado apenas um padrão, a pontuação é multiplicada por 2 para obtenção da classificação de Gleason (42, 46).

Quando a classificação de Gleason é de 6, indica que as células observadas são semelhantes à próstata, sugerindo que o cancro cresce muito lentamente ou que existe um baixo risco de desenvolver cancro. Por norma é indicado pelo médico uma vigilância ativa (18, 40, 42, 44, 46).

A classificação 7 (3+4) indica que a maioria das células ainda apresentam alguma semelhança com as células normais da próstata, sugestivo de um cancro de crescimento lento. Pode ser indicado pelo médico uma vigilância ativa, prostatectomia e radioterapia (42, 44, 46).

A classificação 7 (4+3) indica que há menos células que se assemelham às células normais da próstata e que o cancro cresce a uma taxa moderada. É recomendado pelo médico a prostatectomia ou radioterapia (42, 44, 46).

A classificação 8 apresenta já células anormais e indica um cancro de crescimento rápido ou moderado. Por fim, a classificação de 9 ou 10 indica uma grande quantidade de células anormais, ou seja, um cancro que cresce descontroladamente. Para estas 3 classificações é sugerido pelo médico a prostatectomia, radioterapia ou quimioterapia (42, 44, 46).

Quando é prescrita a terapia, é avaliado regularmente os níveis de PSA dos pacientes. A avaliação de PSA permite detetar a presença de metástases, no caso de prostatectomia, e no caso do tratamento ser radioterapia ou quimioterapia, permite perceber se há uma resposta à terapia ou se há surgimento de recidivas. Contudo, uma vez que PSA é o gene alvo de RA e este é o alvo das terapias utilizadas, há uma regulação negativa de RA e conseqüentemente uma redução da expressão de PSA não indicando verdadeiramente se houve ou não uma diminuição do número de células malignas, ou seja, não indica verdadeiramente se o tratamento está a ter efeito. Para além disso, caso a terapia realizada seja um terapia antiandrogénica, em CPRC, ou seja, hormono-independente, não deve ser avaliado os níveis de PSA (22).

Há uma grande necessidade de novos testes, não invasivos, que consigam detetar o CP num estado mais precoce da doença e que permitam monitorizar o tratamento de uma forma mais precisa, isto é, que o seu resultado não seja afetado pelo tratamento sem nenhum interferente. Uma das hipóteses é

a utilização da detecção de biomarcadores presentes no DNA livre circulante que sofram alterações de metilação de DNA associadas ao CP, à doença metastática e também à recorrência da doença, como por exemplo, a SMYD3 (22).

#### **1.1.4 Tratamento**

O CP é tratado tendo em consideração os níveis de PSA, o grau de Gleason, a idade do paciente, comorbidade associada e a esperança de vida do paciente (18, 42).

Existem várias terapias que podem ser utilizadas que incluem a ressecção cirúrgica, radioterapia e a TPA, a mais utilizada na fase inicial, que é realizada por castração cirúrgica ou castração química, dependendo do grau de Gleason se este é ou não hormono-dependente (13).

A maioria dos CP diagnosticados, cerca de 80%, é considerado hormono-dependente (2). Se o cancro for localizado, é recomendada uma vigilância, prostatectomia ou TPA, caso o cancro seja hormono-dependente. Caso o CP se encontre num estado mais avançado com metastização e for hormono-dependente, é utilizada TPA combinada com quimioterapia, como por exemplo docetaxel conjuntamente com e inibidores de sinal de RA como Abiraterone, Apalutamide e Enzalutamide, entre outros (2, 18, 47). Contudo, cerca de 10-20% dos pacientes cujo CP é hormono-independente, ao fim de 2-3 anos, apresentam recorrência, visualizada através dos níveis serológicos aumentados de PSA e/ou ressonância magnética. É prescrita uma nova terapia, contudo, a maioria destes cancros resulta em CPRC (2). Depois de ser diagnosticado CPRC, os pacientes têm uma esperança média de vida de cerca de 5 anos, podendo ser inseridos em ensaios clínicos e/ou cuidados paliativos (2, 35, 47, 48).

Apesar de haver vários tratamentos, há sempre riscos associados. Por exemplo, a TPA pode levar a que haja cada vez mais pacientes a desenvolverem CPRC devido a ser a terapia mais comumente prescrita, uma vez que mais de 50% dos CP diagnosticados são hormono-dependentes. A prostatectomia radical ou radioterapia localizada também acarretam riscos como incontinência urinária ou disfunção erétil. Face a estes riscos, há uma extrema necessidade de novas terapias principalmente para cancros como o CPRC (2, 49).

## **1.2 Estratégias terapêuticas para o Cancro da Próstata**

Uma revisão na literatura mostra a existência de um grande número de estudos na procura de novos fármacos para prevenção e tratamento do cancro, que tenham baixa toxicidade e poucos efeitos colaterais, sendo cada vez mais pesquisados compostos de origem natural como agentes terapêuticos, como por exemplo a berberina (47, 50-54).

A berberina é um alcaloide isoquinolina natural de cor amarela dourada que tem origem na raiz, rizoma e casca do caule de muitas espécies de plantas medicinais como *Berberis spp.*, *Coptis spp.*, *Hydrastis*

*spp* (54–56). É comumente utilizado na China como agente antimicrobiano e antidiarróico, entre outros (54, 55).

### **1.2.1 Berberina como ferramenta terapêutica**

A berberina tem sido utilizada como fármaco em diversas situações pois apresenta diversas características farmacológicas como atividade anticancerígena, antidiabética, anti-inflamatória, antiobesidade e cardioprotetora, entre outros (56, 57).

Em pacientes diabéticos, a berberina apresenta ter um efeito hipoglicêmico, através de um aumento da sensibilidade à insulina, modulação da microbiota intestinal, estimulação da glicólise o tecido periférico das células, aumento do transportador da glicose, entre outros. Também demonstra ter alguns efeitos na melhoria da ovulação em pacientes com síndrome do ovários policístico, devido a aumentar a sensibilidade à insulina (58).

Esta substância natural demonstra inúmeras atividades farmacológicas benéficas possíveis de tratar ou auxiliar no tratamento de diversas patologias, podendo vir a ser utilizada como tratamento de 1ª linha em vários casos (54, 55, 57, 58).

Estudos realizados em linhas celulares de diferentes tipos de cancro, como do cancro uterino, gástrico, vesical, mamário, hepático, pulmonar e prostático, mostram que a berberina tem potencial como alvo terapêutico anticancerígeno, sendo a sua toxicidade baixa, assim como o seu custo (55, 59). Estão descritos na literatura vários mecanismos que afetam negativamente o crescimento tumoral pela berberina através da regulação negativa da expressão da ciclina B1, paragem do ciclo celular, da indução de apoptose pela via de sinalização mTOR ou ativação do fator indutor de apoptose e da inibição da atividade da telomerase (58, 59).

Relativamente à paragem do ciclo celular, estudos em linhas celulares malignas de bexiga e leucemia linfocítica, demonstraram que a berberina inibe o ciclo celular na fase G1 pela regulação positiva do gene BTG2 (gene regulador da proliferação celular induzido pela proteína p53) e induz a paragem do ciclo celular em G1 pela regulação negativa de ciclinas, como a ciclina D1 e a B1 (59).

Os recetores de morte, conhecidos como TRAIL, também desempenham um papel muito importante na indução de apoptose de células malignas (59), sendo alvos terapêuticos no tratamento contra o cancro. Estudo em linhas celulares de cancro da mama resistentes à apoptose, via TRAIL, após tratamento com berberina combinada com TRAIL, mostraram um aumento dos níveis de apoptose, sugerindo o papel adjuvante da berberina na indução da apoptose (59).

As metaloproteinases (MMP, do inglês *Matriz Metalloproteinases*) da matriz são proteínas bastante importantes pois têm como função degradar e remodelar a matriz extracelular, permitindo a invasão e a migração de células malignas e por fim a metastização (60). Os níveis de expressão e atividade de MMP estão associados ao desenvolvimento de muitos tipos de cancro, como o cancro do cólon, mama,

melanoma, ovário, próstata e pulmão (60). A berberina demonstra ter efeito na expressão das MMP, isto é, reduz os níveis de metaloproteinases no plasma podendo, deste modo, estar envolvida na inibição/prevenção de metástases (59). Pelo exposto, a berberina intervém negativamente em diversos mecanismos moleculares que promovem o desenvolvimento progressão e metastização e, devido a estas propriedades anticancerígenos, torna-se num alvo terapêutico bastante interessante. Relativamente ao CP a berberina tem demonstrado um potencial anticancerígeno através do seu efeito antiproliferativo através da supressão de RA (59). Um estudo de Li *et al* demonstrou que linhas celulares de CP, após o tratamento com berberina, apresentavam níveis significativamente baixos de PSA, RA, COX-2 e Bcl-2 e uma expressão de caspase-3 aumentada, dados que sugerem que o mecanismo principal da berberina é a inibição do microambiente inflamatório, a inibição de proliferação celular e indução da apoptose de células malignas (50). Para além disto, a berberina tem a capacidade de inibir a atividade de transcrição de RA em CPRC. Não afeta a expressão de mRNA mas induz a degradação da proteína RA (61). Estudos *in vitro* em células CP humana mostraram o potencial apoptótico da berberina, via inibição da caspase-3 (62), o seu potencial antiproliferativo, via a indução da paragem do ciclo celular na fase G1 (63).

Um estudo *in vitro* com uma linha celular proveniente de CPRC demonstrou que a berberina tem a capacidade de inibir a migração e invasão de células malignas pela inibição de genes relacionados à transição epitelial-mesenquimal (EMT, do inglês *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*), como BMP7 e NODAL (55).

A proteína supressora tumoral, p53, é crucial na supressão da carcinogénese (64). A corroborar, a maioria dos pacientes com cancro apresenta mutações no gene TP53, incluindo os com cancro da próstata (64). Esta proteína é ativada como fator de transcrição em resposta a oncogenes, hipoxia ou dano no DNA, por exemplo, resultando na paragem do ciclo celular ou indução da apoptose (64). Um estudo *in vitro* de Choi *et al* demonstrou que as células que expressam a proteína p53 são mais suscetíveis à berberina do que as células que não expressam p53 (64). Este estudo mostrou ainda a indução da paragem do ciclo celular, na fase G1, maioritariamente nas células que expressam p53, sugerindo que a inibição da proliferação celular nas células malignas seja devido à paragem do ciclo celular em G1 via p53 (64). Para além disso, a berberina demonstrou induzir a apoptose maioritariamente em células que expressam p53, pelo aumento de proteínas Bax, pró-apoptóticas, que posteriormente induzem a sinalização de caspases (64). Demonstra também ter a capacidade inibir a metastização através da paragem do ciclo celular, indução de apoptose, entre outros, podendo impedir o avanço da doença (47, 50, 53, 55, 61, 64).

### **1.2.2 Berberina e a SMYD3**

Na literatura está descrito que a berberina afeta os níveis de acetilação e metilação de histonas (30). Um estudo de Wang *et al in vitro*, em linhas celulares de mieloma múltiplo, demonstrou que, após o tratamento com berberina, os níveis de metilação de resíduos de lisina de histonas diminuíram à medida que a concentração de berberina aumentava (30). Para além disso, Wang *et al* demonstraram que a berberina tem a capacidade de induzir a acetilação de histonas podendo resultar na ativação de genes responsáveis pela supressão da proliferação celular e apoptose (30).

Esta substância natural, a berberina, demonstra ainda ter efeito na regulação epigenética em células de mieloma múltiplo. Demonstra regular negativamente as metiltransferases de DNA e regular positivamente as metiltransferase de histonas como a SMYD3 (30, 65). Em linhas celulares mieloma múltiplo, após tratamento com berberina, houve uma diminuição dos níveis de H3K4me3, ou seja, uma diminuição da expressão da SMYD3, demonstrando ter efeito antitumorais por meio da regulação epigenética (30).

A berberina tem propriedades anticancerígenas, tendo potencial como ferramenta terapêutica e/ou como adjuvante às terapias convencionais (41, 47, 50, 51, 53, 55, 62, 64). Esta substância natural é capaz de intervir na regulação epigenética através da diminuição da expressão da SMYD3 e, uma vez que CPRC é uma neoplasia sem cura e que tem uma expressão elevada da SMYD3, a berberina poderá ser uma potencial ferramenta terapêutica por meio da inibição da SMYD3 no CPRC (25, 28, 35, 50, 51, 55, 66).

## 2. OBJETIVOS

O cancro da próstata é um problema grave de saúde pública, onde a maioria dos tumores respondem a terapias antiandrogénicas. Contudo, uma pequena percentagem de tumores apresenta ou adquire resistência a esta terapia, sendo as outras terapias pouco eficazes. Assim, têm sido efetuados vários estudos ao nível da patogenia do cancro da próstata, assim como de novos compostos e compostos naturais, na tentativa de identificar potenciais alvos para as terapias e identificar/desenvolver novas moléculas terapêuticas.

A berberina, um composto natural, tem despertado interesse na comunidade científica devido às suas propriedades anti-inflamatórias e anticancerígenas, podendo ser uma alternativa para o tratamento do cancro da próstata, uma vez que pode inibir a expressão da SMYD3 cujo aumento da expressão está associada ao cancro da próstata, nomeadamente à forma mais agressiva do cancro da próstata, o CPRC.

O presente trabalho tem como objetivo estudar o efeito da berberina no cancro da próstata e avaliar se o seu efeito é dependente da expressão da SMYD3.

Para avaliar o efeito da berberina em cancro da próstata foram utilizadas duas linhas celulares, uma proveniente de um tumor numa fase inicial e hormono-dependente (LNCaP) e uma outra proveniente de um tumor CPRC de maior agressividade, para avaliar e caracterizar a nível funcional o efeito da berberina na viabilidade celular, na proliferação celular, na apoptose e na migração celular, tendo sido necessário determinar previamente o IC50 de cada linha celular para escolher as melhores doses de berberina a aplicar nos estudos funcionais.

Para avaliar se o efeito da berberina é dependente da SMYD3 foram utilizadas duas linhas celulares derivadas da linha celular PC-3 que foram manipuladas geneticamente: uma linha sem expressão da SMYD3 (silenciada, PC-3 sh-smyd3) e a outra linha celular controlo da linha silenciada que expressa a SMYD3 (PC-3 sh-scramble), tendo sido o efeito da berberina avaliado através da caracterização funcional, isto é, através de estudos viabilidade celular, na proliferação celular, na apoptose e na migração celular.

