

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO ALCALOIDE APORFÍNICO
XILOPINA**

LUCIANO DE SOUZA SANTOS

Salvador – Bahia

2018

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

**ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO ALCALOIDE APORFÍNICO
XILOPINA**

LUCIANO DE SOUZA SANTOS

Orientador: Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para a obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia

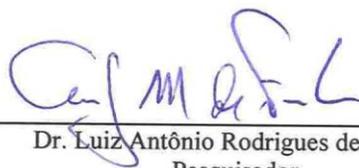
2018

ESTUDO DO POTENCIAL CITOTÓXICO DO ALCALOIDE APORFÍNICO XILOPINA

LUCIANO DE SOUZA SANTOS

Folha de Aprovação

Comissão Examinadora



Dr. Luiz Antônio Rodrigues de Freitas
Pesquisador
FIOCRUZ



Dra. Karine Araújo Damasceno
Pesquisadora
FIOCRUZ



Dra. Caroline Brandi Schläepfer Sales
Professora adjunta
UFBA

FONTES DE FINANCIAMENTO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia - FAPESB

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar condições de concluir mais essa etapa da minha vida, sou grato por tudo que acontece comigo, afinal cada passo que dou é baseado nos acontecimentos que surgem sobre a sua soberana vontade.

Aos meus pais João Luiz dos Santos e Lindiomar Cardoso de Souza Santos, que sempre me deram todo apoio necessário, impossível de ser retribuído, sem eles eu não conseguiria passar por mais essa etapa.

Ao meu avô Adhemar Alberto de Souza, que me ajudou desde a graduação a chegar onde eu estou, sempre será um exemplo de vida para mim.

À minha esposa Tainara Rabelo, por estar sempre ao meu lado em todas as situações me dando todo suporte.

À minha família e amigos, que sempre me incentivaram e torceram por mim, em especial meu irmão Luiz Paulo, meus primos Adiomar e Rafael e meu amigo Danilo por serem os mais próximos.

Ao meu orientador Dr. Daniel Bezerra, que me deu a oportunidade que sempre quis, sou muito grato pela paciência, dedicação, orientação e atenção que recebi.

À equipe do LETI pela empatia e companheirismo sem igual, onde conheci pessoas excepcionais que guardarei por toda vida (a lista é grande, rs), em especial minha parceira de experimentos Valdenizia pela confiança e todo apoio dado, sou imensamente grato.

Aos colegas da pós-graduação: Helenita, Silas, Elissandro, Felipe, Ítalo, Samuel e Mateus pelas resenhas, troca de conhecimentos e preciosa amizade.

Aos professores da pós-graduação pelas aulas excelentes que vivenciei, em especial prof. Edson Moreira.

À banca de qualificação pelos conselhos, orientação e correção que levou ao aperfeiçoamento do trabalho.

À secretária acadêmica lumara e equipe sempre dispostas a ajudar.

Ao pessoal da biblioteca por todo apoio e disposição.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia em saúde e medicina investigativa.

Ao IGM/FIOCRUZ Bahia, pela estrutura e suporte necessários para a execução deste trabalho.

À FAPESB – Fundação de amparo a pesquisa da Bahia pela bolsa concedida.

E por fim a todas as pessoas que conheci nessa jornada, sou grato pelas conversas, dicas, conselhos favores prestados e recebidos.

A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada,
ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.

Albert Einstein

SANTOS, Luciano de Souza. Estudo do potencial citotóxico do alcaloide aporfínico xilopina. 88 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2017.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer é uma doença multifatorial iniciada por mutações genéticas que causam um descontrole na proliferação celular. A quimioterapia é um dos métodos mais importantes para trata-lo; entretanto, os fármacos disponíveis atualmente apresentam limitações relacionados a alta toxicidade e ao desenvolvimento de resistência. A xilopina é um alcaloide aporfínico encontrado principalmente em plantas da família Annonaceae, e estudos prévios realizados no nosso laboratório revelaram que esta apresenta atividade citotóxica promissora. **OBJETIVOS:** O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial citotóxico do alcaloide aporfínico xilopina em diferentes modelos celulares. **MATERIAL E MÉTODOS:** A xilopina foi isolada da planta *Xylopia leavigata* utilizando técnicas clássicas de cromatografia e testada contra diferentes tipos de linhagens de células cancerígenas (HepG2, HL-60, HCT116, SCC9, HSC3, MCF7, K562 e B16-F10) e não cancerígenas (MRC5 e PBMC), através do ensaio do alamar blue após 72 h de incubação em modelo 2D, e em modelo 3D utilizando células de carcinoma de cólon humano HCT116. Posteriormente, células HCT116 foram incubadas por 24 e 48 h com a xilopina (1, 2 e 4 µg/mL) e o número de células viáveis foi determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripam. A análise do ciclo celular, o potencial transmembrânico mitocondrial, marcação para anexina V/iodeto de propídio e a quantificação de espécies reativas de oxigênio/nitrogênio (ERO/ERN) foram determinadas por citometria de fluxo. A ativação de caspase 3 e os níveis de glutathiona reduzida foram determinados por ensaio colorimétrico. **RESULTADOS:** A xilopina apresentou valores de CI_{50} para células cancerígenas que variaram de 1,91 e 7,84 µg/mL para as linhagens HCT116 e SCC9, respectivamente, e apresentou valores de CI_{50} de 7,53 e 5,39 µg/mL para células não cancerígenas MRC5 e PBMC, respectivamente. Células HCT116 tratadas com xilopina apresentaram uma redução no número de células viáveis, parada do ciclo celular na fase G_2/M , aumento da fragmentação do DNA internucleossomal, aumento da externalização de fosfatidilserina, redução do potencial transmembrânico mitocondrial e aumento da atividade de caspase 3. A apoptose induzida por xilopina foi prevenida pelo pré-tratamento com um inibidor de caspase 3 (Z-DEVD-FMK), mas não por um inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica), indicando morte celular por apoptose mediada por caspase por uma via independente de p53. Um aumento de ERO/ERN, incluindo peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, mas não ânion superóxido, e diminuição de glutathiona reduzida também foram observados. O pré-tratamento com o antioxidante N-acetil-cisteína reduziu os níveis de ERO e a apoptose induzida pela xilopina, indicando a ativação da via de apoptose mediada por ERO. **CONCLUSÕES:** Em conclusão, a xilopina possui uma citotoxicidade potente para diferentes linhagens celulares cancerígenas, induz estresse oxidativo e provoca a parada do ciclo celular na fase G_2/M que desencadeia a apoptose mediada por caspase por uma via independente de p53 em células HCT116.

Palavras-chave: Produtos naturais, Quimioterapia, Xilopina, Apoptose.

SANTOS, Luciano de Souza. Study of the cytotoxic potential of the aporphine alkaloid xylopine. 88 f. il. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) - Oswaldo Cruz Foundation, Gonçalo Moniz Institute, Salvador, 2017.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cancer is a multifactorial disease initiated by genetic mutations that cause a disruption in cell proliferation. Chemotherapy is one of the most important methods to treat it; however, currently available drugs have limitations related to high toxicity and the development of resistance. Xylopine is an aporphine alkaloid found primarily in Annonaceae family plants, and previous studies conducted in our laboratory have shown that it has promising cytotoxic activity. **OBJECTIVES:** The aim of this study was to evaluate the cytotoxic potential of the aporphine alkaloid xylopine in different cell models. **MATERIALS AND METHODS:** Xylopine was isolated from the plant *Xylopia leavigata* using classical chromatography techniques and tested against different types of cancer cell lines (HepG2, HL-60, HCT116, SCC9, HSC3, MCF7, K562 and B16-F10) and non-cancer cells (MRC5 and PBMC) by alamar blue assay after 72 h incubation in 2D model, and 3D model using human colon carcinoma HCT116 cells. Subsequently, HCT116 cells were incubated for 24 and 48 h with xylopine (1, 2 and 4 $\mu\text{g/mL}$) and the number of viable cells was determined by the trypan blue exclusion assay. Cell cycle analysis, mitochondrial transmembrane potential, annexin V/propidium iodide staining and quantification of reactive oxygen/nitrogen species (ROS/ERN) were determined by flow cytometry. Activation of caspase-3 and reduced glutathione levels were determined by colorimetric assay. **RESULTS:** Xylopine presented IC_{50} values for cancer cells ranging from 1.91 and 7.84 $\mu\text{g/mL}$ for the HCT116 and SCC9 lines, respectively, and presented IC_{50} values of 7.53 and 5.39 $\mu\text{g/mL}$ for non-cancer cells MRC5 and PBMC, respectively. HCT116 cells treated with xylopine showed a reduction in the number of viable cells, cell cycle arrest in G_2/M phase, increased internucleosomal DNA fragmentation, increased phosphatidylserine externalization, reduction of mitochondrial transmembrane potential and increased caspase-3 activity. Xylopine-induced apoptosis was prevented by pretreatment with a caspase-3 inhibitor (Z-DEVD-FMK), but not by a p53 inhibitor (cyclic α -pifythrine), indicating cell death by caspase-mediated apoptosis by a p53-independent pathway. An increase in ERO/ERN, including hydrogen peroxide and nitric oxide, but not superoxide anion, and decreasing of reduced glutathione were also observed. Pretreatment with the antioxidant N-acetyl-cysteine reduced the levels of ROS and xylopine-induced apoptosis, indicating the activation of the ROS-mediated apoptosis pathway. **CONCLUSIONS:** In conclusion, xylopine has a potent cytotoxicity for different cancer cell lines, induces oxidative stress and causes cell cycle arrest in the G_2/M phase that triggers caspase-mediated apoptosis by a p53-independent pathway in HCT116 cells. **Key words:** Natural Products, Chemotherapy, Xylopine, Apoptosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Fases do processo de formação do câncer.....	30
Figura 2. Ilustração do processo metastático	31
Figura 3. Estrutura química básica do esqueleto de alcalóides aporfínicos	28
Figura 4. Estrutura química da xilopina	40
Figura 5. Efeito da xilopina no modelo 3D de esferoides multicelulares de câncer formados a partir de células HCT116	55
Figura 6. Efeito da xilopina sobre a viabilidade de células HCT116 determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripam.....	56
Figura 7. Histogramas representativos da análise da distribuição do conteúdo de DNA determinados por citometria de fluxo.....	58
Figura 8. Efeito da xilopina na análise morfológica de células HCT116.	49
Figura 9. <i>Dot plots</i> do efeito do tratamento com a xilopina na morfologia celular em células HCT116	50
Figura 10. Avaliação do perfil de morte celular - <i>Dot plots</i> representativos da marcação com anexina V/iodeto de propídio em células HCT116	63
Figura 11. Avaliação do perfil de morte celular - Quantificação da marcação com anexina V/iodeto de propídio em células HCT116	64
Figura 12. Efeito da xilopina sobre o potencial transmembrânico mitocondrial em células HCT116.....	65
Figura 13. Atividade da caspase 3 determinada por ensaio colorimétrico em células HCT116.....	67
Figura 14. <i>Dot plots</i> do efeito do inibidor da caspase 3 (Z-DEVD-FMK) e do inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) na apoptose induzida pela xilopina em células HCT116.....	68
Figura 15. Efeito do inibidor da caspase 3 (Z-DEVD-FMK) e do inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) na apoptose induzida pela xilopina em células HCT116.....	58
Figura 16. Efeito da xilopina nos níveis de espécies reativas de oxigênio das células HCT116 e com proteção por N-acetil-L-cisteína (NAC).	71

- Figura 17.** Efeito da proteção da catalase nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidas pela xilopina em células HCT11672
- Figura 18.** Efeito da xilopina nos níveis de espécies reativas de oxigênio em células HCT116.....73
- Figura 19.** Efeito da xilopina nos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em células HCT116.....74
- Figura 20.** *Dot plots* do efeito do antioxidante N-acetil-L-cisteína na apoptose induzida pela xilopina em células HCT116.....75
- Figura 21.** Efeito do antioxidante N-acetil-L-cisteína na apoptose induzida pela xilopina em células HCT116.....76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividade citotóxica da xilopina em diferentes tipos histológicos celulares	51
Tabela 2. Índice de seletividade da xilopina.....	53
Tabela 3. Efeito da xilopina sobre a distribuição do conteúdo de DNA celular.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2n	n – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos
5-FU	5-fluorouracil
ANOVA	Do Inglês <i>analysis of variance</i> (Análise de variância)
APAF-1	Fator de Ativação de Protease Associada a Apoptose 1
APAF-1ATP	Do Inglês <i>Apoptotic protease-activating factor 1</i> Adenosina trifosfato
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
Bad	Agonista de Morte Celular Associado a Bcl2, do inglês: <i>Bcl2-Associated Agonist of Cell Death</i>
Bak	Proteína Destruidora de Antagonistas de Bcl2, do inglês: <i>Bcl2-Antagonist/Killer 1</i>
Bax	Proteína X Associada a Bcl-2, do inglês: <i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
Bcl2	Proteína Reguladora anti-apoptótica, do inglês: B-cell CLL/lymphoma
BCLX	Proteína antiapoptótica
BID	Domínio de Morte de Interação com BH3
Bid	Proteína Reguladora pró-apoptótica Antagonista de Bcl2, do Inglês: <i>BH3 Interacting Domain Death Agonist</i> .
Bik	Proteína Reguladora pró-apoptótica Antagonista de Bcl2, do inglês: <i>Bcl2 Interacting Killer</i> .
Bim	Proteína pró-apoptótica
CCF	Cromatografia de Camada Fina
Cl ₅₀	Concentração inibitória média de 50%
Citocromo C	Proteína heme associada à membrana externa da mitocôndria
DHE	Dihidroetídio

DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorrubicina
E.P.M.	Erro padrão da média
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GST	Genes supressores de tumor
H2-DCF-DA	Diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína
HPV	Papiloma vírus humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mg	Miligrama
miRNA	microRNA
mL	Mililitro
N.d.	Não determinado
NAC	N-acetil-L-cisteína
NCI	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxaliplatina
p21	Proteína reguladora da transição da fase G1 para S no ciclo celular
p27	Inibidor de complexos de ciclina-CDK
p57	Inibidor de complexos de ciclina-CDK
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico humano, do inglês: Peripheral Blood Mononuclear Cell
PI	Iodeto de Propídio
RNA	Ácido ribonucleico
XIL	Xilopina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1	BIOLOGIA DO CÂNCER	29
2.2	EPIDEMIOLOGIA	34
2.3	TERAPIAS DO CÂNCER	35
2.4	ALCALOIDES APORFÍNICOS	37
3	OBJETIVOS	41
3.1	GERAL	41
3.2	ESPECÍFICOS	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1	OBTENÇÃO DO COMPOSTO	42
4.2	OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA	42
4.3	ENSAIO DO ALAMAR BLUE	43
4.3.1	Cultura de esferoides multicelulares 3D	43
4.4	AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CÉLULAR / MECANISMO DE AÇÃO INDUZIDO PELA XILOPINA	44
4.4.1	Ensaio de exclusão com o azul de tripam	44
4.4.2	Análise do ciclo celular / fragmentação do DNA internucleossomal	45
4.4.3	Análise morfológica	45
4.4.4	Marcação para anexina V/iodeto de propídio	46
4.4.5	Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial	46
4.4.6	Determinação da atividade de caspase 3	47
4.4.7	Quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular	47
4.4.8	Quantificação do radical ânion superóxido intracelular	48
4.4.9	Quantificação de óxido nítrico intracelular	48
4.4.10	Quantificação de glutatona reduzida	48
4.4.11	Ensaio de reversão com inibidores farmacológicos	49
4.4.12	Ensaio de intercalação de DNA	49
4.4.13	Análise estatística	49
5	RESULTADOS	50
5.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E SELETIVIDADE	50
5.1.2	Atividade citotóxica da xilopina no modelo 3D	54

5.2	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO PADRÃO DE MORTE CELULAR/MECANISMO DE AÇÃO.....	54
5.2.1	Determinação da Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripam	54
5.2.2	Análise do ciclo celular	57
5.2.3	Efeito do tratamento com a xilopina na morfologia celular	57
5.2.4	Avaliação do perfil de morte celular	62
5.2.5	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial	62
5.2.6	Avaliação da atividade de caspase 3	66
5.2.7	Citotoxicidade da xilopina para BAD KO SV40 MEF	66
5.2.8	Quantificação dos níveis de ERO/ERN e avaliação da glutatona intracelular	70
5.2.9	Análise da intercalação do DNA	76
6	DISCUSSÃO	77
7	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS	86

INTRODUÇÃO

Dados globais apresentados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) relatam que existem 20 milhões de pessoas com câncer no mundo, e segundo a *International Agency for Research on Cancer (IARC)* da Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública afetando principalmente os países em desenvolvimento. Estima-se que nas próximas décadas 80% dos mais de 20 milhões de casos estimados para 2025 venham de países em desenvolvimento como o Brasil. A incidência global aumentou 20% na última década, e no Brasil estima-se cerca de 600 mil casos novos por ano, sendo considerado a segunda causa de morte chegando a 190 mil por ano. Em 2030, espera-se uma incidência mundial de 27 milhões de novos casos (INCA, 2015).

O câncer, também chamado de neoplasia maligna, é uma doença multifatorial iniciada por mutações genéticas que causam um descontrole na proliferação celular. As células neoplásicas presentes em um tumor maligno apresentam um grau de atipia e desorganização celular que pode ser classificado como displasia de baixo e alto grau, de acordo com o grau da displasia observado, pode-se determinar se a neoplasia é maligna ou não. O que caracteriza um tumor maligno é sua capacidade de invadir tecidos, as células malignas rompem a membrana basal e podem penetrar em cavidades corpóreas, vasos sanguíneos e linfáticos que permite a disseminação das células malignas pelo corpo denominado metástase, desse modo podem surgir outros tumores derivados de um tumor primário (COTRAN, 2010). A invasão tecidual provoca lesões nas células adjacentes ao tumor, somados a processos metastáticos e alterações metabólicas oriundas do câncer, podem trazer sérios danos à saúde e possivelmente a morte, caso o paciente não seja tratado para eliminar o tumor em tempo hábil (KATZUNG, 2003).

O câncer é combatido de duas maneiras basicamente, prevenção e tratamento. Existe a prevenção primária onde o objetivo é impedir a formação do câncer, que inclui a adoção de um estilo de vida saudável, evitando a exposição a carcinógenos ambientais, e a prevenção secundária que é baseada na detecção de lesões precursoras do câncer e tratamento das doenças que são causadoras do

câncer, como pólipos intestinais, infecção pelo vírus HPV, etc (INCA, 2017). A outra maneira de combater o câncer é o tratamento, o que inclui: cirurgia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e quimioterapia. A quimioterapia é um importante método no tratamento do câncer; entretanto, um dos grandes desafios da atualidade é encontrar fármacos com maior eficácia e menos efeitos colaterais para melhorar a qualidade de vida dos pacientes.

Na busca por novos fármacos, a natureza é uma fonte imensurável de compostos bioativos seja de origem animal ou vegetal. Em especial, as plantas são as principais fontes de medicamentos anticâncer (COTREAU et al., 2000). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI-USA), por exemplo, tem realizado pesquisas ao longo de mais de quarenta anos com o intuito de encontrar agentes antitumorais de origem natural (NEWMAN et al., 2012). Diversos medicamentos desenvolvidos a partir de produtos naturais são utilizados no tratamento do câncer. Estudos recentes relatam que foram introduzidos 173 novos compostos anticâncer no período entre 01/1981 e 12/2010, nos quais 75% são derivadas ou baseadas em produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2012; CRAGG e NEWMAN, 2013). A xilopina é um alcaloide aporfínico encontrado principalmente em plantas da família Annonaceae. Esta apresentou atividade citotóxica promissora em estudos anteriores em nosso laboratório. Assim, nesse trabalho foram estudadas as propriedades citotóxicas da xilopina *in vitro* usando diferentes linhagens cancerígenas, e os mecanismos de ação envolvidos na sua citotoxicidade foram avaliados na linhagem HCT116 (carcinoma de colón humano).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 BIOLOGIA DO CÂNCER

O câncer é uma doença iniciada por alterações genéticas que causam um descontrole na proliferação celular. As mutações, quando não são herdadas, surgem de uma interação complexa entre célula e os carcinógenos ambientais tais como, tabaco, produtos químicos, radiações, microrganismos infecciosos, etc (GARCIA et al., 2007). A quantidade de agentes cancerígenos que as pessoas são expostas no dia a dia, causa um impacto significativo nas estatísticas de incidência do câncer. As substâncias encontradas em carnes processadas, produtos em conserva, alimentos industrializados em geral bem como agrotóxicos, poluição do ar, excesso de exposição ao sol, sedentarismo e estresse são aspectos de grande influência no surgimento dessa doença. Estima-se que cerca de 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais, podemos dizer que o “estilo de vida” é um fator crucial para o surgimento das neoplasias malignas (INCA, 2017).

