

## EXTRATO DE *ANDROGRAPHIS PANICULATA* COMO MODULADOR DA IMUNIDADE CONTRA O CÂNCER VIA INIBIÇÃO DA TELOMERASE

Alireza Valdiani<sup>1,2</sup> -  Hamideh Ofoghi<sup>1</sup> - Em  Mahbubeh Akbari<sup>1</sup> - · Daryush  Precioso<sup>3</sup>

Recebido: 30 May 2022 / Aceito: 20 September 2022 / Publicado online: 10 October 2022

© Cidade do Rei Abdulaziz para Ciência e Tecnologia 2022

### RESUMO

De acordo com a importância da inibição da telomerase como um alvo potencial na terapia do câncer e os crescentes relatos sobre a associação entre telômeros curtos e sintomas graves de COVID-19, bem como a aplicação extensiva de *Andrographis paniculata* como remédio para câncer e SARS-CoV-2, o presente estudo teve como objetivo investigar o impacto dos extratos da planta na atividade da telomerase (como uma importante enzima reguladora do comprimento dos telômeros). A inibição da telomerase em células MCF-7 tratadas com os extratos de diclorometano, etanol, água e metanol de *A. paniculata* foi avaliada usando o Protocolo de Amplificação Repetida da Telomerase (TRAP). Os extratos acima mencionados inibiram a telomerase em  $80,3 \pm 1,4\%$ ,  $78,5 \pm 1,35\%$ ,  $77,5 \pm 1,81\%$  e  $73,7 \pm 1,81\%$ , respectivamente. Além disso, a análise por citometria de fluxo mostrou que os extratos aquoso e metanólico induziram maiores taxas de apoptose total em 32,8% e 25%, respectivamente, em comparação com os extratos de diclorometano (10,07%) e etanol (10,7%). O efeito inibitório de *A. paniculata* na atividade da telomerase pode ser considerado como um potencial modulador da imunidade na terapia do câncer; no entanto, a inibição da telomerase como uma abordagem segura para o SARS-CoV-2 é discutível. Dois mecanismos podem ser considerados em conformidade; (a) reduzir a população existente de telômeros curtos por meio da inibição da telomerase em células cancerígenas (interrompendo a proliferação e, finalmente, a morte celular) pode diminuir a suscetibilidade contra o SARS-CoV-2, especialmente em pacientes com câncer ou pacientes propensos ao câncer, e (b) aumentar a população de telômeros curtos por meio da inibição da telomerase em células normais/somáticas pode aumentar a suscetibilidade contra o SARS-CoV-2. Portanto, a inibição da telomerase de *A. paniculata* como modulador da imunidade no câncer e COVID-19 deve ser investigada com cuidado.

**Palavras-chave:** TRAP-ELISA · Telômero curto · Câncer · SARS-CoV-2

### 1. INTRODUÇÃO

*Andrographis paniculata* Nees é uma planta herbácea anual da família Acanthaceae, nativa do sudeste da Ásia (Valdiani et al. 2012). Esta planta desempenhou um papel notável para deter a propagação da pandemia global de gripe (especialmente na Índia) durante 1918-1919 (Hancke et al. 1995; Sharma et al. 2009). Os compostos bioativos mais importantes de *A. paniculata* são andrographolide (AG), 14-Deoxy-11,12-di-dehydroandrographolide (DDAG) e neoandrographolide (NAG) (Valdiani et al. 2017). A erva tem se mostrado importantes propriedades terapêuticas, como propriedades antivirais e anti-inflamatórias, (Gupta et al. 2017), bem como efeitos anticancerígenos (Suriyo et al. 2021), principalmente por causa do andrographolide. Diferentes mecanismos anticancerígenos do andrographolide, como parada do ciclo celular e apoptose (Suriyo et al. 2014), inibição de NF- $\kappa$ B (Mishra 2021), antiangiogênese (Dai et al. 2017), regulação do citocromo P400 e P450s (Suriyo et al. 2021) e inibição de citocinas (Li et al. 2017), foram compilados e revisados, recentemente (Malik et al. 2021). O efeito modulador de *A. paniculata* sobre o câncer tem sido atribuído aos seus efeitos sobre os supressores tumorais, como o p53 (Zhau et al. 2008; Sato et al. 2018).

A telomerase é uma enzima responsável pela regulação do comprimento dos telômeros em eucariotos. Em geral, a ativação e a inibição da telomerase resultam no alongamento (manutenção) e

encurtamento dos telômeros, respectivamente (Aviv et al. 2017). Esses mecanismos provavelmente evoluíram contra o envelhecimento e o desenvolvimento do câncer (Shay 2016). Às vezes, mutações genômicas levam à reconstituição e ao tráfico de telomerase e, finalmente, ao início do câncer e ao desenvolvimento do tumor (Aviv et al. 2017). Hipoteticamente, sob tais circunstâncias, a reativação da telomerase causa divisão celular excessiva (Smith et al. 2003) e encurtamento dos telômeros, em vez da manutenção dos telômeros (Jafri et al. 2016).

Portanto, a manutenção dos telômeros, por meio da reativação da telomerase e da expressão da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT), é uma marca comum das células cancerígenas para apoiar a imortalidade replicativa contra a senescência replicativa (Guterres e Villanueva 2020). Em contraste, a atividade da telomerase é silenciada na maioria das células somáticas adultas. Apesar do paradoxo do comprimento câncer-telômero (Aviv et al. 2017), o comprimento dos telômeros nos tumores é geralmente menor do que o do tecido normal correspondente (Barthel et al. 2017). Considerando esses fatos, a inibição da atividade da telomerase tem sido sugerida como um potencial alvo na terapia do câncer, desde meados dos anos 90 [Kim et al. 1994; Holt e Shay 1999; Zhang et al. 1999], até recentemente (Guterres e Villanueva 2020; Liu et al. 2019).

Na verdade, a ligação relacionada aos telômeros/telomerase efeitos de *A. paniculata* raramente foram sujeitos a qualquer investigação. Neste sentido, o único esforço valioso foi feito por Budiatin et al. (2021). Seu objetivo foi avaliar o efeito do extrato de *A. paniculata* na proliferação de células de câncer de pulmão e indução de morte celular anormal. Os resultados mostraram que o extrato inibiu o desenvolvimento de câncer no estágio de hiperplasia, reduzindo a atividade da telomerase e aumentando a apoptose, "qualitativamente", que foi marcada por um aumento da expressão da caspase-3 (Budiatin et al. 2021).

Portanto, considerando a falta de qualquer evidência "quantitativa", a presente pesquisa tendeu a avaliar o impacto direto de diferentes extratos de *A. paniculata* na inibição da "telomerase", quantitativamente em nível genômico, usando o Telomerase Repeated Amplification Protocol—Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (TRAP-ELISA), como objetivo principal. Além disso, o efeito da polaridade do solvente na toxicidade e inibição da telomerase dos extratos de *A. paniculata* foi avaliado como uma variável dependente. Para esse fim, quatro extratos diferentes de *A. paniculata*, incluindo etanol, metanol, diclorometano (DCM) e extratos aquosos foram aplicados às linhagens de células cancerígenas da Michigan Cancer Foundation-7 (MCF-7).

O ensaio TRAP é uma abordagem genômica confiável e rápida para avaliar a inibição da telomerase. O ensaio é considerado uma técnica baseada em reação em cadeia da polimerase (PCR) que não está envolvida com nenhum procedimento de coloração complicado e métodos/equipamentos de imagem (Mender e Shay 2015).

Um objetivo secundário do presente artigo é discutir a inibição da telomerase como um potencial alvo terapêutico na Síndrome Respiratória Aguda Grave Coronavírus 2 (SARS-CoV-2), uma vez que relatos de telômeros curtos em pacientes com sintomas graves da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) (Sanchez-Vazquez et al. 2021; Kamal et al. 2020) e o interesse em usar *A. paniculata* como tratamento para SARS-CoV-2 têm aumentado (Sa-ngiamsuntorn et al. 2021; Enmozhi et al. 2021; Verma et al. 2021; Rehan et al. 2021). Figura 1

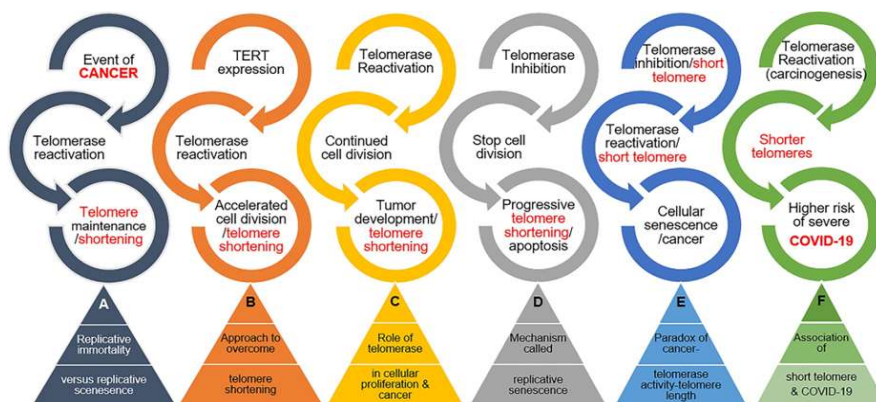


Fig. 1 Representação esquemática do paradoxo da atividade da telomerase, câncer, encurtamento dos telômeros e COVID-19 representa o paradoxo cancro-telômeros, bem como a associação entre telômeros curtos, cancro e COVID-19. Em outra palavra, tentámos estabelecer uma ligação indireta entre os resultados da presente investigação e o SARS-CoV-2, uma vez que os telômeros curtos aumentam o risco de SARS-CoV-2 (Froidure et al. 2020). Este artigo não é uma tentativa de promover ou rejeitar a *A. paniculata* como um tratamento para-SARS-CoV-2 através da sua propriedade de inibição da telomerase.

