



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

SIMONE CRISTINE SEMPREBON

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ANTIPROLIFERATIVOS  
DA GONIOTALAMINA EM LINHAGENS MAMÁRIAS DE  
ADENOCARCINOMA (MCF-7) E DE EPITÉLIO NÃO-  
TUMORAL (HB4A)**

SIMONE CRISTINE SEMPREBON

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ANTIPROLIFERATIVOS DA  
GONIOTALAMINA EM LINHAGENS MAMÁRIAS DE  
ADENOCARCINOMA (MCF-7) E DE EPITÉLIO NÃO-TUMORAL  
(HB4A)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

S473a Semprebon, Simone Cristine.

Avaliação dos mecanismos antiproliferativos da goniotalamina em linhagens mamárias de adenocarcinoma (MCF-7) e de epitélio não tumoral (HB4A) / Simone Cristine Semprebon. – Londrina, 2015.  
102 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Células cancerosas – Teses. 2. Goniotalamina – Teses. 3. Ciclo celular – Teses. 4. Apoptose – Teses. 5. Toxicologia genética – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 576.385.5

SIMONE CRISTINE SEMPREBON

**AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS ANTIPROLIFERATIVOS DA  
GONIOTALAMINA EM LINHAGENS MAMÁRIAS DE  
ADENOCARCINOMA (MCF-7) E DE EPITÉLIO NÃO-TUMORAL  
(HB4A)**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Mário Sérgio Mantovani  
Universidade Estadual de Londrina

---

Dra. Sílvia Helena Sofia  
Universidade Estadual de Londrina

---

Dra. Tânia Longo Mazzuco  
Universidade Estadual de Londrina

---

Dra. Denise Crispim Tavares  
Universidade de Franca

---

Dra. Jenifer Saffi  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de  
Porto Alegre (UFCSPA)

Londrina, 11 de maio de 2015

*Dedico esse trabalho a Deus, à minha mãe e ao Gabriel, por todo apoio e amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Aos professores e amigos do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular;

Ao apoio financeiro da CAPES, Fundação Araucária e CNPq;

Ao Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, por todos esses anos de orientação e amizade, por ter aberto as portas do laboratório e também por todos os conselhos profissionais. Muito obrigada por todo o apoio e confiança!

À profa. Daisy Salvadori por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização dos experimentos de citometria de fluxo.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Toxicológica: Andressa, Gláucia, Lilian, Bruna, Ingrid, Daniela Santos, Daniele Sartori, Sandra, Adivânio, Thalita e Eliane. Muito obrigada por todo esse tempo que passamos juntos. Meu trabalho se tornou ainda mais prazeroso com a companhia diária de vocês. Em especial às amigas Gláucia, Lilian e Andressa por toda a ajuda na realização dos experimentos;

À minha família, por todo apoio, torcida e cuidado. Em especial aos meus avós: Arlindo, Leolinda e Irene, por sempre terem me apoiado e pela presença constante de cada um em minha vida;

À minha mãe, Noeli, por sempre ter apoiado minhas escolhas e ter enfrentado comigo esses dez anos de caminhada profissional. Obrigada, acima de tudo, por ter acreditado que era possível!

Ao meu namorado, Gabriel, por todo cuidado, companheirismo e dedicação. Seu apoio é fundamental em cada etapa da minha vida. Obrigada por viver comigo cada momento e, em especial, essa importante fase da minha vida!

Agradeço a Deus e à intercessão de Nossa Senhora Aparecida. A Ele seja dada toda honra e toda glória na conclusão dessa tese e de todas as etapas da minha vida!

SEMPREBON, Simone Cristine. **Avaliação dos mecanismos antiproliferativos da goniotalamina em linhagens mamárias de adenocarcinoma (MCF-7) e de epitélio não-tumoral (HB4A)**. 2015. 102 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

## RESUMO

A (R)-Goniotalamina (R-GNT) é uma estiril lactona encontrada em plantas do gênero *Goniothalamus* sp., que apresenta propriedade antiproliferativa contra inúmeras linhagens tumorais. A (S)-Goniotalamina (R-GNT) é o enantiômero sintético da R-GNT e suas propriedades biológicas são pouco compreendidas. Nesse contexto, o objetivo desse estudo foi avaliar os mecanismos antiproliferativos da (R)-Goniotalamina e (S)-Goniotalaminana nas linhagens mamárias de adenocarcinoma MCF-7 e de epitélio não-tumoral HB4a. O potencial da goniotalamina em inibir a proliferação celular foi avaliado pelo ensaio de citotoxicidade MTT e pela análise da cinética de crescimento celular (xCELLigence, *Real Time Cell Analyzer*). Os mecanismos antiproliferativos foram investigados por meio da análise do potencial dessas moléculas em induzir danos ao DNA (Ensaio do cometa), causar alterações na dinâmica do ciclo celular (iodeto de propídeo, citometria de fluxo) e induzir apoptose (Anexina V e 7-amino-actinomicina D, citometria de fluxo). Além disso, foi realizada a análise da expressão relativa de genes regulatórios do ciclo celular (ciclina, CDKs e CKIs), apoptose (*CASP8* e *CASP9*) e do gene responsivo ao estresse genotóxico *GADD45a*. A exposição de ambas as linhagens às concentrações de 1-100  $\mu$ M de D e R-GNT levou à redução na viabilidade e inibição do crescimento celular. O enantiômero natural R-GNT foi mais eficaz para ambas as linhagens celulares do que o enantiômero R-GNT, e causou genotoxicidade, parada de ciclo celular e indução de apoptose. A inibição do ciclo celular causada pela R-GNT foi mediada pela regulação positiva de inibidores de CDKs e de *GADD45a*, e pela regulação negativa de ciclina e CDKs. A S-GNT, por sua vez, causou parada de ciclo celular na fase G0/G1 e genotoxicidade nas células MCF-7 e induziu apoptose somente nas células HB4a, sem causar genotoxicidade. Logo, a atividade antiproliferativa da GNT está relacionada ao seu potencial em induzir parada do ciclo celular, genotoxicidade e apoptose em células mamárias.

**Palavras-chave:** Goniotalamina. Genotoxicidade. Ciclo celular. Apoptose. MCF-7. HB4a.

SEMPREBON, Simone Cristine. **Evaluation of antiproliferative mechanisms of goniothalamine for breast cancer MCF-7 cells and epithelial mammary HB4a cells.** 2015. 102 p. Thesis (PhD in Genetics and Molecular Biology) – State University of Londrina, Londrina. 2015.

### ABSTRACT

The (R)-goniothalamine (R-GNT) is a lactone styryl found in plants of the genus *Goniothalamus* sp., which has antiproliferative property against several tumor cell lines. The (S)-goniothalamine (S-GNT) is the synthetic enantiomer of R-GNT and their biological properties are poorly understood. In this context, the aim of this study was to evaluate the antiproliferative mechanisms of R-GNT and S-GNT for MCF-7 breast cancer cells and epithelial mammary HB4a cells. The potential of goniothalamine to inhibit cell proliferation was assessed by MTT cytotoxicity assay and by the cell growth kinetics analysis (xCELLigence, Real Time Cell Analyzer). The antiproliferative mechanism was investigated by the analysis of the potential of these molecules to induce DNA damage (comet assay), to cause changes in cell cycle dynamics (propidium iodide, flow cytometry) and to induce apoptosis (Annexin V and 7-amino - actinomycin D, flow cytometry). In addition, in order to understand the molecular mechanisms of action of R-GNT, was performed the analysis of relative expression of cell cycle regulatory genes (cyclins, CDKs and CKIs), apoptosis (*CASP8* and *CASP9*) and of responsive gene to genotoxic stress *GADD45a*. Exposure of both cell lines to concentrations of 1-100  $\mu$ M of R and S-GNT led to a dose and time-dependent reduction in cell viability and inhibition of cell growth. The natural enantiomer R-GNT was more effective for both cell lines than the S-GNT and caused genotoxicity, cell cycle arrest and apoptosis induction. The cell cycle inhibition caused by R-GNT was mediated by upregulation of CIP/KIP cyclin-kinase inhibitors and *GADD45a* and by downregulation of cyclins and CDKs. The S-GNT, in turn, was able to cause G0/G1 cell cycle arrest and genotoxicity in MCF-7 cells and apoptosis induction only in HB4a cells. Therefore, the antiproliferative activity of the GNT is related to its potential to induce cell cycle arrest, genotoxicity and apoptosis in mammary cells.

**Keywords:** Goniothalamine. Genotoxicity. Cell cycle. Apoptosis. MCF-7. HB4a.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Fotomicrografia da linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7 .....	21
Figura 2 – Fotomicrografia da linhagem epitelial mamária HB4a (Aumento: 460x).....	22
Figura 3 – Controle do ciclo celular .....	23
Figura 4 – Fosforilação e inativação da proteína Rb pelos complexos ciclina D/CDK4 e ciclina E/CDK2. ....	24
Figura 5 – Ativação do complexo ciclina B/CDK1 e sua participação no controle da fase M.....	25
Figura 6 – Via extrínseca e via intrínseca da apoptose.....	29
Figura 7 – A família Bcl-2, a qual inclui as proteínas Bcl-2, Bax, Bid e Bik, é dividida em três grupos de acordo com o número de domínios de homologia (BH1, BH3, BH1, BH2 e TM) à proteína Bcl-2 (Grupo I, Grupo II e Grupo III). ....	30
Figura 8 – Fontes das drogas anticâncer descobertas entre 1940-2010. ....	33
Figura 9 – Estrutura química da (R)-goniotalamina e (S)-goniotalamina. ....	34

### ARTIGO

Fig. 1. Chemical structures of (R)-goniothalamine and (S)-goniothalamine.....	72
Fig. 2. Cell viability (%) of MCF-7 and HB4a breast cell lines after 24 and 48 h of incubation with 1-100 $\mu$ M of R-GNT and S-GNT measured using the MTT assay. ....	73
Fig. 3. Real-time monitoring of HB4a and MCF-7 cells obtained using the xCELLigence system demonstrating the kinetics of cell growth after exposure to R-GNT and S-GNT (1, 10, 20, 30, 40, 50 and 100 $\mu$ M).....	75
Fig. 4. Cell cycle analysis (G0/G1, S, G2/M and subG1) of HB4a and MCF-7 cells after exposure to R and S-GNT (10 $\mu$ M and 50 $\mu$ M) by flow cytometry using propidium iodide labeling. ....	77
Fig. 5. Effects of R-GNT and S-GNT (10 $\mu$ M and 50 $\mu$ M) on apoptosis induction. The apoptosis analysis was performed by flow cytometry using Annexin V-PE (AV) and 7-amino-actinomycin D (7-AAD), and the events were classified into three cell populations: viable cells (AV-/7-AAD-), early apoptotic cells (AV+/7-AAD-), and late stage apoptotic and dead cells (AV+/7-AAD+).....	79
Fig. 6. Evaluation of the damage index (DI) after 3 h of exposure of HB4a and MCF-7 cells to R-GNT and S-GNT (10 $\mu$ M and 50 $\mu$ M) measured using the Comet Assay. ....	80
Fig. 7. RT-qPCR analysis of genes involved in cell cycle regulation. Graphs shown the relative gene expression (fold-change) of cyclins, CDKs and CKIs genes in (A) HB4a and (B) MCF-7 cells after 12h of exposure to R-GNT 50 $\mu$ M.....	81
Fig. 8. RT-qPCR analysis of genes involved apoptosis pathway. Graphs shown the relative gene expression (fold-change) of <i>CASP9</i> and <i>CASP8</i> in (A) HB4a and (B) MCF-7 cells after 12h of exposure to R-GNT 50 $\mu$ M.....	82
Fig. 9. RT-qPCR analysis of Growth Arrest and DNA Damage (Gadd) 45a gene ( <i>GADD45a</i> ). Graphs shown the relative gene expression (fold-change) in (A) HB4a and (B) MCF-7 cells after 3 h and 12 h of exposure to R-GNT 50 $\mu$ M. ....	83

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto câncer de pele não-melanoma.....	17
--	----