O processo de formação do câncer, carcinogênese ou tumorigênese, acontece de forma lenta e progressiva, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa origine um tumor detectável. Existem várias fases nesse processo antes de chegar ao tumor: iniciação, promoção e progressão (Figura 1) (SPANDIDOS, 1985; SPANDIDOS, 2007). A iniciação é a primeira fase da carcinogênese. As células inicialmente sofrem o efeito de um agente carcinogênico que modifica a estrutura e/ou expressão de alguns de seus genes. Nesse período, as células encontram-se geneticamente alteradas, porém ainda não é possível detectar o tumor clinicamente. Exemplos de substâncias químicas carcinogênicas, incluem metilnitrossuréia, cloreto de vinila, sulfato de dimetila, aflatoxinas, dimetilnitrosamina e benzopireno (KUMAR et al., 2004; JUNG et al., 2006). Na promoção, as células alteradas geneticamente sofrem o efeito dos agentes cancerígenos classificados como oncopromotores. A célula iniciada é transformada em célula maligna, de forma lenta e gradual. Para que ocorra essa transformação, é necessário um longo e continuado contato com o agente cancerígeno promotor. A suspensão do contato muitas vezes interrompe o processo nessa fase (SPENCE e JONHSTON, 2001; KUMMAR et al., 2004). A terceira e última fase é a de

progressão, nela se observa multiplicação celular descontrolada, sendo um processo irreversível. O câncer já está instalado, evoluindo progressivamente até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença (SPENCE e JONHSTON, 2001; JUNG et al., 2006; SPANDIDOS, 2007).

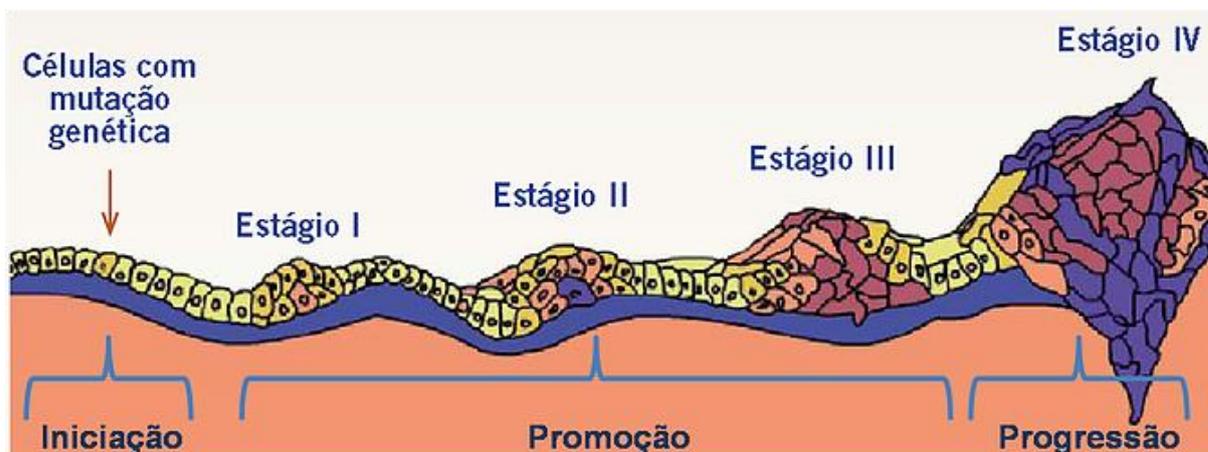


Figura 1. Fases do processo de formação do câncer (INCA, 2011).

Devido ao crescimento desordenado e seu caráter invasivo, as células malignas provocam lesões nos tecidos adjacentes, gerando processos inflamatórios e dor. Além disso, eventualmente podem se espalhar por todo o corpo por um processo chamado de metástase (Figura 2). A metástase ocorre quando algumas dessas células se desprendem do tumor caindo na corrente sanguínea ou linfática, invadem vasos sanguíneos ou linfáticos e aderem a outras regiões do corpo promovendo o crescimento de tumores em diferentes locais (SLEEMAN et al., 2012; ROSAS et al., 2013). Os problemas gerados por essas alterações teciduais são responsáveis pela morte e diversos transtornos que o câncer traz a saúde do paciente.

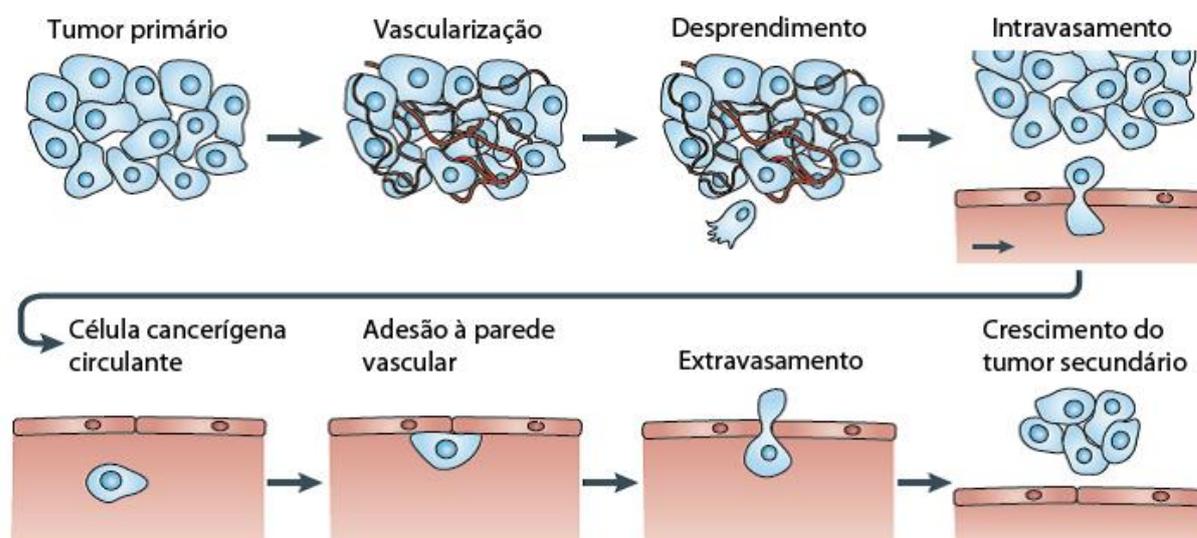


Figura 2. Ilustração do processo metastático (WIRTZ et al., 2011).

Os principais genes envolvidos na formação do tumor maligno podem ser divididos em três grupos principais, oncogenes, genes supressores de tumor e genes que codificam micro-RNAs (CROCE, 2008). Os oncogenes estão relacionados ao controle do crescimento celular, proliferação e apoptose, são gerados por mutações em proto-oncogenes, os quais genes exercem influência direta na organização tecidual através da proliferação e diferenciação celular (KEEP et al., 2011). No desenvolvimento do câncer, os oncogenes são genes dominantes e as alterações genéticas que levam à ativação desses genes incluem mutações pontuais, translocações e amplificações. Todas essas alterações resultam na superexpressão de oncoproteínas que estimulam a proliferação celular. A substituição de uma única base no gene RAS, por exemplo, guanina substituída por um resíduo de timidina, é suficiente para converter o gene normal em um oncogene importante para câncer humano (BOS, 1989). Essa mutação pontual resulta na substituição de valina por glicina, o que resulta na perda da atividade da GTPase intrínseca e na transdução de sinal desregulada para várias vias mitogênicas, como as vias MAP kinase e PI3K (RELÓGIO et al., 2014; STOUT et al., 2014). Esse gene defeituoso faz com que a célula perca o controle da sua proliferação, iniciando o processo de tumorigênese.

Para impedir esse tipo de situação os sistemas biológicos possuem genes responsáveis por inibir o desenvolvimento de tumores, são os chamados genes supressores de tumor (GST). Eles participam do reparo de danos ao DNA, podem retardar o crescimento e a proliferação celular e induzir apoptose, como por exemplo, o gene TP53. Pesquisas recentes mostram que alterações que conduzem ao surgimento do câncer tendem a afetar mais os GST do que os oncogenes (MORRIS et al., 2015). O gene TP53 está localizado no cromossomo 17 e as mutações neste gene são encontradas em 30-50% dos cânceres humanos comuns. A proteína p53 é um regulador negativo do ciclo celular e inibe a proliferação celular defeituosa (PRIVES e HALL 1999). Esta fosfoproteína é conhecida como "guardião do genoma" e atua como um fator de transcrição para suprimir o crescimento do tumor. A proteína p53 é constitutivamente expresso em níveis baixos e existe na célula como homotetrâmero (complexo de proteínas composto por quatro subunidades idênticas que estão associadas, mas não covalentemente ligadas). Como a proteína p53 do tipo selvagem não pode se ligar a um p53 de tipo mutante, o funcionamento do tetrâmero p53 pode ser inibido. Este evento é chamado de efeito dominante negativo (WILLIS et al., 2004). A proteína p53 de tipo selvagem tem uma meia vida curta e, em células normais, a proteína MDM2 regula a degradação do p53, marcando-a com ubiquitina para uma rápida degradação após a sua síntese. A proteína p53 desempenha um papel central no reconhecimento de dano ao DNA causado por exemplo pela radiação ionizante, UV e agentes químicos cancerígenos. Quando o dano do DNA está presente, os sensores de estresse celular, ATM, Chk1 e Chk2 quinases fosforilam p53 para inibir sua degradação, impedindo o MDM2 de ubiquitinar p53. Conseqüentemente, a proteína p53 escapa da degradação, se acumula rapidamente e induz uma série de alterações celulares, como a paralização temporária do ciclo celular e/ou a senescência através da indução de proteínas p21, p27 e p57, que inibem a fosforilação de CDK e conseqüentemente a ativação da proteína Rb, proteínas de reparo de DNA com a participação da família GADD45 e apoptose através do aumento da expressão de BAX (GOTTLIEB e OREN 1996; PRIVES e HALL 1999; LAHAV 2008). Apresentando uma prevalência particularmente alta (> 50%) de mutação nos tipos de câncer de ovário, pulmão, colorretal, cabeça e pescoço, pâncreas, útero, mama e bexiga. O TP53 é um gene

frequentemente inativado no tumor, o que se torna um alvo específico. As principais abordagens para a proteína p53 no câncer incluem moléculas que regulam ou inibem os efeitos da inativação do gene TP53, reintroduzindo o tipo selvagem ou induzindo a morte seletiva de células tumorais com o gene TP53 mutante (MORRIS et al., 2015).

Estudos sobre epigenética do câncer, sugerem que os genes podem ser ativados ou silenciados através de metilação, modificações das histonas covalentes ou por microRNAs, mecanismos os quais não alteram a sequência de DNA. A enzima responsável pela metilação do DNA é a DNA-metiltransferase (DNMT), geralmente esse processo resulta em silenciamento transcricional e inativação do gene metilado. O genoma humano contém 4 genes para DNMT, a expressão desordenada desses genes é vista em diversas doenças tais como autismo, doenças cardiovasculares, obesidade, diabetes tipo 2 e principalmente no câncer, pois existe uma forte relação entre hipometilação e o surgimento de câncer. As histonas também sofrem modificações como metilação, acetilação, fosforilação, biotinylation e ubiquitinação que interfere na expressão gênica. De maneira geral, esses mecanismos são influenciados por fatores ambientais como a dieta e exercem um papel muito importante na prevenção do câncer (HARDY et al., 2012). No nível citoplasmático, a expressão gênica pode ser regulada pelo micro-RNA. Os micro-RNAs são constituídos de 20-22 nucleotídeos de RNAs de cadeia simples não codificantes que estão envolvidos na regulação de processos fisiológicos e patológicos, como diferenciação, proliferação, metástase e angiogênese, o que faz com que o micro-RNA seja um dos maiores reguladores da expressão gênica. Os micro-RNAs se ligam a sequências complementares no RNA mensageiro para inibir sua tradução. Nos cânceres, os micro-RNAs podem estar desregulados em comparação ao tecido saudável e geralmente são considerados supressores de tumor (Zhang et al., 2007). Por exemplo, a perda de expressão da família miR-34 foi associada à metástase (Rokavec et al., 2014), enquanto que a inibição de miR15 e miR16 parece promover a sobrevivência celular (Calin et al., 2002).

2.2 EPIDEMIOLOGIA

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morte no mundo. Em 2015, 8,8 milhões de pessoas morreram de câncer, aproximadamente 70% de todas as mortes por câncer ocorreram em países em desenvolvimento. A estimativa para o Brasil no biênio 2018/2019 foi de 420 mil novos casos de câncer por ano e, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, os tipos de câncer mais prevalentes nos homens são cânceres de próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral. Nas mulheres são cânceres de mama, intestino, colo do útero, pulmão e tireoide. Em 2030, espera-se uma incidência mundial de 27 milhões de novos casos, o impacto do câncer será de 80% entre os países em desenvolvimento no ano de 2025 (INCA, 2017).

O estilo de vida é um fator impactante na incidência do câncer, aproximadamente 30 a 50% dos casos poderiam ser prevenidos através de hábitos saudáveis, nesse aspecto os 5 principais riscos comportamentais e dietéticos relacionados ao câncer são: baixa ingestão de frutas e vegetais, alto índice de massa corporal, falta de atividade física, uso de álcool e tabaco. O cigarro é responsável por 22% das mortes por câncer.

O risco de receber um diagnóstico de diferentes tipos de câncer varia ao longo da vida de uma pessoa. O risco acumulado para todos os cânceres combinados aumenta com a idade, até 70 anos, em seguida, diminui ligeiramente. Para a população total dos EUA, o risco ao longo da vida de ser diagnosticado com câncer é de aproximadamente 41% (HOWLADER et al., 2012). No entanto, uma proporção substancial de adultos mais velhos atingirá o fim de sua vida sem a detecção clínica do câncer (excluindo tumores indolentes). Após 90 anos, o câncer é incomum como causa de doença ou morte (PAVLIDIS et al., 2012). Além da idade existem outras condições que estão relacionadas ao câncer, a diabetes tipo 2 por exemplo está associada a um risco aumentado de desenvolver câncer de cólon, mama (pós-menopausa) e pâncreas (CANNATA et al., 2010; LA et al., 2011). O excesso de peso corporal também foi associado a um risco aumentado de vários tipos de câncer, incluindo o câncer do esôfago, pâncreas, tireoide, vesícula biliar, cólon e reto, mama (pós-menopausa), endométrio e rim. (LA et al., 2011; WOLIN et

al., 2010). O tecido adiposo visceral produz citocinas que criam inflamação crônica e promovem o crescimento do tumor através de múltiplos mecanismos biológicos (TRINCHIERI et al., 2012; GILBERT et al., 2013). O excesso de peso corporal contribui para a síndrome metabólica (TRINCHIERI et al., 2012), que também tem sido associada ao aumento do risco de câncer (CASPERSEN et al., 2012; RUSSO et al., 2008; GIOVANNUCCI et al., 2007). Escolha dietéticas saudáveis e atividade física entre os adultos pode potencialmente ajudar a reduzir a prevalência da síndrome metabólica reduzindo o risco de certos tipos de câncer (WHITE et al., 2014).

O câncer gera um grande impacto para economia global. Em 2010, foi estimado aproximadamente um gasto de 1,16 trilhões de dólares com a doença no mundo (OMS, 2017).

2.3 TERAPIAS DO CÂNCER

Existem vários tratamentos para o câncer tais como, imunoterapia, quimioterapia, hormonioterapia, radioterapia, procedimentos cirúrgicos, entre outros. Além disso, eles podem ser usados de forma combinada (ROSAS et al., 2013). A cirurgia foi a primeira maneira de tratar os tumores malignos. Nela os pacientes são submetidos a remoção do tumor ou a transplante do órgão afetado (WYLD et al., 2015). O avanço tecnológico e a combinação com outras terapias trouxeram uma enorme eficácia a essa modalidade. O carcinoma hepatocelular foi uma das primeiras indicações para transplante de fígado, porém, a depender da gravidade e tamanho do tumor o transplante pode ser inviável (CLAVIEN et al., 2012).

A radioterapia usa radiação ionizante para tratar o câncer, é um método moderno utilizado em mais de 60% dos casos diagnosticados com tumores malignos. Esse tipo de abordagem é aplicado em várias estratégias de tratamento, por exemplo, após cirurgias, combinado com quimioterapia, etc. Foram realizados diversos ensaios randomizados que comprovaram a eficácia da radioterapia e foi descrita em meta-análise que incluíam diversos tipos de câncer (ORTH et al., 2014). Estudos mostram que a radioterapia pode prolongar a sobrevida dos pacientes, diminuir o tamanho de tumores locais e prevenir a amputação cirúrgica de membros, além de poder ser usada de forma paliativa (DELANEY et al., 2005).

A quimioterapia é um tratamento que consiste na administração de fármacos com potencial anticâncer, buscando a regressão e destruição das células neoplásicas. Os resultados são satisfatórios na maior parte dos casos, porém os efeitos colaterais são bastante temidos (RODRIGUES et al., 2012). Os quimioterápicos têm maior efeito nas células com alto potencial de proliferação, causando assim danos mais severos nas células cancerígenas, mas atingindo também outros tipos celulares com estas características, tais como as células gastrointestinais, capilares e as células do sistema imunológico. Por essa falta de seletividade dos quimioterápicos, surgem os diversos efeitos colaterais, tais como náusea, vômito, queda de cabelo, imunossupressão, etc (KATZUNG et al., 2003). Outro problema enfrentado pela quimioterapia é a resistência que as células cancerosas adquirem ao longo do tratamento trazendo transtornos ao paciente, pois o tumor pode voltar a crescer com resistência ao quimioterápico. Estudos revelam que isso acontece porque no tumor inicial podem haver células resistentes ao fármaco que foi administrado, as quais continuam proliferando, podendo posteriormente formar um novo tumor (DIAZ et al., 2012). O uso combinado de quimioterápicos seria uma alternativa para atingir um maior número de células possíveis, evitando casos de resistência e recidivas (DIAZ et al., 2012). Além disso, as células adquirem resistência por mutações que trazem benefícios para sua sobrevivência (CHONG e JÄNNE, 2013). Foi observado em um estudo que avaliou a resistência de células de adenocarcinoma do pulmão, que os mecanismos envolvidos nesse processo são mediados por um complexo conjunto de vias de sinalização celular como a EGFR (também conhecido como ERBB1 ou HER1), que pertence à família ERBB de receptores de tirosina quinases de superfície celular que também inclui o HER2 (também conhecido como NEU ou ERBB2). A ligação de EGF a EGFR desencadeia homodimerização ou heterodimerização deste receptor com outros membros ERBB, nomeadamente HER2, fosforilação do receptor e ativação de efetores tais como RAS-RAF-MEK-ERK-MAPK e PI3K-AKT-mTOR, levando à proliferação celular (CIARDIELLO et al., 2008). Outros ligantes de EGFR incluem o fator de crescimento transformante- α (TGF- α), anfiregulina, epigen, EGF de ligação à heparina, betacelulina e epiregulina (MITSUDOMI et al., 2010). A sinalização de EGFR de tipo selvagem contribui para a proliferação de células tumorais, evasão de

apoptose, angiogênese e metástase (CIARDIELLO et al., 2008; CHONG e JÄNNE, 2013).

Os quimioterápicos agem nas células tumorais provocando morte celular ou inibindo a proliferação. Existem várias classes farmacológicas e estruturais de quimioterápicos antineoplásicos, incluindo agentes alquilantes, inibidores de quinases, alcaloides de vinca, antraciclinas, antimetabólitos, inibidores de aromatase, inibidores de topoisomerasas, corticosteróides, antibióticos antitumorais e inibidores mitóticos.

Aproximadamente 70% dos medicamentos com potencial citotóxico para células tumorais são produtos naturais ou derivadas destes (KARIKAS, 2010). Uma das classes mais comentadas em estudos científicos são os alcaloides da vinca encontrados nas partes aéreas da planta *Catharanthus roseus*, conhecida também como vinca. Ela era utilizada no tratamento da diabetes pela população de Madagascar (BRANDÃO et al., 2010). Durante testes que avaliavam sua ação hipoglicemiante foi identificado granulocitopenia gerada pela supressão da medula óssea nos animais (BRANDÃO et al., 2010). Esse achado foi fundamental para a descoberta da ação anticâncer dos extratos dessa planta e seus constituintes químicos, principalmente alcaloides, classificados farmacologicamente como inibidores mitóticos e usados amplamente como medicamentos, tais como vimblastina (Velban®) e vincristina (Oncovin®). Outra descoberta com destaque foi a do paclitaxel (Taxol®) obtido da casca do teixo (*Taxus baccata* L.) em 1971, um diterpeno antimitótico que interage com a tubulina, uma das proteínas que formam os microtúbulos, este fármaco age estabilizando os microtúbulos de tal forma que impede a sua despolarização, interferindo no fuso mitótico e a mitose conseqüentemente. É indicado principalmente para câncer de pulmão, ovário e mama (BRANDÃO et al., 2010).

2.4 ALCALOIDES APORFÍNICOS

Os alcaloides são um dos metabolitos mais abundantes, e constituem um grande conglomerado de compostos naturais contendo nitrogênio heterocíclico básico que são normalmente produzidos por plantas como substâncias tóxicas. Dos 27.000 diferentes alcaloides, mais de 17.000 exibiram propriedades farmacológicas diversas, incluindo atividades anticancerígenas. Estes metabólitos foram

classificados de acordo com suas estruturas químicas ou sua origem taxonômica. Apenas uma parte do grande número de alcaloides foi estudado quanto a sua atividade anticancerígena (HABLI et al., 2017).