### 3. MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.1 Cultura e manutenção de linhas celulares

No presente trabalho foram utilizadas duas linhas celulares de carcinoma da próstata provenientes de um tumor hormonodependente (linha celular LNCaP) e de um tumor resistente à castração (linha celular PC-3), que foram gentilmente cedidas grupo de Epigenética e Biologia do Cancro do Centro de Investigação do Instituto Português de Oncologia do Porto.

A linha celular LNCaP foi mantida em meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) – 1640 (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) suplementado com 10% de Soro Fetal de Bovino (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*) (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) (67). A linha celular PC-3 foi mantida em meio *RPMI-1640/Ham's F-12* (50:50, v/v) (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) suplementado com 10% de FBS (PAN-Biotech, Aidenbach, Germany) (67). Além destas linhas celulares, foram utilizadas duas outras linhas celulares obtidas por manipulação genética da PC-3: a sh-SMYD3 PC-3 (PC-3 sh-smyd3) e a sh-scramble PC-3 (PC-3 sh-sc). A linha celular PC-3 sh-smyd3 foi manipulada geneticamente para não expressar a SMYD3. No presente trabalho foi usada para avaliar se o efeito da berberina no CP é dependente ou não da expressão SMDY3. A linha celular PC-3 sh-sc foi utilizada como controlo da linha PC-3 sh-smyd3. Ambas as linhas celulares foram cultivadas e mantidas com meio usado para a linha celular PC-3, tendo sido adicionado 1µg/ml de puromicina de forma a garantir só sobrevivem as células que expressam o vetor utilizado na manipulação genética que lhes garante uma resistência a este antibiótico (28, 68). O silenciamento da linha PC-3 sh-smyd3 foi comprovado por Vieira *et al* por Real Time RT-PCR e por Western Blot (28).

Todas as células foram mantidas inicialmente em frascos 25cm<sup>2</sup> numa estufa (BINDER, Tuttlingen, Germany) a 37°C com atmosfera húmida a 5% de CO<sub>2</sub>, tendo sido observadas ao microscópio ótico invertido (Motic AE31, 4x/0.10, Canadá, Germany) em períodos de 48 horas para averiguar a necessidade de mudança do meio. Quando atingida a confluência, as células foram tripsinizadas. Para tal, foi adicionado 3ml de tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffer Saline*) (Corning™, Arizona, EUA) após aspiração do meio. Após a lavagem, foi removido o PBS e foi adicionado 2ml de Tripsina (biowest, Bradenton, EUA) durante 5 min. Após este período, foi adicionado o dobro do volume de meio, tendo sido efetuada uma lavagem a 1200rpm durante 5 minutos. Após a remoção do sobrenadante foi adicionado meio ao pellet para resuspender as células. As células foram colocadas em frascos de 75cm<sup>2</sup> e mantidas em cultura. As células que não foram utilizadas nas experiências foram congeladas a -80°C em meio de cultura suplementado com DMSO a 5%.

### 3.2 Tratamento com a Berberina

A preparação da berberina e as concentrações de berberina utilizadas neste estudo tiveram em consideração vários estudos onde foi avaliado o efeito da Berberina em linhas celulares do cancro da próstata, assim como em outras linhas celulares (30, 50, 64, 69).

A berberina (TCI, Tokyo, Japan) foi dissolvida em DMSO obtendo-se uma solução com uma concentração de 50mM (solução stock). A partir desta solução foram preparadas, também dissolvendo em DMSO, soluções diluídas a 1:10, com a concentração final de 500nM, 5000nM, 50000nM, 500000nM e 5000000nM. No tratamento das células com berberina, garantiu-se que as soluções de berberina preparadas eram diluídas 1:100 em meio de cultura, testando-se assim as concentrações de 5nM, 50nM, 500nM, 5000nM, 50000nM, 500000nM. Desta forma, a concentração final de DMSO por poço foi igual para todas as concentrações testadas (1%) de forma a não ser prejudicial ao crescimento celular. Como controlo foi preparada uma solução de meio de cultura com uma concentração de DMSO a 1% (v/v).

As células foram cultivadas com os respetivos meios em frasco de cultura 75cm<sup>2</sup> e quando atingida a confluência foram tripsinizadas e posteriormente procedeu-se à contagem de células pelo método de exclusão do azul de tripano. Este corante penetra nas células cuja membrana não se encontra íntegra, sendo estas excluídas da contagem. Foi preparada uma suspensão celular com este corante, tendo sido posteriormente colocada no hemocitómetro para contagem de células.

De seguida, procedeu-se ao ajuste do volume do meio, de modo a se obter uma concentração celular final otimizada para cada linha celular:  $5 \times 10^4$  cél/ml para a linha celular LNCaP e  $1 \times 10^4$  cél/ml para as linhas celulares PC-3, PC-3 sh-scramble, PC-3 sh-SMYD3.

As células foram plaqueadas em placas 96 poços, tendo sido adicionado 200µL de suspensão celular a cada poço. Foram colocadas na estufa a 37°C com atmosfera húmida a 5% de CO<sub>2</sub> durante a noite para permitir a adesão celular. Após 24h, o meio foi removido e as células foram tratadas (dia 0) com berberina com as diferentes concentrações acima referidas.

De modo a avaliar a melhor dose de berberina para a realização dos estudos funcionais foi utilizado o ensaio *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium-bromide* (MTT) (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) para obtenção de metade do valor de inibição máxima (IC<sub>50</sub>, *Half Maximal Inhibitory Concentration*), usando a regressão não linear (67). O método MTT baseia-se no princípio de que a maioria das células viáveis têm uma atividade mitocondrial constante e, portanto, um aumento ou diminuição da atividade mitocondrial está linearmente relacionado com o número de células viáveis. Assim sendo, a atividade mitocondrial das células é refletida pela conversão do sal de tetrazólio MTT em cristais roxos (70, 71).

Este ensaio foi realizado 72 horas após a adição de berberina, tendo sido adicionado a cada poço 0,5mg/mL de MTT. Posteriormente as placas foram envolvidas em papel de alumínio e incubadas na

estufa, durante 2 a 3 horas. Após esse período, foi removido o MTT e foi adicionado 100µL de DMSO a cada poço. Como controlo foi adicionado DMSO em 3 poços sem células de forma a servirem como brancos. De seguida foi realizada a leitura das placas num espectrofotómetro (Synergy HTX BioSPX, Drogenbos, Belgium) a um comprimento de onda de 540 nM com subtração de background de 630nM tendo sido retirados, a cada valor, o valor dos brancos. O resultado para cada concentração de berberina é um valor médio obtido a partir dos valores encontrados em 3 culturas independentes, cada uma com 3 réplicas. Os valores médios foram utilizados para representação gráfica  $Abs=f(\text{concentração de berberina})$ .

Após o cálculo do  $IC_{50}$ , os valores obtidos foram utilizados nos restantes ensaios, tendo as células sido expostas a duas concentrações de berberina diferentes: concentração  $IC_{50}$  determinada e o dobro dessa concentração (67).

No ensaio da viabilidade, proliferação e apoptose celular as linhas celulares foram também tratadas 24 horas após o plaqueamento celular, como explicado anteriormente. Na Tabela 2 encontra-se registado o nº de células utilizadas de cada linha celular para cada ensaio funcional e o tempo a que foi efetuado cada ensaio após a adição de berberina. No ensaio da migração celular, o tratamento com berberina ocorreu após a confluência total ter sido alcançada, tendo o ensaio decorrido até ao fecho do rasgo em, pelo menos, uma das condições.

**Tabela 2.** Registo das condições em que foram realizados os ensaios funcionais: concentração de células por poço de cada linha celular para um dado ensaio; e altura a que foi realizado o ensaio após adição de berberina.

	Células (nºcélulas/mL)	Ensaio	Tempo após adição da berberina (horas)
LNCaP	$5 \times 10^4$	Viabilidade celular	0, 24, 48, 72
	$1 \times 10^5$	Proliferação celular	72
	$3 \times 10^4$	Apoptose	72
PC-3	$1 \times 10^4$	Viabilidade celular	0, 24, 48, 72
	$5 \times 10^4$	Proliferação celular	72
	$8 \times 10^3$	Apoptose	72

### 3.3 Avaliação do efeito da berberina na viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada às 0, 24, 48 e 72 horas após a adição da berberina. através do ensaio MTT, como descrito no ponto 3.2.

As células foram plaqueadas, de acordo com a Tabela 2, e incubadas com berberina (dia 0) tendo sido avaliada a viabilidade celular pelo ensaio MTT, como descrito no ponto 3.2. Após a leitura das placas foi

calculado o número de células viáveis através da fórmula:  $\frac{\text{Densidade ótica (OD)} \times \text{número de células no dia 0}}{\text{DO média no dia 0}}$  sendo os resultados representados graficamente como número de células viáveis =f (tempo) (67).

### **3.4 Avaliação do efeito da berberina na proliferação celular**

O efeito da berberina na proliferação celular das linhas celulares do CP foi avaliado através do kit EdU (Abbkine, China) tendo sido o protocolo otimizado por ajustes nos tempos de incubação, quantidades de solução provenientes do kit e concentração celulares. O princípio deste kit baseia-se na incorporação de um análogo de um nucleosídeo, o EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) no DNA durante a síntese ativa de DNA não sendo necessário a desnaturação do DNA. A detecção do EdU é efetuada através de uma reação covalente entre uma azida e um alcino catalizada pelo cobre que origina um anel trizol que apresenta uma coloração verde (72).

Antes de efetuar o plaqueamento celular foi colocada uma lamela por poço numa placa de 12 poços. De seguida, as células foram cultivadas com uma concentração celular otimizada para cada linha celular (Tabela 2) tendo sido adicionado a cada poço 1ml de suspensão celular. As placas foram incubadas na estufa a 37°C com atmosfera húmida a 5% de CO<sub>2</sub> durante a noite para permitir a adesão celular. No dia seguinte as células foram tratadas com berberina (dia 0).

Após 72 horas do tratamento foi realizado o ensaio da proliferação, de acordo com as instruções do kit(72). Para tal foi preparada uma solução EdU a 20µM a qual foi adicionada a cada poço para uma concentração final de EdU a 10µM. Após 2 horas de incubação a 37°C, procedeu-se à fixação das células, tendo sido removido o meio e adicionado 250µL/poço de uma solução aquosa de formaldeído a 3,7% para fixação, durante 15 minutos à temperatura ambiente.

Após a fixação, procedeu-se à lavagem das células com 250µL PBS com 3% Albumina Sérica Bovina (BSA, do inglês *Bovine Serum Albumin*) (PBS/BSA) durante 5 minutos, repetindo-se este procedimento por mais duas vezes. De seguida, após remoção do tampão PBS/BSA, procedeu-se à permeabilização tendo sido adicionado 250µL/poço de PBS com Triton X-100 a 0,5% para permeabilização, durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após uma lavagem das células com PBS/ BSA foi colocado 250µ/poço de uma mistura de reação extemporânea, a *Click-iT* (tampão de reação, reagente de cobre, azida AbFluor 488, agente de redução e água desionizada), tendo sido incubada durante 30 minutos, protegida da luz, à temperatura ambiente.

Após a incubação com a mistura de reação procedeu-se a uma nova lavagem com 250µL/poço PBS/BSA. De seguida, procedeu-se à coloração nuclear com uma solução de DAPI (100µL) durante 1 hora à temperatura ambiente e protegido da luz. Após este período foi removido o DAPI e colocou-se 250µL/poço de PBS. Sem a remoção do PBS, as lamelas foram retiradas para lâminas que continham meio de montagem, colocado previamente. As lâminas foram guardadas protegidas a 4°C, até à sua

leitura. A captação de imagens microscópicas das lamelas foi realizada com um microscópio ótico invertido Zeiss Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Germany), recorrendo ao software axiovision 4.8. de fluorescência.

Para realizar a quantificação do sinal de fluorescência nuclear, as imagens capturadas foram tratadas no programa ImageJ Fiji, no canal verde, ajustando o brilho e contraste de cada imagem individualmente. Posteriormente foi ajustado o *threshold* do controlo, mantendo-se igual para as restantes condições de forma a se quantificar apenas a marcação nuclear. Após a quantificação da fluorescência, foi calculado o número de células utilizando o canal azul com o mesmo programa efetuando-se a subtração do background, ajuste do *threshold* e análise de partículas. Para calcular a fluorescência por número de células recorreu-se ao Excell. O valor de fluorescência para cada condição corresponde ao valor médio de fluorescência obtido a partir dos valores obtidos em 2 culturas independentes, com 3 réplicas para cada condição. Os resultados foram apresentados graficamente de duas maneiras: fluorescência =f (condição) e fluorescência/nº de células =f (condição).

### **3.5 Avaliação do efeito da berberina na resistência à apoptose**

A avaliação da apoptose em linhas celulares de CP foi efetuada 72 horas após o tratamento com a berberina com o kit APOPercentage™ (Biocolor Ltd., Belfast, Northern Ireland), tendo sido realizada uma otimização prévia do protocolo ajustando a concentração celular, quantidade Dye APOPercentage na solução de trabalho, quantidade tripsina e o período de incubação da mesma.

O princípio do kit baseia-se na utilização de um corante rosa que é absorvido durante a cultura celular *in vitro* por células em apoptose. Quando as células se encontram em apoptose, ocorre uma alteração da posição interna da fosfatidilserina na membrana havendo uma captação do corante para dentro das células. Este corante não é libertado das células, só em células necróticas, sendo específico para células apoptóticas (73).

Depois de efetuado o plaqueamento em placa de 24 poços, de acordo com a Tabela 2, as células foram tratadas com berberina. Para controlo positivo da técnica foram plaqueadas células de igual forma apenas com meio de cultura, sem tratamento (controlo). Após 72h, foi adicionado 300µL/poço de 10mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a cada poço controlo. As placas foram colocadas na estufa a 37°C, durante 1 hora.

Após 1 hora, foi preparada a solução de trabalho (15µL Dye + 500µL de meio de cultura por poço) tendo sido retirado todo o meio dos poços e adicionado 300µL/poço da solução de trabalho, deixando na incubadora entre 15 a 45 minutos. Durante este período foi observado ao microscópio o controlo positivo para verificar o surgimento da coloração rosa.

Assim que as células controlo revelam a coloração rosa, foi retirada a solução de trabalho de todos os poços procedendo-se a duas lavagens com PBS. Posteriormente, as células foram incubadas com uma solução de tripsina (100µL/poço), a 37°C durante 10 a 20min, para ocorrer o destacamento das células.