A propriedade de inibição da telomerase, mas sugere que a associação entre a inibição da telomerase e a COVID-19, bem como a aplicação de qualquer agente com propriedades de inibição/ativação da telomerase propriedades de ativação contra o SARS-CoV-2 deve ser cuidadosamente examinada, cuidadosamente.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal

As sementes de *A. paniculata* (acesso 261) foram obtidas do Centro de Pesquisa de Plantas Medicinais da Universidade Shahed - Teerã. As sementes foram então cultivadas em campo aberto localizado em Rasht, Gilan-Irã (coordenadas: 37° 20' 89,7" N e 49° 58' 68,0" E).

### 2.2 Preparo de Amostras Vegetais e Isolamento de Extrato Bruto

As partes aéreas das plantas de *A. paniculata*, incluindo as folhas e caules inteiros, foram colhidas na fase de pré-floração (18 semanas após a semeadura), devido ao maior teor de AG, NAG e DDAG nesta fase (Tajidin et al. 2019).

As partes colhidas foram secas em forno elétrico ventilado universal (Memmert, Alemanha) a 55 °C por 48 h. O material seco foi então cortado em pequenos pedaços e moído em pó fino, conseqüentemente. A extração foi feita usando quatro solventes diferentes de acordo com seu índice de polaridade (PI), incluindo etanol 100% (PI = 5,2), 100% metanol (PI = 6,6), diclorometano 100% (DCM) (PI = 3,4) e água bidestilada 100% (PI = 9,0) (Luque de Castro e García-Ayuso 1998).

A razão para usar os quatro solventes foi uma avaliação inicial do impacto dos extratos na inibição e citotoxicidade da telomerase em células MCF-7, com base na polaridade de cada solvente. No entanto, a polaridade do solvente foi uma variável dependente neste estudo, e o efeito da polaridade não foi estudado independentemente na inibição e citotoxicidade da telomerase.

Para tanto, 50 g de *A. paniculata* foram embebidos em 350 mL de cada solvente, separadamente.

extratos solventes foram filtrados através de papéis de filtro Whatman No. 1. Os resíduos foram enxaguados várias vezes com o mesmo solvente para obter a máxima recuperação do extrato.

Os extratos de solventes foram então concentrados sob pressão reduzida usando um evaporador rotativo e transferidos para frascos cónicos. O processo de secagem final dos extractos dos extractos concentrados foi efectuado num forno elétrico ventilado ventilada (Memmert, Alemanha) a  $25 \pm 1$  °C para remoção dos solventes residuais. Os extractos secos foram colocados em pequenos recipientes de vidro com tampa e, depois de etiquetados e selados, foram mantidos num congelador a - 20 °C até à realização dos testes de citotoxicidade.

### **2.3 Linhagens Celulares e Condição de Cultura**

A linhagem celular MCF-7 foi recebida do Instituto Pasteur do Irã. As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 composto por 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco, EUA) e 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco, EUA). As culturas foram incubadas a 37 °C em uma incubadora de CO<sub>2</sub> (Memmert, Alemanha), sob incubação anaeróbica de 5% de CO<sub>2</sub>, conforme explicado por Akbarizare et al. ([2019](#)).

### **2.4 Teste de citotoxicidade**

A concentração inibitória semimáxima (IC<sub>50</sub>) de cada extrato foi determinada pelo ensaio de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]. As células MCF-7 foram tratadas com tripsina 25% (Gibco, EUA) e centradas a 1500 rpm e 4 °C por 5 min. As células foram então contadas usando hemocítmetro lam e dispensadas em microplaca de 96 poços a uma taxa de  $1 \times 10^4$  células em cada poço.

As células descarregadas foram então tratadas com diferentes concentrações (variando entre 3,1 e 100 µg / mL) de cada extrato em três repetições e incubadas por 24 h a 37 °C. Consequentemente, 100 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados a cada poço, e as placas foram incubadas novamente por 4 h a 37 °C, seguido do tratamento com 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck, Alemanha).

A adsorção foi medida a 570 nm usando um leitor ELISA de microplacas (Bio Tek Instruments, EUA), conforme explicado por Akbarizare et al. ([2021](#)). As alterações morfológicas das células MCF-7 foram avaliadas com aumento de 40 × usando um microscópio invertido CETi (Ceti Inverso TC-100). As células MCF-7 não tratadas foram usadas como tratamento controle.

### **2.5 Citometria de fluxo**

Para investigar melhor o efeito de quatro extratos de *A. paniculata* no ciclo celular MCF-7, o ensaio de citometria de fluxo foi realizado empregando a dose de IC<sub>50</sub> de cada extrato. As taxas de células apoptóticas foram determinadas por citometria de fluxo com base no fato de que as fosfatidilserinas (PS) ficam expostas na superfície celular por inversão do folheto interno para externo da membrana citoplasmática, durante o processo de apoptose inicial.

### **2.6 Preparação celular e coloração com anexina V-FITC/PI para citometria de fluxo**

Inicialmente, as células coletadas em microtubos foram lavadas com 2 mL de solução salina tamponada com fosfato  $1 \times$  (PBS). As células foram centrifugadas a 1500 rpm e 4 °C por 5 min, e os sobrenadantes foram decantados cuidadosamente. As células foram suavemente suspensas em 500 µL do tampão de ligação de  $1 \times$ , e o conteúdo de cada tubo foi transferido igualmente para quatro microtubos (125 µL por tubo  $\times$  16 microtubos). Considerando a sobreposição espectral de isotiocianato de fluoresceína (FITC) e iodeto de propídio (PI), esses fluorocromos foram adicionados juntos e separadamente a cada microtubo.

O controle negativo não continha fluorocromo. Seguindo o protótipo de ensaio do fabricante para o Kit de Detecção de Apoptose TACS™ ANNEXIN V-FITC (USA R & D Systems, Inc.), todas as amostras foram incubadas por 15 min a 4 °C no escuro. Posteriormente, 5 µL adicionais de corante anexina V-FITC foram adicionados apenas às amostras contendo os corantes anexina V-FITC e PI, antes da incubação no escuro. Na etapa seguinte, 1 mL do tampão de ligação de  $1 \times$  foi adicionado a cada amostra, e a centrifugação foi realizada a 1500 rpm e 4 °C por 5 min.

Os sobrenadantes foram suavemente decantados e 500 µL adicionais do tampão de ligação de  $1 \times$  foram adicionados a cada microtubo para atingir uma densidade de células-alvo de  $1 \times 10^5$  células / mL. Finalmente, 3 µL de corante PI foram adicionados a cada microtubo. Os corantes FITC e PI foram excitados por laser de 488 nm. A emissão foi coletada entre os canais padrão de FITC / GFP a 530 nm e PE / Cy3 a 575-610 nm. As células apoptóticas e necróticas foram analisadas usando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (BD biosciences, San Jose, CA, EUA). Os dados foram analisados pelo software FlowJo v10.

O gráfico de pontos de dois parâmetros é exibido em quatro quadrantes. A plotagem da ligação da anexina V-FITC no eixo x de um gráfico bidimensional de ponto/densidade e PI no eixo y permite a identificação de necróticos (anexina V-/PI+, quadrante superior esquerdo "Q1"), apoptóticos/mortos tardios (anexina V+/PI+, quadrante superior direito "Q2"), apoptóticos precoces (anexina V+/PI-, quadrante inferior direito "Q3") e dinâmicos/não apoptóticos (anexina V-/PI-, quadrante inferior esquerdo "Q4") (Yao et al. [2016](#); Cossarizza et al. [2017](#)).

## **2.7 Protocolo de amplificação repetida de telomerase (ensaio TRAP)**

Inicialmente, as células MCF-7 foram tratadas nas concentrações de IC50 e 100 µg/mL dos quatro extratos de *A. paniculata* (três repetições), por 24 h a 37 °C. As células foram então tratadas com 0,25% de tripsina estéril por 3 a 4 minutos em temperatura ambiente e contadas ao microscópio. Uma densidade de semeadura de  $2 \times 10^5$  células MCF-7 foi transferida para cada microtubo estéril, por reação única. As células foram então centralizadas por 5 min usando uma centrífuga refrigerada a 1500 rpm e 2–8 °C.

Os sobrenadantes foram descartados e 200 µL do tampão de lise foi adicionado a cada pellet. Os pellets foram imediatamente incubados em uma caixa de gelo de poliestireno por 30 min. Os lisados foram centrifugados a 16.926 rpm e 2–8 °C por 20 min. Os sobrenadantes foram transferidos para microtubos estéreis de 1,5 mL. O conteúdo desses tubos foi congelado em nitrogênio líquido e

armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para o ensaio TRAP, conforme explicado por Herbert et al. (2006). O ensaio TRAP foi realizado usando o kit TeloTAGGG™ telom-erase PCR-ELISA, versão 8 (Roche, Alemanha).

Cada PCR foi realizada em um volume total de 50  $\mu\text{L}$ . A mistura principal de PCR continha tampão Tris, substrato de telomerase, primer P1-TS marcado com biotina (5'-AATCCGTCG AGCAGAGTT-3'), primer P2 (5'-CCCTTACCCTTACCC TTACCCTAA-3'), mistura de nucleotídeos de PCR (dNTP) e Taq DNA polimerase. A PCR foi realizada utilizando-se uma máquina Thermal Cycler, modelo iCycler™ (Bio-Rad, EUA).