Os alcaloides aporfínicos (Figura 3) pertencem a uma família diversa de alcaloides isoquinolínicos com mais de 300 membros, e possuem uma estrutura tetracíclica com diferentes níveis de oxidação em ambos os anéis aromáticos (LAFRANCE et al., 2007). Dados mostram que os alcaloides aporfínicos tem uma maior distribuição em plantas da família Annonaceae, onde foram observados 28 gêneros dessa família que sintetizam alcaloides aporfínicos, são eles *Alphonsea*, *Anaxagorea*, *Annona*, *Artabotrys*, *Asimina*, *Cananga*, *Cheistophlis*, *Desmos*, *Duguetia*, *Enantia*, *Eupomatia*, *Fusea*, *Goniothalamus*, *Greenwayodendron*, *Guatteria*, *Hexalobus*, *Isolona*, *Meiocarpidium*, *Melodorum*, *Mitrella*, *Monanthotaxis*, *Monodora*, *Pachypodanthium*, *Polyalthia*, *Popowia*, *Pseuduvaria*, *Schefferomitra*, *Uvariopsis*, *Fissistigma* e *Xylopia* (CHEN et al., 2013). Estes apresentam diversos efeitos farmacológicos, incluindo atividade antiplaquetária, antioxidante, imunoreguladora, anticonvulsivante, antiespasmódica, antimalárica, bloqueadora adrenérgica, anti-serotonínica, bloqueadora de canais iônicos, citotoxicidade antitumoral e antiviral, entre outras (CHEN et al., 2013).

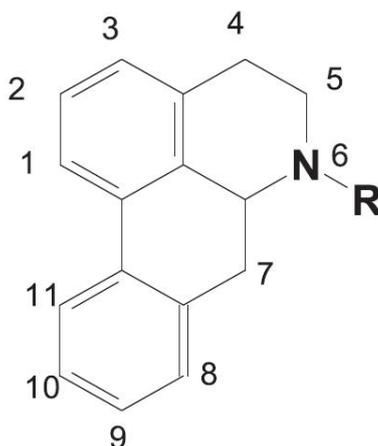


Figura 3. Estrutura química básica do esqueleto de alcalóides aporfínicos.

Estudos anteriores sugerem que esses compostos podem apresentar uma estrutura relativamente planar, que poderia intercalar facilmente na dupla hélice de DNA e/ou combinar alvos da topoisomerase II, formando uma estrutura complexa de

difícil desintegração, desse modo inibindo a atividade catalítica da topoisomerase II (LIU et al.,2013). A atividade citotóxica de alguns alcaloides aporfínicos está relacionada com a presença de grupos metilenodioxí, que promove interferência na atividade catalítica da topoisomerase II (CHEN et al., 2013).

A liriodenina, um dos alcaloides aporfínicos mais estudados, apresenta atividade inibidora de topoisomerase II (DA SILVA et al., 2007). Em um ensaio comparativo para explorar a relação entre a estrutura química e atividade inibidora de topoisomerase II, foram utilizados mais dois alcaloides aporfínicos, bulbocapnina e dicentrina. A partir disso foi observado que a planaridade dos alcaloides testados é um fator importante para atividade exercida por eles. A liriodenina, por ser totalmente planar, seguida da dicentrina, que tem uma conformação relativamente planar, apresentaram potente atividade inibidora de topoisomerase II, enquanto que a bulbocapnina, que não apresenta tal conformação, mostrou-se inativa. Desse modo, notamos que as propriedades físico-químicas e características estruturais são importantes pontos para a avaliação da atividade biológica ou farmacológica (DA SILVA et al., 2007).

Adicionalmente, em estudos com a atividade citotóxica de alcaloides isoquinolina da planta *Stephania pierrei* (*Menispermaceae*), o grupo funcional 1,2-metilenodioxí presente nos alcaloides aporfínicos, dentre eles a xilopina, apresentou uma correlação com a citotoxicidade induzida pelos compostos. Por outro lado, compostos sem este grupo funcional praticamente não apresentaram atividade citotóxica (LIU et al.,2013). Recentemente, nosso grupo de pesquisa estudou a atividade citotóxica de diversos alcaloides aporfínicos isolados do caule da planta *Xylopi laevigata*. Dentre eles, o alcaloide aporfínico xilopina (Figura 4) apresentou potente atividade citotóxica com valores de CI_{50} (concentração inibitório de 50%) de 3,77, 1,87, 1,87 e 3,12 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens de células cancerígenas B16-F10, HepG2, HL60 e K562 respectivamente, e 4,08 $\mu\text{g/mL}$ em células não cancerígenas, PBMC. Em estudos preliminares de mecanismo de morte celular, células de carcinoma hepatocelular, HepG2, tratadas com xilopina apresentaram morfologia celular típica de morte celular apoptótica, um aumento significativo de externalização de fosfatidilserina e parada do ciclo celular na fase G_2/M (MENEZES et al., 2016).

Assim, no presente trabalho decidimos estudar mais detalhes sobre o potencial citotóxico do alcaloide aporfínico xilopina em diferentes modelos celulares.

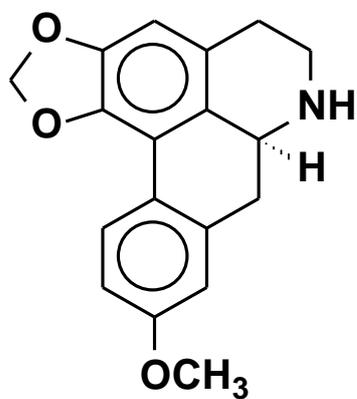


Figura 4. Estrutura química da xilopina.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o potencial citotóxico do alcaloide aporfínico xilopina e estudar seus possíveis mecanismos de ação.

3.2 ESPECÍFICOS

Determinação *in vitro* do índice de seletividade do alcaloide aporfínico xilopina;

Avaliar o tipo de morte celular induzido pelo alcaloide aporfínico xilopina;

Avaliar os mecanismos de ação envolvidos na citotoxicidade induzida pelo alcaloide aporfínico xilopina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DO COMPOSTO

O caule de *X. laevigata* foi coletado na "Serra de Itabaiana", entre as cidades de Itabaiana e Areia Branca [coordenadas: 10°44'50"S, 37 °20'24"W], Sergipe, Brasil, em fevereiro de 2013. A identidade da planta foi confirmada pela Dra. Ana Paula do N. Prata, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, Brasil, e uma exsicata (# 26805) foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Sergipe. O caule seco e em pó de *X. laevigata* (1,4 kg) foi sucessivamente extraída com hexano seguido de metanol, para produzir extratos de hexano (18,8 g) e metanol (87,8 g). A xilopina foi isolada do extrato metanol conforme descrito anteriormente (MENEZES et al., 2016). O isolamento deste composto foi realizado pelo prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa da Universidade Federal do Amazonas.

4.2 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS EM CULTURA

Para os ensaios de citotoxicidade, as linhagens de células cancerígenas B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL-60 (leucemia promielocítica aguda humana), K562 (leucemia mielocítica crônica humana), HSC-3 (carcinoma escamocelular oral humano), SCC9 (carcinoma escamocelular oral humano), HCT-116 (carcinoma de cólon humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), WT SV40 MEF (fibroblasto embrionário de camundongo imortalizado do tipo selvagem) e BAD KO SV40 MEF (fibroblasto embrionário de camundongo imortalizado, gene BAD knockout) obtidas da *American Type Culture Collection* - ATCC (Rockville, Maryland, U.S.A.) foram utilizadas. Para avaliar a seletividade dos compostos sobre a proliferação de células não cancerígenas, a linhagem MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano), também obtida da ATCC, e PBMC (células mononucleares do sangue periférico humano estimulado com concanavalina A – linfoblastos humanos), obtidos de voluntários saudáveis com idades entre 20-40 anos, isentos de fármacos, bebidas alcoólicas e cigarros. O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (Salvador, Bahia, Brasil) aprovou o protocolo experimental (nº 031019/2013) para a coleta de PBMC. As

linhagens celulares foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL) utilizando o meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal e 10 µg/mL de gentamicina. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C e acompanhadas diariamente. Todas as linhagens celulares foram testadas para micoplasma usando um kit de detecção de micoplasma por coloração com Hoechst (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), e todas as células estavam isentas de qualquer contaminação.

4.3 ENSAIO DO ALAMAR BLUE

Para avaliar a citotoxicidade da xilopina e determinar o valor de CI₅₀, foi utilizado o método colorimétrico do alamar blue. O alamar blue (resazurina) é um indicador que produz uma mudança colorimétrica e um sinal fluorescente em resposta à atividade metabólica. O alamar blue reduz-se em células viáveis. A forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do alamar blue reflete a viabilidade celular (AHMED et al., 1994).

As células foram distribuídas em placas de 96 cavidades numa densidade pré-definida de 0,3 x 10⁶ células/mL para células não aderentes e 0,7 x 10⁵ células/mL para células aderentes. A xilopina e os controles positivo foram dissolvidos em DMSO e diluídos com meio de maneira seriada a 8 vezes, as concentrações oscilam de 0,19 a 25 µg/mL, em seguida as diluições foram adicionadas em cada poço e encubados por 72 h, período padrão para esse ensaio. A oxaliplatina e a doxorubicina foram utilizadas como controles positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade do DMSO (DMSO 0,5%). O resultado foi lido em espectrofotômetro nas absorvâncias de 570 nm e 600 nm.

4.3.1 Cultura de esferoides multicelulares 3D

Com objetivo de mimetizar a matriz tecidual in vivo, as células HCT116 foram cultivadas em esferoides multicelulares tridimensionais (3D). Resumidamente, foram inseridos 100 µL de uma suspensão de células (0,5 x 10⁶ células/mL) em uma placa de 96 poços com uma superfície repelente de células (Greiner Bio-One,

Kremsmünster, Áustria) e cultivadas em meio completo mais 3% de matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Os esferoides com estruturas estáveis se formaram após três dias. Em seguida, os esferoides foram expostos a xilopina e controles positivos diluídos de maneira seriada durante 72 h com concentrações oscilando de 0,19 a 25 µg/mL, e após o período de tratamento a viabilidade celular foi quantificada pelo ensaio do alamar blue, como descrito acima.

4.4 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CÉLULAR / MECANISMO DE AÇÃO INDUZIDO PELA XILOPINA

Para os ensaios de padrão de morte celular/mecanismo de ação, foi utilizada apenas a linhagem mais sensível a xilopina. Células da linhagem HCT116 ($0,7 \times 10^5$ células/mL) foram adicionadas à placas de 24 poços por um período inicial de 24 h para aderirem. Após este período, as células foram tratadas por 24 e 48 horas com a xilopina nas concentrações de 1, 2 e 4 µg/mL (concentrações estabelecidas previamente com base no valor de CI_{50}). As células foram mantidas em estufa a 37° C e a 5% de CO₂. A doxorrubicina (0,5 µg/mL) e a oxaliplatina (1 µg/mL) foram utilizadas como controles positivo e o controle negativo recebeu apenas o veículo (DMSO 0,1%) usado para solubilizar e diluir a substância testada.

4.4.1 Ensaio de exclusão com o azul de tripam

Para avaliar a viabilidade celular após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e uma alíquota de 90 µL foi acrescida a 10 µL do corante azul de tripam. Esse corante só é capaz de corar células que apresentam permeabilidade por conta de lesões na membrana plasmática classificada como não viáveis. Desse modo, a contagem foi realizada levando em consideração a exclusão do corante por células viáveis, em câmara de Neubauer, por meio de microscópio óptico.

4.4.2 Análise do ciclo celular / fragmentação do DNA internucleossomal

O ciclo celular é constituído pelas seguintes fases: G₁, S, G₂ e M. Durante o período de crescimento celular (fase G₁), uma célula diplóide apresenta um conteúdo 2n (n – conteúdo de um conjunto haplóide de cromossomos) de DNA nuclear, possui duas cópias de cada gene. Durante a fase S ocorre a duplicação do

genoma nuclear ($2-4n$) e na fase seguinte (fase G_2) ocorre o segundo período de crescimento celular, durante o qual o conteúdo em DNA nuclear é mantido no nível $4n$. Em seguida ocorre a mitose (fase M , $4n$) durante a qual a célula se divide, formando duas células filhas, cada uma com um conteúdo $2n$ em DNA. As células que não se encontram em divisão celular (G_0) apresentam um conteúdo $2n$ de DNA. Logo, as fases do ciclo celular podem ser caracterizadas por variações no seu conteúdo de DNA, quando analisadas por citometria de fluxo após marcação com iodeto de propídio permite quantificar a percentagem de células em cada fase do ciclo celular (CIBAS, 1995). O iodeto de propídio (IP) é um agente fluorogênico hidrofílico com capacidade de se ligar no DNA celular emitindo alta fluorescência quando excitado pelo laser de argônio, refletindo a fase celular em que essas células se encontram (MACKLIS e MADISON, 1990). Após o tratamento, as células foram diluídas com a solução de permeabilização para que o IP pudesse se ligar aos núcleos de todas as células analisadas ($100 \mu\text{g/mL}$ de RNase, $0,1\%$ de citrato de sódio, $0,1 \%$ de triton X-100 e $2 \mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídeo) (todos da Sigma-Aldrich Co.). Na ausência de luz, a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ e após 30 minutos, as células foram analisadas por citometria de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. As diferentes fases do ciclo celular foram identificadas usando o programa Flowjo Software 10.

4.4.3 Análise morfológica

Para a realização da análise morfológica, as células foram plaqueadas em placas de 24 poços sobre lamínulas de vidro adicionadas aos poços da placa de cultura. Após o período inicial de 24 h para aderência das células a lamínula, foram adicionadas à cultura os controles positivo, negativo e a xilopina. Após o tratamento de 24 e 48 h, o meio de cultura foi descartado e em seguida as lamínulas foram coradas com May-Grunwald-Giemsa. As lamínulas coradas foram montadas em lâminas de vidro utilizando balsamo do Canadá, e com o auxílio de microscópio óptico, as alterações morfológicas foram avaliadas e fotografadas utilizando o software ImagemPro (Media Cybernetics, MD, EUA).

4.4.4 Marcação para anexina V/iodeto de propídio

O procedimento de detecção de apoptose e necrose por Anexina V-FITC/iodeto de propídio consiste na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina externalizada na membrana das células que estão iniciando o processo apoptótico e na ligação do iodeto de propídio ao DNA das células no processo final da apoptose ou necrose, desse modo a células marcadas apenas com anexina V são consideradas em apoptose inicial, as marcadas pela anexina V e iodeto de propídio estarão em apoptose tardia e as que marcaram apenas com iodeto de propídio foram classificadas como células necróticas.

A marcação para anexina V/iodeto de propídio foi realizada utilizando o kit *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Biosciences) seguindo as instruções do próprio fabricante. Células HCT116, na concentração de $0,7 \times 10^5$ células/mL, foram incubadas por 24 e 48 horas com a substância teste. Após os tratamentos, as células foram centrifugadas e posteriormente lavadas com salina. O sobrenadante foi descartado e ao pellet celular foi adicionado 400 μ L de tampão de ligação e em seguida acrescentados 5 μ L de anexina V-FITC e 5 μ L de iodeto de propídio. As células foram então incubadas em temperatura ambiente por 15 min, e posteriormente foi feito à aquisição dos dados por citometria de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.4.5 Determinação do potencial transmembrânico mitocondrial

Para a determinação do potencial transmembrânico mitocondrial, as células foram coradas com rodamina 123, esse corante é sequestrado para dentro da mitocôndria quando esta apresenta seu potencial transmembrânico inalterado. Assim, as células viáveis emitem alta fluorescência verde devido à maior quantidade de rodamina 123 ligada às cargas positivas internas, enquanto que as mitocôndrias despolarizadas terão menor afinidade pelo corante, gerando eventos que emitem menor fluorescência. Após o período de tratamento de 24h, as células foram tripsinizadas e transferidas para tubos de ensaio previamente identificados, em seguida foram ressuspensas com a solução de rodamina 123 (1 μ g/mL em salina) (Sigma-Aldrich Co.), na ausência de luz por 15 minutos. Após o período de

incubação, as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspenso em salina e então analisadas por citometria de fluxo. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes realizados em triplicatas. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.4.6 Determinação da atividade de caspase 3

A atividade de caspase 3 foi investigada utilizando o kit *caspase-3 colorimetric assay* (Sigma-Aldrich Co.) seguindo as instruções do próprio fabricante. O ensaio de atividade da caspase 3 é baseado na detecção por espectrofotômetro do cromóforo p-nitroanilina (pNA) depois da clivagem do substrato X-pNA, onde X é a sequência de aminoácidos reconhecida pela caspase 3. Células tratadas por 48 h com os controles positivo e xilopina foram centrifugadas e lisadas em gelo. A quantidade de proteína no lisado foi determinada utilizando-se o ensaio para dosagem de proteína pelo método de Bradford (ensaio colorimétrico para determinação total de proteína, que utiliza o corante azul brilhante de coomassie G-250 que se liga às proteínas, essa ligação gera mudanças na cor do corante proporcional a quantidade de proteína). Em seguida, 100 µg de proteínas foram incubadas com o substrato em placa de 96 poços. A densidade óptica das amostras foi medida a 405 nm em espectrofotômetro.

4.4.7 Quantificação de espécies reativas de oxigênio intracelular

Para quantificar os níveis intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO), as células foram tratadas por 1 h ou 3 h com a xilopina, e os controles positivo e negativo. Após esse período, as células foram tripsinizadas e ressuspenso em 1 mL de meio fresco e 2 µL de diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (H₂-DCF-DA) (Sigma-Aldrich Co.), que é convertido num produto fluorescente na presença de ERO intracelular. Após 30 minutos de incubação a 37° C na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas, ressuspenso em salina e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.4.8 Quantificação do radical ânion superóxido intracelular

Para quantificar os níveis intracelular do radical ânion superóxido, as células foram tratadas por 1 h com a xilopina, e os controles positivo e negativo. Após esse período, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em 1 mL de meio fresco e 2 µL de dihidroetídio (DHE) (Sigma-Aldrich Co.), que é convertido num produto fluorescente na presença do radical ânion superóxido. Após 30 minutos de incubação a 37° C na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas, ressuspensas em salina e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.4.9 Quantificação de óxido nítrico intracelular

Para quantificar os níveis intracelular de óxido nítrico (NO), as células foram tratadas por 1 h com a xilopina, e os controles positivo e negativo. Após esse período, as células foram tripsinizadas e ressuspensas em 1 mL de meio fresco e 2 µL de diacetato de 4-amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína (DAF-FM DA), que é convertido num produto fluorescente na presença de NO. Após 30 minutos de incubação a 37° C, na ausência de luminosidade, as células foram centrifugadas, ressuspensas em salina e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

4.4.10 Quantificação de glutathiona reduzida

A glutathiona (γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina) é um composto tripeptídico que existe no organismo, e está envolvido com o sistema antioxidante, metabolismo de fármacos e outros como um substrato enzimático da glutathiona peroxidase, glutathiona Stransferase, tiol transferase. A glutathiona é geralmente apresentada como uma forma reduzida (GSH), mas a GSH pode ser convertida na forma oxidada (GSSG) pela estimulação do estresse oxidativo. A quantificação de glutathiona reduzida foi realizada utilizando o kit *Quantification kit for reduced glutathione* (Sigma-Aldrich Co.) com período de 1 h de tratamento, seguindo as instruções do próprio fabricante.

4.4.11 Ensaio de reversão com inibidores farmacológicos

No ensaio de reversão com inibidores farmacológicos, foram utilizados inibidor de caspase 3 (Z-VAD-FMK), inibidor de ERO N-acetil-L-cisteína (NAC), inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) e o inibidor de H₂O₂, catalase de fígado bovino (Sigma-Aldrich Co.) para confirmar o possível mecanismo de citotoxicidade induzido pelo tratamento com xilopina. Para avaliação de prevenção da apoptose com Z-VAD-FMK, pifitrina- α cíclica e NAC, os inibidores foram adicionados 1 h antes do tratamento sendo adotada a metodologia da anexina V/IP (5.4.3 Marcação para anexina V/IP) e para analisar a prevenção da produção de ERO, os inibidores NAC e catalase de fígado bovino foram adicionados 1 h antes do tratamento sendo adotada a metodologia (5.4.6 Quantificação de ERO) para determinação dos resultados.

4.4.12 Ensaio de intercalação de DNA

A intercalação do DNA foi avaliada examinando a capacidade da xilopina em deslocar o brometo de etídio do DNA do timo do bezerro (ctDNA, Sigma-Aldrich Co., Saint Louis, MO, EUA) (GLASS et al., 2010). O ensaio foi conduzido em placas de 96 poços e continha 15 μ g/mL de ctDNA, 1,5 μ M de brometo de etídio e 10 ou 20 μ M de xilopina em 100 μ L de solução salina. A doxorrubicina (10 μ M) foi utilizada como controle positivo. A fluorescência foi medida utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão de 320 e 600 nm, respectivamente.

4.4.13 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. ou valores de CI₅₀ e respectivos intervalos de confiança de 95%, obtidos através de regressão não linear, a partir de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. A diferença entre os grupos experimentais foi avaliada pelo teste ANOVA (análise de variância) seguida do teste de Student-Newman-Keuls ($P < 0,05$). O programa GRAPHPAD PRISM (Intuitive Software for Science) foi utilizado para a realização de todas as análises.

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E SELETIVIDADE

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade da xilopina em células cancerígenas e não cancerígenas. A xilopina apresentou valores de CI_{50} para células cancerígenas variando de 1,90 a 7,84 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens HCT116 e SCC9, respectivamente, também apresentou valores de CI_{50} de 7,53 e 5,39 $\mu\text{g/mL}$ para as células não cancerígenas MRC5 e PBMC, respectivamente. A doxorrubicina e a oxaliplatina foram utilizadas como controles positivo. A doxorrubicina apresentou valores de CI_{50} variando de 0,02 a 0,58 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens cancerígenas B16-F10 e MCF7, respectivamente. Em células não cancerígenas, doxorrubicina apresentou valores de CI_{50} de 0,82 e 2,82 $\mu\text{g/mL}$ em células MRC5 e PBMC, respectivamente. Oxaliplatina apresentou valores de CI_{50} que variam de 0,02 a 1,64 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens cancerígenas B16-F10 e HCT116, respectivamente, e valores de CI_{50} de 0,61 e 5,91 $\mu\text{g/mL}$ para as células não cancerígenas MRC5 e PBMC, respectivamente. A Tabela 2 mostra o índice de seletividade obtido. Para a maioria das linhagens celulares de câncer, a xilopina apresentou índice de seletividade semelhante aos controles positivo doxorrubicina e oxaliplatina.