Assim que as células se destacaram, foi adicionado 200µL/poço de *Dye Release* e a placa foi colocada a agitar durante 15 minutos. Seguidamente procedeu-se à transferência de 200µL de cada poço para poços de uma placa de 96 poços. As placas foram lidas no espectrofotómetro a uma absorvância de 550nm com background subtraído a 620nm. Os níveis de apoptose foram calculados utilizando a fórmula:  $\frac{\text{Densidade ótica de Apoptose(OD)}}{\text{DO média do MTT de dia 3}}$  sendo os resultados representados graficamente como nível de apoptose médio =f (condição), normalizados para o controlo. O valor de absorvância para cada condição corresponde a um valor médio que foi obtido a partir dos valores de 3 culturas independentes, com 3 réplicas para cada condição.

### 3.6 Avaliação do efeito da berberina na migração celular

A migração celular foi avaliada através do ensaio *Wound healing* que tem como princípio avaliar a capacidade de as células migrarem em monocamada.

Depois de efetuado o plaqueamento em placas de 6 poços, de acordo com a Tabela 2, as células foram tratadas com berberina. Após atingida a confluência total de todos os poços, foi retirado o meio e lavadas as células com 1mL de PBS. Após descarte do PBS, foi realizado um rasgo na vertical em cada poço utilizando uma ponta de micropipeta de 200µL. Este rasgo foi identificado com uma caneta por detrás da placa. Cada poço foi lavado de seguida com 1mL de PBS.

Após a remoção do PBS, cada poço foi fotografado, sendo considerado o tempo 0 (28). Por fim, foi adicionado o tratamento 30µM de berberina para a LNCaP e 60µM berberina para PC-3/PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3. Cada poço foi fotografado utilizando um microscópio ótico invertido e o programa LAZ EZ, em diferentes intervalos de tempo, até ao fecho do rasgo. Cada imagem foi trabalhada ajustando o contraste, brilho e nitidez de forma a se obterem imagens nítidas. As áreas foram determinadas com auxílio do programa Image J. Para realizar o cálculo do rácio de migração foi utilizado o Excell recorrendo à fórmula:  $\frac{\text{área t0}-\text{área t}}{\text{área t0}} \times 100$  sendo os resultados representados graficamente como rácio de migração =f (tempo) (28). No ensaio de migração foram utilizados valores médios dos valores obtidos em 3 culturas independentes, com 1 réplicas para cada condição.

### 3.7 Análise estatística

Os dados foram tratados estatisticamente utilizando o software GraphPad 8 para o Windows® versão 10. Os resultados foram estimados usando o intervalo de confiança de 95% e o nível de significância admitido foi de 0,05.

Para avaliar os resultados do IC<sub>50</sub> foi utilizado a correlação de Pearson's e o teste de pares combinado de Wilcoxon.

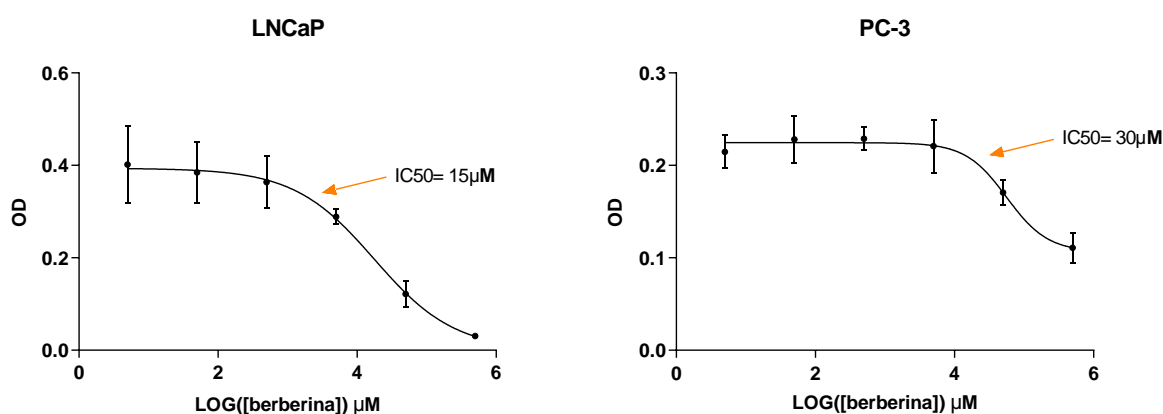
No ensaio de viabilidade e migração celular, quando comparado os diferentes parâmetros para cada linha individual, foi utilizado o testes Two-way ANOVA com o teste de múltipla comparação Dunnett's. No ensaio de proliferação e apoptose, no mesmo âmbito, foi utilizado o ensaio One-way ANOVA com o teste de múltipla comparação Dunnett's.

Para comparar duas linhas celulares ao mesmo tempo, com os mesmo parâmetros, foi utilizado o teste Two-way ANOVA com o teste de múltipla comparação Sidak.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Efeito da berberina em linhas celulares do Carcinoma da Próstata

A primeira abordagem efetuada para avaliar o potencial efeito anti tumoral da berberina, foi estudar a viabilidade de duas linhas celulares provenientes de cancros da próstata com um comportamento biológico diferente quando expostas a diferentes concentrações de berberina. Uma análise da Figura 5 revela que a viabilidade celular de ambas as linhas celulares é dose dependente, isto é a viabilidade celular diminui com o aumento da dose berberina, sendo a linha celular LNCaP mais suscetível ao efeito da berberina do que a linha celular PC-3. O valor  $IC_{50}$  foi calculado a partir da curva de viabilidade celular obtida para cada ensaio para uma dada linha celular de forma a se determinar as duas doses de berberina a usar no estudo do seu efeito a nível biológico nestas duas linhas celulares.



**Figura 5.** Avaliação do efeito da dose de berberina na viabilidade das linhas celulares de cancro da próstata LNCaP e PC-3. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio MTT às 72 horas após o tratamento com a berberina. O valor de  $IC_{50}$  foi calculado a partir de cada curva relativa a um dado ensaio como indicado pela seta laranja.

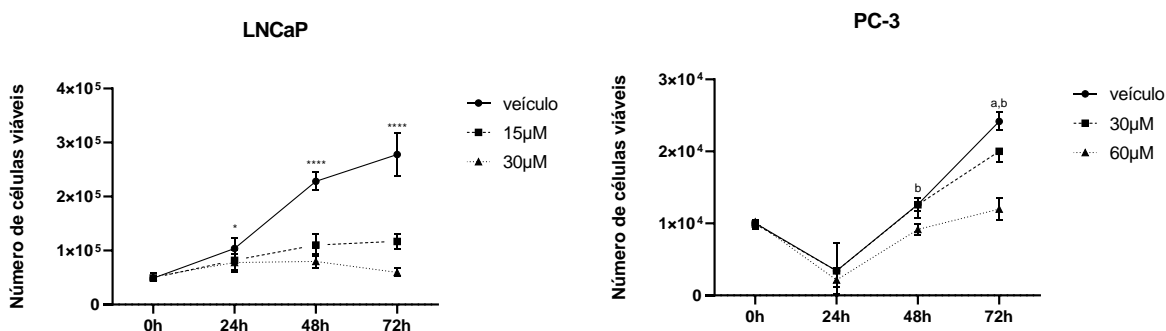
Na Tabela 3 estão registados os valores de  $IC_{50}$  encontrados para as duas linhas celulares em estudo. Estes valores foram calculados a partir dos valores de  $IC_{50}$  encontrados em três ensaios independentes para cada linha celular. Assim, as doses de berberina usadas para o estudo do seu efeito na viabilidade e nas capacidades de proliferação, resistência à apoptose e migração de cada linha celular foram o valor  $IC_{50}$  médio e o dobro do valor médio encontrado para cada linha celular, nomeadamente os valores 15 µM e 30 µM para a linha celular LNCaP e 30 µM e 60 µM para a linha celular PC-3 (Tabela 3). As doses de berberina usadas para as linhas celulares PC-3 manipuladas geneticamente (PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3) foram as mesmas doses do que as usadas para a linha celular PC-3.

**Tabela 3.** Valores da concentração para obtenção da metade do valor de inibição máxima ( $IC_{50}$ ) relativos às linhas celulares de cancro da próstata em estudo. Os valores  $IC_{50}$  correspondem à média dos valores de  $IC_{50}$  obtidos em 3 ensaios independentes realizados para cada linha celular.

Modelo	Linhas celulares	Valor $IC_{50}$ utilizado ( $\mu M$ )	Valor 2x $IC_{50}$ utilizado ( $\mu M$ )
Próstata	LNCaP	15	30
	PC-3	30	60

#### 4.1.1 Efeito da berberina na viabilidade celular

O ensaio de viabilidade teve como objetivo avaliar o efeito da exposição da berberina no número de células viáveis ao longo do tempo (Figura 6). Na linha celular LNCaP (Figura 6), uma linha celular representativa de um cancro da próstata em estado inicial, foi possível verificar um aumento da viabilidade celular ao longo do tempo. Contudo, quando esta linha celular é tratada com a berberina, não se assiste a um aumento da viabilidade celular (Figura 6). O efeito da berberina na viabilidade da linha celular LNCaP é observado logo às 24 horas após exposição, observando a diferenças estatisticamente significativas entre as linhas celulares tratadas e a não tratada ( $p=0,313$ ).



**Figura 6.** Avaliação do efeito da berberina na viabilidade das linhas celulares LNCaP e PC-3 através do ensaio MTT. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em ambas as linhas celulares tratadas com berberina versus com as respetivas não tratadas (veículo). \*  $p<0,05$ ; \*\*\*\*  $p<0,0001$ ; a: veículo vs 30 $\mu M$  b: veículo vs 60 $\mu M$ . Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

Às 48 e 72 horas, após a exposição à berberina, assistiu-se a um não aumento estatisticamente significativo da viabilidade celular da linha celular LNCaP quer o tratamento seja efetuado com 15 ou com 30  $\mu M$  contrariamente ao observado na linha celular não tratada ( $p<0,0001$ ). É de salientar que as células tratadas com a dose mais alta de berberina, 30 $\mu M$ , foram as que exibiram uma perda significativa de células viáveis às 72 horas.

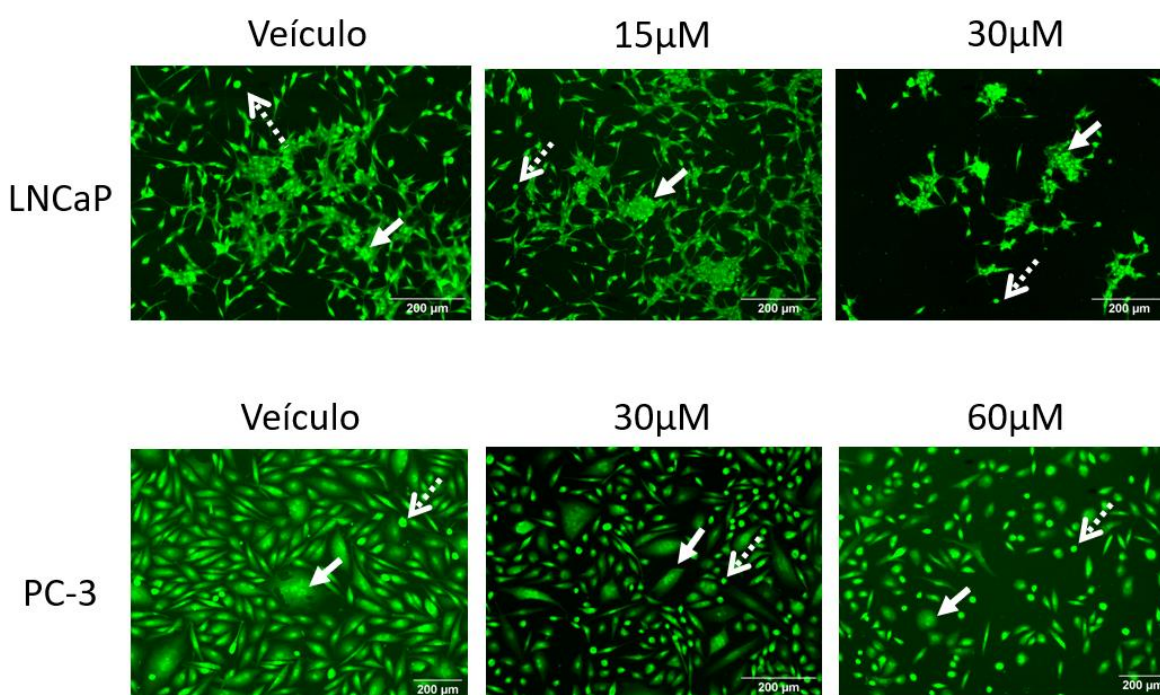
Uma análise da viabilidade celular da linha PC-3 (Figura 6), linha representativa de um cancro da próstata mais agressivo, ao longo do tempo, revela um decréscimo da viabilidade celular às 24 horas

seguida de um aumento substancial no número de células viáveis ao longo do tempo, isto é, às 48 e 72 horas. O tratamento desta linha celular com berberina leva a um aumento da viabilidade ao longo do tempo, embora este aumento seja menor do que o encontrado na linha celular não tratada. Esta diminuição na viabilidade celular é muito maior quando a linha celular é tratada com a dose maior de berberina, sendo as diferenças encontradas entre as linhas tratadas e a não tratada estatisticamente significativas, principalmente às 72 horas ( $p=0,0004$  para a dose de  $30\mu\text{M}$  e  $p<0,0001$  para a dose de  $60\mu\text{M}$ ) (Figura 6).

Estes resultados mostram que a berberina afeta negativamente o aumento da viabilidade celular da linha celular PC-3 e que não permite o aumento da viabilidade celular da linha LNCaP ao longo do tempo, podendo até levar a uma diminuição da viabilidade celular.