### ARTIGO

Table 1 - Sequences of primers used in RT-qPCR.....	70
---	----

### APÊNDICE

Tabela 1 - Média ± Desvio Padrão das absorbâncias obtidas no ensaio de citotoxicidade MTT, após 24 e 48 horas de exposição à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT).....	94
Tabela 2 - Média ± Desvio Padrão das porcentagens de células HB4a nas fases G0/G1, S, G2/M e sub-G1 obtidas na análise do ciclo celular por citometria de fluxo após 3 e 24 horas de exposição à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT). ....	95
Tabela 3 - Média ± Desvio Padrão das porcentagens de células MCF-7 nas fases G0/G1, S, G2/M e sub-G1 obtidas na análise do ciclo celular por citometria de fluxo após 3 e 24 horas de exposição à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT). ....	96
Tabela 4 - Média ± Desvio Padrão do número de células HB4a viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia obtidas pelo ensaio da anexina V/7AAD por citometria de fluxo após 24 horas de exposição à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT).....	97
Tabela 5 - Média ± Desvio Padrão do número de células MCF-7 viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia obtidas pelo ensaio da anexina V/7AAD por citometria de fluxo após 24 horas de exposição à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT).....	98
Tabela 6 - Média ± Desvio Padrão do índice de danos (ID) obtido através do ensaio do cometa após 3 horas de exposição das células HB4a à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT). ....	99
Tabela 7 - Média ± Desvio Padrão do índice de danos obtido através do ensaio do cometa após 3 horas de exposição das células MCF-7 à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT). ....	100
Tabela 8 - Eficiência, erro padrão e valores de expressão relativa obtidos através do experimento de RT-qPCR após 12 h de exposição das células HB4a à R-GNT (50 µM). ....	101
Tabela 9 - Eficiência, erro padrão e valores de expressão relativa obtidos através do experimento de RT-qPCR após 12 h de exposição das células MCF-7 à R-GNT (50 µM). ....	102

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AIF</b>	Apoptosis-inducing factor
<b>APC/C</b>	anaphase-promoting complex/cyclosome
<b>Bad</b>	BCL2-associated agonist of cell death
<b>Bak</b>	BCL2-antagonist/killer 1
<b>Bax</b>	BCL2-associated X protein
<b>Bcl-2</b>	B-cell lymphoma 2
<b>Bcl-B</b>	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
<b>Bcl-w</b>	Bcl-2-like protein 2
<b>Bcl-xL</b>	Bcl-2-like protein 1
<b>Bid</b>	BH3 interacting domain death agonist
<b>Bik</b>	BCL2-interacting killer
<b>Bim</b>	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
<b>Bok</b>	BCL2-related ovarian killer
<b>CAK</b>	Cyclin-dependent Activating Kinase
<b>CCNB1</b>	cyclin B1
<b>Cdc25C</b>	Cell Division Cycle 25C
<b>CDK</b>	cyclin dependent kinases
<b>CDKN1A</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
<b>Chk1</b>	checkpoint kinase 1
<b>CK8/18</b>	Cytokeratins 8 and 18
<b>CKI</b>	cyclin-kinase inhibitors
<b>CKIs</b>	cyclin kinases inhibitor
<b>R-GNT</b>	(R)-goniotalamina
<b>EndoG</b>	endonuclease G
<b>ER</b>	Estrogen receptor
<b>GNT</b>	goniotalamina
<b>GSH</b>	Glutathione synthetase
<b>HER2</b>	Human epidermal growth factor receptor 2
<b>HER2</b>	human epidermal growth factor receptor 2
<b>INK4</b>	Inhibitors of CDK4
<b>LC3</b>	Autophagy-related protein
<b>LC3</b>	Autophagy-related protein
<b>R-GNT</b>	(S)-goniotalamina
<b>MKI67</b>	marker of proliferation Ki-67
<b>p16</b>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
<b>PARP</b>	Polimerase poliADPribose
<b>PARP</b>	Poly ADP ribose polymerase
<b>PCNA</b>	Proliferating Nuclear Antigen
<b>PGR</b>	Progesterone receptor
<b>PMAIP1</b>	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
<b>Rb</b>	retinoblastoma protein

<b>SMAC/DIABLO</b>	Second Mitochondria-derived Activator of Caspases/ Direct IAP-Binding protein
<b>Stat3</b>	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
<b>TNF</b>	Tumor necrosis factor
<b>TNFR1</b>	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
<b>TP53</b>	tumor protein p53
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	13
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1	Câncer .....	14
2.1.1	Carcinogênese .....	14
2.1.2	Epidemiologia do câncer .....	16
2.1.3	Câncer de mama .....	17
2.1.4	Linhagens celulares de mama .....	20
2.2	Ciclo celular e apoptose: alvos celulares de compostos antitumorais .....	22
2.2.1	Ciclo celular .....	22
2.2.2	Apoptose .....	27
2.3	Produtos naturais com potencial anticâncer .....	31
2.4	Goniotalamina .....	33
2.4.1	Histórico, características e estrutura química .....	34
2.4.2	Principais propriedades bioativas .....	35
2.4.3	Goniotalamina como agente antiproliferativo e antitumoral .....	37
2.4.4	Mecanismos moleculares da Goniotalamina .....	40
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	46
3.1	Objetivo Geral .....	46
3.2	Objetivos específicos .....	46
<b>4</b>	<b>MANUSCRITO</b> .....	47
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	84
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	85
	<b>APÊNDICE</b> .....	94

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

O câncer de mama é a segunda neoplasia mais frequente no mundo e a mais comum entre as mulheres. No Brasil são esperados cerca de 57.120 novos casos, aproximadamente 56 casos a cada 100 mil mulheres, segundo estimativas para os anos de 2014 e 2015. Nas regiões sul e sudeste estes números são ainda mais alarmantes, com risco estimado de cerca de 71 novos casos/100.000 mulheres. Embora tenha um bom prognóstico quando diagnosticada precocemente, essa neoplasia ainda é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres. Sendo assim, novas estratégias terapêuticas que tragam menores efeitos colaterais, maior seletividade e uma resposta mais efetiva são necessárias.

Vários compostos naturais com efeitos antiproliferativos têm sido utilizados como fármacos antineoplásicos, sendo grande parte deles obtidos a partir de fontes naturais ou por modificação estrutural de moléculas naturais. Uma molécula obtida a partir de fonte natural com potente atividade antiproliferativa é a goniotalamina. Em sua forma natural essa molécula apresenta configuração absoluta R (*Rectus*) e, recentemente, seu enantiômero sintético S (*Sinister*) foi sintetizado.

A escassez de estudos a respeito da (S)-goniotalamina e a necessidade de esclarecer seu mecanismo de ação tornam essa molécula um importante alvo de estudo. Quanto à (R)-goniotalamina, mesmo com as informações relatadas na literatura, são necessários novos estudos que proporcionem uma visão mais ampla e detalhada dos mecanismos desempenhados por essa molécula.

Portanto, um estudo comparativo entre ambas as formas enantioméricas da goniotalamina (R e S) e que verifique e esclareça a possível seletividade destes compostos contra células tumorais, é de grande importância para a compreensão do modo como essas moléculas exercem sua atividade antiproliferativa.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Câncer**

#### **2.1.1 Carcinogênese**

O câncer é um conjunto de doenças com mais de 100 tipos e subtipos distintos encontrados em órgãos e tecidos específicos, que se caracteriza, principalmente, pelo crescimento descontrolado de células anormais. As células cancerosas possuem defeitos nos circuitos regulatórios normais que coordenam a proliferação celular, rompendo, deste modo, a homeostase do tecido.

A proliferação fora de controle dará origem a um tumor, ou neoplasia. Se essas células neoplásicas permanecerem agregadas formando uma massa única, o tumor é considerado benigno, entretanto, caso as células adquiram a capacidade de invadir tecidos adjacentes, penetrar na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos e formar tumores secundários, o tumor é considerado maligno ou câncer.

Esta vantagem no crescimento ocorre devido a mutações, que são mudanças no genótipo de uma célula, ou a alterações epigenéticas, quando o padrão de expressão gênica é alterado sem mudanças na sequência de DNA. Grande parte das mutações não traz mudanças na atividade celular ou leva a célula à morte, já uma pequena parte pode ocorrer em genes específicos (proto-oncogenes e supressores tumorais) e, então, determinar vantagens e crescimento desordenado a estas células. Estas mutações podem ocorrer de maneira espontânea, devido a erros na replicação ou reparo do DNA; de maneira induzida, quando são resultantes da exposição do organismo a agentes físicos, químicos ou biológicos que causam mudanças no DNA; ou então podem ser herdadas (COHEN; ELLWEIN, 1991; BALMAIN; GRAY; PONDER, 2003; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009).

Um grande número de mutações responsáveis pelo desenvolvimento tumoral já foi identificado. Estudos têm demonstrado que toda célula maligna possui mutações múltiplas e que uma única alteração genética é insuficiente para formar um tumor maligno (YOKOTA, 2000; STRATTON; CAMPBELL; FUTREAL, 2009). Isso ocorre porque os processos celulares são controlados de forma complexa e mecanismos regulatórios redundantes são utilizados para manter o controle do comportamento celular. Sendo assim, inúmeros sistemas regulatórios diferentes precisam ser alterados para que uma célula torne-se cancerosa.

A tumorigênese é um processo genético, multipassos e que dirige progressivamente a

transformação de células normais em células com características malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Segundo Hanahan e Weinberg (2011), o fenótipo maligno é resultado da manifestação de alterações essenciais na fisiologia celular que permitem às células cancerosas sobreviver, se proliferar e se disseminar tais como:

**Autossuficiência em sinais de crescimento:** Tecidos normais controlam cuidadosamente a produção e a liberação de fatores de crescimento que, por sua vez, controlam a progressão das células no ciclo celular. As células cancerosas podem adquirir a capacidade de autossuficiência aos sinais de crescimento de algumas formas, como produzindo seus próprios fatores de crescimento e respondendo a esses sinais de maneira autócrina; enviando sinais para estimular as células normais que reciprocamente fornecem fatores de crescimento às células tumorais; aumentando o número de proteínas receptoras na superfície celular e tornando essas células super responsivas a quantidades limitadas de ligantes de fatores de crescimento, etc.

**Insensibilidade a sinais supressores de crescimento:** Além da autossuficiência na sinalização de crescimento, as células tumorais também apresentam a capacidade de se evadir de sinais supressores de crescimento. Diversos supressores tumorais que atuam limitando o crescimento e a proliferação celular se encontram inativados nos cânceres humanos, tais como a proteína Rb (*retinoblastoma-associated*) e Tp53.

**Resistência à morte celular:** Nos tecidos normais no adulto, as células podem proliferar continuamente, mas seu número permanece constante porque o aumento no número de células é contrabalançado pela perda de células. A morte celular por apoptose tem um papel fundamental nesse equilíbrio, sendo uma barreira natural ao desenvolvimento do câncer. Uma das características fundamentais das células cancerosas é a resistência à morte celular por apoptose e isso acontece devido à perda da função supressora de Tp53, aumento da expressão de reguladores antiapoptóticos (Bcl-2 e Bcl-XL) ou de sinais de sobrevivência (Igf1/2), regulação negativa de fatores pró-apoptóticos (Bax, Bim, Puma) ou ainda por desregulação na via extrínseca da apoptose.

**Imortalidade replicativa:** As células cancerosas adquirem a capacidade de se replicar de forma ilimitada. Alguns estudos sugerem que a enzima telomerase, DNA polimerase que adiciona segmentos repetidos do DNA telomérico, está expressa em aproximadamente 90% das células imortalizadas. Essa atividade da telomerase está correlacionada à resistência da indução de senescência e a crise/apoptose, garantindo que essas células tenham imortalidade replicativa.

**Angiogênese induzida:** Os tumores, assim como os tecidos normais, necessitam de

aporte sanguíneo. A fim de suprir essa necessidade, o processo de angiogênese leva à neovascularização associada ao tumor, o que ajuda a sustentar o desenvolvimento neoplásico. Um exemplo de agente indutor de angiogênese bem definido é o gene *VEGF-A*, que codifica ligantes que estão envolvidos na indução da formação de vasos sanguíneos durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal. A expressão desse gene pode sofrer regulação positiva em situações de hipóxia ou ainda por estímulos oncogênicos.

**Invasão tecidual e metástase:** As células cancerosas podem adquirir a capacidade de invadir tecidos adjacentes, penetrar na corrente sanguínea ou nos vasos linfáticos e formar tumores secundários. Durante esse processo, conhecido como metástase, as células sofrem alterações em sua forma, na sua fixação a outras células e na matriz extracelular (ME). A perda da E-caderina pelas células cancerosas é a principal alteração já caracterizada em relação à invasão tecidual e metástase. Estudos demonstram que a expressão aumentada de E-caderina atua como um antagonista da invasão e metástase, enquanto a redução em sua expressão potencializa esse processo. Além disso, genes que codificam para moléculas de adesão célula-célula e célula-ME apresentam regulação negativa e moléculas de adesão associadas à migração celular durante a embriogênese, como a N-caderina, possuem regulação positiva em carcinomas agressivos.