Tabela 1. Atividade citotóxica da xilopina em células com diferentes tipos histológicos

Células	Tipo histológico	CI ₅₀ em µg/mL (µM)		
		Xilopina	Doxorrubicina	Oxaliplatina
Células cancerígenas				
MCF7	Adenocarcinoma de mama humano	3,54 (12,00)	0,58 (1,06)	n.d
		1,80 - 6,97	0,18 - 1,90	
HCT116	Carcinoma de cólon humano	1,90 (6,46)	0,04 (0,07)	1,64 (4,13)
		1,51 - 2,41	0,02 - 0,06	1,06 – 2,55
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano	2,78 (9,40)	0,032 (0,06)	0,38 (0,96)
		1,77 - 4,36	0,02 - 0,06	0,09 – 1,56
SCC9	Carcinoma escamocelular oral humano	7,84 (26,54)	0,27 (0,50)	n.d
		6,47 - 9,49	0,20 - 0,37	
HSC3	Carcinoma escamocelular oral humano	4,63 (15,69)	(0,14 0,25)	n.d
		3,00 - 7,19	0,10 - 0,20	
HL-60	Leucemia promielocítica humana	5,45 (18,46)	0,17 (0,31)	0,16 (0,40)
		4,71 - 6,30	0,15 - 0,20	0,01 – 1,50
K562	Leucemia mielocítica crônica humana	2,29 (7,74)	0,16 (0,29)	0,36 (0,90)
		1,79 - 2,93	0,10 - 0,25	0,03 – 3,86
B16-F10	Melanoma murino	2,82 (9,54)	0,02 (0,03)	0,02 (0,05)
		2,36 – 3,36	0,01 – 0,04	0,01 – 0,52
Células não cancerígenas				
MRC5	Fibroblasto de pulmão humano	7,11 (24,07)	0,82 (1,51)	0,61 (1,54)
		6,05 - 8,35	0,65 - 1,04	0,34 – 1,13
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i> ativados com ConA - linfoblastos	5,39 (18,25)	2,82 (5,18)	5,91 (14,88)
		3,24 – 8,57	1,29 – 6,17	3,54 – 9,86

Valores de CI₅₀ e o respectivo intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do alamar blue após 72 h de exposição obtidos por regressão não-linear. Doxorrubicina e oxaliplatina foram usadas como controles positivo. N.d. Não determinado.

Tabela 2. Índice de seletividade da xilopina (XIL)

Células cancerígenas	Células não cancerígenas					
	MRC5			PBMC		
	DOX	OXA	XYL	DOX	OXA	XYL
MCF7	1,4	0,3	2	4,7	2,5	1,5
HCT116	15	0,4	3,8	52	3,6	2,9
HepG2	15	1,5	2,6	52	14,9	2
SCC-9	3	N.d.	0,9	10,4	N.d.	0,7
HSC-3	5	0,5	1,5	17,3	4,5	1,2
HL-60	5	3,8	1,3	17,3	37,3	1
K-562	5	1,7	3,1	17,3	16,6	2,4
B16-F10	50	15	2,5	173,3	149	1,9

Os dados apresentam o índice de seletividade (IS) calculado com a seguinte fórmula: $IS = CI_{50}[\text{células não cancerígenas}] / CI_{50}[\text{células cancerígenas}]$. Células cancerígenas: MCF7 (adenocarcinoma de mama humano); HCT116 (carcinoma do cólon humano); HepG2 (carcinoma hepatocelular humano); SCC-9 (carcinoma escamocelular oral humano); HSC-3 (carcinoma escamocelular oral humano); HL-60 (leucemia promielocítica humana); K-562 (leucemia mielóide crônica humana); e B16-F10 (melanoma murino). Células não cancerígenas: MRC-5 (fibroblasto pulmonar humano) e PBMC (células mononucleares de sangue periférico humano). Doxorubicina (DOX) e oxaliplatina (OXA) foram utilizadas como controles positivo. N.d. Não determinado.

5.1.2 Atividade citotóxica da xilopina no modelo 3D

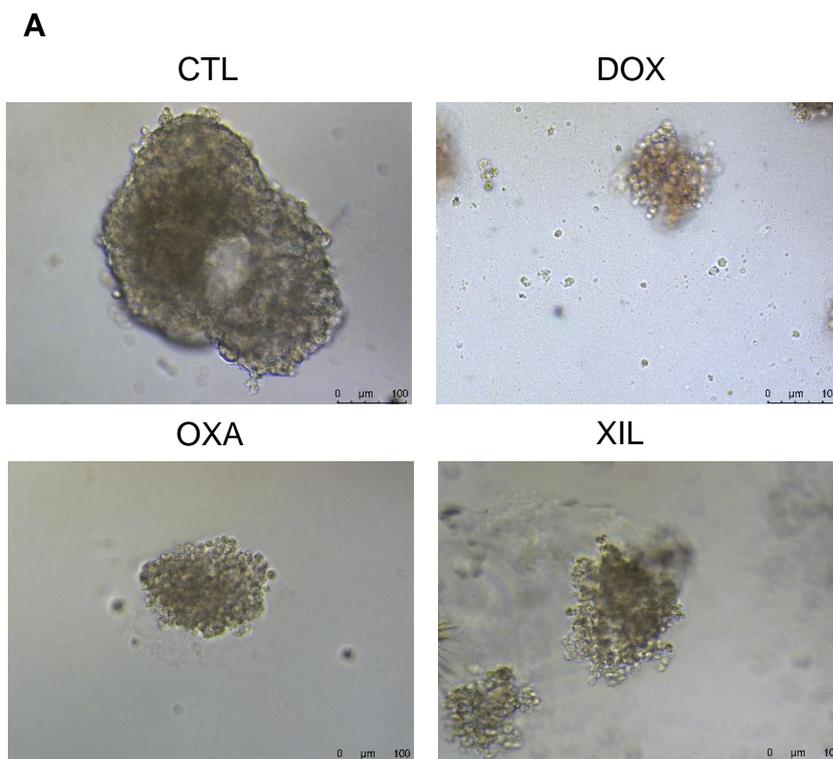
Efeito citotóxico da xilopina em um modelo 3D foi avaliado em esferoides multicelulares formados a partir de células HCT116 (Figura 5). Os esferoides tratados com xilopina apresentaram alterações morfológicas que indicam permeabilidade do fármaco e citotoxicidade na cultura 3D. O valor de CI_{50} da xilopina foi de 7 $\mu\text{g/mL}$ após 72 h de incubação. A doxorubicina e o oxaliplatino apresentaram valores de CI_{50} de 2,4 e 2,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

5.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO PADRÃO DE MORTE CELULAR/MECANISMO DE AÇÃO

Uma vez que as células da linhagem HCT116 foram as mais sensíveis à atividade citotóxica da xilopina, estudos adicionais *in vitro* visando avaliar o efeito da xilopina sobre a proliferação celular e na indução de morte celular apoptótica, foram realizados somente nesta linhagem. As concentrações da xilopina testadas foram de 1, 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$, definidas de acordo com os valores de CI_{50} para a xilopina nessa linhagem. Foram avaliados a viabilidade celular, o conteúdo de DNA nuclear da célula, que reflete as fases do ciclo celular, o padrão de morte celular, a indução da produção de ERO e o potencial transmembrânico mitocondrial.

5.2.1 Determinação da Viabilidade Celular – Exclusão por Azul de Tripam

A Figura 6 apresenta os resultados do ensaio de viabilidade celular por exclusão com o corante azul de tripam. A xilopina causou uma redução significativa no número de células viáveis, de maneira dependente da concentração quando comparado com o controle negativo após 24 e 48 h de incubação. A doxorubicina e a oxaliplatina, utilizadas como controles positivo, também reduziram o número de células viáveis a partir de 24 h de tratamento.



B

Esferóides	CI ₅₀ em µg/mL		
	DOX	OXA	XIL
HCT116	2,4	2,3	7,1
	1,3 – 4,4	1,4 – 4,1	5,2 – 10,3

Figura 5. Efeito da xilopina no modelo 3D de esferóides multicelulares de câncer formados a partir de células HCT116. **(A)** Células examinadas por microscopia óptica (bar = 100 µm). **(B)** Valores de CI₅₀ e o respectivo intervalo de confiança de 95% de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do alamar blue após 72 h de exposição obtidos por regressão não-linear. Doxorrubicina e oxaliplatina foram usadas como controles positivo.

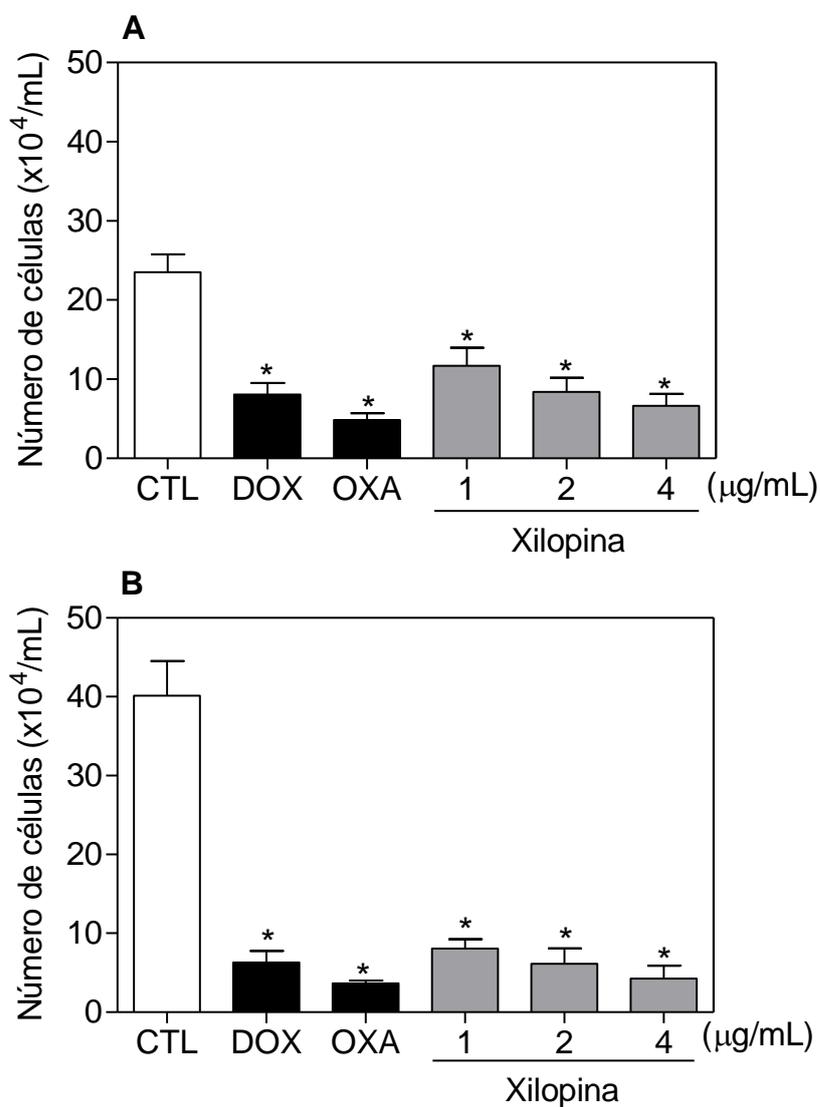


Figura 6. Efeito da xilopina sobre a viabilidade de células de carcinoma de cólon humano HCT116 determinado pelo ensaio de exclusão com o azul de tripam após 24 (**A**) e 48 (**B**) h de incubação. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) utilizado para solubilizar e diluir a substância. A doxorrubicina (DOX, 0,5 µg/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 µg/mL) foram utilizadas como controles positivo. Os valores correspondem a média ± E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

5.2.2 Análise do ciclo celular

A avaliação do ciclo celular foi realizada por citometria de fluxo (Figura 7 e Tabela 3). Foi evidenciado que a xilopina é capaz de induzir parada do ciclo celular na fase G₂/M em todas as concentrações testadas, após 24 h de incubação (33,61% do controle negativo contra 60,15%, 65,47% e 61,5% das células tratadas com xilopina nas concentrações de 1, 2 e 4 µg/mL, respectivamente). Após 48 h de incubação, as células tratadas com xilopina permaneceram com parada do ciclo celular na fase G₂/M. A fragmentação do DNA internucleosomal (sub-G₀/G₁) foi aumentada (7,76% do controle negativo contra 20,95%, 25,09% e 20,95% das células tratadas com xilopina nas mesmas concentrações, respectivamente). A doxorrubicina, usada como controle positivo, também apresentou parada do ciclo celular G₂/M após 24 h de incubação, seguido por fragmentação do DNA celular.

5.2.3 Efeito do tratamento com a xilopina na morfologia celular

A Figura 8 apresenta a morfologia de células HCT116 tratadas com xilopina por coloração com May-Grunwald Giemsa, onde se observa redução no volume celular, condensação da cromatina e fragmentação dos núcleos. A Figura 9 apresenta *dot plots* representativos das características de dispersão da luz determinadas por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* – desvio de luz para frente) e SSC (*Side scatter* – desvio de luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo e granulosidade ou complexidade interna da célula. Estes evidenciam as alterações na morfologia celular causada pela xilopina.

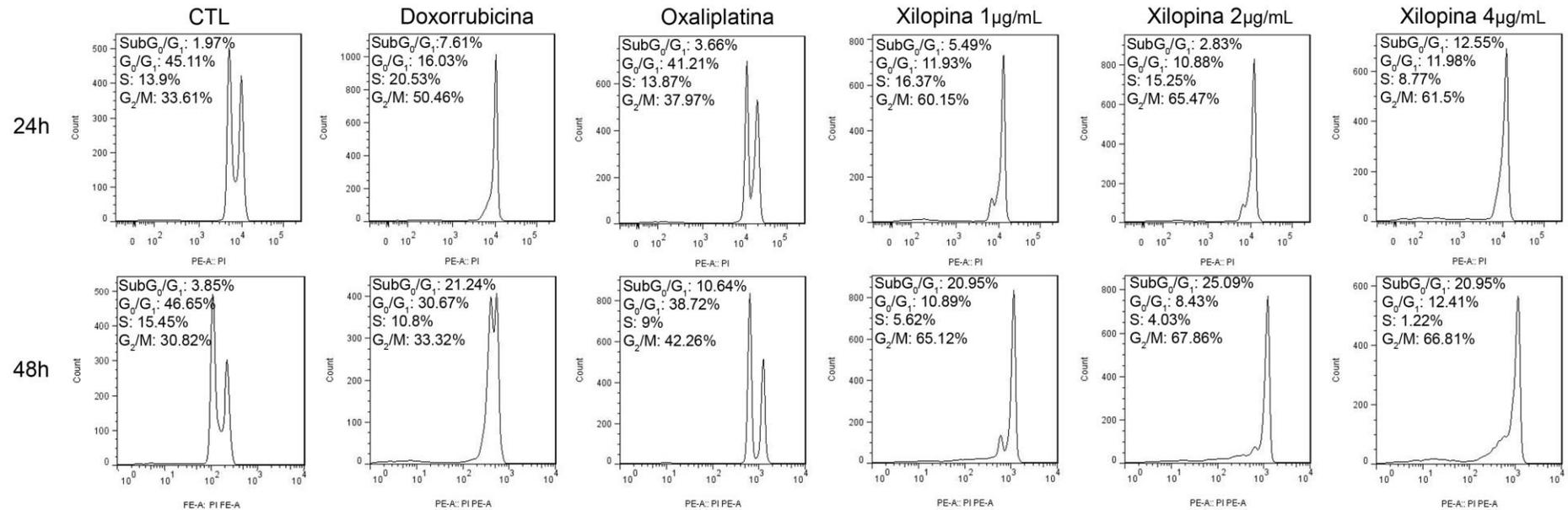


Figura 7. Histogramas representativos da análise da distribuição do conteúdo de DNA determinados por citometria de fluxo. Células de carcinoma de cólon humano HCT116 foram analisadas após o tratamento com xilopina por 24 e 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) utilizado para solubilizar e diluir a substância. A doxorubicina (0,5 µg/mL) e oxaliplatina (1 µg/mL) foram utilizadas como controles positivo. Os histogramas são representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

Tabela 3. Efeito da xilopina sobre a distribuição do conteúdo de DNA celular.

Tratamento	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Distribuição do Conteúdo de DNA (%)			
		Sub G ₀ /G ₁	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
24 h de tratamento					
DMSO 0,1%	-	3,90 \pm 1,03	42,00 \pm 2,50	12,58 \pm 2,77	30,71 \pm 4,07
Doxorrubicina	0,5	9,67 \pm 2,54	27,97 \pm 6,34	10,01 \pm 2,48	44,05 \pm 3,41*
Oxaliplatina	1	8,78 \pm 3,49	32,37 \pm 3,70	13,54 \pm 3,11	39,93 \pm 1,51
Xilopina	1	6,20 \pm 1,93	16,98 \pm 6,98*	24,70 \pm 4,81	57,17 \pm 3,50*
	2	5,12 \pm 1,55	14,85 \pm 4,16*	23,31 \pm 3,70	58,48 \pm 2,92*
	4	11,29 \pm 1,37	30,53 \pm 6,02	11,10 \pm 1,63	54,00 \pm 6,14*
48 h de tratamento					
DMSO 0,1%	-	3,33 \pm 0,72	44,80 \pm 1,07	13,53 \pm 2,41	23,84 \pm 2,83
Doxorrubicina	0,5	18,32 \pm 2,45	22,45 \pm 4,03*	14,86 \pm 2,52	44,16 \pm 4,44*
Oxaliplatina	1	17,67 \pm 1,87	36,17 \pm 2,60	7,602 \pm 0,44	32,23 \pm 4,40
Xilopina	1	15,20 \pm 1,89	16,98 \pm 6,28*	11,12 \pm 2,22	51,95 \pm 6,77*
	2	25,92 \pm 2,45*	10,31 \pm 1,34*	6,83 \pm 2,00	52,68 \pm 3,61*
	4	33,36 \pm 6,19*	14,63 \pm 2,59*	9,29 \pm 1,72	40,82 \pm 5,74*

A tabela apresenta os valores correspondentes a média \pm E.P.M de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. O controle negativo foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) utilizado para solubilizar e diluir a substância. A doxorrubicina e oxaliplatina foram usadas como controles positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

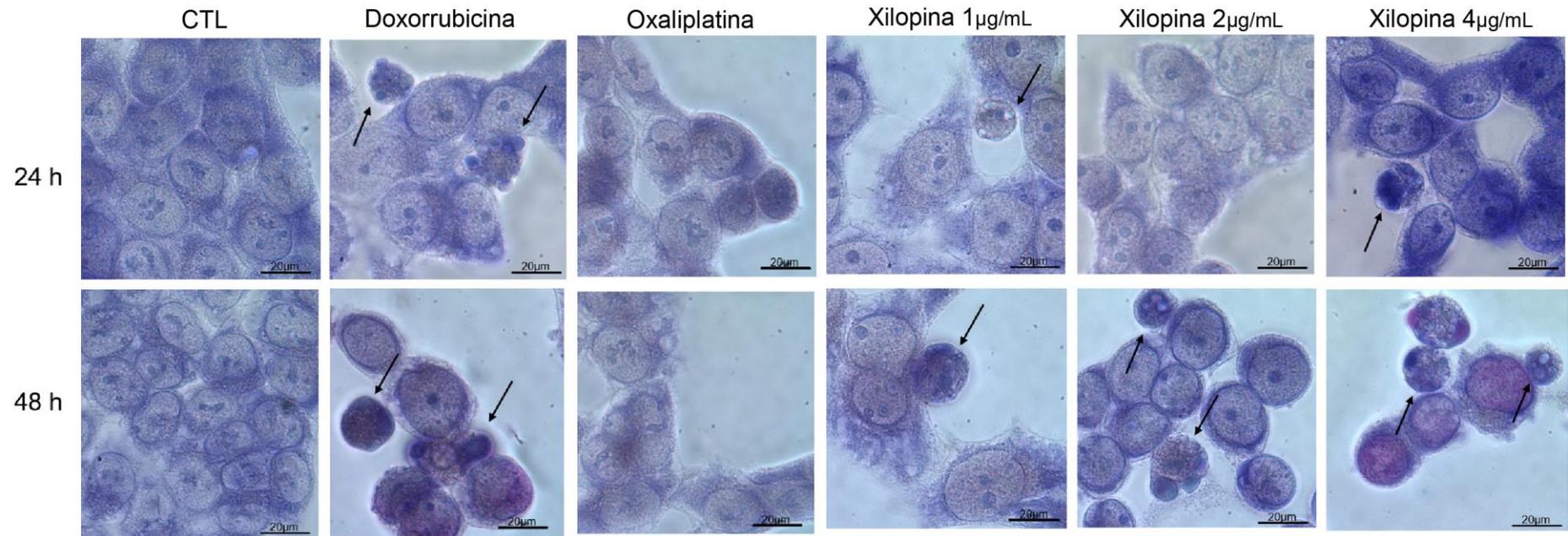


Figura 8. Efeito da xilopina na análise morfológica de células HCT116 após 24 e 48 h de incubação. As células foram coradas com May-Grunwald Giemsa e examinadas por microscopia óptica (bar = 20 µm). As setas indicaram células com redução no volume celular, condensação de cromatina ou DNA fragmentado. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) utilizado para solubilizar e diluir a substância. A doxorubicina e oxaliplatina foram usadas como controles positivo.