#### 4.1.2 Efeito da berberina na proliferação celular

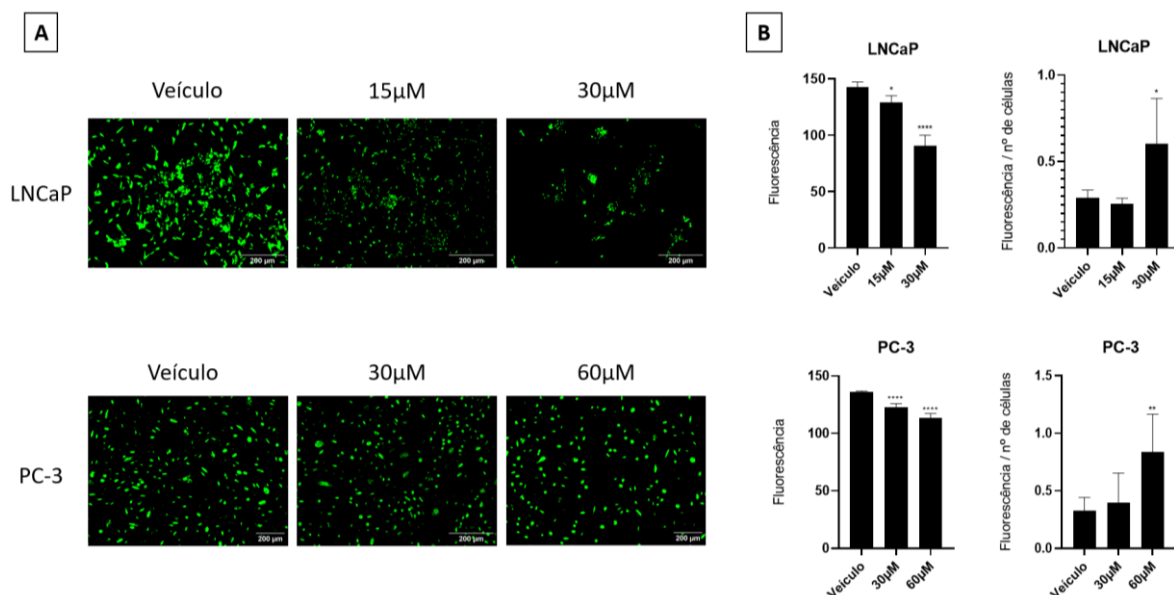
A avaliação do efeito da berberina na proliferação das linhas celulares LNCaP e PC-3 foi realizado 72 horas após exposição à berberina, através do kit EdU de fluorescência verde. Na Figura 7 estão registadas imagens fotográficas representativas dos ensaios realizados para as duas linhas celulares.



**Figura 7.** Avaliação do efeito da berberina na proliferação celular das linhas celulares LNCaP e PC-3 às 72 horas após exposição, através do ensaio EdU Green Fluorescence. As imagens foram obtidas através da captura de imagens com microscópio ótico invertido Zeiss Axio Imager Z1 com a objetiva 10x e posterior ajuste de brilho e contraste. Seta sólida- células com morfologia normal em proliferação nuclear visível; Seta pontilhada- células mais pequenas de conteúdo com intensidade fluorescente homogêneo.

Uma análise à Figura 7 revela que a marcação de fluorescência verde não está presente apenas no núcleo, facto que não era esperado, uma vez que o composto utilizado, EdU, é um análogo do nucleosídeo timidina e é incorporado no DNA aquando da síntese de novo DNA. Uma análise mais minuciosa permite detetar uma marcação nuclear notória em várias células, como demonstrado pelas setas a branco sólido, em que se observa diversos “pontos” verdes no núcleo demonstrando que a célula se encontra em estado proliferativo ocorrendo várias mitoses. De modo a se obter apenas a marcação nuclear para a quantificação da fluorescência nuclear, recorreu-se ao programa ImageJ Fiji e às ferramentas disponíveis do mesmo, ajustando-se o brilho e contraste assim como threshold (Figura 8A).

Depois de obtida a marcação nuclear quantificou-se a fluorescência assim como o número de células, utilizando-se para o efeito o programa ImageJ (Figura 8B).



**Figura 8.** Avaliação do efeito da berberina na proliferação celular das linhas celulares LNCaP e PC-3 através do ensaio EdU Green Fluorescence. A: imagens obtidas através da captura de imagens com microscópio ótico invertido Zeiss Axio Imager Z1 com a objetiva 10x e posterior ajuste com o threshold. B: quantificação de fluorescência e fluorescência/nº de células para cada linha celular. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em ambas as linhas celulares tratadas com berberina versus com as respetivas não tratadas (veículo). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*\*  $p < 0,001$ ; Dados apresentados com média de 2 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

Uma análise das imagens obtidas (Figura 8A) permitiu observar uma diminuição da fluorescência nas células tratadas quando comparadas com as não tratadas (controlo) em ambas as linhas celulares. Relativamente à linha celular LNCaP verificou-se uma diminuição da fluorescência após o tratamento com berberina, sendo este efeito mais notório no tratamento com a dose mais alta (30 μM). Na linha celular PC-3 o efeito da berberina na proliferação não foi tão notório, as células tratadas parecem exibir menor fluorescência comparativamente às células não tratadas (controlo) (Figura 8A), assim como foi

possível observar uma ligeira diminuição do número de células por poço nas células tratadas em comparação com as células não tratadas (Figura 8A).

Aquando da quantificação de fluorescência (Figura 8B) foi possível corroborar a análise das imagens capturadas uma vez que se verificou, na LNCaP, diferenças estatisticamente significativas entre células tratadas com veículo verificando-se uma menor intensidade de fluorescência nas células tratadas com maior dose (Figura 8B). Na linha PC-3 também se observa pequenas diferenças de intensidade de fluorescência, sendo estatisticamente significativas, entre as linhas celulares tratadas com berberina e a respectiva linha celular não tratada (controle).

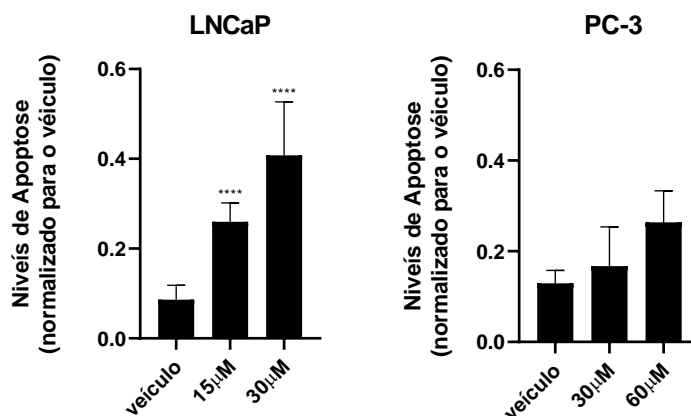
Após a quantificação do número de células foi calculado o valor de intensidade de fluorescência por número de células (Figura 8B). Na linha LNCaP assiste-se a um aumento estatisticamente significativo de fluorescência/nº células nas células tratadas com a dose mais alta de berberina quando comparado com o valor obtido para as células não tratadas. Para a linha celular PC-3 foi obtido um resultado semelhante onde se assiste a um aumento de fluorescência/nº células nas células tratadas com 60µM quando comparado com o valor encontrado para as células não tratadas.

Em ambas as linhas celulares, é possível verificar, através da análise de imagem (Figura 8A) assim como da quantificação (Figura 8B), que a berberina tem efeito negativo na proliferação celular. Este efeito negativo é estatisticamente significativo quando as células são tratadas com a dose mais alta de berberina.

#### **4.1.3 Efeito da berberina na apoptose celular**

A avaliação do efeito da berberina na apoptose das linhas celulares LNCaP e PC-3 foi realizado 72 horas após exposição à berberina, através do kit APOPercentage™, onde as células apoptóticas apresentam coloração, a qual foi quantificada para obtenção dos níveis de apoptose (73). Estes níveis de apoptose permitem perceber se a berberina têm ou não efeito na morte celular.

Uma análise aos resultados obtidos que se encontram representados graficamente na Figura 9, mostra que a berberina aumenta os níveis de apoptose, sendo este aumento dose dependente para ambas as duas linhas celulares. O aumento dos níveis de apoptose é particularmente notório e estatisticamente significativo quando o tratamento com berberina é realizado na linha celular LNCaP ( $p < 0,0001$ ), principalmente para o tratamento com a dose mais alta. Contrariamente, o tratamento da linha celular PC-3 com berberina causa um ligeiro aumento nos níveis de apoptose dose dependente, contudo estes valores não são estatisticamente significativos (Figura 9).



**Figura 9.** Avaliação do efeito da berberina na apoptose celular das linhas celulares LNCaP e PC-3, 72 horas após exposição, através do ensaio APOPercentage. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas na linha LNCaP tratada com berberina versus com a respetiva linha celular não tratada (veículo). \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Dados apresentados com média de 2 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

#### 4.1.4 Efeito da berberina na migração celular

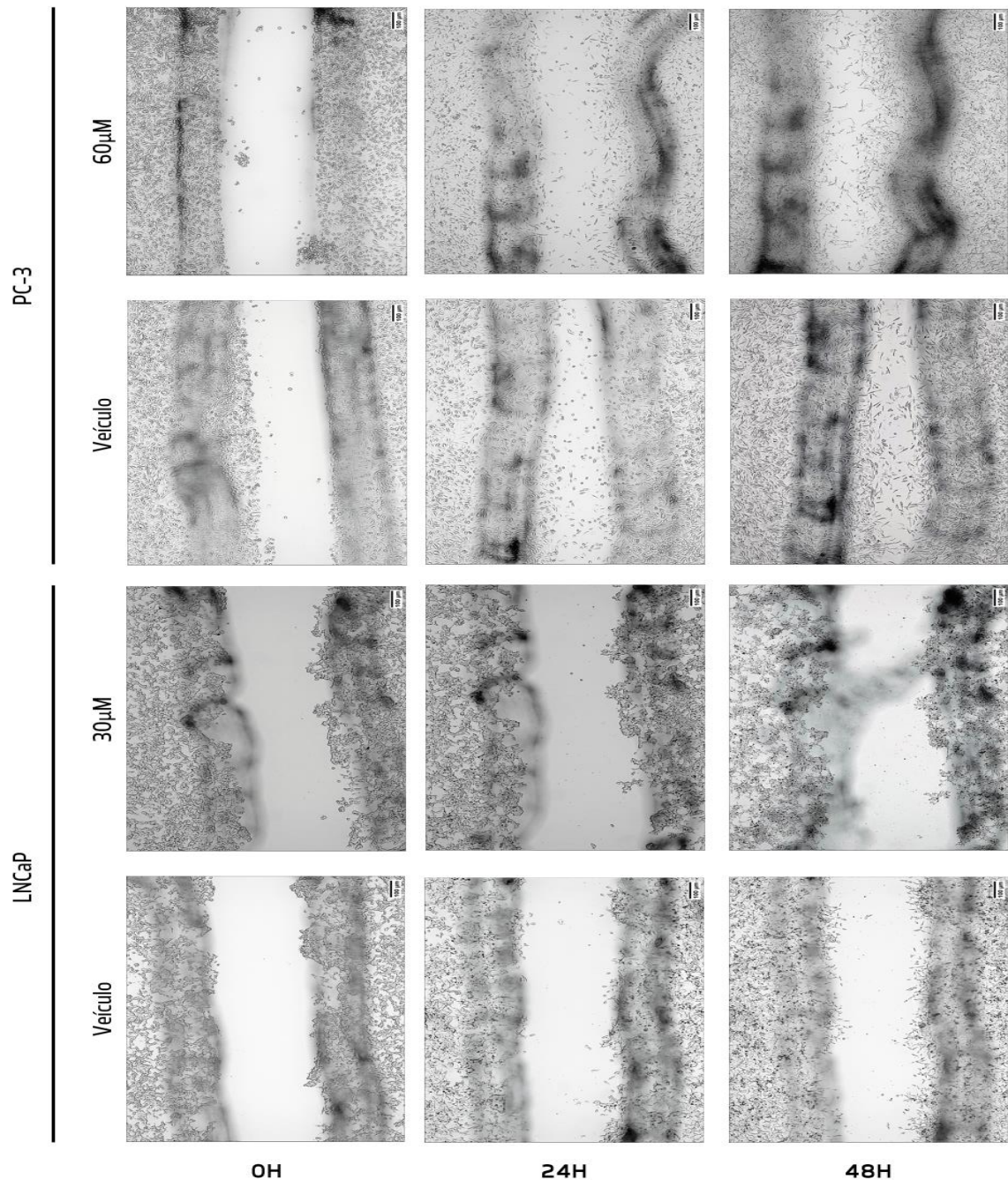
De modo a ser efetuado uma estimativa do efeito da berberina na prevenção/tratamento de metástases no cancro da próstata foi utilizado o ensaio de migração celular onde é realizado um rasgo na cultura celular, utilizando uma ponta de uma micropipeta, e, depois, é realizada uma monitorização microscópica e registado o tempo que demorou as células a “cobrirem” esse rasgo na totalidade (55). Durante o ensaio foram capturadas imagens que foram tratadas individualmente (Figura 10), recorrendo ao programa ImageJ, para analisar/quantificar a área inicial de cada rasgo e a área ao longo do período estudado de modo a efetuar o cálculo da taxa de migração (Figura 11).

Observando a Figura 10 foi possível constatar que as células LNCaP tratadas apresentavam uma migração mais lenta comparativamente à migração das células não tratadas. A linha celular PC-3 não tratada apresentou uma migração mais rápida comparativamente à migração da linha celular LNCaP não tratada, resultado que corrobora com a proveniência da linha celular PC-3, isto é, foi realizada a partir de um tumor de maior agressividade (Figura 10) (28). Apesar de não muito evidente, observou-se uma migração celular mais lenta das células PC-3 tratadas com berberina em comparação com a migração das células não tratadas (Figura 10).

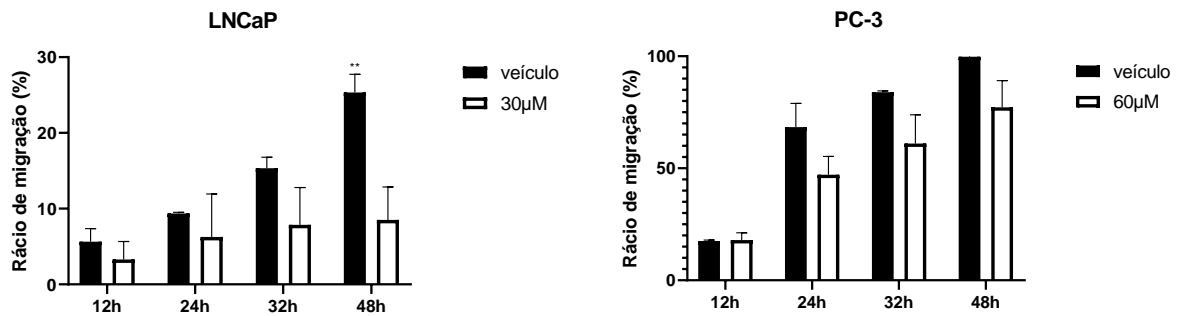
Os níveis de rácio de migração, em ambas as linhas celulares, aumentaram ao longo do tempo, principalmente para as células não tratadas (Figura 11). O tratamento da linha LNCaP com berberina levou a que o rácio de migração dessas células seja muito baixo comparativamente ao encontrado para as células não tratadas, sendo estas diferenças de migração estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) 48 horas após o tratamento com a berberina (Figura 11). O tratamento da linha celular PC-3 com berberina afeta ligeiramente a migração celular quando comparada com a migração observada pelas células PC-3 não tratadas, sendo estas diferenças evidentes a partir das 24 horas após exposição à

berberina. Contudo, as diferenças encontradas no rácio de migração entre as células tratadas com berberina e as não tratadas não são estatisticamente significativas.