As características descritas acima permitem que as células cancerosas sobrevivam, proliferem e se disseminem (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A aquisição dessas marcas durante o desenvolvimento tumoral é dependente do desenvolvimento da instabilidade genômica e do estado inflamatório das lesões pré-malignas ou malignas. Além disso, a reprogramação do metabolismo energético, a fim de sustentar o crescimento tumoral, e a evasão ativa das células tumorais do ataque de células do sistema imune são atributos importantes que também colaboram para a tumorigênese (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

### 2.1.2 Epidemiologia do câncer



O câncer tornou-se um problema de saúde pública mundial nas últimas décadas e estimativas apontam para um aumento na carga global dessa doença nos próximos anos devido ao crescimento e envelhecimento da população. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2012 ocorreram 14,1 milhões de novos casos, 8,2 milhões de mortes por câncer e 32,6 milhões de pessoas vivendo com essa doença. Para o ano de 2030, são esperados 21,4 milhões de casos incidentes e 13,2 milhões de mortes por câncer (WHO, 2012)

Dentre todas as neoplasias, o câncer de mama é o segundo mais comum e o que mais

acomete as mulheres em todo mundo. No ano de 2012, 1,67 milhões de novos casos foram diagnosticados na população mundial, o que representa 25% de todos os cânceres (WHO, 2012)

No Brasil, estimativas de 2014/2015 apontam para a ocorrência de 576 mil novos casos de câncer. Para o sexo masculino, os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não-melanoma, cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral. Já para o sexo feminino, os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não-melanoma, mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide. Com exceção dos cânceres de pele não-melanoma, são estimados 190 mil novos casos de câncer para a população feminina e desses 57.120 serão casos de câncer de mama, sendo esse, portanto, o 2º tipo de câncer mais incidente na população feminina brasileira (Tabela 1) (INCA, 2014).

Tabela 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto câncer de pele não-melanoma.

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	<b>Homens</b> 	<b>Mulheres</b> 	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

\*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

**Fonte:** INCA (2014).

### 2.1.3 Câncer de mama

#### a) Etiologia

A etiologia do câncer de mama é multifatorial e envolve exposição a hormônios esteróides, dieta, obesidade, sedentarismo, consumo de bebida alcoólica, histórico familiar, entre outros.

Essa doença é pouco comum entre mulheres mais jovens do que 30 anos, sendo a idade e a duração da exposição a esteroides endógenos ou exógenos, como o uso de contraceptivos e a terapia de reposição hormonal, os fatores de risco mais bem definidos. Os ovários produzem hormônios esteróides que afetam diretamente o desenvolvimento e a função das mamas durante a vida reprodutiva da mulheres. Uma análise que reuniu 117 estudos epidemiológicos, incluindo

118.964 mulheres com câncer de mama invasivo e 306.091 sem a doença, demonstrou que a menarca precoce e a menopausa tardia são fatores associados a um maior risco no desenvolvimento do câncer de mama (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST, 2012). Além disso, as taxas de incidência dessa doença aumentam ao longo da vida da mulher, mas são reduzidas entre os 45 e 50 anos, sugerindo o envolvimento de hormônios reprodutivos na etiologia do câncer de mama. Esta mudança não é vista entre tumores não-dependentes de hormônio (WIDSCHWENDTER; JONES, 2002).

O consumo de bebidas alcoólicas tem sido correlacionado a um aumento no risco de câncer de mama. O risco relativo para essa doença aumenta em 7,1% a cada 10 g adicionais de álcool por dia, tanto em mulheres fumantes como não-fumantes. Considerando esse risco relativo, cerca de 4% de todos os casos de câncer de mama em mulheres de países desenvolvidos poderiam ser atribuídos ao consumo de bebidas alcoólicas (HAMAJIMA et al., 2002). O papel do tabagismo ativo no risco de câncer de mama ainda é inconsistente, embora estudos recentes demonstrem uma modesta associação entre tabagismo e câncer de mama (CATSBURG; MILLER; ROHAN, 2014).

Um dos fatores de risco mais bem estabelecido para o câncer de mama é o histórico familiar da doença. Uma reanálise de 52 estudos confirma essa correlação. Contudo, também demonstra que a maioria das mulheres com uma ou mais parentes de primeiro grau afetadas nunca irá desenvolver a doença e que a maior parte das mulheres que desenvolvem câncer de mama não possuem nenhum parente afetado (COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST, 2001).

Alguns hábitos de vida como a prática de exercícios físicos, o sedentarismo, hábitos alimentares e o sono têm grande impacto na incidência e sobrevivência de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama (THOMPSON et al., 2014). Também a obesidade é um fator de risco bem estabelecido para essa doença, isto porque após a menopausa o tecido adiposo é a maior fonte de estrógeno do corpo (WIDSCHWENDTER; JONES, 2002).

## **b) Classificação molecular**

Existem diversos subtipos patológicos com diferentes aspectos histológicos, diferentes quadros clínicos e diversidade na resposta a um determinado tratamento. De acordo com as características histológicas, esta neoplasia é categorizada em carcinoma invasivo (incluindo o carcinoma micro invasivo) e carcinoma *in situ*. O carcinoma *in situ* é caracterizado pela ausência de invasão dos tecidos adjacentes. Já o carcinoma invasivo é caracterizado pela

invasão dos tecidos e pela capacidade de metástase. Os subtipos histopatológicos dos carcinomas de mama são definidos com base em critérios morfológicos e padrões de crescimento (AJCC, 2002). O carcinoma *in situ* é subclassificado em ductal ou lobular, já os principais subtipos de carcinoma invasivo são ductal infiltrante, lobular invasivo, ductal/lobular, mucinoso (coloide), tubular, medular e papilar (MALHOTRA et al., 2010).

Pacientes com câncer de mama com o mesmo estágio da doença têm diferentes respostas ao tratamento. Algumas vezes, os fatores que predizem o risco de metástase (como o status dos linfonodos e o grau histológico) falham em classificar os tumores de mama. Isso ocorre porque o câncer de mama é uma doença genética e clinicamente heterogênea. As alterações que levam ao desenvolvimento do câncer de mama são caracterizadas por uma variedade de lesões genéticas que incluem, ampliações gênicas, deleções, mutações pontuais, perda de heterozigotidade, rearranjos cromossômicos, aneuploidia e alterações epigenéticas (WIDSCHWENDTER; JONES, 2002).

A diversidade fenotípica dos tumores de mama é acompanhada por uma correspondente diversidade nos padrões de expressão gênica. Os carcinomas de mama são classificados em alguns subtipos moleculares que englobam os mais de 20 subtipos morfológicos, são eles: *Basal-like*, HER2 (*Human epidermal growth factor receptor 2*) positivo, *Normal breast-like*, Luminal A, Luminal B, *Claudin-low* (TOOKMAN; ROYLANCE, 2010; CANCER GENOME ATLAS, 2012; EROLES et al., 2012).

Na revisão de Eroles et al. (2012), os 6 subtipos principais são descritos de acordo com as características moleculares dos tumores:

1. Subtipo Luminal A: é o mais comum e representa 50-60% dos casos, sendo caracterizado pela expressão de genes ativados pelo receptor de estrógeno (ER), normalmente expressos no epitélio luminal que reveste os ductos mamários. Os pacientes com este subtipo apresentam um bom prognóstico e a taxa de recorrência é de 27,8%. Seu perfil imunohistoquímico é caracterizado pela expressão de ER, PGR, Bcl-2 e CK8/18, ausência de HER2, baixa taxa de proliferação e baixo grau histológico. O tratamento para este subtipo é baseado na terceira geração de inibidores de aromatase em pacientes pós-menopausa, moduladores seletivos de receptores de estrógeno, como o tamoxifeno, e através de reguladores seletivos de receptores de estrógeno como o fulvestrant.

2. Subtipo Luminal B: representa de 10 a 20% dos casos de câncer de mama, sendo mais agressivo do que o subtipo Luminal A. Este subtipo também possui expressão de receptores de estrógeno (ER), entretanto, diferente do subtipo luminal A, apresenta um elevado grau histológico, alta taxa de proliferação, um prognóstico ruim e uma taxa de recorrência maior (cerca

de 30%). É caracterizado pela expressão de genes de proliferação, tais como *MKI67* e *CCNB1*, e de *EGFR* e *HER2*.

3. Subtipo HER2 positivo: representa de 15 a 20% de todos os cânceres de mama. Esses tumores são altamente proliferativos, têm um alto grau histológico e um prognóstico ruim. É caracterizado por uma elevada expressão de HER2 e de genes associados a ele. As taxas de sobrevivência aumentaram na última década depois do início da terapia com anti-HER2.

4. Subtipo *basal-like*: representa 10-20% dos casos de câncer de mama e expressa genes normalmente presentes em células mioepiteliais de mama. Clinicamente, são predominantes em mulheres de origem africana e com pouca idade, possuem um alto grau histológico, com um prognóstico pior do que para os subtipos luminal A e B. Este subtipo não apresenta expressão de ER, PGR e HER2, sendo classificado na prática clínica como Triplo Negativo (TN).

5. Subtipo *Normal Breast*: representa de 5-10% dos casos de carcinoma de mama. Ele expressa genes característicos de tecido adiposo e ainda há dúvidas sobre sua real existência. Alguns estudos o apontam como um artefato de contaminação por tecido normal durante as análises de microarranjo.

6. Subtipo *Claudin-low*: é caracterizado por uma baixa expressão de genes que codificam proteínas de junções intercelulares e de adesão, incluindo claudina-3, -4, -7, cingulina, ocludina e E-caderina. Este subtipo apresenta um prognóstico ruim e baixa expressão de genes envolvidos com a proliferação celular.

Embora o câncer de mama, em geral, tenha um bom prognóstico, as taxas de mortalidade continuam elevadas. Nos países desenvolvidos, a taxa de sobrevivência média em 5 anos é de 85%, já em países em desenvolvimento, cerca de 60% (INCA, 2014). Dos pacientes com esta neoplasia, cerca de 20-30% desenvolvem doença metastática e apresentam uma média de sobrevivência entre 2 e 4 anos, dependendo do subtipo da doença (EROLES et al., 2012). Sendo assim, novas estratégias terapêuticas que tragam menores efeitos colaterais, maior seletividade e uma resposta mais efetiva são necessárias.

#### **2.1.4 Linhagens celulares de mama**

Um modelo experimental frequentemente utilizado para o estudo da influência de novos compostos com potencial terapêutico para o câncer de mama é a cultura celular de linhagens mamárias.

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário humana MCF-7 é a mais utilizada em pesquisas em todo o mundo (HOLLIDAY; SPEIRS, 2011). Essa linhagem foi estabelecida em

1973 a partir das células em cultura primária derivadas de efusão pleural de uma paciente de 69 anos com doença metastática de mama (SOULE et al., 1973).

Os subtipos moleculares do câncer de mama são identificados com base nos perfis de expressão gênica e de proteínas. A linhagem MCF-7 (Fig. 1) expressa o receptor de estrógeno (ER) e de progesterona (PR) e é HER2 negativa, sendo, portanto, classificada como o subtipo molecular Luminal A. Esse subtipo é o mais frequente, representando 50 a 60% de todos os casos, um dos mais bem diferenciados, ocorre frequentemente em pacientes mais velhas e possui o melhor prognóstico quando comparado aos demais subtipos (SUBIK et al., 2010; HOLLIDAY; SPEIRS, 2011).

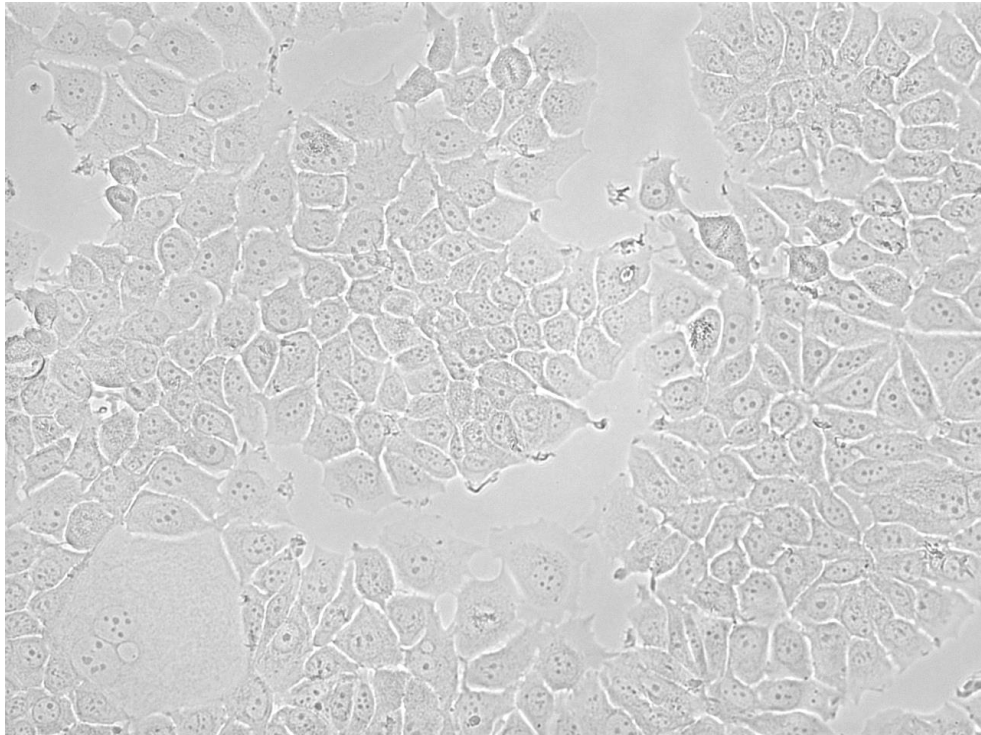


Figura 1 - Fotomicrografia da linhagem de adenocarcinoma mamário MCF-7 (Aumento: 460x).