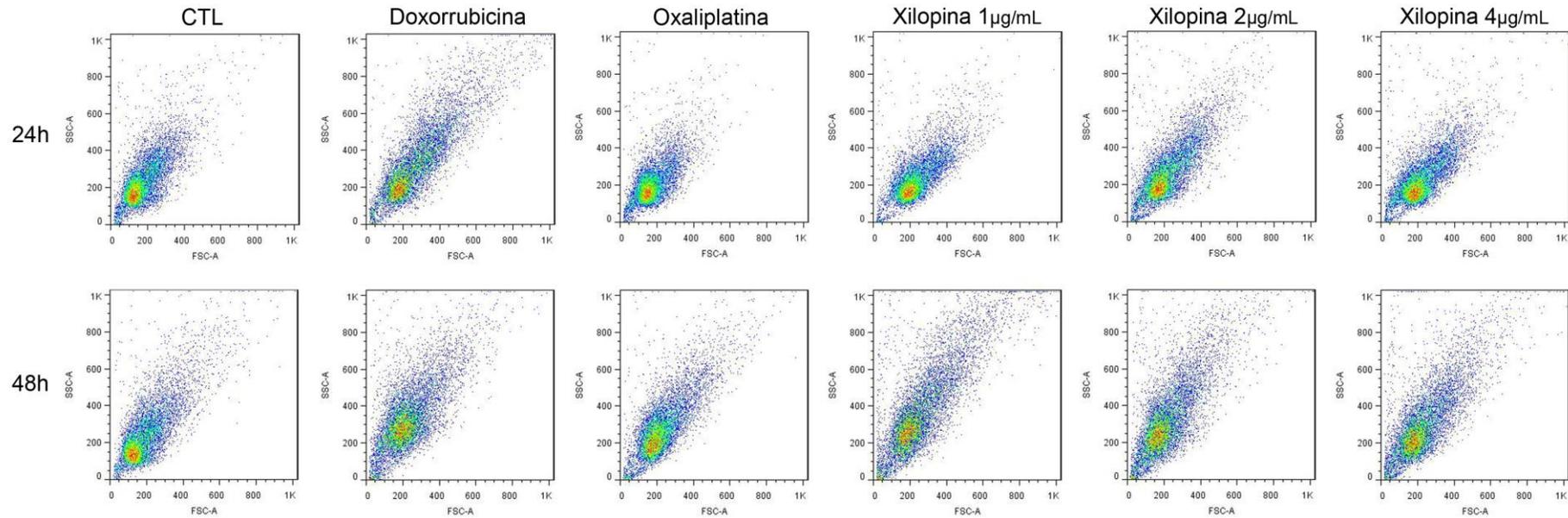


Figura 9 – *Dot plots* representativos das características de dispersão da luz determinadas por citometria de fluxo usando o FSC (*Forward scatter* – desvio de luz para frente) e SSC (*Side scatter* – desvio de luz para o lado) como parâmetros de tamanho relativo e granulidade ou complexidade interna da célula. Células de carcinoma de cólon humano HCT116 foram analisadas após o tratamento com xilopina por 24 e 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) utilizado para solubilizar e diluir a substância. A doxorubicina (0,5 µg/mL) e oxaliplatina (1 µg/mL) foram utilizadas como controles positivo. Os *dot plots* são representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

5.2.4 Avaliação do perfil de morte celular

A avaliação do perfil de morte celular foi verificada a partir da externalização da fosfatidilserina (Figuras **10** e **11**) e permeabilidade da membrana citoplasmática utilizando anexina V-FITC e iodeto de propídio. Os resultados obtidos demonstram uma exposição significativa de fosfatidilserina em células HCT116 tratadas com xilopina em todas as concentrações testadas a partir de 24 h de incubação. Um aumento significativo de células em apoptose inicial e tardia foi observado após 24 h de incubação com xilopina e apenas após 48 h de incubação foi observado aumento do número de células em necrose. A doxorubicina e oxaliplatina, utilizadas como controles positivo, também induziram aumento na externalização da fosfatidilserina de modo significativo após 48 horas de incubação.

5.2.5 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

A mitocôndria é uma importante organela celular responsável por produzir ATP de maneira eficiente, a polaridade da membrana interna da mitocôndria é essencial para seu funcionamento correto. Esse ensaio foi realizado para avaliar a taxa de despolarização da membrana interna da mitocôndria induzida pela xilopina. O potencial transmembrânico mitocondrial foi determinado por citometria de fluxo utilizando o corante rodamina 123 e a Figura **12** mostra os resultados encontrados. Foi observada despolarização mitocondrial em células HCT116 após 24 horas de tratamento com todas as concentrações de xilopina. A doxorubicina e a oxaliplatina, usadas como controles positivo, também foram capazes de induzir despolarização mitocondrial após 24 h de incubação.

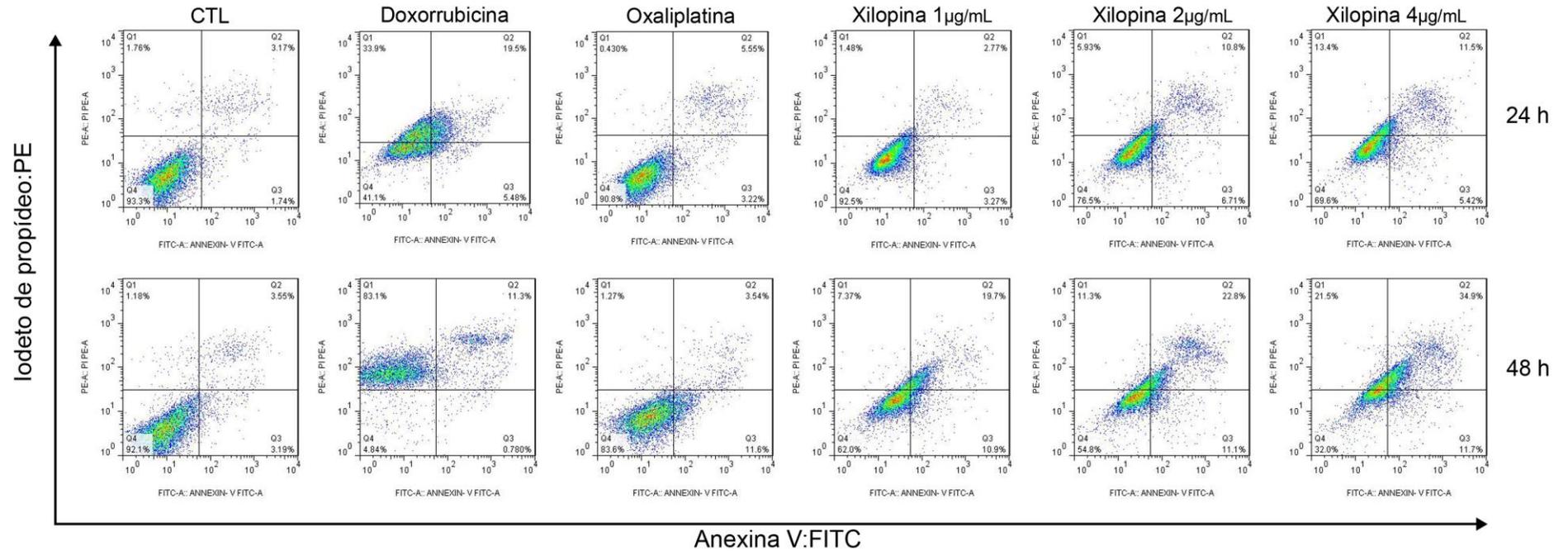


Figura 10. *Dot plots* representativos da marcação com anexina V/iodeto de propídeo por citometria de fluxo. Células de carcinoma de cólon humano HCT116 foram analisadas após o tratamento com xilopina por 24 e 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) utilizado para solubilizar e diluir a substância. A doxorubicina (0,5 µg/mL) e oxaliplatina (1 µg/mL) foram utilizadas como controles positivo. Os *dot plots* são representativos de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra.

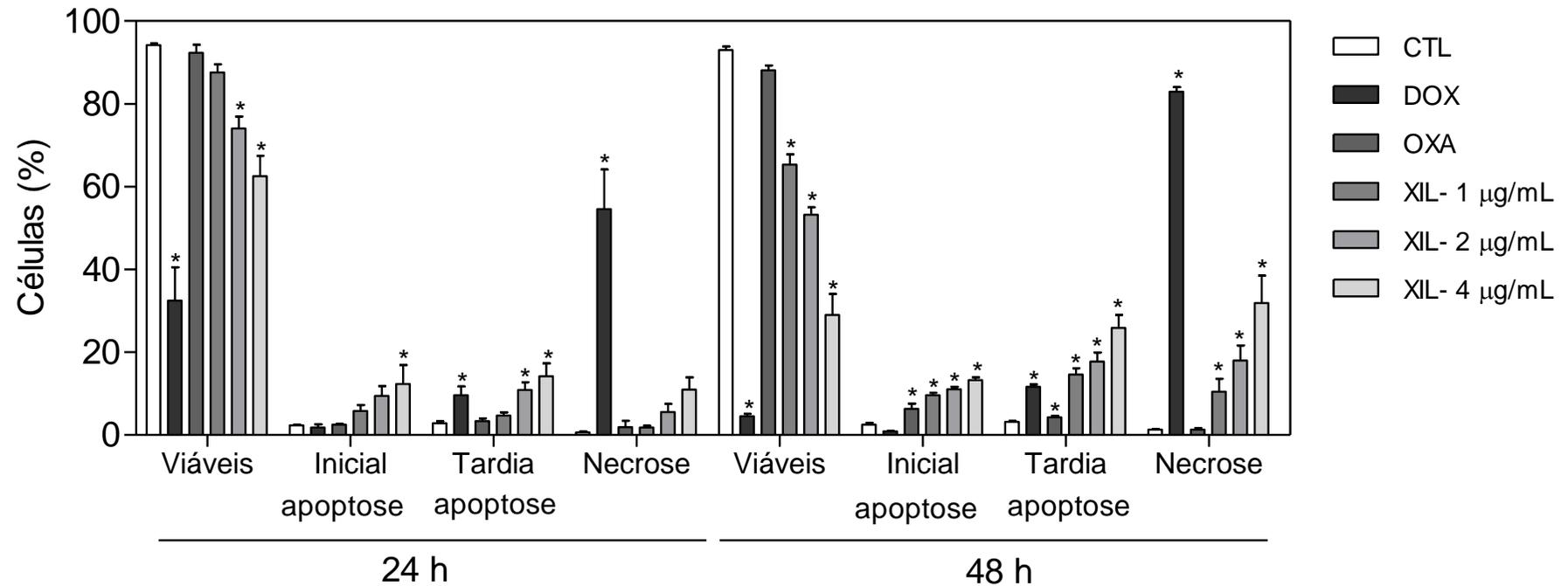


Figura 11. Efeito da xilopina (XIL) sobre a viabilidade de células de carcinoma de cólon humano HCT116 determinado por citometria de fluxo usando anexina V-FITC/iodeto de propídio após 24 e 48 h de incubação. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) utilizado para solubilizar e diluir a substância. A doxorubicina (DOX, 0,5 µg/mL) e a oxaliplatina (OXA, 1 µg/mL) foram utilizadas como controles positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média ± E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

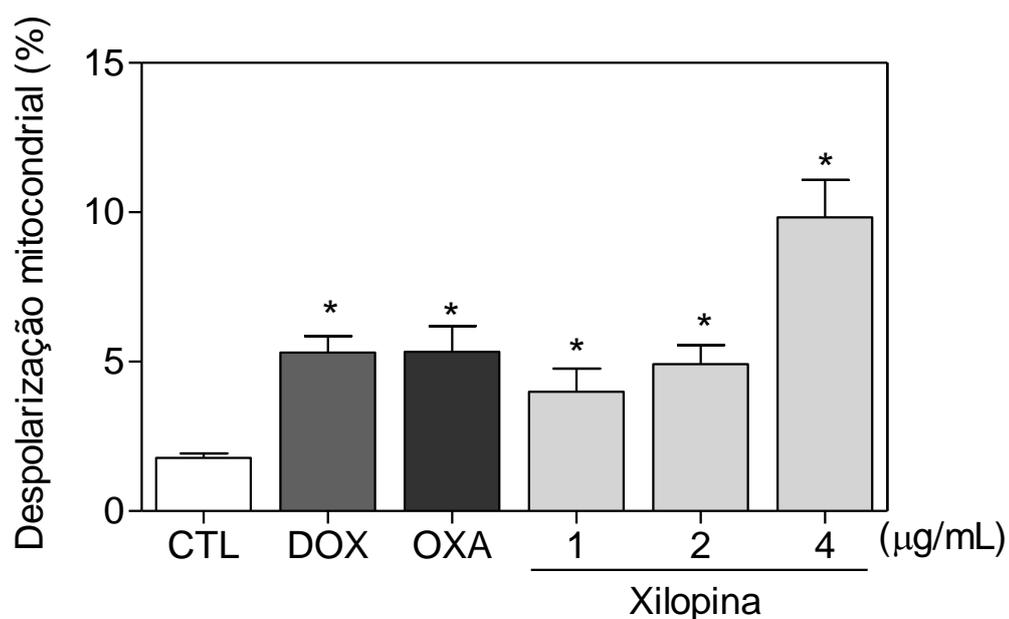


Figura 12. Efeito da xilopina sobre o potencial transmembrânico mitocondrial de células de carcinoma de cólon humano HCT116 determinado por citometria de fluxo usando rodamina 123 após 24 h de incubação. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (DMSO 0,1%) utilizado para solubilizar e diluir a substância. A doxorubicina (DOX, 0,5 µg/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 µg/mL) foram utilizadas como controles positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

5.2.6 Avaliação da atividade de caspase 3

As caspases pertencem a família de proteases cisteínas, podendo ser divididas em caspases inflamatórias e caspases apoptóticas, os quais podem ser incluídas nos grupos de caspases iniciadoras (como no caso da apoptose, as caspases 8 e 9) e efetoras (como no caso da apoptose, as caspases 3 e 7). A ativação da caspase 3 possui papel central no mecanismo de apoptose. A caspase 3 é responsável pela clivagem de vários componentes celulares relacionados ao reparo e controle do DNA. Assim, a dosagem da caspase 3 permite o estudo de mecanismos apoptóticos (MEHMET, 2002). A Figura 13 mostra um aumento da ativação da caspase 3 induzido pela xilopina após 48 h de incubação. Além disso, o pré-tratamento com um inibidor de caspase 3 (Z-DEVD-FMK), mas não com um inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica), impediu a apoptose induzida pela xilopina (Figuras 14 e 15), indicando a indução de morte celular por apoptose mediada por caspases em uma via independente de p53.

5.2.7 Citotoxicidade da xilopina para BAD KO SV40 MEF

A citotoxicidade da xilopina para BAD KO SV40 MEF (fibroblasto embrionário de camundongos imortalizado knockout BAD) e sua linhagem celular parental WT SV40 MEF (fibroblasto embrionário de camundongos imortalizado de tipo selvagem) também foi avaliada pelo ensaio do alamar blue após 72 h de incubação. Os valores de CI_{50} para a xilopina foram 6,4 e 8,0 μ M para a linhagem celular BAD KO SV40 MEF e WT SV40 MEF, respectivamente, sugerindo que o gene BAD não é essencial para a citotoxicidade induzida pela xilopina. A doxorubicina apresentou valores de CI_{50} de 0,4 e 0,03 μ M, enquanto que 5-FU apresentou valores de CI_{50} de 7,3 e 1,7 μ M nas linhagens celulares MEF BAD KO SV40 MEF e WT SV40 MEF, respectivamente.

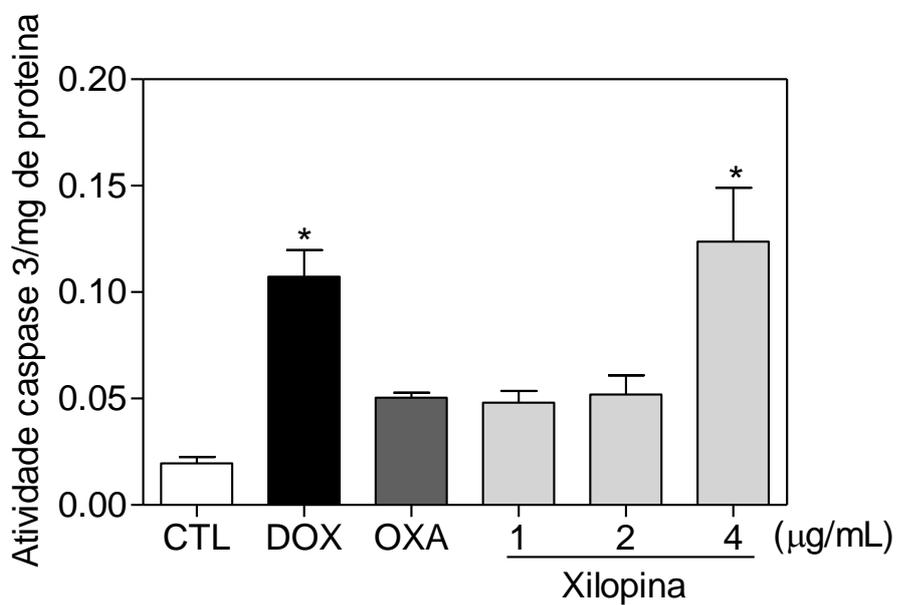


Figura 13. Atividade da caspase 3 determinada por ensaio colorimétrico após 48 horas de incubação. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 0,5 µg/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 µg/mL) foram utilizados como controles positivo. Os valores correspondem a média ± E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

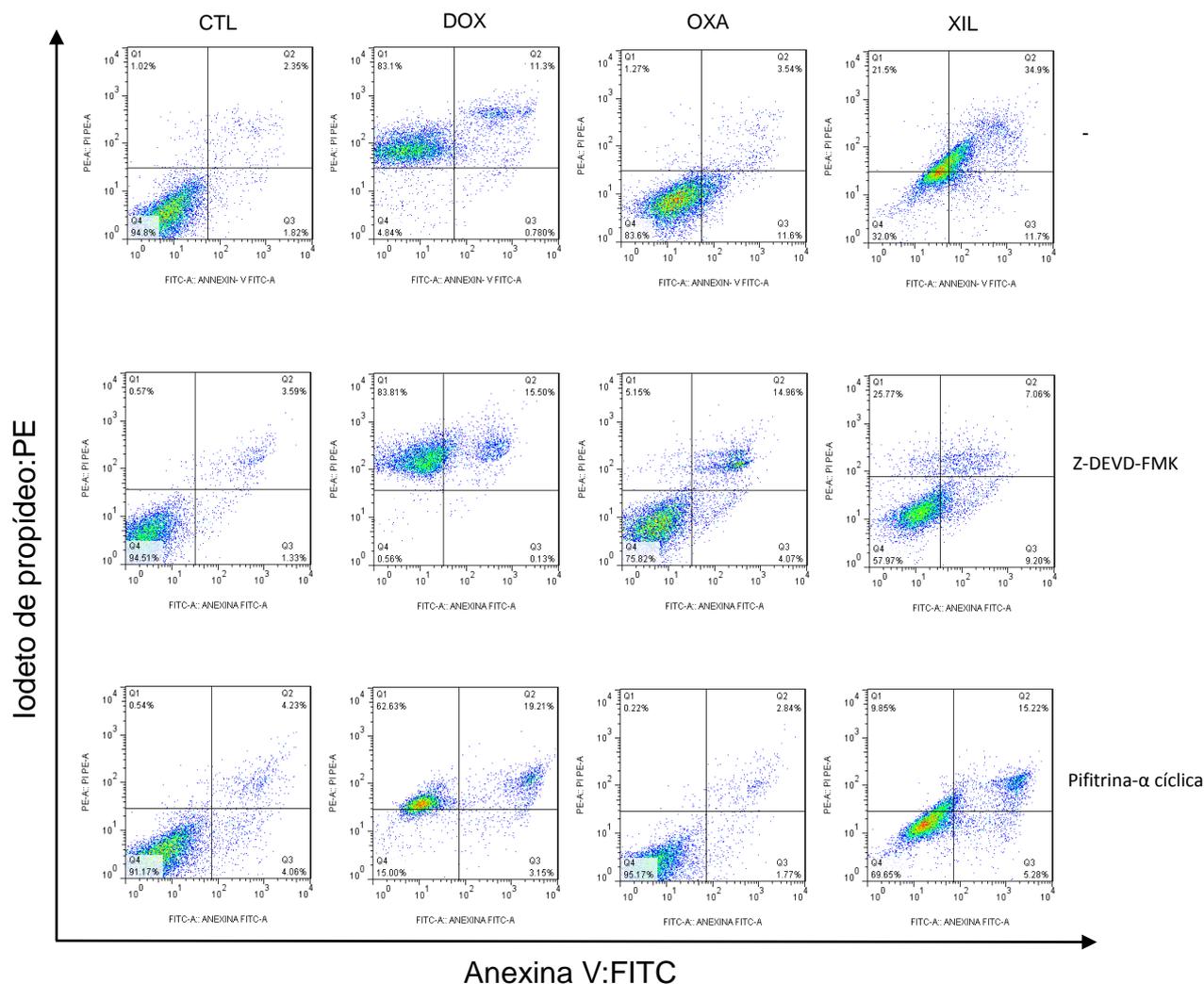


Figura 14. Efeito do inibidor da caspase 3 (Z-DEVD-FMK) e do inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) na apoptose induzida pela xilopina em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/IP. São mostrados *Dot plots* representativos de citometria de fluxo mostrando a porcentagem de células em estágios de necrose, apoptose tardia, apoptose inicial e viáveis. As células foram pré-tratadas durante 1 h com 50 μ M de Z-DEVD-FMK e 10 μ M de pifitrina- α cíclica, depois incubadas com 4 μ g/mL de xilopina (XIL) durante 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 0,5 μ g/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 μ g/mL) foram utilizados como controles positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