Uma pré-PCR foi realizada a  $25^{\circ}\text{C}$  (30 min) e  $95^{\circ}\text{C}$  (5 min), para alongamento do primer e inativação da telomerase, respectivamente, conforme explicado por Akbarizare et al. (2021). Os produtos estendidos foram então submetidos à PCR principal com uma desnaturação inicial a  $95^{\circ}\text{C}$  por 3 min, seguida por 30 ciclos de 30 s a  $94^{\circ}\text{C}$  (desnaturação), 30 s a  $50^{\circ}\text{C}$  (recozimento) e 90 s a  $72^{\circ}\text{C}$  (extensão). Uma extensão final foi realizada por 10 min a  $72^{\circ}\text{C}$  (Akbarizare et al. 2021).

## 2.8 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O método de ensaio imunoenzimático foi usado para análise quantitativa da atividade da telomerase usando os produtos de PCR confirmados. Os produtos de PCR foram denaturados e hibridizados com digoxigenina marcada como sonda de detecção específica de repetição telômica. Os produtos hibridizados foram imobilizados em microplaca revestida com estreptavidina por reação biotina-estreptavidina.

Finalmente, os produtos TRAP foram detectados e visualizados via método de reação da peroxidase usando peroxidase conjugada com anticorpo anti-digoxigenina e substrato cromogênico TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) (Sigma-Aldrich, EUA). A absorbância foi registrada separadamente a 450 nm para cada amostra usando um leitor ELISA de microplacas (Bio Tek, EUA) (Akbarizare et al. 2021).

## 3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos MTT e TRAP-ELISA foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados usando a versão 9.3 do software SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC). A análise da variação da inibição da telomerase foi realizada em  $P \leq 0,01$ . As comparações de médias foram realizadas por meio do teste de amplitude múltipla de Duncan. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Análise de citotoxicidade baseada no teste MTT

Os efeitos de quatro extratos de *A. paniculata*, incluindo extratos de etanol, metanol, água e DCM, sobre a viabilidade das células MCF-7 mostraram que o extrato etanólico teve a menor dose de IC50 (37



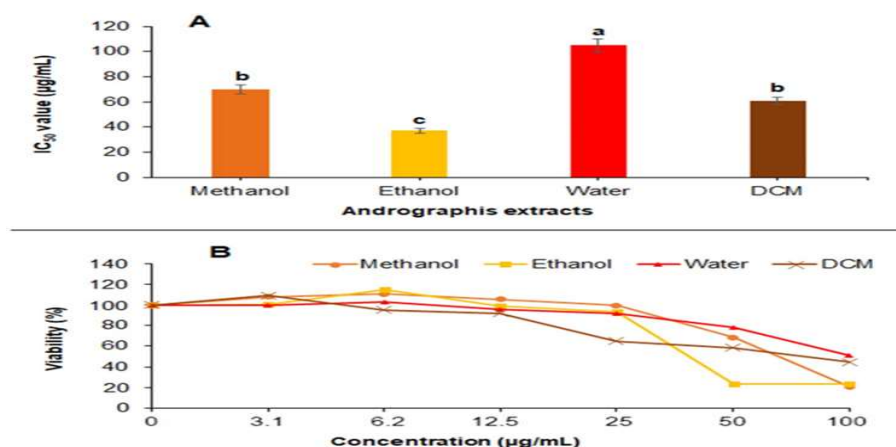
$\mu\text{g/mL}$ ) e o extrato aquoso possuiu a maior dose de IC<sub>50</sub> (105  $\mu\text{g/mL}$ ). De fato, o extrato aquoso foi o único tratamento deste experimento com um valor de IC<sub>50</sub> maior que o valor da dose de 100  $\mu\text{g/mL}$  (Fig. 2A). As doses de IC<sub>50</sub> de DCM e extratos metanólicos foram de 61  $\mu\text{g/mL}$  e 70  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Fig. 2A). Maiores concentrações de extratos de *A. paniculata* diminuíram a viabilidade celular.

A Figura 2B representa as curvas dose-resposta da viabilidade das células MCF-7 em relação a cada extrato, o que implica a inibição dose-dependente dos extratos de *A. paniculata*. Além disso, os resultados mostraram que os valores de IC<sub>50</sub> dos quatro extratos foram significativamente diferentes no nível de 1% (Fig. 2A).

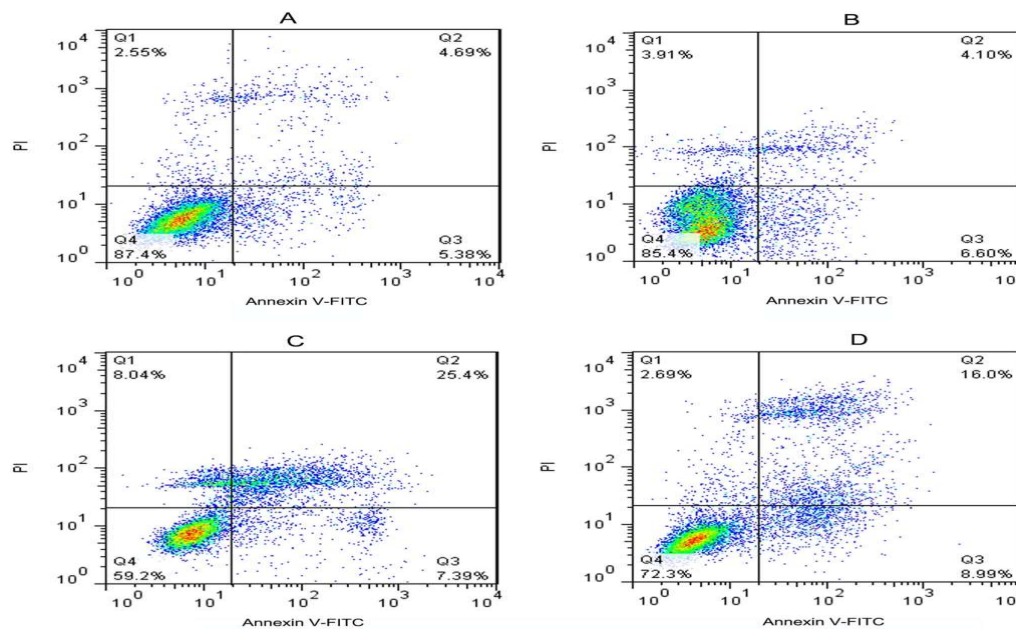
#### 4.2 Viabilidade celular e apoptose com base na citometria de fluxo

Os resultados da citometria de fluxo revelaram que o extrato aquoso de *A. paniculata* levou a uma taxa maciça de apoptose (32,8%) em células MCF-7, apenas 24 h após a indução do extrato (Fig. 3C). Mais especificamente, o extrato aquoso pareceu mais tóxico e alcançou a maior taxa de células necróticas (anexina V-/PI+, Q1 = 8,04%), células apoptóticas/mortas tardias (anexina V+/PI+, Q2 = 25,4%), células apoptóticas precoces (anexina V+/PI-, Q3 = 7,39%), bem como a menor taxa de células dinâmicas/não apoptóticas (anexina V-/PI-, Q4 = 59,2%), quando comparado a outros extratos (Fig. 3).

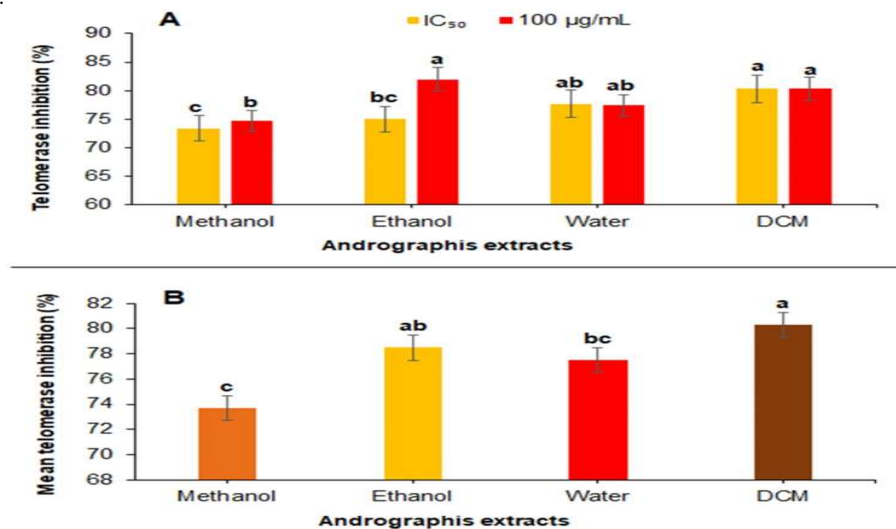
O extrato metanólico de *A. paniculata* resultou em um total de 24,99% de apoptose, incluindo Q3 = 8,99% de células apoptóticas precoces (anexina V+/PI-) e Q2 = 16% de células apoptóticas/mortas tardias (anexina V+/PI+). A taxa de células não apoptóticas foi determinada como Q4 = 72,3% (anexina V-/PI-), conforme mostrado na Fig. 3D. Como resultado notável, os extratos DCM e etanólico alcançaram a maior toxicidade (valores mais baixos de IC<sub>50</sub>: 61  $\mu\text{g/mL}$  e 37  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, conforme mostrado na Fig. 2A), bem como a maior inibição média da telomerase ( $80,3 \pm 1,4\%$  e  $78,5 \pm 1,35\%$ ,



**Fig. 2** Viabilidade celular do MCF-7 após tratamento com diferentes concentrações de extratos de *A. paniculata*: valores de **A** IC<sub>50</sub> em células MCF-7 e **curvas de resposta de dose B** de células MCF-7 a extratos de *A. paniculata*. Diferentes letras minúsculas no topo das barras de erro das colunas indicam uma diferença significativa entre os valores dos pares de tratamento dentro das colunas usando o teste de comparação múltipla de Duncan em  $P \leq 0,05$ . Células MCF-7 não tratadas foram usadas como tratamento controle



**Fig. 3** Resultados da citometria de fluxo de células MCF-7 após serem tratadas com **A** DCM, **B** etanol, **C** água e **D** extrato metanólico de *A. paniculata*. O quadrante superior esquerdo (Q1) representa células necróticas (anexina V-/PI+), o quadrante superior direito (Q2) representa apoptótico/morto tardio respectivamente, conforme mostrado na Fig. 4B). Surpreendentemente, os extratos DCM e etanólico alcançaram as menores taxas de apoptose com base nos resultados da citometria de fluxo (Fig. 3). Mais especificamente, o extrato DCM alcançou a menor taxa total de células apoptóticas, incluindo células apoptóticas precoces e tardias (Q2 + Q3 = 10,07%) e chamadas necróticas (Q1 = 2,55%) como bem como a maior taxa de células não apoptóticas (Q4 = 87,4%), entre os quatro extratos, como mostrado na Fig. 3uma. Da mesma forma, o extrato etanólico mostrou uma taxa total de células apoptóticas em 10,7%, chamadas necróticas em 3,91% e células não apoptóticas em 85,4% (Fig. 3B).