A linhagem HB4a (Fig. 2) foi estabelecida a partir de epitélio mamário normal e imortalizada por infecção retroviral com antígeno SV40 T (STAMPS et al., 1994). Essa linhagem apresenta níveis basais de expressão de HER2 e é positiva para os receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) (DOS SANTOS et al., 2006). Os perfis de expressão de RNAm dessas células são semelhantes a aqueles encontrados em tecidos normais de mama (GIT et al., 2008).

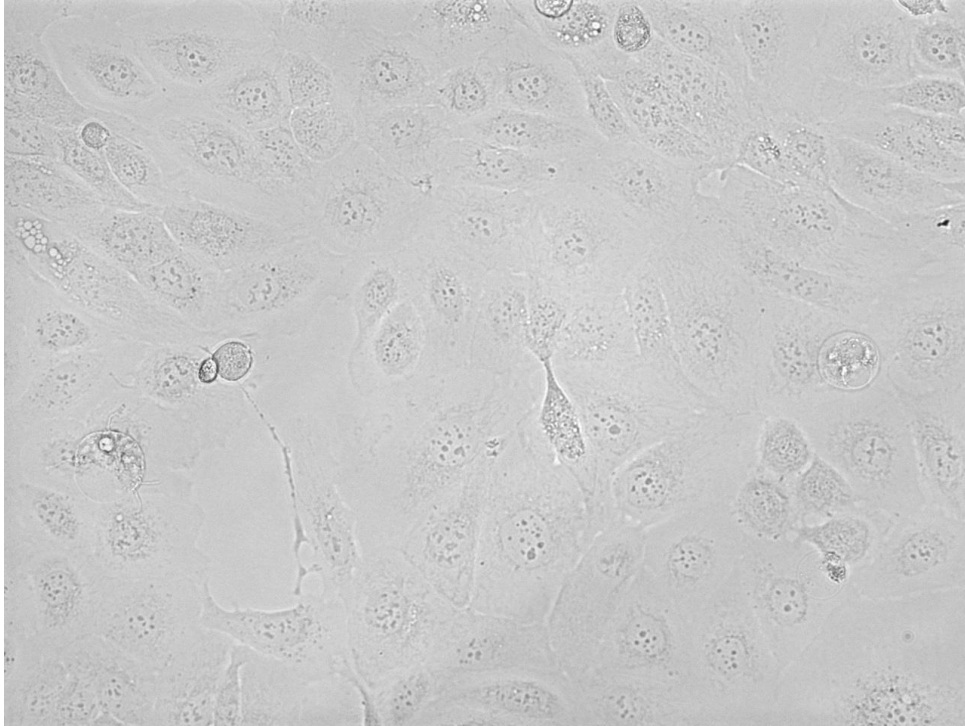


Figura 2 - Fotomicrografia da linhagem epitelial mamária HB4a (Aumento: 460x).

## 2.2 Ciclo celular e apoptose: alvos celulares de compostos antitumorais

### 2.2.1 Ciclo celular

O ciclo celular constitui uma série de eventos ordenados, onde as células duplicam seu conteúdo de DNA e depois se dividem em duas células-filhas geneticamente idênticas à célula-mãe. As duas principais fases do ciclo celular são as fases de síntese do DNA (fase S), onde ocorrerá a replicação cromossômica, e a fase de mitose (fase M), onde haverá a segregação dos cromossomos e, por fim, a divisão celular. Entre essas duas fases (fase S e fase M), existem as fases de intervalo (fase G1 e fase G2), onde as células crescem, duplicam sua quantidade de organelas e proteínas e fornecem tempo para que a maquinaria celular monitore o ambiente intra e extracelular antes de seguir para as fases de mudanças mais críticas. Sendo assim, o ciclo celular ocorre de modo sequencial entre as fases G1 (*gap 1*), S (síntese), G2 (*gap 2*) e M (mitose). Quando a fase M termina, a célula retorna à fase G1 (Fig. 3A) (SURYADINATA; SADOWSKI; SARCEVIC, 2010).

A maquinaria do ciclo celular deve viabilizar a progressão da célula ao longo do ciclo garantindo a fidelidade genômica. As cinases dependentes de ciclinas (*cyclin dependent kinases*, *CDKs*) associadas com ciclinas dirigem a progressão da célula ao longo do ciclo

celular. As CDKs 4, 6, 2 e 1, fosforilam as proteínas responsáveis pelos eventos do ciclo celular de forma cíclica. Essas mudanças nas atividades das CDKs são reguladas pelas ciclinas D, E, A e B. Para que as CDKs exerçam sua atividade de proteíno-quinase, elas devem estar ligadas às ciclinas, as quais são sintetizadas e destruídas em momentos específicos do ciclo celular, garantindo, assim, que a atividade quinase seja regulada de forma tempo-específica (Fig. 3B e 3C). Portanto, a célula entra e sai de uma determinada fase do ciclo de acordo com a síntese e degradação de ciclinas específicas. Além do controle temporal, diferentes complexos ciclina/CDKs fosforilam grupos diferentes de proteínas ao longo do ciclo (MALUMBRES; BARBACID, 2009).

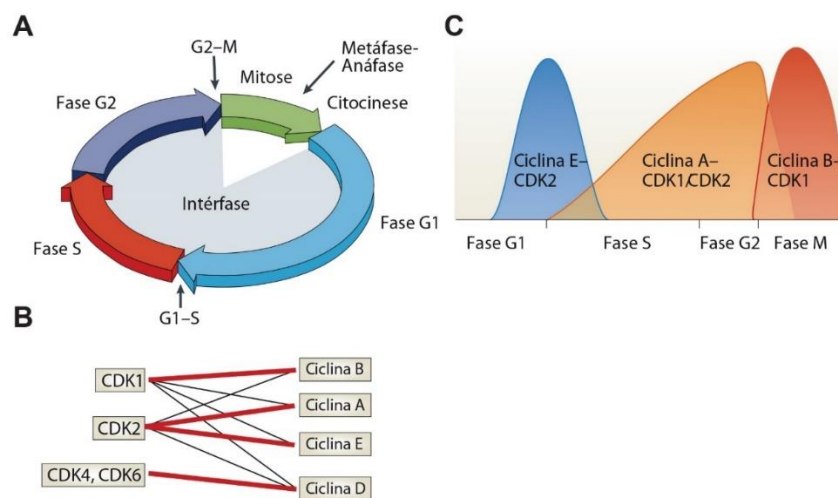


Figura 3 – Controle do ciclo celular. A) Fases do ciclo celular. B) Interações entre ciclinas A, B, E e D e CDKs 1, 2, 4 e 6. C) Complexos ciclina/CDK responsáveis por regular os eventos da fase G1, S, G2 e M.

**Fonte:** Modificado de HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT (2008).

Em resposta a estímulos mitogênicos, ocorre o acúmulo de ciclina D. Essa ciclina se complexa com CDK4/6 durante a fase G1 do ciclo celular e fosforila a proteína Rb, inativando sua atividade de repressor transcricional (SHERR; ROBERTS, 2004). A fosforilação de Rb, por sua vez, causa sua dissociação do fator transcricional E2F, permitindo que ocorra a transcrição de genes que codificam para componentes responsáveis pelos eventos subsequentes do ciclo celular, tais como ciclina E, A e B1, CDK1, entre outros (Fig. 4) (TRIMARCHI; LEES, 2002). Além disso, evidências sugerem que esse complexo também atue sequestrando e inativando proteínas da família CIP/KIP de inibidores de CDKs (CKIs), tais como p21 e p27 (SHERR; ROBERTS, 2004).

A próxima ciclina a ser induzida é a ciclina E, a qual se associa à CDK2. O complexo ciclina E/CDK2 é responsável por manter a proteína Rb em um estado hiperfosforilado e também por fosforilar p27, contribuindo para sua subsequente degradação via proteossomo. A máxima atividade de ciclina E/CDK2 é detectada na transição G1/S. No início da fase S ocorre uma queda na atividade do complexo ciclina E/CDK2 devido à degradação de ciclina E (SHERR; ROBERTS, 2004). Sendo assim, juntos, os complexos ciclina D/CDK4-6 e ciclina E/CDK2 são responsáveis pela progressão da célula ao longo de G1 e pela transição G1/S.

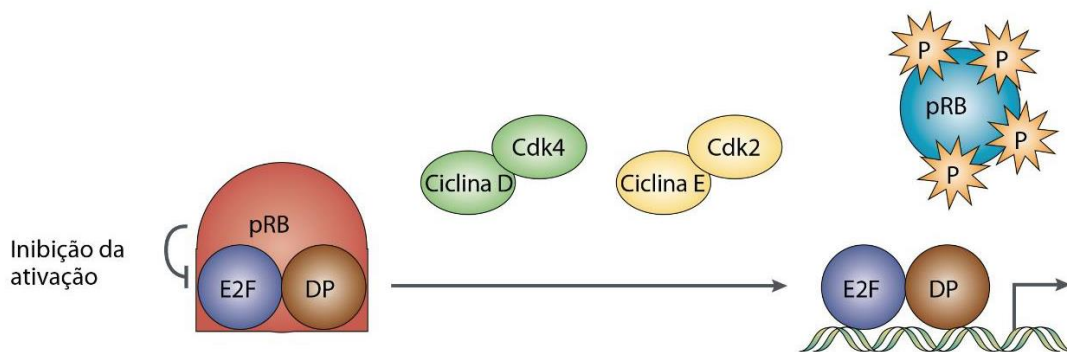


Figura 4 – Fosforilação e inativação da proteína Rb pelos complexos ciclina D/CDK4 e ciclina E/CDK2.

**Fonte:** Modificado de TRIMARCHI; LEES (2002).

Os complexos ciclina E/CDK2 e ciclina A/CDK2 são responsáveis por regular a entrada na fase S, a progressão da replicação e também por limitar a ocorrência da replicação a somente uma vez por ciclo. Além de seu papel na fosforilação de Rb, o complexo ciclina E/CDK2 também atua de forma conjunta com o complexo ciclina A/CDK2 fosforilando componentes da maquinaria de replicação do DNA (WOO; POON, 2003).

Após a fase S, as células na fase G2 possuem duas cópias do genoma. Durante a fase M, esses cromossomos devem ser distribuídos para as duas células-filhas. A progressão da fase G2 para a fase M é dirigida pela ativação do complexo ciclina B/CDK1 (Fig. 5). Esse complexo é capaz de promover várias reorganizações celulares que ocorrem no início da mitose, tais como a montagem do fuso mitótico, a condensação dos cromossomos, o rompimento do envelope nuclear, reorganização do citoesqueleto, entre outros. Além disso, um dos principais alvos desse complexo é o complexo promotor da anáfase (APC), uma ubiquitina ligase que promove a destruição de proteínas mitóticas regulatórias. No início da mitose, o complexo ciclina B/CDK1 fosforila as subunidades de APC e contribui para sua ativação. Inicia-se então a ubiquitinação e degradação das proteínas securinas e também de ciclina B1 durante a transição da metáfase

para anáfase. Uma vez que a proteína securina é degradada, a proteína separase livre consegue clivar uma das subunidades do complexo de coesão (*SCC1*, *sister chromatid cohesion 1*), permitindo a separação das cromátides irmãs (NIGG, 2001).