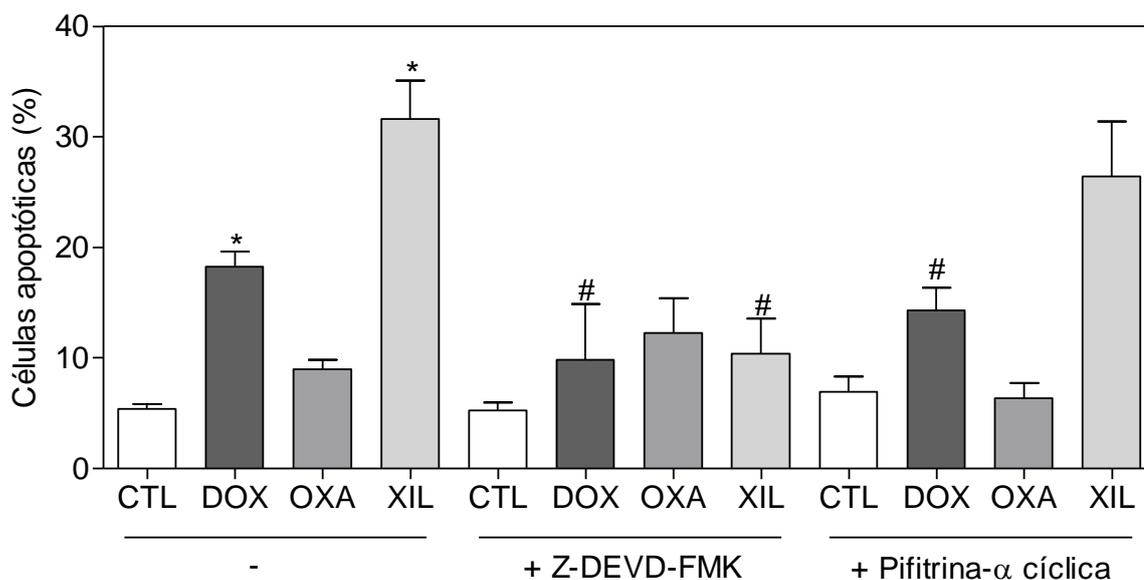


Figura 15. Efeito do inibidor da caspase 3 (Z-DEVD-FMK) e do inibidor de p53 (pifitrina- α cíclica) na apoptose induzida pela xilopina em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/IP. As células foram pré-tratadas durante 1 h com 50 μ M de Z-DEVD-FMK e 10 μ M de pifitrina- α cíclica, depois incubadas com 4 μ g/mL de xilopina (XIL) durante 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 0,5 μ g/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 μ g/mL) foram utilizados como controles positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média \pm E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

5.2.8 Quantificação dos níveis de ERO/ERN e avaliação da glutatona intracelular

O efeito da xilopina nos níveis intracelular de ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) foi investigado em células HCT116 através de citometria de fluxo. O tratamento com xilopina durante 1 e 3 h causou aumento nos níveis de ERO

(Figura **16A**) e o pré-tratamento com o antioxidante NAC impediu o aumento ERO intracelular induzido pela xilopina (Figura **16B**). O pré-tratamento com catalase, que induz a decomposição de peróxido de hidrogênio, também impediu o aumento ERO intracelular induzido pela xilopina que indica a produção de peróxido de hidrogênio induzido pela xilopina (Figura **17**). Usando sonda fluorescente específica para ERO/ERN, descobrimos que a xilopina aumenta os níveis de óxido nítrico (Figura **18A**), mas não o ânion superóxido (Figura **18B**), em células HCT116. Além disso, os níveis de glutathiona reduzida (GSH) diminuíram nas células tratadas com xilopina (Figura **19**). O pré-tratamento com NAC também impediu o aumento da morte celular apoptótica induzida pela xilopina (Figuras **20** e **21**), indicando que xilopina induz apoptose via ERO/ERN.

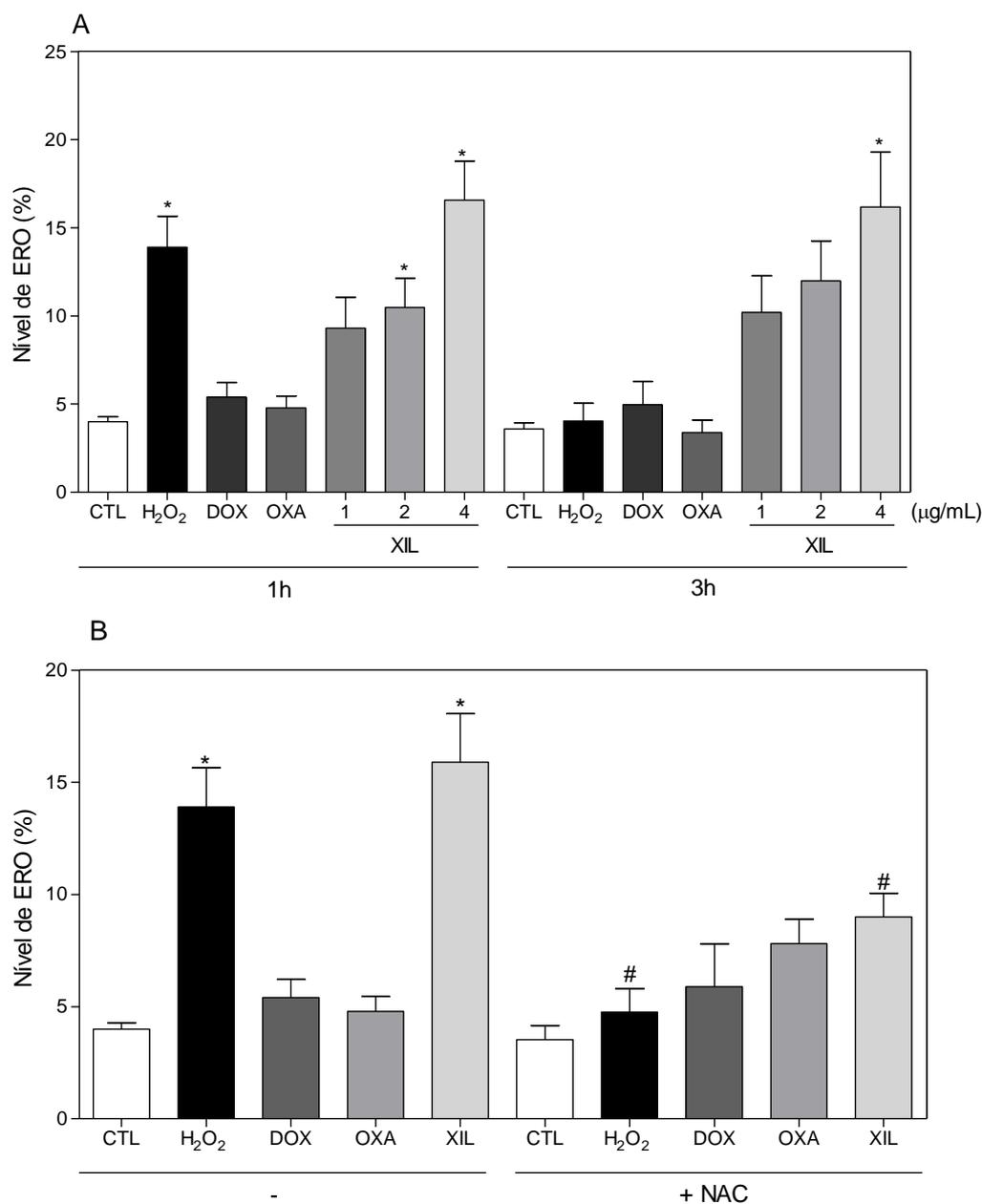


Figura 16. Efeito da xilopina (XIL) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) das células HCT116 e proteção por N-acetil-L-cisteína (NAC) determinada por citometria de fluxo usando coloração DCF-DA. **(A)** Níveis de ERO das células HCT116 após 1 e 3 h de incubação. **(B)** Níveis de ERO de células HCT116 pré-tratadas com o antioxidante NAC e, em seguida, tratadas com xilopina. Para o ensaio de proteção, as células foram pré-tratadas durante 1 h com 5 mM de NAC. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 200 µM), doxorrubicina (DOX, 0,5 µg/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 µg/mL) foram utilizados como controles positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média ± E.P.M. de pelo menos três

experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

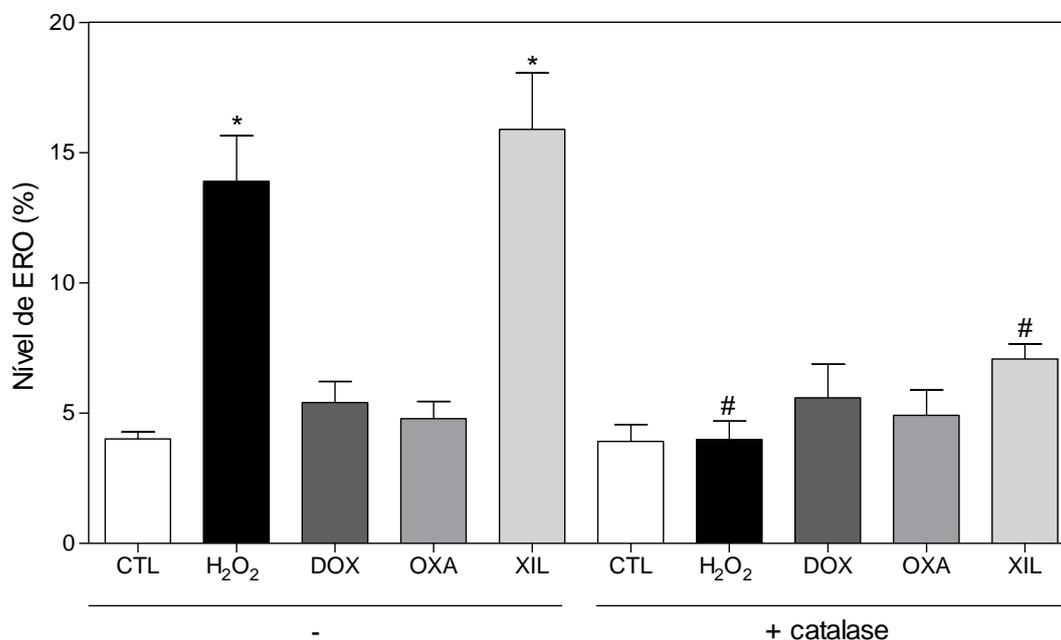


Figura 17. Efeito da proteção com catalase nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) induzidas pela xilopina (XIL) em células HCT116 determinada por citometria de fluxo usando coloração DCF-DA. As células foram pré-tratadas com 2.000 UI de catalase, depois incubadas com 4 µg/mL de xilopina durante 1 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 200 µM), doxorrubicina (DOX, 0,5 µg/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 µg/mL) foram utilizados como controles positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média ± E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

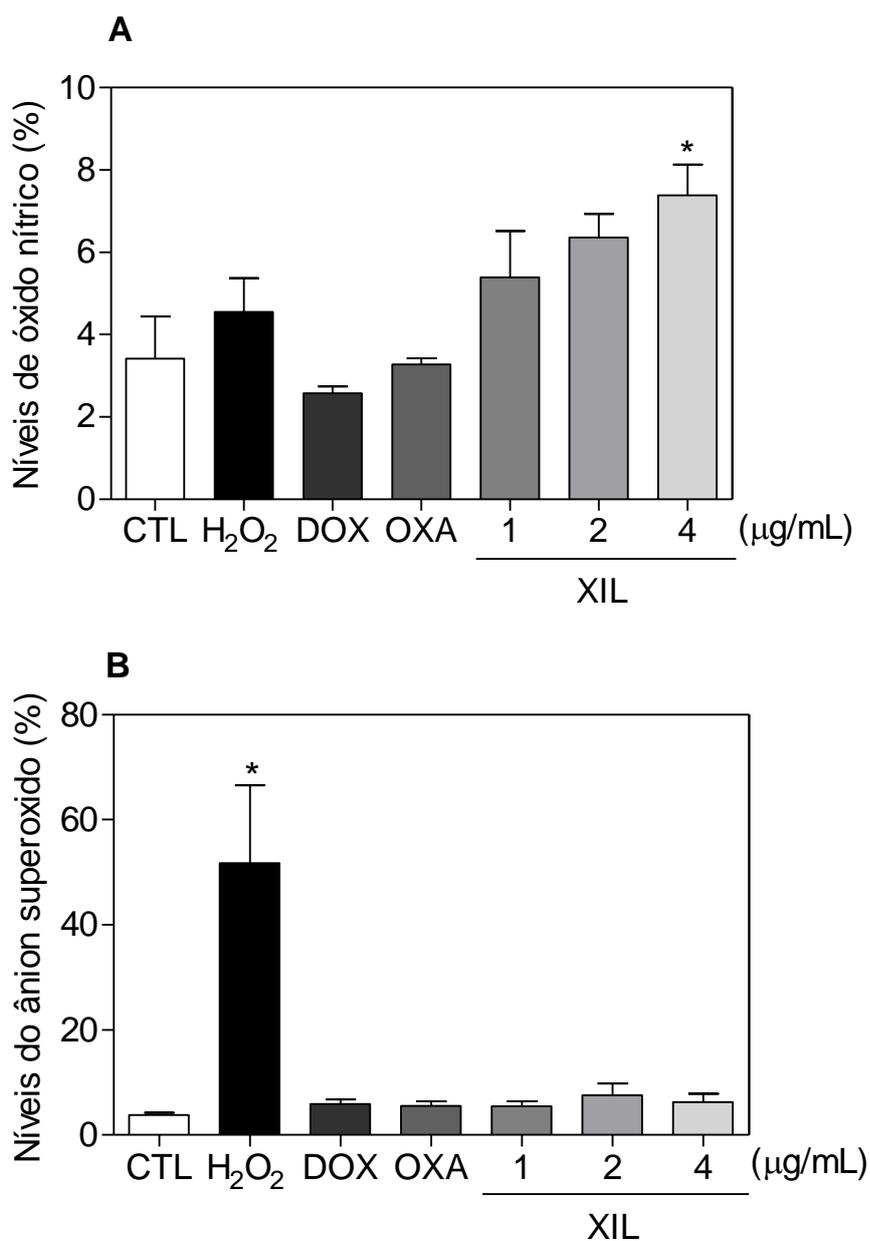


Figura 18. Efeito da xilopina (XIL) nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) em células HCT116 após 1 h de incubação. **(A)** Níveis de óxido nítrico das células HCT116 determinado por citometria de fluxo usando coloração com diacetato DAF-FM. **(B)** Níveis do radical ânion superóxido das células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração com hidroetidina. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado. O peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 200 µM), doxorrubicina (DOX, 0,5 µg/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 µg/mL) foram utilizados como controles positivos. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média ± E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado

com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

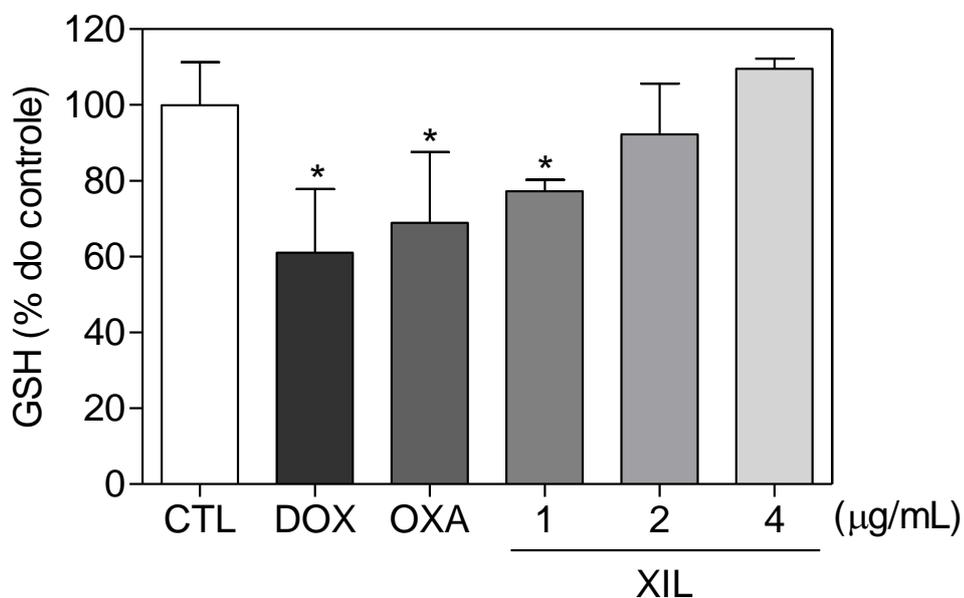


Figura 19. Efeito da xilopina (XIL) na glutathiona reduzida (GSH) em células HCT116 após 1 h de incubação. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado. A doxorrubicina (DOX, 0,5 µg/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 µg/mL) foram utilizadas como controles positivo. Os valores correspondem a média ± E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

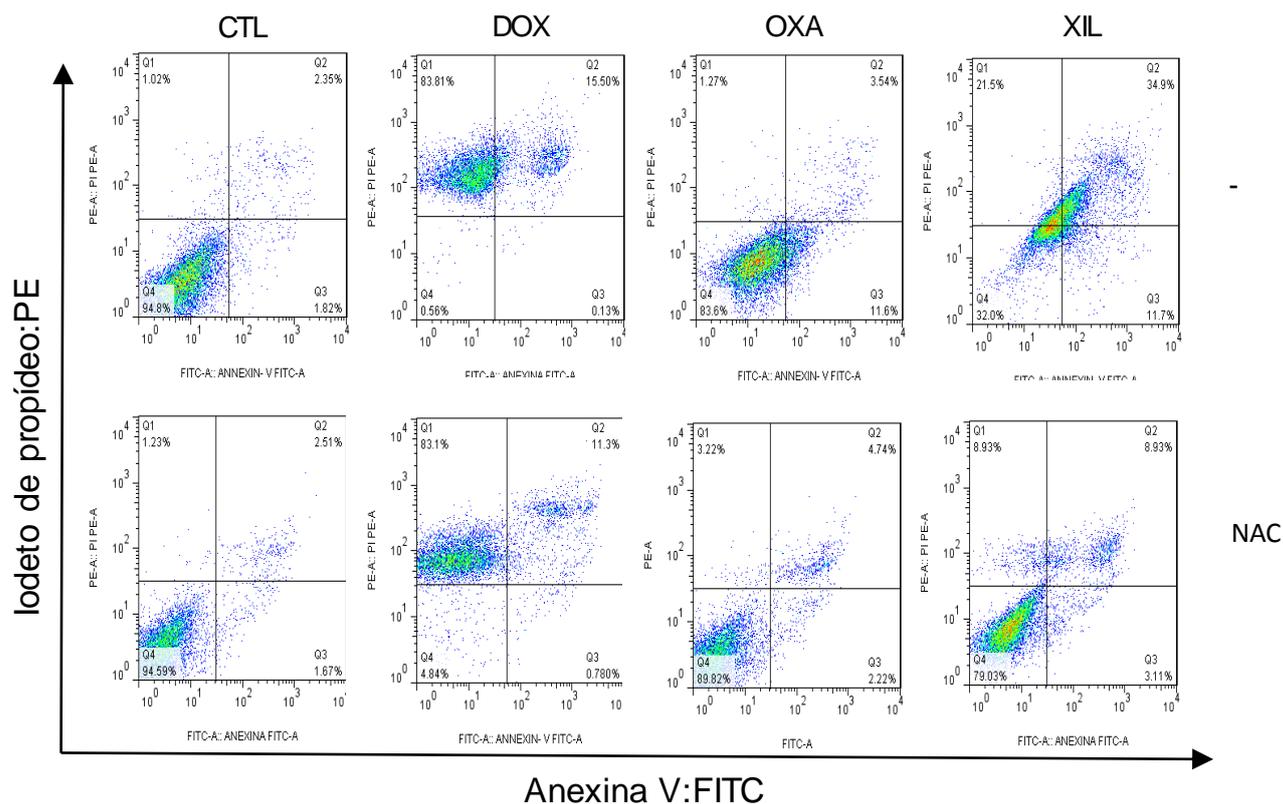


Figura 20. Efeito do antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) na apoptose induzida pela xilopina em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/IP. São mostrados *Dot plots* representativos de citometria de fluxo mostrando a porcentagem de células em estágios de necrose, apoptose tardia, apoptose inicial e viáveis. As células foram pré-tratadas por 1 h com NAC 5 mM, depois incubadas com 4 µg/mL de xilopina (XIL) durante 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 0,5 µg/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 µg/mL) foram utilizadas como controles positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média ± E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

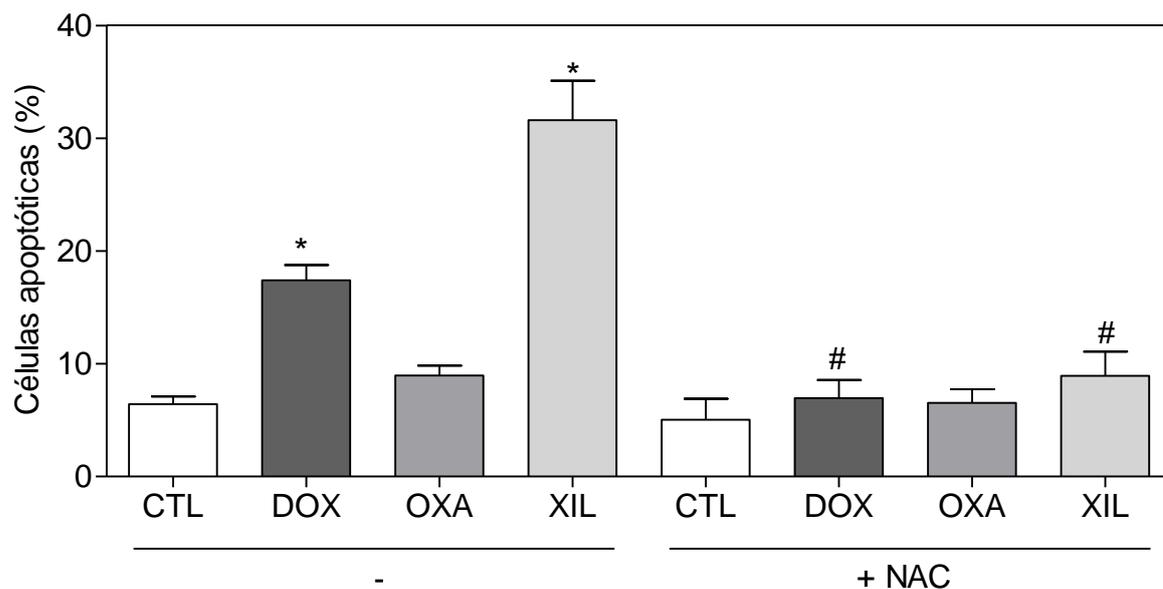


Figura 21. Efeito do antioxidante N-acetil-L-cisteína (NAC) na apoptose induzida pela xilopina em células HCT116 determinadas por citometria de fluxo usando coloração anexina V-FITC/IP. São mostrados a quantificação de células apoptóticas. As células foram pré-tratadas por 1 h com NAC 5 mM, depois incubadas com 4 µg/mL de xilopina (XIL) durante 48 h. O controle negativo (CTL) foi tratado com o veículo (0,1% de DMSO) usado para diluir o composto testado. Doxorrubicina (DOX, 0,5 µg/mL) e oxaliplatina (OXA, 1 µg/mL) foram utilizadas como controles positivo. Os detritos celulares foram omitidos das análises e 10.000 eventos foram analisados por amostra. Os valores correspondem a média ± E.P.M. de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo por ANOVA (análise de variância) seguido por Student Newman-Keuls.