**Fig. 4** Inibição da telomerase baseada em TRAP de células MCF-7 após tratamento com *extratos de A. paniculata* na dose **A** IC<sub>50</sub> e 100 µg/mL, e **média B** da dose de IC<sub>50</sub> e 100 µg/mL. Letras minúsculas diferentes no topo das barras de erro das colunas indicam uma diferença significativa entre os valores dos pares de tratamento dentro das colunas usando o teste de comparação múltipla de Duncan em  $P \leq 0,05$ . Células MCF-7 não tratadas foram usadas como tratamento controle.

#### 4.3 Detenção da inibição da telomerase por ELISA

A inibição da telomerase das células MCF-7 tratadas pelos extratos de *A. paniculata* foi duplamente confirmada usando TRAP-ELISA. Curiosamente, todos os quatro *extratos de A. paniculata* levaram a altas taxas de inibição da telomerase em doses de IC<sub>50</sub> e 100 µg / mL (Fig. 4). A análise de variância (ANOVA) unidirecional revelou que a inibição da telomerase dos extratos nas doses de IC<sub>50</sub> e 100 µg/mL foi significativamente diferente nos níveis de 1% e 5%, respectivamente.

A diferença da inibição média do telomerase dos extratos foi significativa ao nível de 5% (Tabela

1). O extrato etanólico alcançou a maior taxa de inibição da telomerase entre os quatro extratos em 82,1%



1,35% a 100 µg / mL. A inibição da telomerase do extrato etanólico na dose IC50 (37 µg / mL) foi determinada como  $75 \pm 1,17\%$  (Fig. 4).

O extrato de DCM mostrou os resultados mais estáveis ao levar a uma inibição da telomerase de  $80,3 \pm 0,66\%$  na dose IC50 (61 µg / mL) e  $80,3 \pm 1,4\%$  a 100 µg / mL (Fig. 4A). O extrato metanólico obteve as menores taxas de inibição da telomerase entre os extratos em  $73,4 \pm 1,24\%$  na dose IC50 (70 µg/mL) e  $74,7 \pm 1,81\%$  na dose de 100 µg/mL (Fig. 4A). O extrato aquoso alcançou  $77,7 \pm 1,42\%$  e  $77,4 \pm 1,81\%$  de inibição da telomerase na dose IC50 (105 µg/mL) e 100 µg/mL, respectivamente (Fig. 4A). Os resultados também mostraram que os extratos DCM e metanol possuíram as maiores e menores taxas de inibição média da telomerase em  $80,3 \pm 1,4\%$  e  $73,7 \pm 1,81\%$ , respectivamente (Fig. 4B).

A inibição média da telomerase dos extratos DCM e metanol foi estatisticamente significativa no nível de 5% (Fig. 4B). Além disso, os resultados do teste comparativo revelaram que a inibição média da telomerase dos extratos etanólicos e aquosos, bem como dos extratos metanol e aquoso, não foi significativamente diferente no nível de 5%; no entanto, a diferença entre os extratos etanólicos e metanólicos foi significativa no nível de 5% (Fig. 4B).

#### 4.4 Inibição da telomerase, citotoxicidade e polaridade do solvente

De acordo com os resultados da ANOVA, as diferenças entre os solucionados com base em sua polaridade foram significativas ao nível de 1% (Tabela 1). Além disso, a correlação entre a polaridade do solvente e as características estudadas foi calculada, separadamente. As correlações entre a inibição da telomerase e a citotoxicidade (MTT em IC50 e 100 µg/mL) Foram significativas em nível 1%, conforme apresentado na tabela 2. Curiosamente não houve correlação significativa entre a polaridade do solvente e a inibição da telomerase, bem como a citotoxicidade (Tabela 2).

Table 1 Variance analysis of *A. paniculata* extracts based on cytotoxicity, telomerase inhibition, and solvent polarity index

S. O. V. source of variation, df degree of freedom, MS mean square

S. O. V. df/MTT (

IC50) MTT (100 µg/mL) Telomerase

inhibition

Solvent polarity

MS F Sig MS F Sig MS F Sig MS F Sig

Extracts 3 27.73 6.84 0.01 30.84 3.97 0.05 20.56 5.327 0.03 16.75 633.49 0.00

Error 8 4.05 7.78 3.86 0.03

CV (%) 2.63 3.55

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Inibição da telomerase, telômeros curtos, câncer e COVID-19

O papel das plantas herbáceas, incluindo *A. paniculata*, como moduladores de imunidade contra COVID-19 tem atraído muita atenção recentemente (Das 2022; Sarkar e Mukhopadhyay 2022). Elevada atividade da telomerase e telômeros curtos têm sido notificados em tumores cancerígenos (Piotrowska et al. 2005), enquanto as descobertas sobre telômeros curtos e inibição da telomerase se tornaram um alvo

(Nakajima et al. 2003).

A hipótese inicial sobre a associação entre telômeros curtos e sintomas graves de COVID-19 (Aviv 2020) voltou-se para relatos sólidos, logo após o surto da doença (Sanchez-Vazquez et al. 2021; Kamal et al. 2020; Froidure et al. 2020; Simões et al. 2020; Benetos et al. 2021). Vários mecanismos moleculares foram sugeridos para abordar a conexão entre telômeros curtos e COVID-19. Aviv (2021) sugere que o comprimento dos telômeros das células T afeta a resposta imune adaptativa e a resposta imune inata à infecção por SARS-CoV-2.

De acordo com esse modelo, o indivíduo com telômeros longos de células T mostra forte resposta de células T e supressão robusta da resposta imune inata que é acompanhada por atividade "calibrada" (moderada) da resposta imune inata. Em contraste, o indivíduo com telômeros curtos de células T mostra resposta fraca de células T e supressão inadequada da resposta imune inata que é acompanhada por atividade "calibrada" (forte) da resposta imune inata, expressa em tempestade de citocinas, lesão pulmonar e COVID-19 grave (Fig. 5).

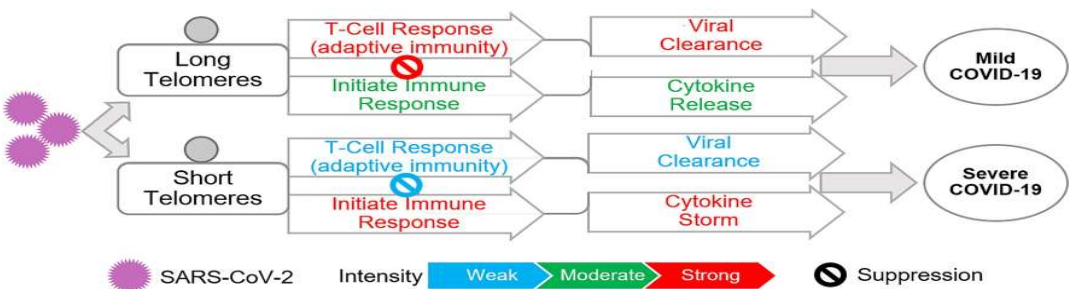
Com base em um relatório muito recente, a expressão do receptor celular para o SARS-CoV-2, ou seja, a Enzima Conversora de Angiotensina-2 (ACE2), que é essencial para mediar a entrada celular do coronavírus, aumenta nos pulmões de camundongos e humanos idosos. Além disso, a expressão de ACE2 aumenta com o encurtamento ou disfunção dos telômeros - marcas comuns do envelhecimento - em células humanas cultivadas e em camundongos. Tal aumento depende de uma resposta a danos no DNA provocada por telômeros disfuncionais (Sepe et al. 2022).

A telomerase pode funcionar tanto como supressores tumorais, limitando o número de divisões celulares, quanto como promotores tumorais, induzindo instabilidade do genoma (Gobbini et al. 2014). Por outro lado, o papel da telomerase e da interação do vírus no desenvolvimento do câncer destaca o papel das abordagens terapêuticas dependentes da telomerase (Salimi-Jeda et al. 2021). Assim, *A. paniculata* deve ser notado como uma potente telomerase.

| Traços                 | MTT (IC50) | MTT (100 µg/mL) | Inibição da telomerase | Polaridade do solvente |
|------------------------|------------|-----------------|------------------------|------------------------|
| MTT (IC50)             | 1          |                 |                        |                        |
| MTT (100 µg/mL)        | 0.373 Ns   | 1               |                        |                        |
| Inibição da telomerase | 0.800**    |                 | 0.855**                | 1                      |
| Polaridade do solvente | - 0.282ns  | - 0.461ns       | - 0.456ns              | 1                      |

\*\*Significativo em  $P \leq 0,01$ , ns não significativo

Tabela 2 Coeficientes de correlação das características estudadas sob extratos de *A. paniculata*



**Fig. 5** Efeito do comprimento dos telômeros das células T na resposta imune adaptativa e na resposta imune inata à infecção por SARS-CoV-2. Para o indivíduo com telômeros longos de células T, a cor vermelha representa forte reação de células T e supressão robusta da resposta imune inata. A cor verde representa a atividade "calibrada" (moderada) da resposta imune inata. Para o indivíduo com telômeros de células T curtos, azul inibidor, uma vez que a atividade excessiva da telomerase (reativação da telômero-ase + estresse oxidativo) nas células cancerígenas é um fator chave no encurtamento dos telômeros. Portanto, o efeito inibitório de *A. paniculata* na atividade da telomerase pode ser considerado como um alvo potencial na terapia do câncer; no entanto, a inibição da telomerase como uma terapia segura para-SARS-CoV-2 é discutível.