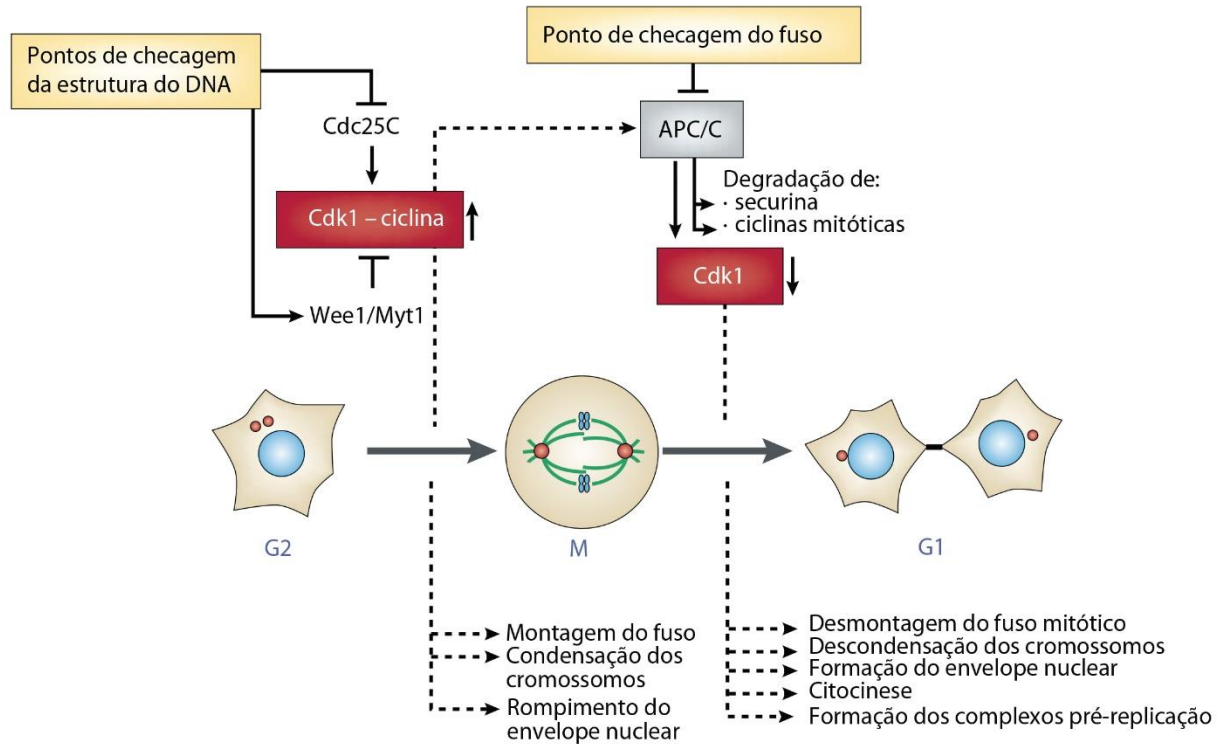


Figura 5 – Ativação do complexo ciclina B/CDK1 e sua participação no controle da fase M. Esse complexo promove várias reorganizações celulares no início da mitose, tais como a montagem do fuso mitótico, a condensação dos cromossomos e o rompimento do envelope nuclear. Um dos seus principais alvos é o complexo promotor da anáfase (APC), uma ubiquitina ligase que promove a destruição de proteínas mitóticas regulatórias e da securina. Os pontos de checagem da estrutura do DNA e do fuso inibem a ativação do complexo ciclina B/CDK1 e de APC.

**Fonte:** Modificado de NIGG (2001)

Além da regulação da atividade das CDKs pela ligação das ciclinas, o aumento de sua atividade pode ser regulado pela quinase ativadora de CDK, CAK (CDK7/ciclina H) (LOLLI; JOHNSON, 2005), e a inibição pode se dar pela fosforilação de sítios inibitórios pela proteínoquinase Wee1. A remoção desses fosfatos dos sítios inibitórios pela fosfatase Cdc25C resulta na ativação do complexo ciclina/CDK, causando a defosforilação e ativando as CDKs (PERRY; KORNBLUTH, 2007) (Fig. 5).

As proteínas inibidoras de CDKs (*cyclin-kinase inhibitors, CKIs*) também podem atuar causando a inibição desses complexos. Esses inibidores causam a supressão da proliferação celular sob condições de estresse, tais como deficiência de fatores de crescimento, danos ao DNA, entre outros. Existem duas famílias de CKIs, CIP/KIP (p21, p27 e p57) e INK4 (p15, p16, p18 e p19). Os membros da família INK4 (*Inhibitors of CDK4*) se ligam e inibem a atividade das CDKs 4 e 6. Já os membros da família CIP/KIP podem se ligar e inibir uma ampla gama de CDKs (ROUSSEL, 1999; LEE, J. et al., 2009).

O principal membro da família CIP/KIP é a proteína p21. Essa proteína está envolvida com os pontos de checagem de G1/S e desempenha sua atividade de inibidor do ciclo celular por interagir diretamente e inibir a atividade quinase dos complexos ciclina E/CDK2 e ciclina A/CDK2, também interage com PCNA (Proliferating Nuclear Antigen) e com os fatores transcricionais E2F, cMyc e STAT3. Desse modo, p21 causa repressão da transcrição gênica indiretamente através da interação com o complexo ciclina/CDK, inibindo a fosforilação da proteína Rb e, portanto, bloqueando a atividade transcricional de E2F, e diretamente através da interação com os fatores transcricionais (BESSON, 2008; WARFEL, 2013). Além disso, em resposta aos danos ao DNA, p21 também contribui para a parada de ciclo na fase G2 através da repressão transcricional de Emi1 (*early mitotic inhibitor 1*), um inibidor do complexo ubiquitina ligase APC/C. A regulação negativa de Emi1 leva à ativação de APC/C, a qual leva à degradação de ciclinas e outras proteínas necessárias para a entrada na mitose, bloqueando as células na fase G2 (LEE, J. et al., 2009).

Mutações de perda de função no gene *CDKN1A*, o qual codifica para a proteína p21, são raros nos cânceres humanos, embora muitos cânceres possuam uma expressão reduzida de p21. Essa expressão desregulada de p21 ocorre principalmente devido à perda de função de seus ativadores transcricionais, como a proteína p53, e também com o ganho de função ou superexpressão de seus repressores, como Myc (ABBAS; DUTTA, 2009).

Os pontos de checagem do ciclo celular agem para garantir a fidelidade da replicação e divisão celular, protegendo as células contra os efeitos de agentes genotóxicos, tais como agentes químicos, radicais livres, radiação ionizante, medicamentos, produtos do metabolismo celular, etc. Em resposta a lesões ao DNA, a célula irá ativar os pontos de checagem e fazer com que a célula pare transitoriamente ou permanentemente nas transições G1/S ou G2/M e ative os mecanismos de reparo do DNA em resposta aos estímulos genotóxicos. Existem dois pontos de checagem dos DNA danificado, um no final de G1, que irá impedir a entrada em S, e um ao final de G2, que irá bloquear a entrada da célula em M.

Na fase G1, em resposta aos danos ao DNA, a proteína p53 é ativada e estimula a transcrição de genes responsáveis por inibir a ativação dos complexos ciclina/CDK responsáveis pela transição G1/S. O gene *CDKN1A* é um dos genes cuja transcrição é estimulada em resposta ao p53 e que irá colaborar para o bloqueio das células na fase G1. O ponto de checagem de G2, de modo semelhante ao ponto de checagem de G1, atrasa a entrada na mitose para que o reparo aconteça. Como já discutido acima, embora os níveis de ciclina B colaborem para a ativação do complexo ciclina B/CDK1, outros mecanismos também são importantes na regulação desse processo. Um desses mecanismos é a ativação de Cdc25C, fosfatase responsável por defosforilar os sítios inibitórios e ativar a enzima Cdk1 (Fig. 5). A presença de danos ao DNA ativa a proteína Chk1, que então inativa a fosfatase Cdc25C, e assim inibe a ativação de Cdk1, impedindo que a célula prossiga para a fase M (DIPAOLA, 2002). Sendo assim, a regulação negativa de ciclina B1, Cdk1 e Cdc25C pode contribuir para o bloqueio das células na transição G2/M.

As neoplasias possuem defeitos nos circuitos regulatórios do ciclo celular. Frequentemente, são encontradas mutações associadas aos tumores que desregulam alguns complexos ciclina/CDK, resultando em proliferação celular descontrolada. Entretanto, mutações em CDKs são raras nos cânceres humanos, a maioria das neoplasias carregam mutações em reguladores das CDKs, tais como ciclinas e CKIs, ou em seus substratos, como a proteína Rb. Também as alterações nas vias de resposta aos danos ao DNA resultam em progressão das células no ciclo celular mesmo na presença de DNA danificado, contribuindo para a instabilidade genômica do tumor (MALUMBRES; BARBACID, 2005). Sendo assim, drogas que atuem causando a inibição dos reguladores positivos do ciclo, tais como ciclinas e CDKs, e a ativação dos inibidores, como as CKIs, são bons alvos para a terapêutica anticâncer.

### **2.2.2 Apoptose**

Para combater os danos ao DNA, as células possuem um mecanismo de resposta ao dano no DNA (*DNA damage response*, DDR) que irá detectar as lesões ao DNA e iniciar os pontos de checagem do DNA danificado, que podem bloquear as células na transição das fases G1/S ou G2/M do ciclo celular e ativar as vias de reparo ao DNA em resposta aos insultos genotóxicos. Entretanto, se os danos não forem passíveis de reparo, a célula deverá ser encaminhada à morte celular por apoptose. Nas células tumorais, no entanto, os mecanismos de *checkpoints* podem não ser efetivos permitindo que essas células proliferem mesmo com o DNA danificado. Isso faz com que essas células sejam mais suscetíveis ao tratamento com

agentes indutores de danos ao DNA, uma vez que a replicação do DNA danificado aumenta a probabilidade de que ocorra morte celular por apoptose. Diversas drogas anticâncer utilizadas na prática clínica, tais como a doxorrubicina, cisplatina, etoposídeo, 5-fluoro-uracila, entre outras, têm o DNA como alvo (CHEUNG-ONG; GIAEVER; NISLOW, 2013).

Na apoptose, também conhecida como morte celular programada, uma maquinaria de execução é acionada e culmina na morte da célula de forma ordenada e controlada, que não afeta as células vizinhas. A observação da morfologia externa de uma célula em apoptose mostra que, inicialmente, essa célula se torna arredondada e perde o contato com as células vizinhas, em seguida formam-se bolhas no citoplasma (*blebbings*) e corpos apoptóticos. A célula em apoptose também apresenta mudanças em sua arquitetura interna, e as principais características são a condensação da cromatina e a fragmentação nuclear. A identificação de uma célula em apoptose também pode ser realizada através do estudo de marcadores bioquímicos do processo apoptótico, como a exposição de fosfatidilserina na superfície celular, o extravasamento de proteínas mitocondriais (citocromo-c, SMAC/DIABLO, AIF, EndoG e OMI/HTRA2) e a clivagem de caspases e seus substratos-alvo (TAYLOR; CULLEN; MARTIN, 2008).

Existem duas principais vias de execução da apoptose, a via extrínseca, que opera a partir dos receptores de morte presentes na superfície celular, e a via intrínseca, controlada por membros da família Bcl-2, que se inicia por meio de estímulos que não envolvem receptores (danos ao DNA, privação de fatores de crescimento, calor, hipóxia, exposição a drogas citotóxicas, radiação ou estresse oxidativo, entre outros). Essas duas vias convergem para a ativação de enzimas conhecidas como caspases (*Cysteine Aspartate Proteases*) (Fig. 6) (JIN; EL-DEIRY, 2005).

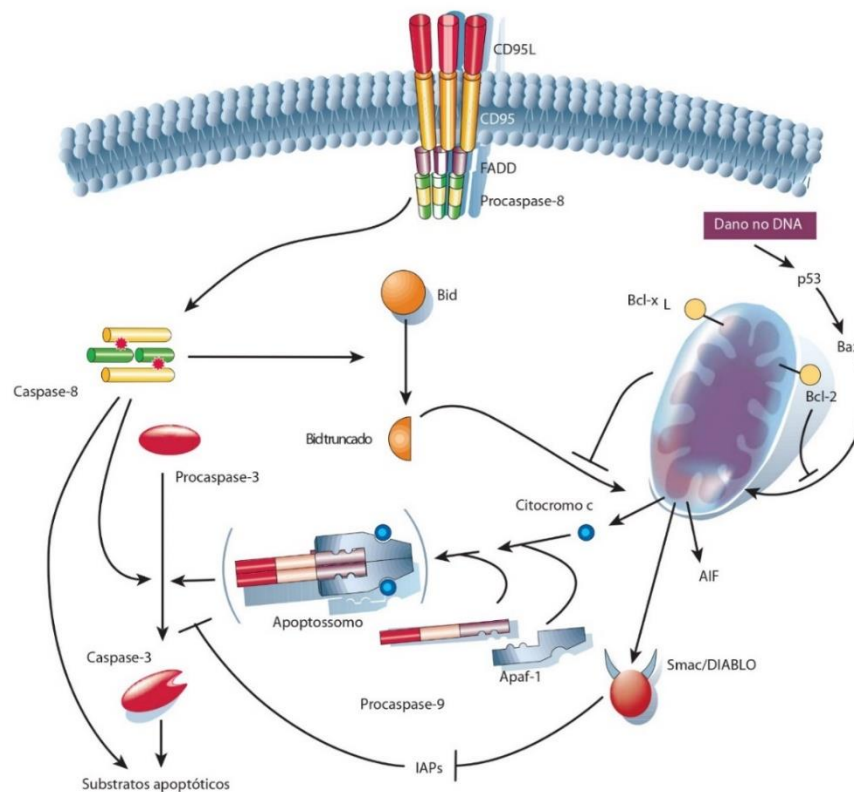


Figura 6 – Via extrínseca e via intrínseca da apoptose.