Observou-se também uma maior migração das células tratadas em PC-3 em comparação com a LNCaP, como observado na Figura 11.



**Figura 10.** Efeito da berberina na migração celular na LNCaP e PC-3. As imagens foram fotografadas com o microscópio ótico invertido utilizando o programa LAZ EZ. As linhas escuras são representação da área inicial do rasgo.



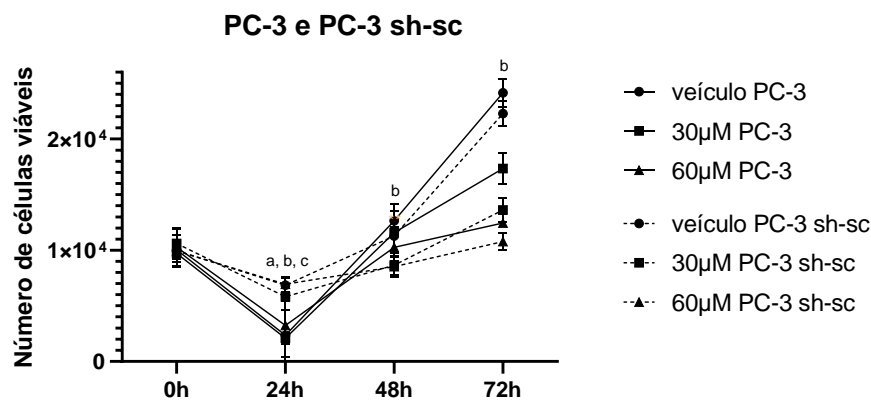
**Figura 11.** Efeito da berberina na migração celular na LNCaP e PC-3. Foram observadas diferenças significativas na linha celular LNCaP, após 48 horas de exposição à berberina. \*\*:  $p < 0,01$ . Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

## 4.2 Efeito da berberina dependente / independente de SMYD3

De modo a testar a hipótese de que o efeito da berberina é mediado via SMYD3, foram utilizadas duas linhas celulares manipuladas geneticamente, uma com a expressão da SMYD3 silenciada (PC-3 sh-smyd3) enquanto a outra tem apenas o mesmo construto que a linha celular silenciada, não sendo a expressão da SMYD3 afetada (PC-3 sh-sc; controlo).

A primeira abordagem efetuada foi averiguar se a linha celular manipulada geneticamente controlo (PC-3 sh-sc) tem um comportamento semelhante à linha celular de origem (PC-3) com e sem tratamento à berberina. Para tal foram realizados estudos de viabilidade celular, proliferação celular, apoptose e migração celular com estas duas linhas celulares (PC-3 sh-sc *versus* PC-3)

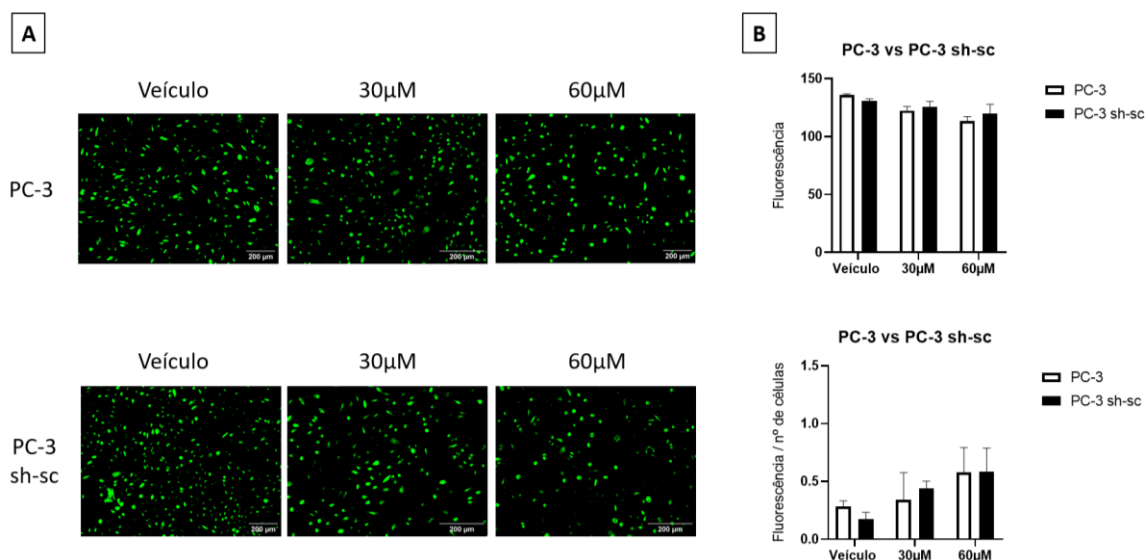
Por observação da Figura 12 foi possível verificar que em ambas as linhas celulares houve uma diminuição do número de células viáveis nas primeiras 24 horas, havendo diferenças estatisticamente significativas entre os veículos de ambas as linhas celulares ( $p < 0,0001$ ). Nessa altura (24 horas), também se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as linhas celulares (PC-3 e PC-3 sh-sc) quando são tratadas com berberina com 30µM ou 60µM ( $p < 0,01$ ) (Figura 12).



**Figura 12.** Avaliação do efeito da berberina na viabilidade das linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc através do ensaio MTT. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em ambas as linhas celulares tratadas com berberina *versus* com as respetivas não tratada (veículo). a: veículo PC-3 *vs* veículo PC-3 sh-sc; b: 30µM PC-3 *vs* 30µM PC-3 sh-sc; c: 60µM PC-3 *vs* 30µM PC-3 sh-sc. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

A partir das 24 horas de exposição à berberina, assistiu-se a um aumento do número de células viáveis em ambas as linhas celulares, quer estas fossem ou não tratadas com berberina. De referir que ambas as linhas celulares apresentaram um comportamento semelhante às 72 horas, existindo apenas uma diferença estatisticamente significativa ( $p=0,0003$ ) entre as linhas celulares tratadas com a menor dose de berberina ( $30\mu\text{M}$  PC-3 *versus*  $30\mu\text{M}$  PC-3 sh-sc). Foi possível verificar o efeito da berberina na viabilidade celular em ambas as linhas celulares, levando a uma diminuição do número de células viáveis nas linhas celulares tratadas quando comparada com o veículo. O efeito da berberina demonstrou ser mais eficaz na diminuição do aumento da viabilidade celular por exposição da dose mais alta.

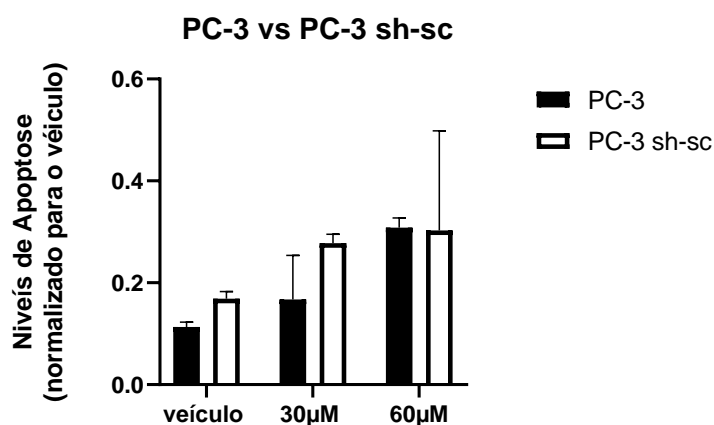
Relativamente à proliferação celular (Figura 13A), assistiu-se, para ambas as linhas celulares (PC-3 e PC-3 sh-sc), uma ligeira diminuição da fluorescência das células tratadas com berberina em comparação com as células não tratadas, sendo esta diferença mais evidente nas células tratadas com a dose mais alta de berberina. Em ambas as linhas celulares, foi observado também uma diminuição do número de células nos poços de células tratadas em comparação com as células controlo. Não se observaram diferenças de intensidade de fluorescência nem no número de células entre as linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc (Figura 13B).



**Figura 13.** Avaliação do efeito da berberina na proliferação celular das linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc através do ensaio EdU Green Fluorescence. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em ambas as linhas celulares tratadas com berberina versus com as respectivas não tratada (veículo). a: veículo PC-3 vs veículo PC-3 sh-sc; b:  $30\mu\text{M}$  PC-3 vs  $30\mu\text{M}$  PC-3 sh-sc; c:  $60\mu\text{M}$  PC-3 vs  $30\mu\text{M}$  PC-3 sh-sc. Dados apresentados com média de 2 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

Após quantificação de fluorescência (Figura 13B) foi possível corroborar o que foi observado na Figura 13A, havendo uma diminuição de fluorescência à medida que há um aumento da concentração de berberina comparando com o veículo, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre as linhas celulares.

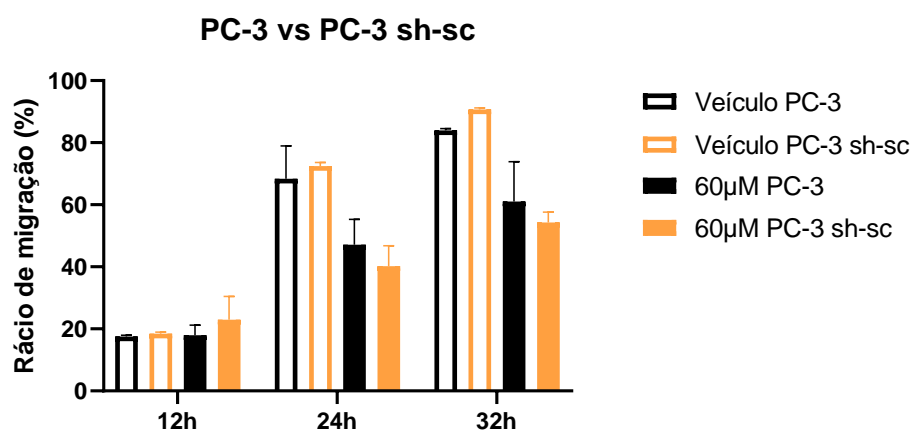
Pela representação cálculo fluorescência/nº células verificou-se uma diminuição ligeira na intensidade das células não tratadas das linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sh, embora não seja estatisticamente significativa, havendo um comportamento semelhante entre as células as linhas celulares tratadas e não tratadas, isto é, apresentaram uma proliferação semelhante (Figuras 13A e 13B). Relativamente aos níveis de apoptose encontrados para ambas as linhas celulares, verificou-se um aumento dos níveis de apoptose dose dependente, embora não se tenham encontrado diferenças estatisticamente significativas entre os valores encontrados para as células das linhas celulares tratadas e as linhas celulares não tratadas (Figura 14).



**Figura 14.** Avaliação do efeito da berberina na apoptose celular das linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc através do ensaio APOPercentage. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

Comparando os controlos de ambas as linhas celulares houve um ligeiro aumento dos níveis de apoptose da linha celular PC-3 sh-sc comparativamente à PC-3, mas esta diferença não é estatisticamente significativa (Figura 14). Fenómeno similar ocorreu, quando ambas as linhas celulares foram tratadas com uma dose 30µM de berberina (Figura 14). De salientar que se observou um aumento dos níveis de apoptose à medida que houve um aumento da concentração da berberina, sendo mais elevados nas células tratadas com 60µM. Os níveis de apoptose foram muito semelhantes em ambas as linhas celulares tratadas com 60 µM.

Relativamente ao ensaio de migração celular efetuado com as linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc tratadas com 60 µM de berberina ou não tratadas (Figura 15), verificou-se que às 32 horas a linha celular manipulada geneticamente (PC-3 sh-sc) não tratada “fechou a ferida”, o que significa que atingiu uma migração completa às 32 horas (Figura 15).

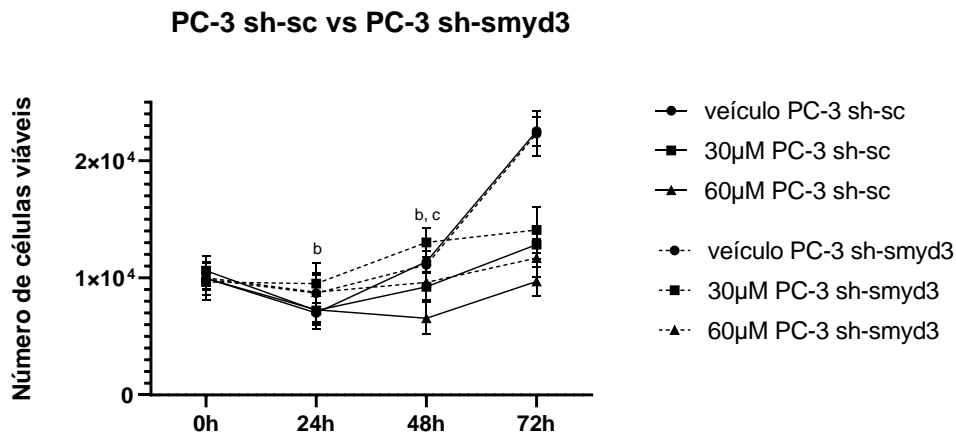


**Figura 15.** Avaliação do efeito da berberina na migração celular das linhas celulares PC3- e PC-3 sh-sc através do ensaio de migração celular. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

O rácio de migração relativo ao controlo, em ambas as linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc, aumentou ao longo do tempo, não existindo diferenças estatisticamente significativas entre estas linhas celulares não tratadas (PC-3 e PC-3 sh-sc) (Figura 15). O mesmo se verificou quando essas linhas celulares foram tratadas com berberina, isto é não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os rácios de migração das linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc tratadas com berberina. De referir que o rácio de migração das linhas celulares tratadas com a berberina é menor ao encontrado nas mesmas linhas celulares não tratadas ao longo do tempo.