## 5.2 Fitoquímica de *A. paniculata* e inibição da telomerase

Os inibidores da telomerase podem levar a uma crise grave na maioria das células cancerígenas cultivadas dentro de uma faixa de 50 a 80% de redução na atividade da telomerase (Shay e Wright [2005](#)). Budiatin et al. ([2021](#)) descobriram que o extrato etanólico de *A. paniculata* tem o potencial de inibir o desenvolvimento de câncer no estágio de hiperplasia, diminuindo a atividade da telomerase e representa uma resposta fraca das células T e supressão insuficiente da resposta imune inata.

A cor vermelha representa a atividade pouco "calibrada" (forte) da resposta imune inata, expressa em tempestade de citocinas, lesão pulmonar e COVID-19 grave. (Esta imagem e sua legenda foram adaptadas de Aviv [2021](#).) aumentando a apoptose, marcada por um aumento da expressão de caspase-3 em ratos fêmeas Sprague Dawley (SD). No entanto, não se sabe se a inibição da telomerase é mediada pelo andrographolide ou por outros constituintes bioativos da planta.

Como comparação, o extrato etanólico de *A. paniculata* alcançou a maior taxa de inibição da telomerase ( $82 \pm 1,35\%$  a  $100 \mu\text{g/mL}$ ), e sua inibição média da telomerase ( $78,5 \pm 1,35\%$ ) obteve o segundo lugar matematicamente na presente pesquisa (Fig. [4](#)). Apesar das taxas de inibição de telomerase semelhantes dos quatro extratos, não está claro qual composto bioativo da planta (por exemplo, AG, DDAG, NAG, etc.) foi responsável pela maior inibição da telomerase, uma vez que o conteúdo fitoquímico dos extratos não foi analisado no presente estudo.

De acordo com Rafi et al. ([2020](#)), os extratos de etanol e água a 50% de *A. paniculata* possuíram o maior teor ( $114,56 \text{ mg/g}$  de peso seco) e o menor ( $25,18 \text{ mg/g}$  de peso seco) de andrographolide, respectivamente. Pelo contrário, Suriyo et al. ([2014](#)) relataram um maior teor de andrographolide ( $8,26 \text{ mg/g}$  de peso seco) no extrato aquoso de folhas maduras (MLWE) em comparação com o extrato etanólico das primeiras folhas verdadeiras (FTLEE), que foi encontrado mais rico em 14-Deoxy-11,12-didehydroandrographolide ( $5,74 \text{ mg/g}$  de peso seco), neoandrographolide ( $8,82 \text{ mg/g}$  de peso seco), e 14-desoxiandrographolide ( $123,73 \text{ mg/g}$  de peso seco).

Como a citotoxicidade do FTLEE (rico em 14-desoxi-andrographolide) foi quatro vezes maior do que o MLWE (rico em andrographolide), foi levantada a hipótese de que a interação entre os diterpenóides ativos, especialmente o andrographolide e 14-desoxiandrographolide, podem desempenhar um papel importante no efeito inibidor do crescimento do FTLEE (Suriyo et al. [2014](#)). Outras interações podem ocorrer entre outros análogos do andrographolide, levando à parada do ciclo celular em vários tipos de câncer (Geethangili et al. [2008](#)).

De fato, a concentração e a composição dos constituintes químicos nas plantas são muito afetadas por fatores variáveis, como condição de colheita, condição de crescimento, genética, tipo e concentração

de solventes de extração (Rafi et al. [2020](#)).

Um estudo separado deve ser realizado para entender melhor o impacto de cada constituinte (por exemplo, AG, DDAG, NAG, etc.) na inibição da telomerase. A aplicação de pós puros desses diterpenóides pode esclarecer essas ambigüidades nos empreendimentos futuros. A literatura disponível apresenta o andrographolide responsável pela inibição da telomerase devido ao seu papel na fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K)/serina/treonina quinase (AKT) (Duan et al. [2019](#)) e/ou vias NF-κB (Li et al. [2017](#); Mishra [2021](#)).

A aplicação de extratos de *A. paniculata* como tratamento para COVID-19, devido à sua inibição da telomerase, deve ser investigada com cuidado, uma vez que um estudo recente mostra que a infecção por SARS-CoV-2 reduz a expressão do complexo proteico shelterin do Fator de Ligação à Repetição Telomérica 2 (TRF2) e resulta em encurtamento dos telômeros nas células Vero E6 (Vic- tor et al. [2021](#)).

Além disso, o comprimento exato dos telômeros com uma inibição consistente da telomerase após o tratamento com *Os extractos de A. paniculata* devem ser confirmados pelos métodos como Southern blot ou kit de PCR telômero-q, conforme explicado por Cawthon et al. ([2003](#)). Idealmente, um método desenvolvido recentemente, chamado Ensaio de Pentear o Comprimento dos Telômeros (TCA), pode ser empregado para medir o comprimento dos telômeros (Kahl et al. [2020](#)).

### 5.3 *Andrographis paniculata* e COVID-19

Várias revisões (Lim et al. [2021](#); Adiguna et al. [2021](#)) e artigos de pesquisa (Sa-ngiamsuntorn et al. [2021](#); Enmozhi et al. [2021](#); Verma et al. [2021](#); Rehan et al. [2021](#)) consideraram *Extrato de A. paniculata* e andrographolide como um potencial remédio para SARS-CoV-2. Resumidamente, tratamento pós-infecção de extrato etanólico de *A. paniculata* e andrographolide em células Calu-3 infectadas com SARS-CoV-2 reprimiram significativamente a produção de vírions infecciosos com um IC<sub>50</sub> de 0,036 µg/mL e 0,034 µM, respectivamente, conforme determinado pelo ensaio de placa (Sa-ngiamsuntorn et al. [2021](#)).

Em outra pesquisa, o andrographolide inibiu a protease principal do SARS-CoV-2 in silico, sendo acoplado com sucesso no local de ligação do SARS-CoV-2 Mpro. O andrographolide segue a regra de Lipinski, o que o torna um candidato promissor para futuras investigações sobre o COVID-19 (Enmozhi et al. [2021](#)). Além disso, Verma et al. ([2021](#)) mostraram os principais fitoquímicos de *A. paniculata* como potenciais inibidores de proteases SARS-CoV-2, incluindo protease semelhante à papaína (PLpro) e protease principal (Mpro)/protease semelhante à 3-quimotripsina (3CLpro).

O andrographolide interagiu com os sítios ativos por meio de ligações de hidrogênio convencionais (VAL159 e GLN269) e com interações de van der Waals com o restante dos resíduos. O DDAG estabilizou o sítio ativo por meio da ligação de hidrogênio convencional (GLN269), ligação carbono-hidrogênio (GLY160) e interações de van der Waals com o restante dos resíduos. Neo-andrographolide ligado aos sítios ativos através de ligações de hidrogênio convencionais (ASN109, GLN269, VA159) e ligação carbono-hidrogênio (GLY160, THR158).

Mais recentemente, o método de docking molecular mostrou o potencial do andrografólido na ligação com o Fator de Necrose Tumoral (TNF) e na ligação covalente com as proteínas NFkB1 da via de sinalização do TNF, que é responsável pela tempestade de citocinas em pacientes com COVID-19 (Rehan et al. [2021](#)).

Como mencionado, a inibição da telomerase como uma terapia segura para-SARS-CoV-2 é discutível. Por um lado, eliminar (ou reduzir) a população existente de telômeros curtos por meio da atividade específica da telomerase humana em células imortais e inibição do câncer (interrompendo a proliferação e, finalmente, a morte celular), conforme descrito por Kim et al. ([1994](#)) e Zhang et al. ([1999](#)), também pode diminuir a suscetibilidade contra o SARS-CoV-2, especialmente em grupos sensíveis de indivíduos (por exemplo, idosos e pacientes com câncer, bem como pacientes propensos ao câncer). Por outro lado, aumentar a população de telômeros curtos via telomerase.



**Fig. 6** Representação esquemática da seletividade/especificidade do extrato de *A. paniculata*. Telômeros curtos ST, telômeros normais (longos) NT, atividade da telomerase TA (causada por um inibidor da telomerase) pode aumentar a suscetibilidade contra o SARS-CoV-2 (Fig. [6](#)). Portanto, é necessária uma investigação mais aprofundada para estabelecer se a inibição do telomerase (e até mesmo a ativação) é eficiente na diminuição da taxa de infecção por SARS-CoV-2 e sintomas graves de COVID-19. Mais importante ainda, a seletividade/especificidade do extrato de *A. paniculata* deve ser indicada em estudos futuros, o que significa que deve ser confirmado que o efeito inibitório do extrato está confinado às células que contêm telômeros curtos e atividade excessiva da telomerase (por exemplo, no tumor cancerígeno). Além disso, o impacto do extrato de *A. paniculata* (como inibidor da telomerase) nas células normais e telômeros longos deve ser especificado (Fig. [6](#)).