**Fonte:** Modificado de HENGARTNER (2000).

As caspases estão presentes nas células saudáveis sob a forma de zimógenos, conhecidos como procaspases. A ativação dessas proenzimas requer a clivagem dos resíduos de ácido aspártico por outras caspases ou por auto ativação. Quando ativadas, essas enzimas clivam e ativam outras procaspases e seus substratos intracelulares. Com isso, essa cascata proteolítica amplifica os sinais de morte e resultam, por fim, na eliminação completa da célula (HENGARTNER, 2000). As caspases apoptóticas são divididas em dois principais grupos:

- Caspases iniciadoras (2, 8, 9 e 10): as quais ativam as caspases efetoras;
- Caspases efetoras (3, 6 e 7): degradam diretamente vários substratos incluindo proteínas regulatórias e estruturais no núcleo, citoplasma e citoesqueleto, levando à execução da morte celular por apoptose. A revisão de Luthi e Martin (2007) traz uma lista com os principais substratos das caspases.

A via intrínseca ou via mitocondrial de sinalização se inicia na mitocôndria. Estímulos intracelulares, como por exemplo danos ao DNA, aumentam a permeabilidade da membrana mitocondrial e levam ao extravasamento de proteínas pró-apoptóticas, tais como citocromo-c,

SMAC/DIABLO, AIF, EndoG e OMI/HTRA2, do espaço intermembrana da mitocôndria para o citosol (RIEDL; SHI, 2004). O citocromo-c liberado para o citosol irá se ligar à proteína citosólica Apaf-1, formando um complexo chamado apoptossomo. Esse complexo é responsável por promover a clivagem e ativação da procaspase-9. Uma vez ativada, a caspase-9 será responsável pela clivagem e ativação das caspases efetoras 3 e 7 (Fig. 6) (HUERTA et al., 2007)

As proteínas da família Bcl-2 estão relacionadas à regulação da via intrínseca da apoptose. As proteínas dessa família são divididas em três subfamílias de acordo com o número de domínios de homologia à proteína Bcl-2 (BH, Bcl-2 *homology*) e com funções antiapoptótica ou pró-apoptótica na célula (Fig. 7) (HENGARTNER, 2000; ADAMS; CORY, 2007):

- Quatro domínios de homologia (BH1, BH2, BH3 e BH4): Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 e Bcl-B são proteínas antiapoptóticas e que, portanto, protegem a célula da apoptose;
- Três domínios de homologia (BH1, BH2 e BH3): Bax, Bak e Bok são proteínas pró-apoptóticas e que, portanto, promovem a apoptose
- Um domínio de homologia (BH3): Bik, Bad, Bid, Bim, Bmf, Hrk, Noxa (PMAIP1, *phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) e Puma são proteínas pró-apoptóticas que desencadeiam ou sensibilizam as células para a apoptose.

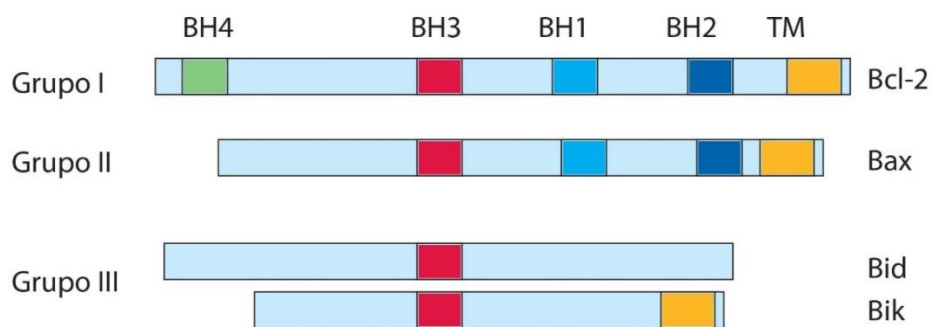


Figura 7 – A família Bcl-2, a qual inclui as proteínas Bcl-2, Bax, Bid e Bik, é dividida em três grupos de acordo com o número de domínios de homologia (BH1, BH3, BH1, BH2 e TM) à proteína Bcl-2 (Grupo I, Grupo II e Grupo III).

**Fonte:** Modificado de HENGARTNER (2000)

Essas proteínas controlam a permeabilidade mitocondrial e, por isso, têm grande importância na decisão da célula em iniciar ou abortar o processo de apoptose. A resposta celular irá depender da estequiometria e da interação entre as proteínas anti e pró-apoptóticas

(WILLIS et al., 2003). A superexpressão de membros anti-apoptóticos da família Bcl-2 são comuns nos cânceres humanos e a inibição dessas proteínas é alvo de estudo na busca por novos agentes anticâncer (STOREY, 2008).

A ativação das caspases também pode se iniciar a partir dos receptores de morte da superfície celular, conhecida como via extrínseca ou via dos receptores de morte. O estímulo dos membros da família de receptores de morte TNF, como o CD95 (APO-1/Fas), *TNF receptor 1* (TNFR1), *TNF-related apoptosis-inducing ligand-receptor 1* (TRAIL-R1), TRAIL-R2, entre outros, levam à ativação da caspase iniciadora da via extrínseca, caspase-8. Essa caspase iniciadora, por sua vez, será responsável pela clivagem e ativação das caspases efetoras 3 e 7. A regulação negativa ou a ausência da expressão dos receptores de morte é um mecanismo de resistência de alguns tipos de tumores à apoptose (Fig. 6) (FULDA; DEBATIN, 2006).

### **2.3 Produtos naturais com potencial anticâncer**

As principais estratégias terapêuticas em câncer são cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Para tumores localizados a cirurgia e a radioterapia são as melhores opções terapêuticas. A quimioterapia, por sua vez, pode ter propósito curativo, para tumores quimiossensíveis, como neoadjuvante, adjuvante ou paliativa. A terapia adjuvante melhora significativamente as chances de cura do paciente, pois reduz os riscos de recorrência da doença após os tratamentos de cirurgia ou radioterapia. O tratamento neoadjuvante é utilizado antes da cirurgia para tratar micrometástases e reduzir o tamanho de tumores sensíveis, a fim de se preservar o órgão durante a ressecção cirúrgica. Já para os casos onde não há chances de cura, como em casos de tumores sólidos metastáticos, a quimioterapia é utilizada de forma paliativa, a fim de aliviar os sintomas e prolongar a sobrevivência do paciente.

Nos últimos 100 anos, desde a descoberta da atividade anticâncer do gás mostarda durante a Segunda Guerra Mundial, houve grande avanço no desenvolvimento de agentes quimioterápicos e, conseqüentemente, grande redução na mortalidade causada por vários tipos de câncer. A partir do início do século, surgiram novas possibilidades de tratamentos, tais como os alcaloides da vinca, os esquemas de tratamentos combinados por ciclos, entre outros. A terapia anti-hormônios, por sua vez, foi um “divisor de águas” no tratamento quimioterápico, trazendo a possibilidade do tratamento de tumores dependentes de hormônio de forma específica e mais seletiva. A terapêutica imunológica, baseada em ativadores de linfócitos T, interleucina 2, e interferon alfa, passou a ser administrada paliativamente aos pacientes com melanoma. Além disso, também surgiram as terapias baseadas em anticorpos monoclonais. A

terapêutica alvo-específica passou a ser utilizada para tumores com translocação em genes que codificam para proteínas com atividade tirosina quinase, tais como a leucemia mieloide crônica (LMC) e o tumor estromal gastrointestinal (GIST) (DEVITA; CHU, 2008).

Embora todo avanço obtido neste século, as taxas de mortalidade causadas por neoplasias malignas continuam bastante elevadas. Além disso, grande parte dos tratamentos utilizados hoje para a terapêutica do câncer possuem uma baixa eficiência, alta taxa de resistência e recorrência do tumor. Assim, há grande necessidade do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos alvo-específicos, que não somente aumentem as taxas de sobrevida, mas reduzam os efeitos colaterais e sejam mais seletivos e efetivos às células tumorais.

A maior parte das drogas terapêuticas com atividade anticâncer são derivadas de produtos naturais ou baseadas em moléculas naturais (Fig. 8). Dentre as drogas derivadas de produtos naturais utilizadas na clínica pode-se citar os alcalóides da vinca, vinblastina e vincristina, isoladas de *Catharanthus roseus*, juntamente com o etoposídeo e o tenoposídeo, os quais são derivados semisintéticos do produto natural epipodofilotoxina (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Nos últimos anos, uma das mais importantes drogas derivadas de plantas, o Paclitaxel (Taxol®), foi descoberta. Sua utilização foi aprovada para uso clínico contra o câncer de ovário em 1992 e contra o câncer de mama em 1994. Outros agentes quimioterapêuticos derivados de plantas recentemente descobertos foram o topotecan, irinotecan e belotecan, todos eles derivados semissintéticos da camptotecina, isolada de *Camptotheca acuminata* (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Também é importante ressaltar a importância dos produtos anticâncer derivados de organismos marinhos, tais como o alcaloide exteinascidin 743 isolado de *Ecteinascidia turbinatae* e a briostatina 1, isolada do briozoário *Bugula neritina* (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Os microrganismos também são um grupo importante na descoberta de novas drogas com potencial anticâncer. Alguns antibióticos estão entre os mais importantes agentes quimioterápicos, os quais incluem as antraciclina, a bleomicina, mitomicina, doxorubicina, entre outros (CRAGG; NEWMAN, 2013).

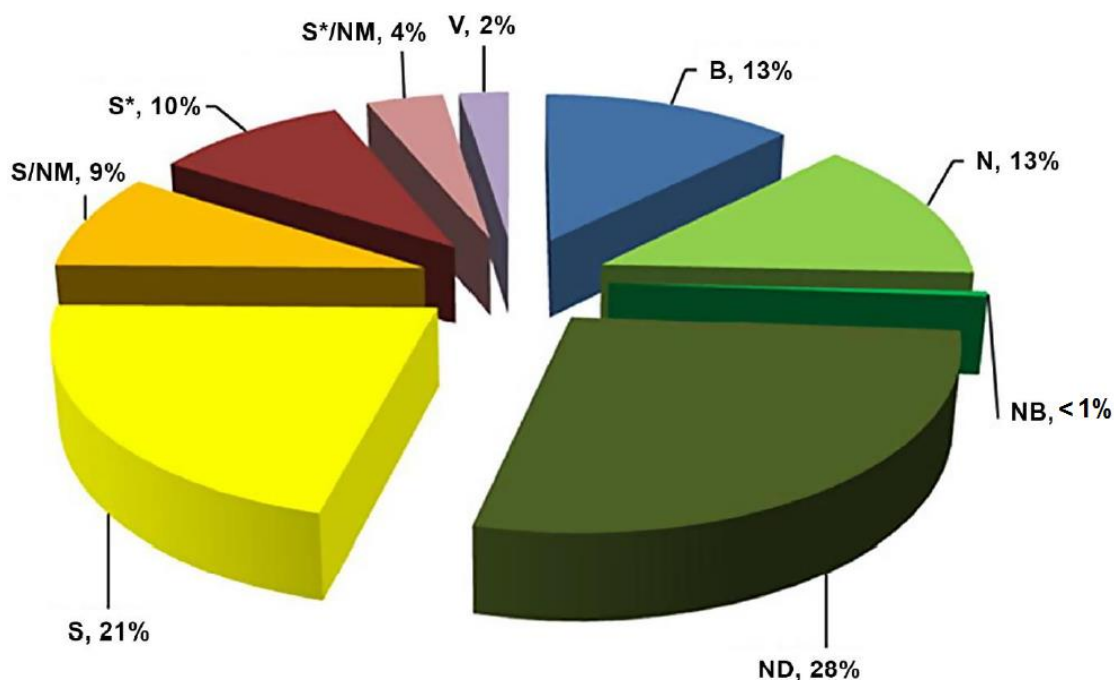


Figura 8 - Fontes das drogas anticâncer descobertas entre 1940-2010.

“B” Produto biológico: normalmente um peptídeo ou proteína isolado de um organismo/linhagem celular ou produzido por biotecnologia. “N” Produto natural. “NB” Produto natural botânico. “ND” Derivado de um produto natural e com modificação semi sintética. “S” Droga totalmente sintética, frequentemente encontrada a partir de triagem/modificação de um agente existente. “S\*” Droga sintética, mas o farmacóforo é derivado ou baseado em um produto natural. “V” Vacina.

**Fonte:** Modificado de NEWMAN; CRAGG (2012).

## 2.4 Goniotalamina

Vários compostos naturais com potentes efeitos citotóxicos têm sido utilizados como fármacos antineoplásicos. Uma molécula obtida a partir de fonte natural com potente atividade antiproliferativa é a goniotalamina. Alguns autores relatam seletividade para células tumorais em seu mecanismo de ação, o que é de grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer. Em sua forma natural essa molécula apresenta configuração absoluta R (*Rectus*) e, recentemente, seu enantiômero sintético S (*Sinister*) foi sintetizado (Figura 9).