5.2.9 Análise da intercalação do DNA

A xilopina não diminuiu a fluorescência do brometo de etídio, indicando que não é um forte intercalador de DNA. A doxorrubicina foi usada como controle positivo por ser um potente intercalador de DNA. Assim, foi observada a redução na intensidade de fluorescência do brometo de etídio pelo seu deslocamento do ctDNA.

6 DISCUSSÃO

Em estudos anteriores, identificamos a xilopina como um agente citotóxico potente que causa parada do ciclo celular na fase G₂/M, e apoptose em células de carcinoma hepatocelular humano HepG2 (MENEZES et al., 2016). No entanto, o mecanismo de ação da xilopina em células cancerosas não foi claramente compreendido. Para entender melhor a ação citotóxica da xilopina, foi realizado um estudo farmacológico para avaliar seu potencial citotóxico em diferentes linhagens de células cancerígenas. Inicialmente, foram avaliadas a atividade citotóxica e sua seletividade em relação a células cancerígenas e não cancerígenas. Em seguida, foi estudado o mecanismo de ação envolvido na citotoxicidade deste composto. No presente estudo, relatamos pela primeira vez que a xilopina induz estresse oxidativo, parada no ciclo celular na fase G₂/M e apoptose mediada por caspases em células HCT116 por uma via independente de p53.

Diferentes alcalóides aporfinicos apresentaram efeitos citotóxicos em vários tipos de células cancerígenas humanas, incluindo acutiaporberina, anonaína, artabotrina, lisicamina, magnoflorina, norglaucina, norpurpureína, calicina e liriodenina (MENEZES et al., 2016; CHEN et al., 2002; COSTA et al., 2016). A acutiaporberina induz apoptose em células de câncer de pulmão PLA-801 e 95-D, acompanhadas por diminuição da expressão do gene de Bcl-2 e aumento da expressão do gene Bax (CHEN et al., 2002; CHEN et al., 2002). A liriodenina inibe a proliferação celular de adenocarcinoma de pulmão humano A549, bloqueia a progressão do ciclo celular na fase G₂/M, acompanhada da redução da ciclina D1, acúmulo de ciclina B1 e redução da atividade enzimática do complexo ciclina B1/ciclina dependente de quinase. A ativação de caspases e a indução de apoptose também foram observadas em células A549 tratadas com liriodenina (CHANG et al., 2004).

Nesse estudo, a citotoxicidade da xilopina foi avaliada em oito linhagens de células cancerígenas, na linhagem mais sensível HCT116, apresentou CI₅₀ de 1,90 µg/mL. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, compostos puros com valores de CI₅₀ < 4 µg/mL são considerados promissores e

devem ser investigados quimicamente e biologicamente (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990). Analisando o grau de seletividade da xilopina, observamos que os valores de CI_{50} nas células cancerígenas eram menores do que nas não cancerígenas. Para quantificar o IS da xilopina, foi feito um cálculo baseado na razão entre o CI_{50} encontrado para as células não cancerígenas e cancerígenas, o qual indica o quanto um composto é ativo sem causar danos às células saudáveis (OSTI et al., 2012). Valores de IS são considerados significativos quando apresenta valores $\geq 2,0$ (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990). Dentre as linhagens testadas para xilopina, a HCT116 apresentou o menor valor de CI_{50} (1,90 $\mu\text{g/mL}$) e maior valor de IS (3,8). HCT116 foi a linhagem celular mais sensível à citotoxicidade induzida pela xilopina e foi usado como modelo celular em um novo conjunto de experimentos.

O efeito citotóxico da xilopina foi avaliado também em um modelo 3D de esferoides multicelulares formados a partir de células HCT116. Os métodos de cultura de células 3D melhoram a relevância dos resultados *in vitro*, devido apresentar achados mais próximos do que acontece nos experimentos *in vivo*, possibilitando uma melhor triagem pré-clínica de compostos. Neste trabalho, utilizamos a cultura esferoide que é formada por pequenos agregados de células, os quais possibilitam a formação de microambiente, uma heterogeneidade celular e exposição diferencial a diversos fatores como nutrientes e oxigênio (FENNEMA et al., 2013). Os esferoides tratados com xilopina apresentaram alterações morfológicas que indicam permeabilidade aos compostos e sua citotoxicidade na cultura.

Os estudos relacionados ao tipo de morte celular foram realizados com o intuito de identificar a via de morte envolvida. Nesse trabalho, a xilopina aumentou significativamente o número de células em apoptose inicial e tardia, também aumentou significativamente no número de células em necrose após 48 h de incubação. Modificações morfológicas também sugerem morte celular por apoptose após tratamento com xilopina. Esse composto também induziu despolarização mitocondrial após 24 h de incubação. A via intrínseca da apoptose é também conhecida como via mitocondrial, tendo como o principal modulador dessa via a proteína Bcl-2 da superfamília Bcl-2, que consiste de membros pró-apoptóticos e anti-apoptóticos, a interação do equilíbrio global entre o balanço dessas proteínas

pode determinar o destino da célula (ORRENIUS, 2004). A alteração no potencial transmembrânico mitocondrial pode ser medida para avaliação indireta da ativação da via intrínseca. Adicionalmente, modelos atuais sugerem que o Bax/Bak, que é um subgrupo de moléculas (Bax, Bak, Bad e Bcl-x5), com função pró-apoptótica central e são mantidas e verificadas pela proteína anti-apoptótica Bcl-2. Essas moléculas são, por sua vez, inativadas pela *BH3-only*, uma família de proteínas como a Bim, Bid, Bik, Noxa e Puma. O *BH3-only* faz uma ligação hidrofóbica com as proteínas da família Bcl-2 e atua como sensores celulares que regulam a ativação da morte celular por apoptose na via intrínseca (STRASSER, 2005). Esta via é ativada por uma multiplicidade de estímulos, incluindo fármacos citotóxicos, estresse genotóxico, retirada de fatores de crescimento, dano no DNA, perda de ancoragem e pelos chamados modificadores de resposta imune (LEVERKUS, 2004). Muitas proteínas devam ser inativadas para que ocorra a expressão do Bax/Bak, e estas, por sua vez, conduzirem o processo da apoptose através da mitocôndria (CORY et al, 2003). Assim, com o intuito de verificar se o gene BAD é essencial para a morte celular causada pela xilopina, a citotoxicidade da xilopina para a linhagem celular BAD KO SV40 MEF (fibroblasto embrionário de camundongos imortalizado com knockout para o gene BAD) e sua linhagem celular parental WT SV40 MEF (fibroblasto embrionário de camundongos imortalizado de tipo BAD selvagem) foi avaliado. Os resultados sugerem que o gene BAD não é essencial para citotoxicidade causada pela xilopina. O alcaloide evodiamina também foi capaz de induzir apoptose e despolarização mitocondrial, isso foi observado em células de glioma U87-MG, nesse caso o processo foi iniciado através da liberação de cálcio do canal de receptor de inositol-1,4,5-trifosfato (IP3R) do retículo endoplasmático, o que leva à ativação de JNK e a despolarização mitocondrial (LIU et al., 2013).

A indução da apoptose pela xilopina foi posteriormente confirmada com a quantificação da ativação da caspase 3 e com o pré-tratamento com um inibidor de caspase 3, Z-DEVD-FMK. Os resultados mostram ativação da caspase 3, após 48 horas de incubação, e a prevenção da apoptose pelo pré-tratamento com inibidor de caspase 3. Esses resultados foram observados em outros alcaloides aporfínicos como a liriodenina, que induziu apoptose em células de câncer de ovário humano (CAOV-3) através da via de sinalização mitocondrial por envolvimento de caspase 3

e caspase 9 (NORDIN et al., 2015). A ativação das caspases é reconhecida como um processo fundamental no desenvolvimento da apoptose. Numerosos estímulos podem ativar as caspases, que vão da ativação de receptores de membrana celular até os que causam disfunção mitocondrial (SALVESEN et al., 1997). As caspases podem ser divididas em iniciadoras (caspases 8 e 9) e efetoras (caspases 3 e 7), e são as responsáveis pela ativação de mecanismos que levam às mudanças de morfologia celular características da apoptose e fragmentação do DNA (CAI et al., 1998). A ativação da caspase 9, especificamente, ocorre via mitocôndria (via intrínseca), por meio da clivagem pelo apoptossoma, formando, entre outros compostos, pelo citocromo c liberado da mitocôndria, e responsável pelo desencadeamento da cascata apoptótica, evidenciando assim uma disfunção nessa organela e culminando na ativação da caspase 3.

A xilopina foi capaz de induzir apoptose de maneira independente de p53, tal indução pode ser desencadeada pela degradação BCL-2, GSK3 e ativação de membros da família PI3K (BOCK et al., 2011).

Alguns alcaloides aporfínicos são agentes intercaladores de DNA, incluindo liriodenina e dicentrina, que podem induzir a inibição de topoisomerasas de DNA como mecanismo de citotoxicidade (WOO et al., 1999). Aqui, a capacidade de intercalação do DNA da xilopina foi avaliada no ctDNA. Entretanto, a xilopina não conseguiu induzir a intercalação do DNA.

A distribuição do ciclo celular em células HCT116 tratadas com xilopina foi investigada por citometria de fluxo após 24 e 48 h de incubação. Em todas as concentrações, o tratamento com xilopina resultou em um aumento significativo no número de células na fase G₂/M em comparação com o controle negativo. Esses resultados podem ser justificados em parte pela produção de ERO induzidas pela xilopina, visto que em excesso pode causar danos ao DNA e interferir nas vias envolvidas no controle do ciclo celular (MIGLIORE et al., 2002; BARZILAI et al., 2004; SVILAR et al., 2010). Ao detectar o dano do DNA, é necessária uma ativação coordenada dos pontos de controle do dano do DNA, bem como proteínas de reparo do DNA para parar o ciclo celular, permitindo assim tempo para processos de reparo (ZHOU et al., 2000). Os pontos de verificação também induzem mudanças na cromatina, recrutamento de proteínas de reparo de DNA para os locais de dano ao

DNA, ativação de transcrição, comprimento de telômero e indução de morte celular por apoptose (ZHOU et al., 2000).

A Chk1, uma proteína quinase específica de serina/treonina, é necessária para o checkpoint que desencadeia parada do ciclo celular e reparo do DNA em resposta à presença do dano no DNA ou DNA não replicado. Chk1 se liga e fosforila o CDC25 e desencadeia a degradação do CDC25 através da via de ubiquitinação e degradação proteossômica (SMITH et al., 2010; VERMEULEN et al., 2003). Chk2 funciona de forma semelhante a Chk1, regulando a parada do ponto de controle do ciclo celular através da fosforilação do CDC25, inibindo sua atividade (SMITH, 2010; BAHASSI et al., 2008; STRACKER et al., 2008). A inibição da atividade da fosfatase CDC25 leva ao aumento da fosforilação de tirosina quinase que inibe os complexos CDK-ciclina e bloqueia a progressão do ciclo celular. Chk2 também fosforila NEK6, que está envolvido na parada do ciclo celular em G₂/M (BARTEK et al., 2003). Semelhante a Chk1, Chk2 regula o reparo do DNA mediado por recombinação homóloga através da fosforilação do BRCA2, aumentando a associação da cromatina da RAD51. Além disso, Chk2 promove a transcrição de genes envolvidos no reparo do DNA (incluindo BRCA2) através da fosforilação e ativação do fator de transcrição FOXM1 (BAHASSI et al., 2008). Chk2 também regula a apoptose através da fosforilação de p53, MDM4 e PML (SHIEH et al., 2000; PABLA et al., 2008; POLAGER et al., 2009). A fosforilação mediada por Chk2 na proteína p53 inverte a inibição pelo MDM2, levando ao acúmulo de p53 ativo, agindo também em MDM4 reduzindo a degradação do p53. Essa quinase também controla a transcrição de genes pró-apoptóticos através da fosforilação do fator de transcrição E2F1. Finalmente, Chk2 também possui um papel de supressão de tumor, na medida em que funciona na montagem de fuso mitótico por fosforilação de BRCA1 e a ausência de Chk2 foi observada em alguns tipos de câncer (SMITH, 2010; STRACKER et al., 2009; POLAGER et al., 2009). No presente trabalho, identificamos que a apoptose induzida pela xilopina ocorre por via independente de p53. O alcaloide aporfínico liriodenina, por sua vez, desencadeia parada do ciclo celular fase G₁/S dependente de óxido nítrico e p53 em células de adenocarcinoma do cólon humano (SW480) (CHEN et al., 2014).

As ERO causam danos ao DNA e interferem em diversas vias de sinalização celular (BOONSTRA et al., 2012). Os mecanismos pelos quais as ERO influenciam a progressão do ciclo celular incluem a capacidade de ativar os receptores de fator de crescimento e o efeito nos reguladores do ciclo celular via fosforilação e ubiquitinação (VERBON et al., 2012). ERO/ERN são partes de produtos tóxicos do metabolismo celular, e estão envolvidos na apoptose celular, tanto pela via do receptor de morte celular extrínseca, quanto pela via de morte da célula mitocondrial intrínseca. As ERO incluem radicais livres derivados de oxigênio, incluindo ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxídeos (OH^{\cdot}), peróxidos (RO_2^{\cdot}), alcoóxidos (RO^{\cdot}) e espécies não radicais derivadas de oxigênio, incluindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e ERN incluem principalmente o óxido nítrico ($^{\cdot}NO$). Além disso, a glutatona que participa do sistema antioxidante celular, geralmente apresentada na forma reduzida (GSH), pode ser convertida em uma forma oxidada (GSSG) pela estimulação do estresse oxidativo, a diminuição dos níveis de GSH celular, está associada à apoptose mediada por ERO (BALABAN et al., 2005; KAMOGASHIRA et al., 2015). A xilopina induz o estresse oxidativo, através do aumento dos níveis de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, sem aumentar o ânion superóxido e também foi capaz de diminuir significativamente a concentração GSH celular em células HCT116. Além disso, o pré-tratamento com o antioxidante NAC impediu a apoptose induzida pela xilopina, indicando que esse efeito é mediado por ERO.

Nas células cancerosas, níveis elevados de ERO podem resultar do aumento da atividade metabólica, disfunção mitocondrial, atividade de peroxisoma, aumento da sinalização do receptor celular, atividade oncogênica, aumento da atividade das oxidases, cicloxigenases, lipoxigenases e timidina fosforilase, ou através de células imunológicas (STORZ et al., 2005; BABIO et al., 1999). Nas mitocôndrias, ERO são produzidos como um subproduto inevitável da fosforilação oxidativa. A cadeia de transporte de elétrons abrange complexos I-IV e ATP sintase na membrana interna mitocondrial (HA et al., 2001). O poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPTP) na membrana externa da mitocôndria permite o vazamento de superóxido no citoplasma (CROMPTO et al., 1999; STOR et al., 2006). Superóxido é dismutado para H_2O_2 , na matriz mitocondrial (por MnSOD) ou no citosol (por Cu/ZnSOD). Dados recentes sugerem que peróxido de hidrogênio pode atravessar membranas

celulares através de membros específicos da família aquaporina (BIENER et al., 2007). Por exemplo, a aquaporina-8 foi detectada na membrana mitocondrial interna e sugeriu que funcionasse como um canal para a água e potencialmente H_2O_2 (LE et al., 2006). O aumento desproporcional das ERO intracelular pode induzir interrupção do ciclo celular, senescência e apoptose. Isso pode ser alcançado com a quimioterapia contra o câncer, esgotamento de proteínas antioxidantes ou a geração de ERO por células imunes. A apoptose pode estar ligada ao aumento do estresse oxidativo mitocondrial que causa a liberação do citocromo C, um evento irrevogável que leva à ativação de caspases e morte celular (CADENAS et al., 2004; SIMON et al., 2000). A liberação mitocondrial de H_2O_2 e NO sobre sinais apoptóticos leva à ativação de quinases N-terminais c-Jun (JNKs) (CADENAS et al., 2004; STORZ et al., 2007). Em resposta as ERO, JNKs catalisam a fosforilação diminuindo a atividade de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 e Bcl-XL (CADENAS et al., 2004). Ambos Bcl-2 e Bcl-XL mostraram antagonizar a geração de ERO e proteger células da apoptose mediada por ERO (GOTTLIEB et al., 2000; LI et al., 1999). JNK também altera a composição do complexo Bax/Bcl-2 ao aumentar a expressão de Bax, levando à formação de homodímeros Bax resultando em dissipação da integridade da membrana mitocondrial (LEE et al., 2008; QANUNGO et al., 2005). p38, outro membro da família MAPK também estava implicado na sinalização apoptótica em resposta ao aumento da geração de ERO. Tanto p38 quanto JNK são ativados através de Ask-1 (quinase-1 reguladora de sinal de apoptose), cuja atividade é regulada pela interação com a tioredoxina. A tioredoxina é uma proteína redox regulada que em sua forma reduzida liga e inibe Ask-1 (SAITOH et al., 1998; TAKEDA et al., 2003). Além das cascatas de sinalização induzidas por Ask-1, outras proteínas de sinalização, como fatores de transcrição FOXO3a, p66Shc e p53, foram implicadas na indução de apoptose em resposta a ERO (BRUNET et al., 1999; YOU et al., 2006). Os receptores de morte, como o receptor de TNF I, induzem principalmente a geração de ERO através das mitocôndrias, levando à ativação da caspase e à morte celular (SCHULZE-OSTHOFF et al., 1993). No entanto, TRAF4 (fator associado ao receptor de TNF 4), um componente da via de sinalização de $TNF\alpha$, também se liga ao complexo de NADPH oxidase para ativar JNK (XU et al., 2002), sugerindo que os receptores de morte podem usar várias

maneiras de induzir ERO dentro das células. Notavelmente, o estresse oxidativo induzido por TNF também medeia a sinalização anti-apoptótica induzindo a expressão de MnSOD e catalase através de NF- κ B (WONG et al., 1988).

Os alcaloides aporfinicos anonaina, glaucina e norglaucina foram previamente relatados como indutores de estresse oxidativo (CHIU et al., 2012). Além disso, o tratamento de combinação de liriodenina/ácido valpróico aumenta a produção de ERO e a depleção de GSH intracelular (CHEN et al., 2014). O excesso de ERO pode induzir a transcrição mediada por NF κ B do ligante FAS, estimulando assim a apoptose (RYAN et al., 2000). NF- κ B induz a produção de TNF- α e subsequente autofosforilação por interagir com RIP1. Em associação com NEMO, RIP1 quinase promove a indução mediada por JNK3 de IL-8 e recruta FADD para ativar a caspase 8, o que induz a apoptose (BITON et al., 2011).