#### 5.4 *Andrographis paniculata*, inibição do crescimento e apoptose

Os efeitos apoptóticos e citotóxicos do extrato de *A. paniculata* e/ou seu principal constituinte "andrographolide" em diferentes linhagens de células cancerígenas, incluindo MCF-7, foram previamente estudados empregando ensaios de MTT e/ou citometria de fluxo (Banerjee et al. [2016](#)).

Portanto, a citotoxicidade dos extratos de *A. paniculata* é um objetivo secundário da presente pesquisa. Apesar disso, a diferença entre os resultados do ensaio de MTT e da análise por citometria de fluxo deve ser discutida. Tecnicamente, o MTT é um método colorimétrico que se baseia na "atividade metabólica" determinada principalmente pela função das mitocôndrias, e não consegue diferenciar entre inibição do crescimento e morte celular. Portanto, quando um tratamento leva à redução da atividade metabólica celular, ele é indiretamente considerado como um sintoma de apoptose no ensaio de MTT, embora isso possa acontecer sem nenhum processo apoptótico. Portanto, não se observa necessariamente um aumento da apoptose na análise da mesma amostra/tratamento por citometria de fluxo. A falta de tal capacidade no ensaio MTT muitas vezes leva a uma interpretação errônea dos resultados (Ghasemi et al.



[2021](#)).

Por outro lado, a citometria de fluxo é capaz de diferenciar entre células necróticas, saudáveis e apoptóticas precoces e tardias usando marcação de fluorescência da anexina V-FITC/PI (Henslee et al. [2016](#)). As diferenças entre os resultados do MTT e da citometria de fluxo são relatadas, de acordo. A diferença de sensibilidade entre diferentes linhagens de células cancerígenas aos extratos de *A. paniculata* e/ou andrographolide também foi registrada em outras pesquisas (Suriyo et al. [2014](#); Banerjee et al. [2016](#)). Uma parte desses diferentes feedbacks corresponde ao conteúdo fitoquímico de vários extratos de *A. paniculata* que são muito afetados pelo estágio fenológico, material vegetal e órgão amostrado (Tajidin et al. [2019](#)), tipo e concentração de solvente e tempo de exposição (conforme mencionado na Seção. [4.2](#)).

### **5.5 *Andrographis paniculata*, inibição da telomerase e apoptose**

Alegadamente, a apoptose é uma consequência inseparável da inibição da telomerase nas células cancerígenas (Mondello e Scovassi [2004](#)). A maioria das evidências relacionadas ao efeito do extrato de *A. paniculata* em várias células cancerígenas cumpre a indução de apoptose (Suriyo et al. [2014](#); Budiatin et al. [2021](#); Sarkar et al. [2018](#)).

Os resultados da presente pesquisa, no entanto, não foram completamente alinhados com a tendência acima mencionada, uma vez que as altas taxas de inibição da telomerase causadas pelos extratos DCM e etanólico não foram acompanhadas pelas altas taxas de apoptose. A composição fitoquímica e a duração da indução podem ser os fatores-chave em tal observação, conforme mencionado em Seitas. [4.2](#) e [4.4](#).

Estudos anteriores atribuíram papéis diferentes a cada diterpenóide. Por exemplo, o dideidroandrographolide foi introduzido como um potencial inibidor de P-PLC $\gamma$  que pode promover a apoptose de células tumorais (Che et al. [2019](#)). Com base em evidências recentes, o enriquecimento mitocondrial com hTERT pode ser acompanhado por modulação do nível de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou um número aumentado de cópias de mtDNA que podem levar à repressão da apoptose e podem desempenhar um papel protetor durante a terapia do câncer (Lipinska et al. [2017](#)).

Curiosamente, um comportamento semelhante (diminuição da proporção de apoptose) foi registrado por Duan et al. ([2019](#)), quando a glicose alta foi a fonte de apoptose por oxidação e níveis de ROS nas células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs). Provavelmente, as menores taxas de apoptose em células MCF-7 sob os tratamentos de DCM e extratos etanólicos foram devidas ao seu perfil fitoquímico desconhecido e à interação entre eles. Essa observação sugere que a inibição da telomerase nesses dois tratamentos (DCM e etanol) pode não ser resultado da morte celular (apoptose), mas pode estar correlacionada com a inibição do crescimento celular. Uma condição semelhante foi observada pela aplicação de ceramida para inibir a atividade da telomerase em células adenocarcinoma pulmonares humanas A549 (Ogretmen et al. [2001](#); Guenther et al. [2008](#)).

No entanto, este último mecanismo não governa os extratos aquosos e metanólicos. Independentemente da taxa de apoptose, todos os quatro extratos de *A. paniculata* podem ser

considerados como um potencial adjuvante, para superar a resistência das células cancerígenas às drogas durante a terapia do câncer, por meio da inibição da atividade de teloma-apagamento. O uso de células MCF-7 nesta pesquisa foi baseado na recomendação do fabricante do kit TRAP. As células MCF-7 são deficientes em caspase-3 com uma deleção parcial no *gene CASP-3*. Essas células exibem morte celular que carece de propriedades apoptóticas típicas (Wang et al. [2016](#)).

Assim, a indução da apoptose e a inibição da telomerase podem ter sido afetadas por essa deficiência neste estudo. Assim, células cancerígenas mais independentes, como as linhagens celulares A431, podem ser usadas em estudos futuros. Proliferação adicional marcadores, como Ki67 e PCNA ou um anticorpo contra a caspase-3 ativada (não em células MCF-7), podem ser usados em estudos futuros para confirmar uma redução na proliferação e apoptose.

## 6. CONCLUSÃO

A telomerase pode funcionar como um supressor de tumor, limitando o número de divisões celulares e também como um promotor de tumores, induzindo a instabilidade do genoma. O papel da interação telomerase e vírus no desenvolvimento do câncer destaca o papel das abordagens terapêuticas dependentes da telomerase. Deve-se notar que o telômero curto é um "efeito", mas não uma "causa".

A telomerase parece ser um elo entre os telômeros curtos e os sintomas graves do COVID-19. O extrato de *A. paniculata* como inibidor da telomerase pode ser considerado na terapia do câncer; no entanto, sua segurança como inibidor da telomerase na terapia do SARS-CoV-2 é atualmente desconhecida. Portanto, a aplicação de *A. paniculata* como tratamento para COVID-19 deve ser investigada com cuidado. O comprimento exato dos telômeros após o tratamento com *extratos de A. paniculata* deve ser quantificado por um método adequado. Mais investigações são necessárias para estabelecer se a inibição da telomerase (e até mesmo a ativação) é eficiente na diminuição da taxa de infecção por SARS-CoV-2 e sintomas graves de COVID-19. Mais importante, a seletividade/especificidade do extrato de *A. paniculata* deve ser indicada no futuro.

**Agradecimentos** Os autores gostariam de agradecer sinceramente ao Dr. Mohammad Shariat (PED) por seus esforços bem-sucedidos no cultivo de *A. paniculata* no Irã (província de Rasht - Gilan), sob a condição de não estufa, pela primeira vez.

**Contribuições dos autores** AV contribuiu para investigação, metodologia, redação - rascunho original, redação - revisão e edição e visualização. HO esteve envolvido na investigação, metodologia, supervisão e recursos. MA conduziu investigação e metodologia. DT contribuiu para metodologia, análise formal - estatística e material vegetal.

**Financiamento** Este projeto foi parcialmente apoiado pela Fundação Nacional de Elites do Irã, no âmbito do programa de cooperação com especialistas e empresários iranianos no exterior.

**Disponibilidade de dados** Não aplicável.

## ❖ DECLARAÇÕES

**Conflito de interesses** Em nome de todos os autores, o autor correspondente declara que não há conflito

de interesses.

**Aprovação ética e consentimento para participar** Este artigo não contém nenhum estudo com participantes humanos ou animais realizados por nenhum dos autores.

**Consentimento para publicação** Todos os autores aprovaram a presente versão para fins de publicação e concordaram em responsabilizar-se por todos os aspectos do trabalho.

**Consentimento informado** Não aplicável.

## 7. REFERÊNCIAS

1. Adiguna SP, Panggabean JA, Atikana A, Untari F, Izzati F, Bayu A, Rosyidah A, Rahmawati SI, Putra MY (2021) **Atividades antivirais do andrographolide e seus derivados: mecanismo de ação e sistema de entrega. Produtos farmacêuticos (basel)** 14(11):1102. <https://doi.org/10.3390/ph14111102>
2. Akbarizare M, Ofoghi H, Hadizadeh M (2019) **Avaliação anticancerígena in vitro de saponinas obtidas de *Spirulina platensis* em linhagens celulares MDA, HepG2 e MCF7.** Multidiscip Cancer Invest 3(4):25–32. <https://doi.org/10.30699/acadpub.mci.3.4.25>
3. Akbarizare M, Ofoghi H, Valdiani HM, A, (2021) **Impactos bilaterais associados à telômerase de extratos de *Spirulina platensis*: ativação versus inibição.** Eur J Integr Med 43:101303. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2021.101303>
4. Aviv A (2020) **Telômeros e COVID-19.** FASEB J 2020(00):1–6. <https://doi.org/10.1096/fj.202001025>
5. Aviv A (2021) **Telômeros curtos e COVID-19 grave: o enigma da conexão.** eBioMed 70:103513. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103513>
6. Aviv A, Anderson JJ, Shay JW (2017) **Mutações, câncer e o paradoxo do comprimento dos telômeros.** Tendências Câncer 3(4):253–258. <https://doi.org/10.1016/j.trecan.2017.02.005>