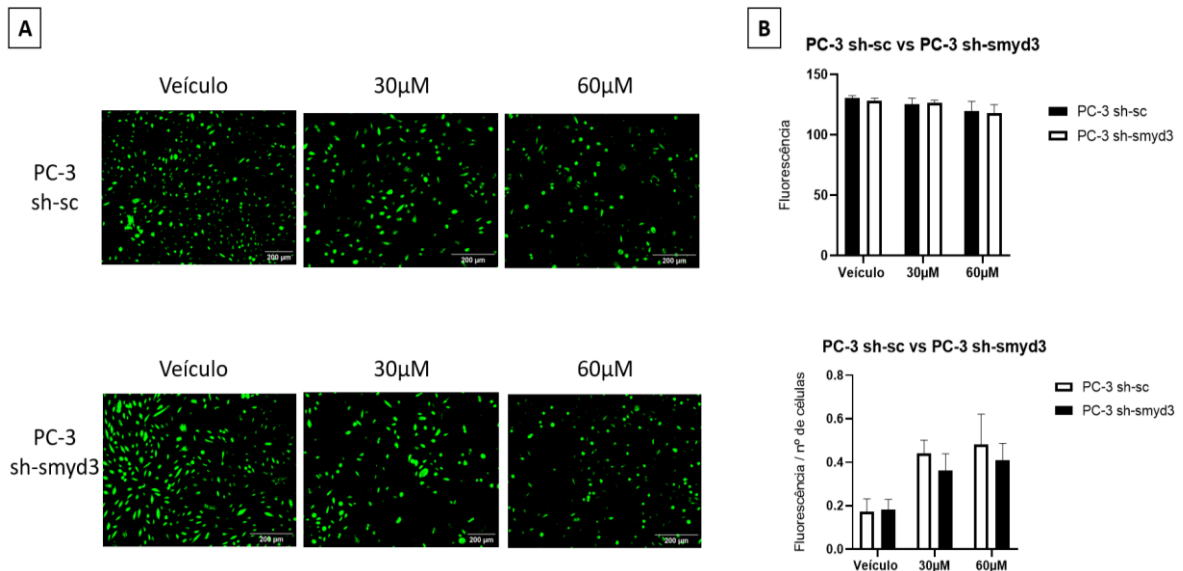
Os estudos funcionais apresentados revelaram que a linha de controlo PC-3 sh-sc apresenta um comportamento semelhante ao da linha PC-3, tendo a berberina demonstrado ter efeito em ambas as linhas celulares, pelo que foi possível proceder aos estudos funcionais com as linhas celulares PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3 para se averiguar se o efeito da Berberina é via SMYD3.

Relativamente ao efeito da berberina na viabilidade das linhas celulares PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3 (Figura 16), verificou-se que o tratamento com a berberina afeta negativamente a viabilidade celular uma vez que às 72 horas de exposição de berberina o número de células viáveis nas culturas das linhas celulares não tratadas é muito superior ao encontrado nas culturas das respetivas linhas celulares tratadas, sendo as diferenças estatisticamente significativas (Figura 16).



**Figura 16.** Avaliação do efeito da berberina na viabilidade das linhas celulares PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3 através do ensaio MTT. Foram observadas diferenças estatisticamente significativas em ambas as linhas celulares tratadas com berberina versus as respectivas linhas celulares não tratadas (veículo). *b* 24h:  $p < 0,05$  30µM PC-3 sh-sc vs 30µM PC-3; *b* 48h:  $p < 0,0001$  30µM PC-3 sh-sc vs 30µM PC-3; *c*: 48h:  $p < 0,01$  60µM PC-3 sh-sc vs 60µM PC-3 sh-smyd3.

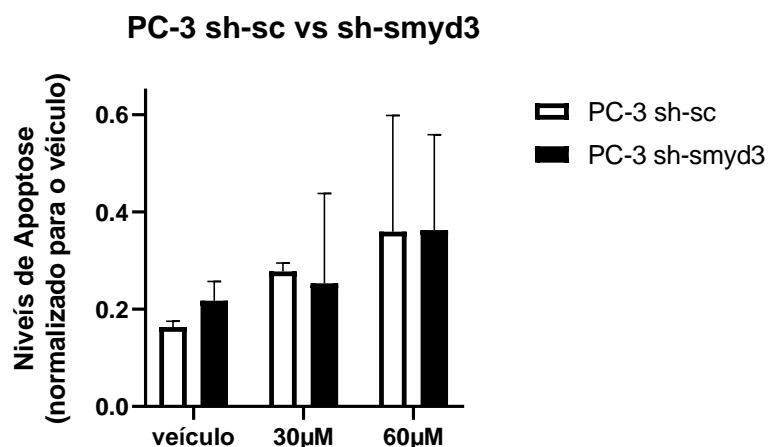
De salientar que não são observadas diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas celulares após 72 horas de exposição à berberina em qualquer uma das doses estudadas (Figura 16), resultado indicativo que o efeito da berberina observado na viabilidade celular não depende da SMYD3. Após se verificar que a berberina tinha efeito em ambas as linhas celulares e que o comportamento da linha celular que expressa SMYD3 é idêntico ao da linha celular silenciada avaliou-se se o silenciamento da SMYD3 influencia o efeito da berberina na proliferação celular (Figura 17).



**Figura 17.** Avaliação do efeito da berberina na proliferação celular das linhas celulares PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3 através do ensaio EdU Green Fluorescence. *A*: imagens obtidas através da captura de imagens com microscópio óptico invertido Zeiss Axio Imager Z1 com a objetiva 10x e posterior ajuste com o threshold. *B*: quantificação de fluorescência e fluorescência/nº de células para cada linha celular. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

Ambas as linhas celulares, a que expressa SMYD3 e a silenciada, demonstraram uma intensidade de fluorescência muito idêntica entre elas, quer sejam tratadas com berberina quer não sejam tratadas (Figura 17A) havendo uma diminuição da intensidade da fluorescência nas células tratadas em comparação com as células não tratadas, sendo esta diferença de intensidades mais evidente nas células tratadas com a dose mais alta de berberina (Figura 17A). As células tratadas com 60 $\mu$ M de berberina foram as que apresentaram menor intensidade de fluorescência em ambas as linhas celulares. Observou-se também um menor número de células nas culturas das linhas celulares tratadas com berberina comparativamente ao observado nas culturas das linhas celulares controlo. Após a quantificação de fluorescência (Figura 17B) foi possível confirmar a diminuição da intensidade de fluorescência em ambas as linhas celulares, principalmente quando foram tratadas com 60 $\mu$ M de berberina, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre a linha celular silenciada e a que expressa SMYD3. Posteriormente foi avaliada a intensidade de fluorescência por número de células observando-se uma tendência contrária, isto é, as linhas celulares tratadas apresentaram um aumento da intensidade de fluorescência por número de células à medida que a concentração de berberina aumentava quando comparadas com os respetivos controlos (Figura 17B). Ambas as linhas apresentaram comportamentos muito idênticos entre si, quer fossem expostas ou não à berberina, resultado indicativo que o efeito da berberina na proliferação celular não depende da expressão da SMYD3.

De forma avaliar se o silenciamento da SMYD3 influencia o efeito da berberina na indução da apoptose, foram comparados os níveis de apoptose entre a linha celular que expressa SMYD3 (PC-3 sh-sc) e a linha celular silenciada (PC-3 sh-smyd3) 72 horas após a exposição à berberina (Figura 18).



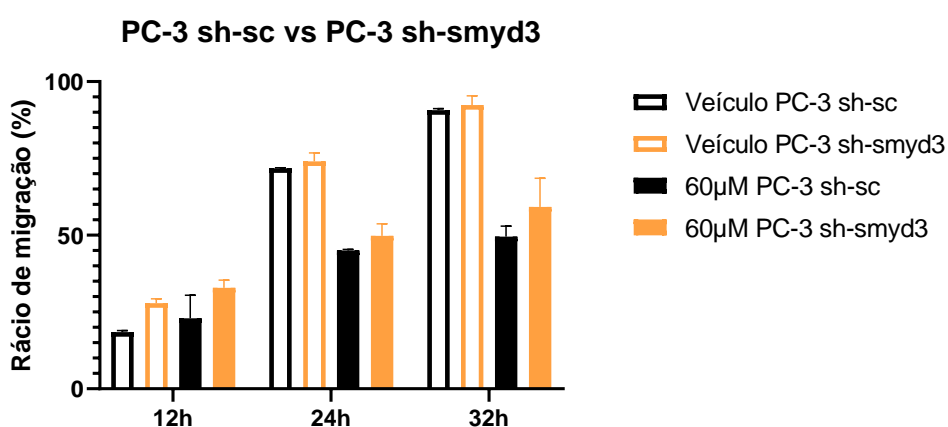
**Figura 18.** Avaliação do efeito da berberina na apoptose celular das linhas celulares PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3 através do ensaio APOPercentage. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

Uma análise à Figura 18 mostra que a berberina leva a um ligeiro aumento não estatisticamente significativo dos níveis de apoptose em ambas as linhas celulares, sendo este mais elevado nas

culturas tratadas com a dose mais alta, quando comparado com os níveis observados nas linhas celulares não tratadas. Nas linhas celulares controlo assistiu-se a um ligeiro aumento dos níveis de apoptose na linha celular silenciada em comparação com a linha que expressa SMYD3, embora, este aumento não seja estatisticamente significativo.

Os níveis de apoptose observado nas células tratadas com 30 $\mu$ M de berberina foram ligeiramente mais altos do que nas células PC-3 sh-sc, aumento este que não foi significativo. Nas células tratadas com 60 $\mu$ M, os níveis de apoptose em ambas as linhas são idênticas não havendo diferenças. Este resultado é indicativo que a berberina tem um efeito na apoptose celular uma vez que as linhas tratadas apresentaram níveis de apoptose mais altos, nomeadamente quando tratadas com a dose mais alta, contudo este efeito não depende da expressão da SMYD3.

Por fim, para avaliar se o efeito da berberina na migração celular era dependente ou não da expressão de SMYD3 comparou-se o rácio de migração celular da PC-3 sh-sc e da PC-3 sh-smyd3 quando tratadas com berberina (Figura 19).



**Figura 19.** Efeito da berberina na migração celular na PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3. Dados apresentados com média de 3 ensaios independentes  $\pm$  desvio padrão.

Ao analisar a Figura 19 verificou-se que os controlos de ambas as linhas celulares, PC-3 sh-sc e PC-3 sh-smyd3, apresentaram rácio de migração semelhantes, não havendo diferenças estatisticamente significativas nos tempos de exposição analisados, embora ocorra um aumento ao longo do tempo. Verificou-se que as células tratadas com berberina apresentaram um rácio de migração mais baixo quando comparadas com o respetivo controlo, o que indica que a berberina tem efeito na migração celular, sendo mais evidente na concentração 60 $\mu$ M (Figura 19). Para além disso não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as linhas celulares tratadas com uma dada dose, apresentando um comportamento idêntico entre si. Este resultado indica que o efeito da berberina na migração celular não depende da expressão da SMYD3

## 5. DISCUSSÃO

O cancro da próstata é uma doença maligna, a segunda mais frequente entre homens, sendo a sua prevalência ainda elevada nos dias de hoje (13). Grande parte dos tumores relatados após tratamento com TPA tornam-se resistentes à castração, levando à morte do indivíduo (9, 22, 39, 74). Existe uma grande necessidade da descoberta de novas terapias, mais conhecimento e uma melhor compreensão sobre os mecanismos e vias intervenientes na progressão e disseminação do cancro de modo a descobrir fármacos capazes de atuar nessas vias (47, 53, 59, 75).

Alguns estudos têm demonstrado que a berberina tem efeito no cancro da próstata, causando a indução da apoptose, afetando negativamente a viabilidade das células, inibindo a proliferação celular, entre outras (61, 62, 64).

Uma vez que a SMYD3 tem um nível de expressão elevado em CPRC (28) e a berberina tem algum efeito na regulação da expressão da SMYD3 em células de mieloma múltiplo (30), este estudo teve por base avaliar se o efeito da berberina no modelo de cancro da próstata é mediado via a regulação da expressão/atividade da SMYD3.

Neste estudo foram utilizadas duas linhas celulares: uma representativa de um cancro dependente de androgénio em estado inicial, LNCaP, e uma outra linha representativa de um cancro independente de androgénios em estado mais agressivo, PC-3, tendo ainda sido usadas duas linhas celulares, provenientes da PC-3, manipuladas geneticamente para uma delas não expressar a SMYD3.

De modo a ser utilizada uma concentração de berberina não tóxica para as células em cultura foram calculados os valores de  $IC_{50}$ , estando estes valores dentro do intervalo de valores calculados e utilizados em outros estudos (30, 50, 64, 69). Como esperado, o valor de  $IC_{50}$  da linha celular PC-3 foi superior (2x) ao da linha celular LNCaP, uma vez que a linha celular PC-3 representa uma linha independente de androgénios, sendo necessário uma maior concentração de berberina para inibir metade das células em cultura, dado se tratar de uma representação de um cancro mais agressivo, fato que está de acordo também com estudos anteriormente realizados (64).

Inicialmente foi avaliado o efeito da berberina na viabilidade celular das linhas celulares LNCaP e PC-3, tendo sido demonstrado que a berberina causa uma diminuição do número de células viáveis às 72 horas em ambas as linhas celulares, resultado que está de acordo com estudos anteriormente realizados em que a berberina demonstrou também ter efeito na viabilidade celular (55, 64). Em relação à linha celular LNCaP, a berberina demonstra ter efeito na diminuição do número de células havendo diferenças estatisticamente significativas entre o controlo e as células tratadas após 48 e 72 horas de tratamento com a berberina, sendo mais eficaz na dose mais alta.

Relativamente ao efeito da berberina na viabilidade celular da linha celular PC-3 foi constatado um decréscimo no número de células viáveis às 24 horas após o tratamento com berberina, decréscimo este que não foi ocorrido na linha celular LNCaP. Esta diminuição pode ser devido ao facto de as

concentrações de berberina utilizadas nesta linha celular serem maiores e, devido à berberina ser dissolvida em DMSO, ter influenciado o comportamento das células uma vez que o DMSO pode ser tóxico (76). Apesar de ter ocorrido uma diminuição no número de células viáveis a este tempo, há um aumento do número de células viáveis ao longo do tempo, o que demonstra que a berberina e o DMSO não foram tóxicos para as células. De referir que o efeito da berberina na viabilidade celular é muito pronunciado às 72 horas de exposição berberina em dose mais alta, em ambas as linhas celulares, LNCaP e PC-3.