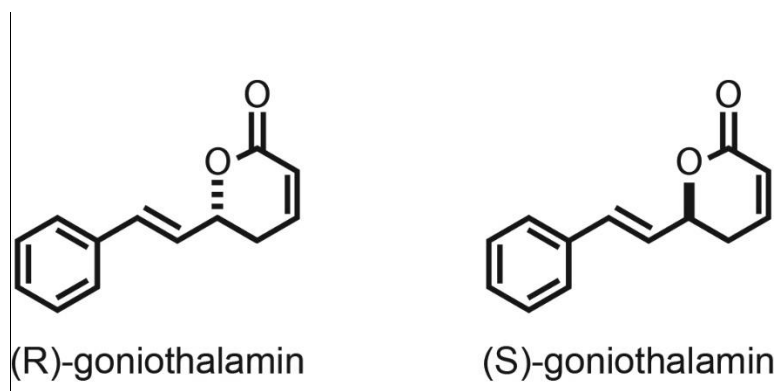


Figura 9 - Estrutura química da (R)-goniothalamina e (S)-goniothalamina.

#### 2.4.1 Histórico, características e estrutura química

A goniotalamina (GNT) é uma estiril lactona encontrada em membros da família Annonacea, em plantas do gênero *Goniothalamus* sp. Essa molécula foi isolada em 1967 pela primeira vez a partir da casca de *Cryptocarya caloneura* (HLUBUCEK; ROBERTSON, 1967). Em 1972, relatou-se que essa molécula estava presente como um constituinte da casca de *G. andersonii*, *G. macrophyllus* e *G. malayanus* (JEWERS et al., 1972). Além da GNT, outras estiril lactonas podem ser encontradas nas espécies de *Goniothalamus* sp., tais como a altolactona e a cardiopetalolactona (WIART, 2007).

Inicialmente, a goniotalamina foi caracterizada como uma molécula de configuração estereoquímica S (*Sinister*). Entretanto, sua estereoquímica foi revisada e a configuração R (*Rectus*) foi aceita como a configuração absoluta dessa molécula em sua forma natural (HARSH; O'DOHERTY, 2009).

Algumas moléculas naturais bioativas, tais como a fostriecina (LEWY et al., 2002), kazusamicina A (ANDO et al., 2006) e a goniotalamina possuem  $\delta$ -Lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas em sua estrutura química. Estudos demonstram que moléculas com o anel  $\delta$ -Lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas atuam como inibidores de proteínas fosfatases (LEWY et al., 2002; BUCK et al., 2003; GHATGE et al., 2006; THEOBALD et al., 2013), possuem atividade antibacteriana (MOSADDIK; HAQUE, 2003), antifúngica (MARTINS et al., 2009), imunossupressora (LEE, S. M. et al., 2011) e anticâncer (LEWY et al., 2002; DE FATIMA et al., 2005; 2008). Acredita-se que essa estrutura desempenhe um papel essencial para as atividades biológicas apresentadas por essas moléculas devido ao seu potencial em agir como um aceptor de Michael na presença de grupos protéicos funcionais (BOUCARD; GARANCE; CAMPAGNE, 2007; BARCELOS et al., 2014b). Modificações estruturais realizadas na molécula de goniotalamina mostraram que

a atividade biológica depende da existência do aceptor de Michael em sua estrutura (KASAPLAR; ÇAKMAK; ÇAGIR, 2010).

As plantas medicinais podem ser utilizadas como agente terapêutico direto ou como ponto de partida para a elaboração de produtos semissintéticos ou sintéticos, a fim de se minimizar os efeitos colaterais resultantes e também com o objetivo de se melhorar a eficácia terapêutica. Diversas alterações na estrutura química da goniotalamina foram realizadas na última década, algumas delas mais potentes, outras similares ou com atividade antitumoral menor do que a molécula natural (ZHOU et al., 2005; HARIKUMAR et al., 2008; HARSH; O'DOHERTY, 2009; KASAPLAR; YILMAZER; ÇAGIR, 2009; MARQUISSOLO et al., 2009; DUMITRESCU et al., 2010; KASAPLAR; ÇAKMAK; ÇAGIR, 2010; MOHIDEEN et al., 2013; BARCELOS et al., 2014a).

A (S)-goniotalamina (S-GNT) (FATIMA et al., 2006) é o enantiômero da (R)-goniotalamina (R-GNT) e seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido. Mesmo apresentando as mesmas propriedades químicas e físicas, as atividades biológicas exercidas por essas moléculas podem ser divergentes, já que a interação dos enantiômeros com os receptores biológicos se dá de forma específica (TUCKER, 2000).

#### **2.4.2 Principais propriedades bioativas**

Dentre as principais propriedades bioativas da (R)-goniotalamina estão as atividades antibacteriana (MOSADDIK; HAQUE, 2003), antifúngica (MARTINS et al., 2009), larvicida (SENTHIL-NATHAN et al., 2008), tripanocida (DE FATIMA et al., 2006) e antimalária (MOHD RIDZUAN et al., 2006).

##### **a) Atividade antibacteriana e antifúngica**

Em 2003, Mosaddik e Haque demonstraram que a goniotalamina exerce atividade antibacteriana contra uma ampla gama de bactérias gram positivas e gram negativas e também uma significativa atividade antifúngica contra *Candida albicans*, *Tinea pedis* e *Tinea corporis*. A concentração mínima inibitória contra *Bacillus cereus* e *Shigella shiga* foi de 64 µg/mL. A atividade antifúngica da goniotalamina foi correlacionada à presença do anel lactônico em sua estrutura química, o qual é frequentemente associado a uma boa atividade antifúngica.

A atividade antifúngica da goniotalamina foi relatada contra 11 cepas de fungos patogênicos para humanos. Além disso, nesse mesmo trabalho os autores viram efeitos tóxicos

mínimos para células normais de mamíferos (DE FATIMA, A et al., 2008). A goniotalamina também apresenta atividade antifúngica contra seis espécies de *Candida* sp. com uma concentração mínima inibitória menor ou igual a 128 µg/mL. Além disso, a GNT também foi duas vezes mais potente do que o antifúngico de referência Fluconazol em inibir a formação de biofilme por *C. albicans* e demonstrou a mesma eficiência de inibição que o Fluconazol para *C. dubliniensis* (MARTINS et al., 2009).

#### **b) Atividade Larvicida**

A atividade larvicida da goniotalamina foi detectada contra a lagarta *Spodoptera exigua* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae), uma praga para a lavoura que age como hospedeiro de diversas plantas, vegetais e demais culturas ao redor do mundo. A infestação por essas larvas é de difícil controle com inseticidas. Quando tratadas com goniotalamina, a mortalidade dessas larvas aumentou de modo dose-dependente, elas ganharam menos peso até a fase de pupa, a duração do período larval foi afetada, a metamorfose foi adiada e ocorreram danos no intestino das larvas (SENTHIL-NATHAN et al., 2008).

#### **c) Atividade tripanocida**

Outra importante atividade biológica da goniotalamina é sua atividade tripanocida. No trabalho de de Fátima et al. (2006), as atividades da goniotalamina e de seus análogos foram avaliadas *in vitro* e se detectou atividade tripanocida contra a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*, o agente causal da Doença de Chagas.

#### **d) Atividade antimalária**

A malária é uma doença endêmica causada, principalmente, pelo parasita *Plasmodium falciparum*. Em 2006, Mohd Ridzuan et al., relataram uma atividade antimalária da goniotalamina em combinação com a Cloroquina, droga padrão utilizada no tratamento da malária. A combinação de 1 mg/kg de Cloroquina com 30 ou 60 mg/kg de goniotalamina reduziu a parasitemia de ratos infectados com *P. yoelii* em 90% e prolongou a sobrevivência dos animais tratados.

### 2.4.3 Goniotalamina como agente antiproliferativo e antitumoral

Dentre todas as propriedades bioativas descritas, destaca-se a capacidade antiproliferativa da goniotalamina contra diversas linhagens tumorais (INAYAT-HUSSAIN et al., 2003; CHEN et al., 2005; DE FATIMA et al., 2005; RAJAB et al., 2005; WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005; TIAN et al., 2006; DE FATIMA, A. et al., 2008; INAYAT-HUSSAIN et al., 2009). Alguns autores sugerem uma possível seletividade da goniotalamina contra linhagens tumorais, com pouca atividade contra células normais, o que tem despertado grande interesse por essa molécula nas últimas duas décadas (PIHIE; STANSLAS; DIN, 1998; WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005; TIAN et al., 2006; ORLIKOVA et al., 2013).

#### a) Atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa seletiva da goniotalamina foi identificada pela primeira vez no trabalho de Pihie, Stanslas e Din (1998) através da técnica de coloração por Azul de metileno. A GNT demonstrou forte atividade antiproliferativa contra a linhagem MCF-7 na concentração de  $6,30 \times 10^{-7}$  M. Nessa mesma concentração, entretanto, não houve inibição na proliferação das células normais de fígado humano, CCL 13, e das células normais de rim bovino, MDBK.

No trabalho de Wattanapiromsakul et al. (2005) esta citotoxicidade seletiva foi demonstrada através do Ensaio da sulforodamina B (SRB). Nas linhagens celulares tumorais os valores de IC<sub>50</sub> foram menores do que para as linhagens celulares normais, as quais apresentaram uma citotoxicidade moderada após a exposição à GNT. O valor de IC<sub>50</sub> para as células de câncer de cólon (LS174T) foi de  $0,51 \pm 0,02$  µg/ml; para células de câncer de mama (MCF-7), de  $0,95 \pm 0,02$  µg/ml; e para células de câncer de pulmão (COR-L23), de  $3,51 \pm 0,03$  µg/ml. Já para linhagens normais, o valor de IC<sub>50</sub> para fibroblastos de pele de camundongo (ST3) foi de  $26,73 \pm 1,92$  µg/ml e para os fibroblastos humanos (HF), de  $11,99 \pm 0,15$  µg/ml.

Tian et al. (2006) investigaram os efeitos da goniotalamina e de mais duas estirilactonas em duas linhagens de hepatócitos, HepG2, *drug resistant* HepG2 (HepG2R) e em cultura primária de hepatócitos normais de camundongo. No ensaio do MTT, observou-se uma redução drástica na proliferação celular de modo concentração-dependente com valores de IC<sub>50</sub> de 8,83 µM para HepG2, 8 µM para HepG2R e de 23,33 µM para a linhagem normal de hepatócito de camundongo, o que sugere uma citotoxicidade mais significativa contra as células

cancerosas.

Os efeitos citotóxicos da GNT sob as linhagens de leucemia mieloide crônica K562 e de leucemia aguda Jurkat T, e também sob células mononucleares de sangue periférico (PBMC) foram investigados. As células K562 tiveram redução de 70% da viabilidade celular quando expostas à concentração de 20  $\mu\text{M}$  de GNT e as células Jurkat T, de 50%. Já para as células saudáveis, a GNT não apresentou efeito citotóxico (ORLIKOVA et al., 2013).

A partir do trabalho de Pihie, Stanslas e Din (1998), diversos trabalhos a respeito da goniotalamina se desenvolveram e, hoje, se sabe que essa molécula apresenta atividade antiproliferativa contra inúmeras linhagens celulares tumorais derivadas de vários órgãos (Quadro 1), tais como mama (CHEN et al., 2005; DE FATIMA et al., 2005; WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005; TIAN et al., 2006); fígado (TIAN et al., 2006); leucemia (INAYAT-HUSSAIN et al., 2003; RAJAB et al., 2005; INAYAT-HUSSAIN et al., 2009); cólon (DE FATIMA et al., 2005; WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005); pulmão (DE FATIMA et al., 2005; WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005; SEMPREBON et al., 2014); rim (DE FATIMA et al., 2005; DE FATIMA, A. et al., 2008); ovário e próstata (DE FATIMA et al., 2005); útero (ALABSI et al., 2012); pâncreas (BARCELOS et al., 2014b); e bexiga urinária (YEN, C. Y. et al., 2012).

Quadro 1 - Valores de IC50 (Concentração inibitória para 50% de células) da goniotalamina.