7. Banerjee M, Chattopadhyay S, Choudhuri T, Bera R, Kumar S, Chakraborty B, Mukherjee SK (2016) **A citotoxicidade e a parada do ciclo celular induzidas pelo andrographolide levam à morte celular programada da linhagem celular de câncer de mama MDA-MB-231.** J Biomed Sci 23:40. <https://doi.org/10.1186/s12929-016-0257-0>
8. Barthel FP, Wei W, Tang M, Martinez-Ledesma E, Hu X, Amin SB, Akdemir KC, Seth S, Song X, Wang Q, Lichtenberg T, Hu J, Zhang J, Zheng S, Verhaak RG (2017) **Análise sistemática do comprimento dos telômeros e alterações somáticas em 31 tipos de câncer.** Nat Genet 49: 349–357. <https://doi.org/10.1038/ng.3781>
9. Benetos A, Lai TP, Toupance T (2021) **O nexa entre o comprimento dos telômeros e a contagem de linfócitos em idosos hospitalizados com COVID-19.** J Gerontol A Biol Sci Med Sci 76(8):e97–e101. <https://doi.org/10.1093/gerona/glab026>
10. Budiadin AS, Sagitaras IB, Nurhayati IP, Khairah N, Nisak K, Susilo I, Khotib J (2021) **Atenuação da hiperplasia em células epiteliais parenquimatosas e colônicas pulmonares em câncer induzido por DMBA pela administração de extrato de *Andrographis paniculata* Nees usando modelo animal.** J Farmacol Fisiol Clin Básico 32(4):497–504. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2020-0440>
11. Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA (2003) **Associação entre o comprimento dos telômeros no sangue e a mortalidade em pessoas com 60 anos ou mais.** Lanceta 361(9355):393–395. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12384-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12384-7)
12. Che D, Hou Y, Zeng Y, Li C, Zhang Y, Wei D, Hu S, Liu R, An H, Wang Y, Zhang T (2019) **O desidroandrographolide inibe as reações anafiláticas mediadas por IgE por meio da via de sinalização do cálcio.** Toxicol Appl Pharmacol 366: 46–53. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2019.01.019>
13. Cossarizza A, Chang HD, Radbruch A, Acs A, Adam D, Adam-Klages S, Agace WW, Aghaepour N, Akdis M, Allez M et al (2017) **Diretrizes para o uso de citometria de fluxo e classificação de células em estudos imunológicos.** Eur J Immunol 47:1584–1797. <https://doi.org/10.1002/eji.201646632>
14. Dai J, Lin Y, Duan Y, Li Z, Zhou D, Chen W, Wang L, Zhang QQ (2017) **O andrographolide inibe a angiogênese inibindo a via de sinalização Mir-21-5p / TIMP3.** Int J Biol Sci 13(5):660– 668. <https://doi.org/10.7150/ijbs.19194>
15. Das K (2022) **Plantas herbáceas como moduladores de imunidade contra COVID-19: uma medida preventiva primária durante a quarentena domiciliar.** J Herb Med 32:100501. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100501>
16. Duan MX, Zhou H, Wu QQ (2019) **O andrographolide protege contra inflamação, apoptose, migração e comprometimento da angiogênese induzidos por HG via sinalização PI3K / AKT-eNOS em HUVECs.** Mediat Inflamm. <https://doi.org/10.1155/2019/6168340>
17. Enmozhi SK, Raja K, Sebastine I, Joseph J (2021) **Andrographolide como um potencial inibidor da protease principal do SARS-CoV-2: uma abordagem in silico.** JBiomol Struct Dinâmico 39(9):3092–3098. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1760136>

18. Froidure A, Mahieu M, Hoton D, Laterre PF, Yombi JC, Koenig S, Ghaye B, Defour JP (2020) **Telômeros curtos aumentam o risco de COVID-19 grave.** *Envelhecimento* 12(20):19911–19922. [https://doi.org/ 10.18632/aging.104097](https://doi.org/10.18632/aging.104097)
19. Geethangili M, Rao YK, Fang SH, Tzeng YM (2008) **Constituintes citotóxicos de *Andrographis paniculata* induzem a parada do ciclo celular em células jurkat.** *Phytother Res* 22: 1336–1341. <https://doi.org/10.1002/ptr.2493>
20. Ghasemi M, Turnbull T, Sebastian S, Kempson I (2021) **O ensaio MTT: utilidade, limitações, armadilhas e interpretação na análise em massa e de célula única.** *Int J Mol Sci* 22(23):12827. [https://doi.org/ 10.3390/ijms222312827](https://doi.org/10.3390/ijms222312827)
21. Gobbini E, Trovesi C, Cassani C, Longhese MP (2014) **Destampamento de telômeros na encruzilhada entre a parada do ciclo celular e a carcinogênese.** *Mol Cell Oncol* 1(1):e29901. <https://doi.org/10.4161/mco.29901>
22. Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, Wong SY, Siskind LJ, Edinger AL (2008) **A ceramida mata as células de fome regulando negativamente as proteínas transportadoras de nutrientes.** *PNAS* 105(45):17402–17407. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802781105>
23. Gupta S, Mishra KP, Ganju L (2017) **Propriedades antivirais de amplo espectro do andrographolide.** *Arch Virol* 162(3):611–623. <https://doi.org/10.1007/s00705-016-3166-3>
24. Guterres AN, Villanueva J (2020) **Direcionamento da telomerase para terapia do câncer.** *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-01405-w>
25. Hancke J, Burgos R, Caceres D, Wikman G (1995) **Um estudo duplo-cego com um novo monofármaco Kan Jang: diminuição dos sintomas e melhora na recuperação de resfriados comuns.** *Phytother Res* 9(8):559–562. <https://doi.org/10.1002/ptr.2650090804>
26. Henslee EA, Torcal Serrano RM, Labeed FH, Jabr RI, Fry CH, Hughes MP, Hoettges KF (2016) **Quantificação precisa do progresso da apoptose e toxicidade usando uma abordagem dieletroforética.** *Analista* 141:6408. <https://doi.org/10.1039/c6an01596d>
27. Herbert BS, Hochreiter AE, Wright WE, Shay JW (2006) **Deteção não radioativa da atividade da telomerase usando o protocolo de amplificação de repetição telomérica.** *Nat Protoc* 1(3):1583–1590. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.239>
28. Holt SE, Shay JW (1999) **Papel da telomerase na proliferação celular e câncer.** *J Cell Physiol* 180:10–18. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199907\)180:1%3C10::AID-JCP2%3E3.0.CO;2-D](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4652(199907)180:1%3C10::AID-JCP2%3E3.0.CO;2-D) Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW (2016) **Papéis dos telômeros e da telomerase no câncer e avanços nas terapias direcionadas à telomerase.** *Genoma Med* 8:69. <https://doi.org/10.1186/S13073-016-0324-X>
29. Kahl VSF, Allen JAM, Nelson CB, Sobinoff AP, Lee M, Kilo T, Vasireddy RS, Pickett HA (2020) **Medição do comprimento dos telômeros por penteado molecular. Desenvolvimento de células frontais Biol.** <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00493>
30. Kamal MA, Alamiry KR, Zaki M (2020) **Diferenças de sexo e idade no comprimento dos**



**telômeros e suscetibilidade ao COVID-19.** J Biomed Res Environ Sci 1(7):303–310.

<https://doi.org/10.37871/jbres1159>

31. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) **Associação específica da atividade da telomerase humana com células imortais e câncer.** Ciência 266: 2011–2015. <https://doi.org/10.1126/science.7605428>
32. Li Y, He S, Tang J, Ding N, Chu X, Cheng L, Ding X, Liang T, Feng S, Rahman SU, Wang X, Wu J (2017) **O andrographolide inibe a secreção de citocinas inflamatórias em células RAW264.7** estimuladas por LPS por meio da supressão da via de sinalização NF- $\kappa$ B / MAPK. Evid Based Complement Alternat Med 2017:8248142. <https://doi.org/10.1155/2017/8248142>
33. Lim XY, Chan JSW, Tan TYC, Teh BP, Razak MRMA, Mohamad S, Mohamed AFS (2021) **Andrographis paniculata (Burm. F.) Parede. Ex Nees, andrographolide e análogos de andrographolide como antivirais SARS-CoV-2? Uma revisão rápida.** Prod Commun 16(5):1– 15. <https://doi.org/10.1177/1934578X211016610>
34. Lipinska N, Romaniuk A, Paszel-Jaworska A, Toton E, Kopczynski P, Rubis B (2017) **Telomerase e resistência a medicamentos em câncer.** Célula Mol Life Sci 74: 4121–4132. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2573-2>
35. Liu R, Liu J, Wang S, Wang Y, Zhang T, Liu Y, Geng X, Wang F (2019) **O tratamento combinado com emodina e um inibidor da telomerase induz danos/disfunção significativa dos telômeros e morte celular.** Morte celular Dis 10:527. <https://doi.org/10.1038/S41419-019-1768-X>
36. Luque de Castro MD, García-Ayuso LE (1998) **Extração de materiais sólidos por Soxhlet: uma técnica ultrapassada com um futuro inovador promissor.** Analytica Chimica Acta 369(1–2):1–10. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(98\)00233-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(98)00233-5)
37. Malik Z, Parveen R, Parveen B, Zahiruddin S, Aasif Khan M, Khan A, Massey S, Ahmad S, Husain SA (2021) **Potencial anticancerígeno do andrographolide de Andrographis paniculata (Burm.f.) Nees e seus mecanismos de ação.** J Etnofarmacol 272:113936. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.113936>
38. Mender I, Shay JW (2015) **Protocolo de amplificação repetida da telomerase (TRAP).** Bio Protoc 5(22):e1657. <https://doi.org/10.21769/biopr.1657>
39. Mishra KP (2021) **Andrographolide: Regulando o regulador mestre NF- $\kappa$ B.** Ind J Clin Biochem 36: 117–119. <https://doi.org/10.1007/S12291-019-00866-5>
40. Mondello C, Scovassi AI (2004) **Telômeros, telomerase e apoptose.** Biochem Cell Biol 82: 498–507. <https://doi.org/10.1139/O04-048>
41. Nakajima A, Tauchi T, Sashida G, Sumi M, Abe K, Yamamoto K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K (2003) **A inibição da telomerase aumenta a apoptose em células de leucemia aguda humana: possibilidade de terapia antitelomerase.** Leucemia 17:560–567. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2402825>
42. Ogretmen B, Schady D, Usta J, Wood R, Kravka JM, Luberto C, Birbes H, Hannun YA, Obeid LM (2001) **Papel da ceramida na mediação da inibição da atividade da telomerase em células de adenocarcinoma de pulmão humano A549.** J Biol Chem 276: 24901–24910.