A avaliação do efeito da berberina na proliferação celular foi realizada por um kit que marca as células em proliferação com fluorescência nuclear. A marcação fluorescente observada nas imagens capturadas (Figura 7) estava presente em toda a célula, resultado que não era esperado, uma vez que este kit utiliza um análogo do nucleosídeo timidina, o Edu, que incorpora no DNA aquando da síntese de novo DNA. Este kit foi escolhido por ser uma inovação ao ensaio BrdU pois este ensaio não precisa que ocorra a desnaturação do DNA para a deteção da incorporação do nucleosídeo, além da sua deteção ser mais rápida (ocorre em 30 minutos). Apesar disso, a observação das imagens com pormenor permitiu verificar uma marcação nuclear e a presença de mitoses, como identificado com as setas sólidas (Figura 7). De forma a se obter uma marcação mais específica dos núcleos corados foi utilizada a ferramenta *threshold*, do ImageJ Fiji (Figura 8). Através dessas imagens tratadas (Figura 8) foi possível verificar o efeito da berberina na proliferação celular, assistindo-se a uma diminuição da intensidade da fluorescência das células tratadas quando comparadas com a intensidade emitida pelas células não tratadas, sendo o efeito mais evidente nas células das linhas LNCaP e PC-3 tratadas com a dose de berberina de 30 $\mu$ M e 60 $\mu$ M respetivamente.

Os valores da quantificação da intensidade de fluorescência por número de células parecem ser contraditórios com o observado, uma vez que as células tratadas com maior concentração berberina apresentavam valores mais altos. Apesar de se ter verificado uma diminuição no número de células tratadas à medida que se usa doses mais altas de berberina comparativamente ao número de células não tratadas (controlo) observaram-se também a presença de células com uma emissão de fluorescência maior, identificadas por setas tracejadas (Figura 7). Estas células apresentavam uma morfologia diferente das células identificadas com setas sólidas.

As células identificadas com setas sólidas apresentavam uma morfologia coincidente com a morfologia normal das células, tanto as células da linha PC-3 como as da linha LNCaP, uma forma estrelada e espalhada, sendo que as células LNCaP, usualmente, crescem agrupadas, como observado na Figura 7. Foi possível também verificar nessas células, o núcleo e as mitoses que estavam a ocorrer. Já as células identificadas com setas ponteadas apresentavam uma forma "oval", forma esta que não é a forma normal das células das linhas celulares em estudo, não se observando o núcleo nem a presença de mitoses, mas apenas uma emissão grande e homogénea de fluorescência em toda a

células, ocorrendo este tipo celular em maior número nas células tratadas com concentração dose mais alta de berberina.

O facto de células apresentarem esta morfologia oval com uma intensidade de fluorescência elevada e homogénea por toda a célula fez com que, aquando utilização do *threshold* para a quantificação de fluorescência/nº de células, os valores fossem mais elevados na concentração mais alta de berberina, uma vez que foi nessa condição que se verificou um maior número de células com este tipo de morfologia.

Estas células, com uma morfologia oval identificadas com setas ponteadas, poderão ser células que se destacaram, uma vez que o ensaio foi realizado ao 3º dia após tratamento, ou células que estejam numa fase inicial de apoptose. Esta diferença de morfologia já tinha sido visualizada por um estudo de Yang *et al* em que foi avaliado o efeito da berberina em células de fibroblastos embrionários de ratos, tendo sido observado células em apoptose induzida pela berberina. Essas células em apoptose apresentavam uma mudança na sua morfologia, de uma forma estrelada para uma forma oval, o que está de acordo com o que foi observado neste estudo (77). Para além disso, através dos resultados obtidos com o ensaio de apoptose, para ambas a linhas celulares LNCaP e PC-3, verificou-se um aumento dos níveis de apoptose nas células tratadas com a dose de berberina mais alta comparativamente às células não tratadas (controlo) (Figura 9), facto indicativo que as células observadas com morfologia oval são células que se encontram numa fase inicial de apoptose. Esta morfologia celular e os valores contraditórios aquando da quantificação de fluorescência/nº de células foi recorrente nas outras linhas celulares em estudo.

Contudo, foi possível verificar o efeito da berberina na proliferação celular, assistindo-se a uma diminuição tanto do número de células como da intensidade de fluorescência nas células tratadas com berberina quando comparadas com os valores obtidos para as células não tratadas.

Devido ao ensaio de proliferação utilizado não ser encontrado na literatura como um ensaio comumente utilizado, seria interessante realizar um outro ensaio, como o ensaio BrdU, comumente utilizado, para averiguar se o padrão morfológico e coloração celular é semelhante e, assim validar este método que tem a vantagem de ser mais rápido (78).

Após se verificar que a berberina tinha efeito na proliferação celular foi avaliado o seu efeito na apoptose. Estudos anteriores mostram que a berberina induz a apoptose (62, 64). Este efeito é comprovado por este estudo, pois as células da linha celular LNCaP quando tratadas com berberina mostraram níveis de apoptose mais elevados comparativamente aos valores obtidos para as células não tratadas, sendo essas diferenças estatisticamente significativas, sendo os níveis de apoptose mais altos para as células tratadas com a dose mais alta.

Na linha celular PC-3 foi observado o mesmo efeito ao observado na linha LNCaP: um aumento dos níveis de apoptose à medida que se usa doses mais altas de berberina. Apesar de as doses utilizadas

nesta linha celular serem mais altas comparativamente às usadas na linha LNCaP, trata-se de uma linha representativa de um CPRC, mais agressivo, não se verificando níveis de apoptose tão altos como os encontrados na linha celular LNCaP. Contudo, observa-se que ambas as concentrações de berberina têm efeito na apoptose celular sendo mais eficaz a dose mais alta, 60 $\mu$ M, quando comparada com a obtida para a dose 30 $\mu$ M e para as células controlo. Em ambas as linhas celulares, LNCaP e PC-3, a berberina demonstrou ter um efeito na apoptose celular sendo maiores os seus níveis quando se usa a concentração mais alta em ambas as linhas celulares tendo sido este efeito demonstrado em outros estudos (63).

De forma a avaliar o potencial efeito da berberina como ferramenta para o tratamento ou retardo de metástases, foi realizado o ensaio de migração celular. O rácio de migração celular observado em células LNCaP tratadas com berberina é inferior comparativamente ao observado nas células controlo, principalmente às 48 horas onde se encontram diferenças estatisticamente significativas. É de referir que esse efeito da berberina na inibição da migração celular é visível desde as 12 horas de tratamento. Relativamente ao efeito da berberina na linha PC-3 existe uma diminuição do rácio de migração nas células tratadas quando comparadas com o valor encontrado para as células controlo a partir das 24 horas de tratamento, contudo, as diferenças encontradas não são estatisticamente significativas. De referir que há um aumento gradual do rácio de migração celular nas células tratadas, assim como no controlo ao longo do tempo. Outros estudos, em linhas celulares de CP e outras, demonstraram diferenças significativas na migração celular entre as células controlo e células tratadas com diferentes doses de berberina, confirmando a capacidade da berberina de inibir a migração celular, principalmente em concentrações elevadas (55, 79).

Uma vez que se verificou que a berberina, nas doses utilizadas, demonstrou ter efeito na viabilidade, proliferação, apoptose e migração celular foi avaliar-se o impacto da expressão ou ausência de SMYD3 nos efeitos da berberina nas linhas celulares de CP em estudo. Para tal, foram usadas duas linhas celulares, uma que expressa SMYD3 e outra que não expressa a SMYD3, a PC-3 sh-smyd3.

Uma vez que a linha PC-3 sh-smyd3 foi uma linha obtida por manipulação genética da PC-3, foi utilizado uma linha celular de controlo interno, a PC-3 sh-sc, também obtida por manipulação genética em que há expressão de SMYD3, comprovado através de Western Blot e RNA em um outro estudo prévio (28).

Inicialmente foi avaliada a viabilidade celular das linhas PC-3 e PC-3 sh-sc onde foi possível verificar o efeito da berberina na diminuição do número de células às 72h, registando-se uma diferença estatisticamente significativa entre as linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc quando tratadas com 30 $\mu$ M de berberina. Apesar de existir esta diferença, na generalidade, é observado um comportamento idêntico entre ambas as linhas celulares sem e com berberina, principalmente na sua dose mais alta.

Este comportamento também foi observado no ensaio da proliferação, não se tendo registado diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas celulares quando tratadas ou não com berberina, resultados que apoiam, mais uma vez, que ambas as linhas celulares apresentam comportamentos semelhantes e que a berberina atua de igual modo em ambas as linhas celulares.

Relativamente aos níveis de apoptose, o presente estudo mostrou que os níveis mais altos foram encontrados nas células tratadas com 60 $\mu$ M em ambas as linhas celulares. Apesar das células da linha PC-3 sh-sc apresentarem valores mais elevados de apoptose comparativamente com às da linha PC-3, estes valores não foram significativos, havendo um comportamento semelhante entre ambas as linhas celulares.

No que concerne à migração celular das linhas celulares PC-3 e PC-3 sh-sc, este estudo mostrou uma vez mais o efeito negativo da berberina na migração celular, levando a que as células tratadas com berberina demorassem mais tempo a migrar comparativamente às células controlo. Neste estudo não se registaram diferenças significativas entre a migração das duas linhas celulares quer fossem ou não tratadas com berberina, tendo um comportamento idêntico.

Após se verificar que a linha PC-3 sh-sc se comportava de modo semelhante/idêntico à linha celular PC-3, não existindo alterações significativas, avaliou-se se o comportamento da berberina era ou não dependente da expressão de SMYD3.

Assim, a viabilidade celular foi avaliada nas linhas celulares silenciadas, PC-3 sh-smyd3, e na linha celular controlo, PC-3 sh-sc. Foi demonstrado o efeito da berberina em ambas as linhas, ocorrendo uma diminuição do número de células viáveis às 72 horas, sendo esta diminuição mais notória nas células tratadas com a concentração mais alta. Comparando a linha silenciada com a que expressa SMYD3, não se observou diferenças significativas, sendo o comportamento semelhante entre ambas, o que indica que a berberina tem efeito na viabilidade celular, mas que o seu modo de atuação não é dependente da SMYD3.

Posteriormente foi avaliado a proliferação celular, tendo sido demonstrado, novamente, o efeito da berberina tanto nas células silenciadas como nas outras células que expressam SMYD3, havendo uma redução da fluorescência nas células tratadas comparativamente às células não tratadas (controlo), sendo a redução maior nas células tratadas com a dose mais alta. Ao se observar o comportamento das células silenciadas e as que expressam SMYD3, foi possível verificar um comportamento semelhante entre ambas, havendo uma diminuição da fluorescência com o aumento da dose da berberina, indicativo que a berberina tem efeito negativo na proliferação, levando a uma diminuição da proliferação celular, sendo o seu mecanismo de atuação independente da expressão de SMYD3.

Este comportamento também foi observado no ensaio de apoptose, não se tendo registado diferenças estatisticamente significativas entre as duas linhas celulares quando tratadas ou não com berberina,

resultados que apoiam, uma vez mais, que a berberina tem efeito na apoptose, como demonstrado em estudos anteriores, mas que o seu modo de atuação é independente da berberina.

Relativamente ao potencial efeito da berberina como ferramenta para o tratamento ou retardo de metástases e se o seu modo de atuação era dependente de SMYD3, foi realizado o ensaio de migração celular. Este estudo mostrou que a berberina tem um efeito negativo na migração celular levando a que as células tratadas com berberina demorassem mais tempo a migrar comparativamente às células controlo. Não se registaram diferenças significativas entre a linha silenciada e a que expressa SMYD3, tendo um comportamento idêntico, o que nos indica que o atraso na migração observado não depende da expressão da SMYD3.

Um estudo realizado por Wang *et al* demonstrou uma relação entre a berberina e a SMYD3 em células do mieloma múltiplo, tendo descrito uma diminuição dos níveis de metilação de resíduos de lisina à com o aumento da dose de berberina, havendo uma diminuição dos níveis da proteína H3KAm3, ou seja, uma diminuição da expressão da SMYD3. Este resultado indica que o efeito anti-tumoral da berberina é por meio da regulação epigenética (30). Face ao CPRC expressar elevados níveis de SMYD3 foi colocada a hipótese de existir uma relação semelhante entre a berberina com a SMYD3 no CP. Contudo, após os resultados do estudo realizado com as linhas celulares manipuladas geneticamente (uma que expressa a SMYD3 e outra silenciada para a SMYD3) foi possível demonstrar que o efeito anti-tumoral da berberina não depende da expressão da SMYD3, indicando que a berberina atua por mecanismos independentes da SMYD3.

## 6. CONCLUSÕES

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da berberina como potencial ferramenta terapêutica contra o CP, principalmente no tratamento de CP mais agressivo, o CPRC, para os quais não existe uma terapia eficaz. Um outro objetivo foi avaliar se o seu efeito anti-tumoral é dependente da expressão de SMYD3 uma vez que esta proteína tem uma expressão elevada no CPRC.

1. Os resultados do presente estudo apontam para que a berberina possa vir a ser utilizada em terapias alternativas para o CP, principalmente no tratamento de tumores agressivos.

- O tratamento da berberina na linha celular hormono dependente (LNCaP) mostrou que esta tem propriedades anti-tumorais afetando negativamente consideravelmente a viabilidade celular diminuir a proliferação celular e induzir a apoptose.
- O tratamento da berberina na linha celular mais agressiva proveniente de um CPRC (PC-3) mostrou que esta tem propriedades anti-tumorais afetando negativamente a viabilidade celular diminuir a proliferação celular e induzir a apoptose, além de ter um efeito negativo na migração celular, retardando a migração das células.
- A berberina tem efeito negativo na migração celular quer na linha celular hormono dependente (LNCaP) que na linha celular mais agressiva (PC-3), sugerindo que a berberina poderá ser usada como terapia secundária ou complemento de terapia primária para a prevenção da progressão do cancro e da doença metastática.

2. Os resultados do presente estudo mostraram que o efeito anti-tumoral da berberina em cancros muito agressivos (CPRC) não dependente da expressão de SMYD3, o que sugere que o efeito anti-tumoral da berberina é mediado por outras vias.