Os eventos de sinalização mediada pelo estresse oxidativo foram relatados como fatores de grande influência no comportamento das células cancerígenas (STORZ et al., 2005; SZATROWSK et al., 1991; GUPTA et al., 1999). Por exemplo, ERO no câncer estão envolvidas na progressão e proliferação do ciclo celular, sobrevivência celular e apoptose, metabolismo energético, morfologia celular, adesão célula-célula, motilidade celular e angiogênese.

Por fim, a xilopina mostrou-se promissora como composto citotóxico e estes dados encontrados aqui reforçam que estudos complementares de mecanismo de ação, bem como estudos *in vivo*, devem ser realizados com essa molécula para melhor caracterizar seu potencial anticancerígeno.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, a xilopina possui uma citotoxicidade potente para diferentes linhagens celulares de câncer, induz estresse oxidativo e provoca a parada do ciclo celular na fase G₂/M que desencadeia a apoptose mediada por caspases por uma via independente de p53 em células HCT116.

REFERÊNCIAS

- AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.
- BABIO, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464–1476, 1999.
- BAHASSI E.M.; OVESEN, J.L.; RIESENBERG, A. L. The checkpoint kinases Chk1 and Chk2 regulate the functional associations between hBRCA2 and Rad51 in response to DNA damage. **Oncogene**, v. 27, p. 3977–2885, 2008.
- BALABAN, R. S; NEMOTO, S; FINKEL, T. Mitochondria, oxidants, and aging. **Cell**, vol. 120, n. 4, p. 483–495, 2005.
- BARTEK, J.; LUKAS, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. **Cancer Cell**, v. 3, p. 421–429, 2003.
- BARZILAI, A; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA Repair (Amst)**, v.3, p. 1109-1115, 2004.
- BAS, A. K. et al. **Robbins e Cotran: Patologia - Bases patológicas das doenças**. 8. ed, Elsevier, 2010. p. 682–692.
- BIENER, G. P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 1183–1192, 2007.
- BITON, S.; ASHKENAZI, A. NEMO and RIP1 control cell fate in response to extensive DNA damage via TNF- α feedforward signaling. **Cell**. v. 145, p. 92–103, 2011.
- BOCK, F.J; VILLUNGER, A. GSK3 TIPping off p53 to unleash PUMA. **Mol. Cell.**, v. 42, p. 555–556, 2011.

BOS, J.L. Ras oncogenes in human cancer: a review. **Cancer Res.**, v. 49 p. 4682–4689, 1989.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quim. Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRUNET, A. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. **Cell**, v. 96, p. 857–868, 1999.

CADENAS, E. Mitochondrial free radical production and cell signaling. **Mol. Asp. Med.**, v. 25, p. 17–26, 2004.

CAI, J.; YANG, J.; JONES, D.P. Mitochondrial control of apoptosis. The role of cytochrome c. **Bioch. Bioph. Acta**, v.1366, p.139–149, 1998.

CALIN, G.A; DUMITRU, C.D; SHIMIZU, M. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 99, p. 15524–15529, 2002.

CANNATA, D; FIERZ, Y; VIJAYAKUMAR, A. Type 2 diabetes and cancer: what is the connection? **Mt Sinai J. Med.**, v. 77, p. 197–213, 2010.

CASPERSEN C.J; THOMAS G.D; BOSEMAN L.A. Aging, diabetes, and the public health system in the U. S **Am. J. Publ. Health**, v. 102, p. 1482–1497, 2012.

CDC. Diabetes report card 2012. Atlanta DC: USDHHS, CDC; 2012. Disponível em: www.cdc.gov/diabetes/pubs/pdf/DiabetesReportCard.pdf

CHANG, H. C. et al. Anti-cancer effect of liriodenine on human lung cancer cells. **Kaohsiung J. Med. Sci.**, v. 20, n. 8, p. 365-371, 2004.

CHEN, C. Y. et al. Process biochemistry liriodenine enhances the apoptosis effect of valproic acid in human colon cancer cells through oxidative stress upregulation and Akt inhibition. **Process Bioch.**, v. 49, n. 11, p. 1990-2000, 2014.

CHEN, C.Y.; CHEN, S.Y.; CHEN, C.H. Liriodenine induces G1/S cell cycle arrest in human colon cancer cells via nitric oxide-and p53-mediated pathway. **Process Biochem.** v. 47, p. 1460–1468, 2012.

CHEN, J. et al. Aporphine alkaloids: a kind of alkaloids' extract source, chemical constitution and pharmacological actions in different botany. **Asian J. Chem.**, v. 25, n. 18, p. 10015-10027, 2013.

CHEN, Q. et al. Apoptosis of human highly metastatic lung cancer cell line 95-D induced by acutiaporberine, a novel bisalkaloid derived from *Thalictrum acutifolium*. **Planta Med.**, v. 68, n. 6, p. 550-553, 2002.

CHEN, Q; PENG, W; XU, A. Apoptosis of a human non-small cell lung cancer (NSCLC) cell line, PLA-801, induced by acutiaporberine, a novel bisalkaloid derived from *Thalictrum acutifolium* (Hand.-Mazz.) Boivin. **Bioch. Pharmacol.**, v. 63, n. 8, p. 1389-1396, 2002.

CHIU, C. C; CHOU, H. L; WU, P. F. Bio-functional constituents from the stems of *Liriodendron tulipifera*. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4357-4372, 2012.

CHONG, C. R.; JÄNNE, P. A. The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. **Nat. Med.**, v. 19, n. 11, p. 1389–1400, 2013.

CIARDIELLO, F; TORTORA, G. EGFR antagonists in cancer treatment. **N. Engl. J. Med.**, v. 13, p. 1160–1174, 2008.

CIBAS, E.S. Applications of flow cytometric DNA analysis to diagnostic cytology. **Diagn. Cytopathol.**, v.13, p. 166–171, 1995.

CLAVIEN, P. A.; LESURTEL, M.; BOSSUYT, P. M. Recommendations for liver transplantation for hepatocellular carcinoma: an international consensus conference report. **Lancet Oncol.**, v. 13, n. 1 p. 11-22, 2012.

CORY, S.; HUANG, D.C.; ADAMS, J.M. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. **Oncogene**, v. 22, p. 8590–8607, 2003.

COSTA, E. V. et al. 7,7-Dimethylaporphine and other alkaloids from the bark of *Guatteria friesiana*, **J. Nat. Prod.**, v. 79, n. 6, p. 1524-1531, 2016.

COTREAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Eds). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1318.

CRAGG, D.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2013.

CROMPTO, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. **Biochem. J.**, v. 341, p. 233–249, 1999.

DA SILVA, D. B. et al. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007.

DELANEY, G. et al. The role of radiotherapy in cancer treatment: estimating optimal utilization from a review of evidence-based clinical guidelines. **Cancer**, v. 104, e. 6, p. 37, 2005.

DIAZ, J.R. et al. The molecular evolution of acquired resistance to targeted EGFR blockade in colorectal cancers. **Nature**, v. 486, p. 14, 2012.

DOERFLINGER, M.; GLAB, J. A.; PUTHALAKATH, H. BH3-only proteins: a 20-year stock-take. **The FEBS Journal**, v. 282, p.1006-1016, 2015.

FENNEMA, E. et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in Biotechnology**, v.31, p.108-115, 2013.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell and Differentiation**, v. 10, p.107-120, 2012.

GARCIA, M. et al. Global Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, GA: **American Cancer Society**, p. 1-2, 2007.

GILBERT, C.A; SLINGERLAND, J.M. Cytokines, obesity, and cancer: new insights on mechanisms linking obesity to cancer risk and progression. **Annu. Rev. Med.**, v. 64, p. 45–57, 2013.

GIOVANNUCCI, E. Metabolic syndrome, hyperinsulinemia, and colon cancer: a review. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 86, p. S836–S842, 2007.

GLASS, L. S. et al. Semi-automated high-throughput fluorescent intercalator displacement-based discovery of cytotoxic DNA binding agents from a large compound library. **Bioorganic & Med. Chem. Letters**, v. 20, n. 5, p. 1685-1688, 2010.

GOTTLIEB, T.M.; OREN, M. p53 in growth control and neoplasia. **Biochim. Biophys. Acta**, e. 1287, p. 77–102, 1996.

GOTTLIEB, E.; VANDER HEIDEN, M.G.; THOMPSON, C.B. Bcl-x(L) prevents the initial decrease in mitochondrial membrane potential and subsequent reactive oxygen species production during tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **Mol. Cell. Biol.**, v. 20, p. 5680–5689, 2000.

GUPTA, A.; ROSENBERGER S.F.; BOWDEN, G.T. Increased ROS levels contribute to elevated transcription factor and MAP kinase activities in malignantly progressed mouse keratinocyte cell lines. **Carcinogenesis**. v. 20, p. 2063–2073, 1999.

HA, D.; WILLIAMS, E.; CADENAS, E. Mitochondrial respiratory chain-dependent generation of superoxide anion and its release into the intermembrane space. **Biochem. J.**, v. 353, p. 411–416, 2001.

HABLI, Z. et al. Emerging Cytotoxic Alkaloids in the Battle against Cancer: Overview of Molecular Mechanisms. **Molecules**, v. 22, p. 250, 2017.

HARDY, T. M.; TOLLEFSBOL, T. O. Epigenetic diet: impact on the epigenome and cancer. **Epigenomics**, v. 3, n. 4, p. 503–518, 2011.

HOWLADER, N.; NOONE, AM.; KRAPCHO, M. **SEER cancer statistics review, 1975–2009** (Vintage 2009 Populations). Bethesda MD: National Cancer Institute, 2012.

INCA. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. **Estimativas 2016: Incidência de Câncer no Brasil.**, Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/dados-apresentados.pdf>> Acesso em: 01 dez 2015 e 12 nov 2016.

JUNG, A.; BRABLETZ, T.; KIRCHNER, T. The migrating cancer stem cells model--a conceptual explanation of malignant tumour progression. **Ernst Schering Found. Symp. Proc.**, v.5, p.109–124, 2006.

KAMOGASHIRA, T.; FUJIMOTO, C.; YAMASOBA, T. Reactive oxygen species, apoptosis, and mitochondrial dysfunction in hearing loss. **BioMed. Res. Int.**, v. 2015, p. 617207, 2015.

KARIKAS, G. A. Anticancer and chemopreventing natural products: some biochemical and therapeutic aspects. **J. BUON**, v. 15, p. 627–638, 2010.

KATZUNG, G.B. **Basic and Clinical Pharmacology**, 9th ed., McGraw-Hill Medical, United States of America, 2003. p.1088.

KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nat. Rev.**, v. 10, p. 221-237, 2011.

KUMMAR, V. et al. **Pathology Basis of Disease**, 7th edn., WB Saunders, China, 2004. p.1552.

LA V.C; GIORDANO S.H; HORTOBAGYI G.N. Overweight, obesity, diabetes, and risk of breast cancer: interlocking pieces of the puzzle. **Oncologist**, v. 16, p. 726–729, 2011.

LAFRANCE, M.; BLAQUIERE, N.; FAGNOU, K. aporphine alkaloid synthesis and diversification via direct arylation. **Eur. J. Org. Chem.**, v. 2007, n. 5, p. 811–825, 2007.

LAHAV G. Oscillations by the p53–Mdm2 feedback loop. **Adv. Exp. Med. Biol.**, e. 641, p. 28–38, 2008.

LE, W.K.; THEVENOD, F. A role for mitochondrial aquaporins in cellular life-and-death decisions? **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 291, p. 195–202, 2006.

LEE, C.H. Novel 2-step synthetic indole compound 1,1,3-tri(3-indolyl)cyclohexane inhibits cancer cell growth in lung cancer cells and xenograft models. **Cancer**, v. 113, p. 815–825, 2008.

LEVERKUS, M. Imiquimod: unexpected killer. **J. Invest. Dermatol.**, v.122, p.15-16, 2004.

LI, P.F.; DIETZ, R.; VON HARSDORF, R. p53 regulates mitochondrial membrane potential through reactive oxygen species and induces cytochrome c-independent apoptosis blocked by Bcl-2. **Embo J.**, v. 18, p. 6027–6036, 1999.

LIU, A. J. et al. Evodiamine, a plant alkaloid, induces calcium/JNK-mediated autophagy and calcium/mitochondriamediated apoptosis in human glioblastoma cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 205, e. 1, p. 20-28, 2013.

LUC, G. T. et al. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. **Cancer**, v. 121, e. 9, p. 1357–1368, 2015.

MACKLIS, J. D.; MADISON, R. D. Progressive incorporation of propidiumiodide in cultured mouse neurons correlates with declining electrophysiological status: a fluorescence scale of membrane integrity. **J. Neurosci. Methods**, v. 31, p. 43-46, 1990.

MEHMET, H. Apoptosis: caspase Wnds a new place to hide. **Nature**, v.403, p.29 – 30, 2002.

MENEZES, L. R. A. et al. Cytotoxic Alkaloids from the Stem of *Xylopi laevigata*. **Molecules**, v. 21, e. 7, p. 21, 2016.

MENEZES, L. R. A. et al. Cytotoxic alkaloids from the stem of *Xylopi laevigata*. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. E890, 2016.

MIGLIORE, L.; COPPEDE, F. Genetic and environmental factors in cancer and neurodegenerative diseases. **Mutat. Res.**, v. 512, p.135–153, 2002.

MITSUDOMI, T; YATABE, Y. Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. **FEBS J**, v. 244, p. 301-308, 2010.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; Natural products as sources of new drugs over the 1586 30 years from 1981 to 2010, **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 311–338, 2012.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; Natural products as sources of new drugs over the 1586 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.**, v. 75, p. 311–338, 2012.

NORDIN, N. et al. Liriodenine, an aporphine alkaloid from *Enicosanthellum pulchrum*, inhibits proliferation of human ovarian cancer cells through induction of apoptosis via the mitochondrial signaling pathway and blocking cell cycle progression. **Drug Des. Devel Ther.**, v. 9, p. 1437–1448, 2015.

ORRENIUS, S. Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. **Toxicol. Letters**, v. 149, p. 19-23, 2004.

ORTH, M. et al. Current concepts in clinical radiation oncology. **Radiat. Env. Biophys.**, v. 53, e. 1, p. 1–29, 2014.

OSTI, R. Z. et al. The in vitro and in vivo antitumour activities of nitrosyl ruthenium amine complexes. **Aust. J. Chem.**, v. 65, p. 1333–1341, 2012.

PABLA, N; HUANG; S; MI, Q. S. ATR-Chk2 signaling in p53 activation and DNA damage response during cisplatin-induced apoptosis. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 6572–6583, 2008.

PAVLIDIS, N; STANTA, G; AUDISIO, R.A. Cancer prevalence and mortality in centenarians: a systematic review. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 83, p. 145–152, 2012.

POLAGER, S; GINSBERG, D. p53 and E2f: partners in life and death. **Nat. Rev. Cancer**, v. 9, p. 738–748, 2009.

PRIVES, C.; HALL, P.A The p53 pathway. **J. Pathol.**, v. 187, p. 112–126, 1999.

QANUNGO, S. Epigallocatechin-3-gallate induces mitochondrial membrane depolarization and caspase-dependent apoptosis in pancreatic cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 26, p. 958–967, 2005.

RELÓGIO, A; THOMAS, P; MEDINA-PÉREZ, P. Ras-mediated deregulation of the circadian clock in cancer. **PLoS Genet**, v.10, 2014.

RODRIGUES, F. S. S.; POLIDORI, M. M. Confront and resiliency of the patients in the chemotherapeutic treatment and their families. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 58, n. 4, p. 619-627, 2012.

ROKAVEC, M; LI, H; JIANG, L. The p53/miR-34 axis in development and disease. **J. Mol. Cell Biol.**, v. 6, p. 214–230, 2014.

ROSAS, M. S. L. et al. Incidência do câncer no Brasil e o potencial uso dos derivados de isatinas na cancerologia experimental. **Rev. Virtual Quim.**, v. 5, n. 2, p. 243-265, 2013.

RUSSO, A; AUTELITANO, M; BISANTI, L. Metabolic syndrome and cancer risk. **Eur. J. Cancer**, v. 44, p. 293–297, 2008.

RYAN, K.M.; ERNST, M.K. RICE, N.R. Role of NF- κ B in p53-mediated programmed cell death. **Nature**, v. 404, p. 892–896, 2000.

SAITOH, M. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. **Embo J.** v. 17, p. 2596–2606, 1998.

SALVESEM, G.S.; DIXIT, V.M. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. **Cell**, v.91, p.443–446, 1997.

SCHULZE-OSTHOFF, K. Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. **Embo J.**, v. 12, p. 3095–3104, 1993.

SHIEH, S. Y; AHN, J; TAMAI, K. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. **Genes Dev.**, v. 14, p. 289–300, 2000.

SIMON, H.U.; HAJ-YEHIA, A.; LEVI-SCHAFFER, F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. **Apoptosis**, v.5, p. 415–418, 2000.

SLEEMAN, J. P. Metastasis: Understanding is the beginning of order in chaos. **Semin. Cancer Biol.**, v. 22, e. 3, p. 22-173, 2012.

SMITH, J.; THO L.M.; XU, N. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. **Adv. Cancer Res.**, v. 108 p. 73–112, 2010.

SPANDIDOS, D.A. Mechanism of carcinogenesis: The role of oncogenes, transcriptional enhancers and growth factors. **Anticancer Res.**, v.5, p.485–498, 1985.

SPANDIDOS, D.A. Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. **J. Buon**, v. 12 Suppl 1, p. S9–12, 2007.

SPENCE, R.A.J.; JONHSTON, P.G. **Oncology**. Oxford: Oxford University Press, 2001. p.536.

STOR, P. Reactive oxygen species-mediated mitochondria-to-nucleus signaling: a key to aging and radical-caused diseases. **Sci STKE**, v. 332, p. 3, 2006.

STORZ P. Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D. **Trends Cell Biol.**, v.17, p. 13–18, 2007.

STORZ, P. Reactive oxygen species in tumor progression. **Front Biosci.**, v. 10, p. 1881–1896, 2005.

STOUT, M.C; ASIIMWE, E; BIRKENSTAMM, J.R. Analyzing ras-associated cell proliferation signaling. *Methods*, **Mol. Biol.**, e.1170, p. 393–409, 2014.

STRACKER, T. H, COUTO, S.S.; CORDON-CARDO, C. Chk2 suppresses the oncogenic potential of DNA replication associated DNA damage. **Mol. Cell**, v. 31, p. 21–32, 2008.

STRACKER, T. H.; USUI, T.; PETRINI, J. H. J. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. **DNA Repair (Amst)**, v. 8, p. 1047–1054, 2009.

STRASSER, A. The role of BH3-only proteins in the immune system. **Nat. Rev. Immunol.**, v.5, p.189-200, 2005.

SUFFNESS, M; PEZZUTO, J.M. **Assays related to cancer drug discovery**. In: **Hostettmann K, editor. Methods in plant biochemistry: assay for bioactivity**. London: Academic Press, 1990. p. 71–133.

SVILAR, D. et al. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, p. 2491, 2010.

SZATROWSKI, T.P.; NATHAN C.F. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. **Cancer Res.**, v.51, p. 794–798, 1991.

TAKEDA, K. Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. **Cell Struct. Funct.**, v.28, p. 23–29, 2003.

TRINCHIERI, G. Cancer and inflammation: an old intuition with rapidly evolving new concepts. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 30, p. 677–706, 2012.

VERBON, E. H; POST, J. A; BOONSTRA, J. The influence of reactive oxygen species on cell cycle progression in mammalian cells. **Gene**, p. 511, p. 1–6, 2012.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE D.R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, p. 131–149, 2003.

WHITE, M.C. et al. Age and Cancer Risk: A Potentially Modifiable Relationship. **Am. J. Prev. Med.**, v. 46, p. 7–15, 2014.

WILLIS, A; JUNG, E.J, WAKEFIELD, T. Mutant p53 exerts a dominant negative effect by preventing wild-type p53 from binding to the promoter of its target genes. **Oncogene**, e. 23, P.2330–2338, 2004.

WIRTZ, D; KONSTANTOPOULOS, K; SEARSON, P.C. The physics of cancer: the role of physical interactions and mechanical forces in metastasis. **Nat. Rev. Cancer**, v. 11, p. 512-522, 2011.

WOLIN K.Y; CARSON, K; COLDITZ, G.A. Obesity and cancer. **Oncologist**, v. 15, p. 556–565, 2010.

WONG, G.H.; GOEDDEL, D.V. Induction of manganous superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. **Science**, v. 242, p. 941–944, 1988.

WOO, S. H; SUN, N. J; CASSADY, J. M; SNAPKA, R. M. Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids. **Bioch. Pharmacol.**, v. 57, n. 10, p. 1141-1145, 1999.

WYLD, L.; AUDISIO, R. A.; POSTON, G. J. The evolution of cancer surgery and future perspectives. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 12, p. 24-115, 2015.

XU, Y.C. Involvement of TRAF4 in oxidative activation of c-Jun N-terminal kinase. **J Biol Chem.**, v. 277, p. 28051–28057, 2002.

YOU, H.; YAMAMOTO, K.; MAK, T.W. Regulation of transactivation-independent proapoptotic activity of p53 by FOXO3a. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v. 103, p. 9051–9056, 2006.

ZHANG, B; PAN, X; COBB, G.P. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Dev. Biol.**, v. 302, p. 1–12, 2007.

ZHOU B.B.S; ELLEDGE, S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. **Nature**, v. 408, p. 433–439, 2000.