<https://doi.org/10.1074/jbc.M100314200>

43. Piotrowska K, Kleideiter E, Mürdter TE (2005) **Otimização do ensaio TRAP para avaliar a especificidade dos inibidores da telomerase**. *Laboratório Invest* 85: 1565–1569.

<https://doi.org/10.1038/labinvest.3700352>

44. Rafi M, Devi AF, Syafitri UD, Heryanto R, Suparto IH, Amran MB, Rohman A, Prajogo B, Lim LW (2020) **Classificação de extratos de *Andrographis paniculata* por extração por solvente usando impressão digital HPLC e análise quimiométrica**. *BMC Res Notas* 13(1):56.

<https://doi.org/10.1186/s13104-020-4920-x>

45. Rehan M, Ahmed F, Howladar SM, Refai MY, Baeissa HM, Zughaibi TA, Kedwa KM, Jamal MS (2021) **Uma abordagem computacional identificou o andrographolide como uma droga potencial para suprimir Tempestade de citocinas induzida por COVID-19**. *Imunol frontal* 12:648250.

<https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.648250>

46. Salimi-Jeda A, Badrzadeh F, Esghaei M, Abdoli A (2021) **O papel da interação da telomerase e dos vírus no desenvolvimento do câncer e nas abordagens terapêuticas dependentes da telomerase**.

*Tratamento do câncer Res Commun* 27:100323. <https://doi.org/10.1016/j.ctarc.2021.100323>

47. Sanchez-Vazquez R, Guío-Carrión A, Zapatero-Gaviria A (2021) **Comprimentos de telômeros mais curtos em pacientes com doença grave de COVID-19**

*facilidade. Envelhecimento* 13(1):1–15. <https://doi.org/10.18632/aging.202463>

48. Sa-ngiamsuntorn K, Suksatu A, Pewkliang Y, Thongsri P, Kanjana-sirirat P, Manopwisedjaroen S, Charoensutthivarakul S, Wongtra-koongate P, Pitiporn S, Chaopreecha J et al (2021) **Atividade anti-SARS-CoV-2 do extrato de *Andrographis paniculata* e seu principal componente andrographolide em células epiteliais pulmonares humanas e avaliação de citotoxicidade em representantes de células de órgãos principais**. *J Nat Prod* 84: 1261–1270.

<https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01324>

49. Sarkar PK, Mukhopadhyay CD (2022) **Insights mecanicistas da revisão e avaliação de medicamentos fitoterápicos ayurvédicos para a prevenção e tratamento de pacientes com COVID-19**. *J Herb Med* 32:100554. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2022.100554>

50. Sarkar S, Gopal PK, Paul S (2018) **Apoptose induzida por andrographolide em células NALM-6 mediada pela parada do ciclo celular e fragmentação nuclear**. *Farmacog. J* 10(2):210–214. <https://doi.org/10.5530/pj.2018.2.36>

51. Sato H, Hiraki M, Namba T, Egawa N, Baba K, Tanaka T, Noshiro H (2018) **Andrographolide induz a degradação do p53 mutante por meio da ativação de Hsp70**. *Int J Oncol* 53(2):761–770.

<https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4416>

52. Sepe S, Rossiello F, Cancila V (2022) **A resposta a danos no DNA nos telômeros aumenta a transcrição do receptor SARS-CoV-2 ACE2 durante o envelhecimento**. *EMBO Rep* 23:e53658.

<https://doi.org/10.15252/embr.202153658>

53. Sharma SN, Sinha RK, Sharma DK, Jha Z (2009) **Avaliação da variabilidade intra-específica em**

nível morfológico, molecular e bioquímico de *Andrographis paniculata* (Kalmegh). Curr Sci 96(3):402–408

54. Shay JW (2016) **Papel dos telômeros e da telomerase no envelhecimento e no câncer.** Câncer Discov 6(6):584–593. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0062>

55. Shay JW, Wright WE (2005) **Terapia de inibição de teloma de apagamento de combinação baseada em mecanismo.** Célula cancerosa. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.12.012>

56. Simões HG, Rosa TS, Sousa CV (2020) **O comprimento dos telômeros leucocitários mais longo e a maior aptidão física protegem os atletas mestres das consequências da infecção por coronavírus (SARS-CoV-2)?** Ato de Esportes da Frente Vivendo 2:87. <https://doi.org/10.3389/fspor.2020.Nº.00087>

57u. Smith LL, Collier HA, Roberts JM (2003) **A telomerase modula a expressão de genes controladores de crescimento e aumenta a proliferação celular.** Nat Cell Biol 5: 474–479. <https://doi.org/10.1038/ncb985>

58. Suriyo T, Pholphana N, Rangkadilok N, Thiantanawat A, Watchara-sit P, Satayavivad J (2014) **Os extratos de *Andrographis paniculata* e os principais diterpenóides constituintes inibem o crescimento de células intra-hepáticas de colangiocarcinoma, induzindo a parada do ciclo celular e a apoptose.** Planta Med 80:533–543. <https://doi.org/10.1055/s-0034-1368399>

59. Suriyo T, Chotirat S, Rangkadilok N, Pholphana N, Satayavivad J (2021) **Efeitos interativos de extratos de *Andrographis paniculata* e quimioterápico de câncer 5-Fluorouracil na expressão do citocromo P450s em células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano.** J Herb Med 26:100421. <https://doi.org/10.1016/j.hermed.2021.100421>

60. Tajidin NE, Shaari K, Maulidiani M (2019) **Perfil de metabólitos de *Andrographis paniculata* (Burm. f.) Nees. folhas jovens e maduras em diferentes idades de colheita usando a abordagem metabolômica baseada em RMN de 1H.** Sci Rep 9:16766. <https://doi.org/10.1038/S41598-019-52905-Z>

61. Valdiani A, Kadir MA, Tan SG, Talei D, Abdullah MP, Nikzad S (2012) **Nain-e Havandi "*Andrographis paniculata*" presente ontem, ausente hoje: uma revisão plenária sobre a erva subutilizada das plantas farmacêuticas do Irã.** Mol Biol Rep 39(5):5409–5424. <https://doi.org/10.1007/s11033-011-1341-x>

62. Valdiani A, Talei D, Lattoo SK, Ortiz R, Rasmussen SK, Batley J, Rafii MY, Maziah M, Sabu KK, Abiri R, Sakuanrungrasirikul S, Tan SG (2017) **Melhoria assistida por genoproteômica de *Andrographis paniculata*: em direção a uma plataforma de melhoramento molecular e convencional promissora para plantas autógamas que afetam a indústria farmacêutica.** Crítico Rev Biotechnol 37(6):803–816. <https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1260525>

63. Verma D, Mitra D, Paul M, Chaudhary P, Kamboj A, Thatoi H, Janmeda P, Jain D, Panneerselvam P, Shrivastav R, Pant K, Das Mohapatra PK (2021) **Inibidores potenciais das proteases SARS-CoV-2 (COVID 19) PLpro e Mpro/3CLpro: estudos de docking molecular e simulação de três**

**componentes naturais de plantas medicinais pertinentes.** Disco de Drogas Farmacol Curr Res 2 (2021): 100038. <https://doi.org/10.1016/j.crphar.2021.100038>

64. Victor J, Deutsch J, Whitaker A, Lamkin EN, March A, Zhou P, Bot- ten JW, Chatterjee N (2021) **SARS-CoV-2 desencadeia resposta a danos no DNA em células Vero E6.** Biochem Biophys Res Commun 579: 141–145. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.09.024>

65. Wang S, He M, Li L, Liang Z, Zou Z, Tao A (2016) **A morte célula a célula não é restrita pela deficiência de caspase-3 em células MCF-7.** J Câncer de Mama 19(3):231–241. <https://doi.org/10.4048/jbc.2016.19.3.231>

66. Yao J, Jiao R, Liu C, Zhang Y, Yu W, Lu Y, Tan R (2016) **Avaliação dos efeitos citotóxicos e apoptóticos da quetominina em uma linha celular de leucemia humana.** Biomol Ther Seul 24(2):147–155. <https://doi.org/10.4062/biomolther.2015.093>

67. Zhang X, Mar V, Zhou W (1999) **Encurtamento dos telômeros e apoptose em células tumorais humanas inibidas pela telomerase.** Genes Dev 13(18):2388–2399. <https://doi.org/10.1101/gad.13.18.2388>

68. Zhou J, Lu GD, Ong CS, Ong CN, Shen HM (2008) **O andrographolide sensibiliza as células cancerígenas à apoptose induzida por TRAIL por meio da regulação positiva do receptor de morte 4 mediado por p53.** Mol Cancer Ther 7(7):2170– 2180. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0071>

*A Springer Nature ou seu licenciante detém direitos exclusivos sobre este artigo sob um contrato de publicação com o(s) autor(es) ou outro(s) detentor(es) de direitos; O auto-arquivamento do autor da versão manuscrita aceita deste artigo é regido exclusivamente pelos termos de tal contrato de publicação e pela lei aplicável.*