Pelo exposto, será importante identificar e dissecar quais as vias de atuação da berberina no CP mais agressivo (CPRC) para aumentar o conhecimento dessas vias, assim como a sua relação com outras vias, conhecimento este que poderá permitir a identificação de biomoléculas como biomarcadores para direcionamento de esquemas terapêuticos com a berberina.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wang G, Zhao D, Spring DJ, Depinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & Development*. 2018;32(17-18):1105-40.
2. Vellky JE, Ricke WA. Development and prevalence of castration-resistant prostate cancer subtypes. *Neoplasia*. 2020;22(11):566-75.
3. Pejčić T, Tosti T, Džamić Z, Gašić U, Vuksanović A, Dolićanin Z, et al. The Polyphenols as Potential Agents in Prevention and Therapy of Prostate Diseases. *Molecules*. 2019;24(21):3982.
4. Lee SH, Shen MM. Cell types of origin for prostate cancer. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015;37:35-41.
5. Miyahira AK, Sharp A, Ellis L, Jones J, Kaochar S, Larman HB, et al. Prostate cancer research: The next generation; report from the 2019 Coffey-Holden Prostate Cancer Academy Meeting. *The Prostate*. 2020;80:113-32.
6. Nevo A, Navaratnam A, Andrews P. Prostate cancer and the role of biomarkers. *Abdominal Radiology*. 2020;45(7):2120-32.
7. Vlajnic T, Bubendorf L. Molecular pathology of prostate cancer: a practical approach. *Pathology*. 2021;53(1):36-43.
8. Zhao X, Lei Y, Li G, Cheng Y, Yang H, Xie L, et al. Integrative analysis of cancer driver genes in prostate adenocarcinoma. *Molecular Medicine Reports*. 2019.
9. Maurie Markman M, President, Medicine & Science at CTCA. Prostate cancer type Cancer Treatment Centers of America 2021 [Available from: <https://www.cancercenter.com/cancer-types/prostate-cancer/types>].
10. Tan ME, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E-L. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2015;36(1):3-23.
11. Aurilio G, Cimadamore A, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Verri E, Scarpelli M, et al. Androgen Receptor Signaling Pathway in Prostate Cancer: From Genetics to Clinical Applications. *Cells*. 2020;9(12):2653.
12. Montironi R, Cimadamore A, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Aurilio G, Santoni M, et al. Morphologic, Molecular and Clinical Features of Aggressive Variant Prostate Cancer. *Cells*. 2020;9(5):1073.
13. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71(3):209-49.
14. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 2018;68(6):394-424.
15. Perner CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. 2018;8(12):a030361.
16. Byrne MM, Davila EP, Zhao W, Parker D, Hooper MW, Caban-Martinez A, et al. Cancer screening behaviors among smokers and non-smokers. *Cancer Epidemiology*. 2010;34(5):611-7.
17. Kenfield SA, Stampfer MJ, Chan JM, Giovannucci E. Smoking and prostate cancer survival and recurrence. *JAMA*. 2011;305(24):2548-55.
18. Sehn JK. Prostate Cancer Pathology: Recent Updates and Controversies. *Mo Med*. 2018;115(2):151-5.
19. Zhao X, Lei Y, Li G, Cheng Y, Yang H, Xie L, et al. Integrative analysis of cancer driver genes in prostate adenocarcinoma. *Mol Med Rep*. 2019;19(4):2707-15.
20. Priolo C, Pyne S, Rose J, Regan ER, Zadra G, Photopoulos C, et al. AKT1 and MYC induce distinctive metabolic fingerprints in human prostate cancer. *Cancer Res*. 2014;74(24):7198-204.
21. Huang QL, Whittington T, Gao P, Lindberg JF, Yang YH, Sun JL, et al. A prostate cancer susceptibility allele at 6q22 increases RFX6 expression by modulating HOXB13 chromatin binding. *Nat Genet*. 2014;46(2):126-+.
22. Yegnasubramanian S. Prostate cancer epigenetics and its clinical implications. *Asian J Androl*. 2016;18(4):549-58.

23. Bottino C, Peserico A, Simone C, Caretti G. SMYD3: An Oncogenic Driver Targeting Epigenetic Regulation and Signaling Pathways. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1).
24. Bernard BJ, Nigam N, Burkitt K, Saloura V. SMYD3: a regulator of epigenetic and signaling pathways in cancer. *Clin Epigenetics*. 2021;13(1):45.
25. Vieira FQ, Costa-Pinheiro P, Ramalho-Carvalho J, Pereira A, Menezes FD, Antunes L, et al. Deregulated expression of selected histone methylases and demethylases in prostate carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2014;21(1):51-61.
26. Sawan C, Vaissiere T, Murr R, Herceg Z. Epigenetic drivers and genetic passengers on the road to cancer. *Mutat Res*. 2008;642(1-2):1-13.
27. Huang L, Xu AM. SET and MYND domain containing protein 3 in cancer. *Am J Transl Res*. 2017;9(1):1-14.
28. Vieira FQ, Costa-Pinheiro P, Almeida-Rios D, Graça I, Monteiro-Reis S, Simões-Sousa S, et al. SMYD3 contributes to a more aggressive phenotype of prostate cancer and targets Cyclin D2 through H4K20me3. *Oncotarget*. 2015;6(15):13644-57.
29. Park SH, Fong KW, Mong E, Martin MC, Schiltz GE, Yu J. Going beyond Polycomb: EZH2 functions in prostate cancer. *Oncogene*. 2021;40(39):5788-98.
30. Wang Z, Liu Y, Xue Y, Hu H, Ye J, Li X, et al. Berberine acts as a putative epigenetic modulator by affecting the histone code. *Toxicology in Vitro*. 2016;36:10-7.
31. Luo XG, Zhang CL, Zhao WW, Liu ZP, Liu L, Mu A, et al. Histone methyltransferase SMYD3 promotes MRTF-A-mediated transactivation of MYL9 and migration of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Lett*. 2014;344(1):129-37.
32. Cock-Rada AM, Medjkane S, Janski N, Yousfi N, Perichon M, Chaussepied M, et al. SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. *Cancer Res*. 2012;72(3):810-20.
33. Zhang H, Zheng Z, Zhang R, Yan Y, Peng Y, Ye H, et al. SMYD3 promotes hepatocellular carcinoma progression by methylating S1PR1 promoters. *Cell Death Dis*. 2021;12(8):731.
34. Ponnusamy L, Kothandan G, Manoharan R. Berberine and Emodin abrogates breast cancer growth and facilitates apoptosis through inactivation of SIK3-induced mTOR and Akt signaling pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 2020;1866(11):165897.
35. Peserico A, Germani A, Sanese P, Barbosa AJ, Di Virgilio V, Fittipaldi R, et al. A SMYD3 Small-Molecule Inhibitor Impairing Cancer Cell Growth. *J Cell Physiol*. 2015;230(10):2447-60.
36. Zhang H, Zheng Z, Zhang R, Yan Y, Peng Y, Ye H, et al. SMYD3 promotes hepatocellular carcinoma progression by methylating S1PR1 promoters. *Cell Death & Disease*. 2021;12(8).
37. Carlsson SV, Vickers AJ. Screening for Prostate Cancer. *Medical Clinics of North America*. 2020;104(6):1051-62.
38. Pezaro C, Woo HH, Davis ID. Prostate cancer: measuring PSA. *Intern Med J*. 2014;44(5):433-40.
39. Kim J, Coetzee GA. Prostate specific antigen gene regulation by androgen receptor. *J Cell Biochem*. 2004;93(2):233-41.
40. Merriel SWD, Funston G, Hamilton W. Prostate Cancer in Primary Care. *Adv Ther*. 2018;35(9):1285-94.
41. E. Alonso-Sandoicauma JJ-R, JI Martínez-Salamancabe C. Hernandez-Fernandezb. Validez diagnóstica del tacto rectal en la era del antígeno específico de la próstata. *ORIGINALES*. 2006;37:9-13.
42. Nguyen-Nielsen M, Borre M. Diagnostic and Therapeutic Strategies for Prostate Cancer. *Seminars in Nuclear Medicine*. 2016;46(6):484-90.
43. Montironi R, Mazzucchelli R, Algaba F, Bostwick DG, Krongrad A. Prostate-specific antigen as a marker of prostate disease. *Virchows Arch*. 2000;436(4):297-304.
44. Srigley JR, Delahunt B, Samaratinga H, Billis A, Cheng L, Clouston D, et al. Controversial issues in Gleason and International Society of Urological Pathology (ISUP) prostate cancer grading: proposed recommendations for international implementation. *Pathology*. 2019;51(5):463-73.

45. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol.* 2016;40(2):244–52.
46. Swanson GP, Trevathan S, Hammonds KAP, Speights VO, Hermans MR. Gleason Score Evolution and the Effect on Prostate Cancer Outcomes. *Am J Clin Pathol.* 2021;155(5):711–7.
47. Singla RK, Sharma P, Dubey AK, Gundamaraju R, Kumar D, Kumar S, et al. Natural Product-Based Studies for the Management of Castration-Resistant Prostate Cancer: Computational to Clinical Studies. *Front Pharmacol.* 2021;12:732266.
48. Mateo J, Seed G, Bertan C, Rescigno P, Dolling D, Figueiredo I, et al. Genomics of lethal prostate cancer at diagnosis and castration resistance. *Journal of Clinical Investigation.* 2020;130(4):1743–51.
49. Carioli G, Bertuccio P, Boffetta P, Levi F, La Vecchia C, Negri E, et al. European cancer mortality predictions for the year 2020 with a focus on prostate cancer. *Ann Oncol.* 2020;31(5):650–8.
50. Li X, Zhang A, Sun H, Liu Z, Zhang T, Qiu S, et al. Metabolic characterization and pathway analysis of berberine protects against prostate cancer. *Oncotarget.* 2017;8(39):65022–41.
51. Kallifatidis G, Hoy JJ, Lokeshwar BL. Bioactive natural products for chemoprevention and treatment of castration-resistant prostate cancer. *Semin Cancer Biol.* 2016;40–41:160–9.
52. Wang XN, Fang G, Pang YZ. Chinese Medicines in the Treatment of Prostate Cancer: From Formulas to Extracts and Compounds. *Nutrients.* 2018;10(3).
53. Liu D, Meng X, Wu D, Qiu Z, Luo H. A Natural Isoquinoline Alkaloid With Antitumor Activity: Studies of the Biological Activities of Berberine. *Front Pharmacol.* 2019;10:9.
54. Sut S, Faggian M, Baldan V, Poloniato G, Castagliuolo I, Grabnar I, et al. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) to Enhance Berberine Absorption: An In Vivo Pharmacokinetic Study. *Molecules.* 2017;22(11).
55. Liu CH, Tang WC, Sia P, Huang CC, Yang PM, Wu MH, et al. Berberine inhibits the metastatic ability of prostate cancer cells by suppressing epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-associated genes with predictive and prognostic relevance. *Int J Med Sci.* 2015;12(1):63–71.
56. Habtemariam S. Berberine pharmacology and the gut microbiota: A hidden therapeutic link. *Pharmacological Research.* 2020;155:104722.
57. Zou K, Li Z, Zhang Y, Zhang HY, Li B, Zhu WL, et al. Advances in the study of berberine and its derivatives: a focus on anti-inflammatory and anti-tumor effects in the digestive system. *Acta Pharmacol Sin.* 2017;38(2):157–67.
58. Imenshahidi M, Hosseinzadeh H. Berberine and barberry (*Berberis vulgaris*): A clinical review. *Phytotherapy Research.* 2019;33(3):504–23.
59. Och A, Podgórski R, Nowak R. Biological Activity of Berberine—A Summary Update. *Toxins.* 2020;12(11):713.
60. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010;141(1):52–67.
61. Rauf A, Abu-Izneid T, Khalil AA, Imran M, Shah ZA, Emran TB, et al. Berberine as a Potential Anticancer Agent: A Comprehensive Review. *Molecules.* 2021;26(23):7368.
62. Mantena SK, Sharma SD, Katiyar SK. Berberine, a natural product, induces G1-phase cell cycle arrest and caspase-3-dependent apoptosis in human prostate carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(2):296–308.
63. Huang ZH, Zheng HF, Wang WL, Wang Y, Zhong LF, Wu JL, et al. Berberine targets epidermal growth factor receptor signaling to suppress prostate cancer proliferation in vitro. *Mol Med Rep.* 2015;11(3):2125–8.
64. Choi. Myoung Suk, Oh. Ju Hooh, Kim. Sun Mi, Jung. Hai Young, Yoo. Hwan So, Lee. Yong Moon, et al. Berberine inhibits p53-dependent cell growth through induction of apoptosis of prostate cancer cells. *International Journal of Oncology.* 2009.
65. Xiang Y, Guo Z, Zhu P, Chen J, Huang Y. Traditional Chinese medicine as a cancer treatment: Modern perspectives of ancient but advanced science. *Cancer Medicine.* 2019;8(5):1958–75.

66. Liu C, Wang C, Wang K, Liu L, Shen Q, Yan K, et al. SMYD3 as an Oncogenic Driver in Prostate Cancer by Stimulation of Androgen Receptor Transcription. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 2013;105(22):1719–28.
67. Vieira FQ, Marques–Magalhães Â, Miranda–Gonçalves V, Ferraz R, Vieira M, Prudêncio C, et al. The Impact of [C16Pyr][Amp] on the Aggressiveness in Breast and Prostate Cancer Cell Lines. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21(24):9584.
68. Sun C, Zhao X, Xu K, Gong J, Liu W, Ding W, et al. Periostin: a promising target of therapeutical intervention for prostate cancer. *J Transl Med*. 2011;9:99.
69. Liu L, Fan J, Ai G, Liu J, Luo N, Li C, et al. Berberine in combination with cisplatin induces necroptosis and apoptosis in ovarian cancer cells. *Biological Research*. 2019;52(1).
70. Kupcsik L. Estimation of cell number based on metabolic activity: the MTT reduction assay. *Methods Mol Biol*. 2011;740:13–9.
71. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237–45.
72. Abbkine. EdU Proliferation Image Kit (Green Fluorescence). 2021.
73. Cell-APOPercentage Apoptosis Assay 2008 [
74. Fujita K, Nonomura N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health*. 2019;37(3):288–95.
75. Guamán Ortiz L, Lombardi P, Tillhon M, Scovassi A. Berberine, an Epiphany Against Cancer. *Molecules*. 2014;19(8):12349–67.
76. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, et al. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Sci Rep*. 2019;9(1):4641.
77. Yang IW, Chou CC, Yung BY. Dose-dependent effects of berberine on cell cycle pause and apoptosis in Balb/c 3T3 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1996;354(2):102–8.
78. Lei H, Ma F, Jia R, Tan B. Effects of Arf6 downregulation on biological characteristics of human prostate cancer cells. *Int Braz J Urol*. 2020;46(6):950–61.
79. Gu Y, Zhou Z. Berberine inhibits the proliferation, invasion and migration of endometrial stromal cells by downregulating miR429. *Mol Med Rep*. 2021;23(6).