Linhagem celular	Tempo de tratamento	IC50	Referência
<b>Mama</b>			
MDA-MB-231	72 h	1,46 $\mu\text{M}$	(CHEN et al., 2005)
MCF-7	48 h	10,5 $\mu\text{M}$	(DE FATIMA et al., 2005; FATIMA et al., 2006)
MCF-7	72 h	4,75 $\mu\text{M}$	(WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005)
MCF-7	72 h	32,9 $\mu\text{M}$	(ALABSI et al., 2012)
<b>Fígado</b>			
HepG2	48 h	8,83 $\mu\text{M}$	(TIAN et al., 2006)
HepG2-R	48 h	8 $\mu\text{M}$	(TIAN et al., 2006)
Hepatócito	48 h	23,33 $\mu\text{M}$	(TIAN et al., 2006)
HepG2	72 h	4,6 $\mu\text{M}$	(AL-QUBAISI et al., 2011)
Liver Chang	72 h	35 $\mu\text{M}$	(AL-QUBAISI et al., 2011)
<b>Leucemia</b>			
Jurkat	24 h	21 $\mu\text{M}$	(INAYAT-HUSSAIN et al., 1999; INAYAT-HUSSAIN et al., 2009)
Jurkat (RACK-1)	24 h	33 $\mu\text{M}$	(INAYAT-HUSSAIN et al., 2009)
HL-60	24 h	22,47 $\mu\text{M}$	(RAJAB et al., 2005)
CEM-SS	24 h	12 $\mu\text{M}$	(RAJAB et al., 2005)

HL-60	24 h	5,67 $\mu$ M	(PETSOPHONSAKUL; POMPIMON; BANJERDPONGCHAI, 2013)
U937	24 h	11,5 $\mu$ M	(PETSOPHONSAKUL; POMPIMON; BANJERDPONGCHAI, 2013)
<b>Timo</b>			
W7.2	24 h	12 $\mu$ M	(INAYAT-HUSSAIN et al., 2009)
W7.2 (RACK-1)	24 h	16 $\mu$ M	(INAYAT-HUSSAIN et al., 2009)
<b>Cólon</b>			
HT-29	48 h	11,2 $\mu$ M	(DE FATIMA et al., 2005; FATIMA et al., 2006)
LS-174T	72 h	2,57 $\mu$ M	(WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005)
HT-29	72 h	19 $\mu$ M	(ALABSI et al., 2012)
<b>Pulmão</b>			
NCI-H460	48 h	6,4 $\mu$ M	(DE FATIMA et al., 2005; FATIMA et al., 2006)
COR-L23	72 h	17,55 $\mu$ M	(WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005)
<b>Rim</b>			
786-O	48 h	6,4 $\mu$ M	(DE FATIMA. et al., 2008)
<b>Ovário</b>			
OVCAR03	48 h	39 $\mu$ M	(DE FATIMA et al., 2005; FATIMA et al., 2006)
<b>Próstata</b>			
PCO.3	48 h	>100 $\mu$ M	(DE FATIMA et al., 2005; FATIMA et al., 2006)
<b>Útero</b>			
Hela	72 h	16 $\mu$ M	(ALABSI et al., 2012)
<b>Fibroblastos</b>			
ST3	72 h	133,63 $\mu$ M	(WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005)
HF	72 h	59,95 $\mu$ M	(WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005)
3T3	72 h	>50 $\mu$ M	(ALABSI et al., 2012)
<b>Pâncreas</b>			
Panc-1	24 h	65 $\mu$ M	(BARCELOS et al., 2014a)
<b>Bexiga</b>			
RT4	24, 48 e 72 h	61, 38 e 31 $\mu$ M	(YEN, H. K. et al., 2014)

## b) Atividade antitumoral

Os tumores têm sido reconhecidos como órgãos devido à sua complexidade. A biologia do tumor é influenciada pelo microambiente que o cerca e por diversos tipos celulares que contribuem para o desenvolvimento e manutenção tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Sendo assim, estudos *in vivo* são essenciais para a compreensão do mecanismo de ação de novas drogas anticâncer. Embora diversos trabalhos tenham relatado a potente atividade antiproliferativa da goniotalamina contra inúmeras linhagens tumorais *in vitro*, pouco se sabe sobre a atividade antitumoral dessa molécula *in vivo*.

A atividade antitumoral do racemato de Goniotalamina (R-GNT e S-GNT) foi avaliada em tumor sólido de Ehrlich. As doses de 30, 100 e 300 mg/Kg do racemato inibiram em  $48.5 \pm 9.4\%$ ,  $40.9 \pm 9.5\%$ , e  $66.7 \pm 15.9\%$ , respectivamente, o crescimento tumoral em relação ao grupo controle. Os autores também avaliaram a atividade antitumoral de cada um dos enantiômeros e observou-se que a inibição máxima do crescimento tumoral foi de  $53,7 \pm 20,9\%$  no 10º dia após a administração da 3ª dose no grupo tratado com o enantiômero sintético (S-GNT) e de  $37.4 \pm 10.8\%$  no grupo tratado com o enantiômero natural (R-GNT). Não houve evidências de toxicidade ou perda de peso para os grupos tratados com o racemato ou com as formas R-GNT e S-GNT enquanto os animais foram observados. Já o grupo tratado com a Doxorubicina (3 mg/kg) exibiu perda de peso ao final do experimento (VENDRAMINI-COSTA et al., 2010).

#### **2.4.4 Mecanismos moleculares da Goniotalamina**

##### **a) Ciclo celular**

O efeito antiproliferativo após tratamento com goniotalamina tem sido atribuído à parada na fase G0/G1 (BARCELOS et al., 2014b), G2/M (TIAN et al., 2006) e na fase S (ALABSI et al., 2012) do ciclo celular.

A ciclina D1 é importante na transição da fase G1 para fase S do ciclo celular. O complexo ciclina D1-CDK4/CDK6 age fosforilando e, conseqüentemente, inativando a proteína Rb, que é uma proteína inibidora da progressão do ciclo celular para a fase S. Quando a proteína Rb está desfosforilada, ela se liga à proteína E2F e bloqueia a transcrição dos genes da fase S (MASSAGUE, 2004). A exposição das células PANC-1 à GNT por 24 h levou à redução nos níveis de ciclina D1 e da fosforilação da proteína Rb, o que sugere que tenha ocorrido bloqueio das células na fase G0/G1 do ciclo celular (BARCELOS et al., 2014b).

O tratamento das células Hela com GNT causou um aumento na população de células na fase S do ciclo celular de modo tempo-dependente com concomitante redução da população de células na fase G1. Nesse estudo, os autores também relataram um aumento da população de células em sub-G1 (ALABSI et al., 2012).

A exposição das células de HepG2 e HepG2-R à GNT (15  $\mu$ M) por 24 h causou parada das células na fase G2/M do ciclo celular e também um aumento da população sub-G1 (TIAN et al., 2006). O tratamento das células MDA-MB-231 com GNT (30  $\mu$ M) também levou à parada do ciclo celular na fase G2/M com concomitante redução de G1. Além disso, as células

MDA-MB-231 foram mais suscetíveis à apoptose induzida pela GNT na fase G2/M. Esses autores também relataram que o tratamento com a GNT levou à degradação de cdc25C e não causou alterações nos níveis de expressão de p21 (CHEN et al., 2005).

## **b) Indução de apoptose**

Falhas na via apoptótica representam um dos maiores obstáculos para o sucesso no tratamento do câncer. Logo, a modulação deste processo de morte celular é um dos principais mecanismos de interesse no desenvolvimento de novos compostos e estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer (REED, 2002). Vários relatos sugerem que a indução de apoptose seja o principal mecanismo pelo qual a GNT exerça seu potencial antiproliferativo (INAYAT-HUSSAIN et al., 1999; INAYAT-HUSSAIN et al., 2003; CHEN et al., 2005; CHAN et al., 2006; TIAN et al., 2006; AL-QUBAISI et al., 2011; CHIU et al., 2011; KUO et al., 2011; ALABSI et al., 2012; ALABSI et al., 2013; ORLIKOVA et al., 2013; PETSOPHONSAKUL; POMPIMON; BANJERDPONGCHAI, 2013; BARCELOS et al., 2014a; SEMPREBON et al., 2014; YEN, H. K. et al., 2014). Alguns estudos relatam que a apoptose induzida pela GNT ocorre através da via intrínseca da apoptose.

A exposição das células humanas promielocíticas HL-60 à GNT (50  $\mu$ M) levou à indução de morte celular por apoptose, como demonstrado pela análise da exposição de fosfatidilserina através de citometria de fluxo. A via intrínseca da apoptose foi ativada com perda de potencial de membrana mitocondrial, ativação da caspase iniciadora-9 e das caspases efetoras-3 e 7. O tratamento com o inibidor de caspases Z-VAD.FMK não levou à inibição completa da exposição de fosfatidilserina, sugerindo que a apoptose observada nas células HL-60 também pode ter ocorrido através de mecanismos independentes de caspase (INAYAT-HUSSAIN et al., 2003).

As células de câncer de mama humana MDA-MB-231 expostas à GNT tiveram um aumento da população sub-G1 e alterações morfológicas características da apoptose, como condensação da cromatina e fragmentação nuclear. Um aumento tempo-dependente de citocromo c no citosol e um efluxo mitocondrial dessa proteína foi observado. O tratamento também levou à ativação da caspase efetora-3 e clivagem de *poly (ADP-ribose) polymerase* (PARP), uma enzima de reparo ao DNA que é substrato da caspase-3. O tratamento com o inibidor de caspases Z-VAD.FMK atenuou a indução de apoptose (CHEN et al., 2005).

De Fátima et al. (2008), relataram uma redução nos níveis de expressão do receptor de morte da superfície celular TNFR1 após tratamento das células 786-O com S-GNT (IC50: 4

nM) e R-GNT (6.4  $\mu$ M). A exposição à R-GNT reduziu os níveis de expressão da proteína anti-apoptótica BCL-2 e levou a um aumento na clivagem de PARP (*Poly(ADP-ribose) polymerase*), sugerindo a apoptose tenha sido ativada.

A goniotalamina induziu apoptose em *coronary artery smooth muscle cells* (CASMCs) de modo concentração-dependente (10-100  $\mu$ M). A apoptose foi inibida após o tratamento com o inibidor de caspases z-VAD-FMK, sugerindo a participação das caspases no processo de indução de apoptose. Assim, após o tratamento com GNT houve um aumento na atividade das caspases-2, 3 e 9 sem ativação da caspase-8, a qual caracteristicamente é ativada pela via dos receptores de morte (via extrínseca) da apoptose (CHAN et al., 2010).

A GNT induziu apoptose de modo dose-dependente (10, 20 e 40  $\mu$ M) nas células derivadas de carcinoma hepatocelular Hep-3B (negativa para TP53) e Sk-Hep1 (positiva para TP53). Nas células SK-Hep1, o tratamento com GNT induziu a clivagem das proteínas CASP8, CASP9, CASP3 e PARP. Já nas células Hep-3B, houve somente a clivagem de CASP8 e CASP3. O tratamento com o inibidor de caspases z-VAD-FMK reduziu a porcentagem de células em apoptose. Em ambas as linhagens se observou alterações no potencial de membrana mitocondrial e extravasamento mitocondrial de citocromo c para o citosol, confirmando a participação da via intrínseca na apoptose induzida pela GNT. A GNT também induziu regulação positiva nos níveis transcricionais e das proteínas TP53 e PMAIP1 (*Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1*) nas células SK-Hep1 e de PMAIP1 na linhagem Hep-3B. O *knockdown* do gene *TP53* nas células SK-Hep1 causou regulação negativa dos níveis de RNAm de *TP53* e de *PMAIP1* (KUO et al., 2011).

O tratamento das células HL-60 e U937 com as concentrações do IC10, IC20 e IC50 de GNT levou a um aumento dose-dependente da população sub-G1 e da exposição de fosfatidilserina por ambas as linhagens celulares. A via intrínseca da apoptose foi ativada, com redução no potencial de membrana mitocondrial, aumento da expressão de Smac/Diablo e ativação da caspase iniciadora-9. Nesse estudo, se observou a ativação da caspase iniciadora-8, sugerindo que a via extrínseca também participe da apoptose induzida pela GNT (PETSOPHONSAKUL; POMPIMON; BANJERDPONGCHAI, 2013).

A goniotalamina induziu alterações morfológicas típicas da apoptose, tais como condensação da cromatina e fragmentação nuclear, aumento da população sub-G1 e exposição de fosfatidilserina nas células de câncer de cérvix uterino Hela. Também houve aumento dos níveis de caspase-9, sem alteração nos níveis das caspases-3, 7 e 8 (ALABSI et al., 2013).

As células de câncer de pâncreas PANC-1 expostas à GNT (IC50: 65  $\mu$ M) exibiram morte celular por apoptose, como evidenciado pelo aumento na razão das proteínas Bax (pró-

apoptótica)/Bcl-2 (anti-apoptótica), pela redução nos níveis de procaspase-3 e pelo aumento da clivagem de PARP (BARCELOS et al., 2014b).

A família IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) constitui uma classe de proteínas regulatórias que desempenham alguns papéis importantes na célula como inibição da apoptose e promoção da progressão do ciclo celular (RUMBLE; DUCKETT, 2008). A S-GNT inibiu os níveis de expressão do gene *BIRC5*, que codifica para a proteína survivina, pertencente à família IAP (SEMPREBON et al., 2014).

### c) Autofagia

Em resposta a condições de estresse celular, níveis fisiológicos de autofagia promovem a sobrevivência celular. Trata-se de um processo de englobamento do citosol que ocorre de forma aleatória e indiscriminada. Alguns estágios principais levam à autofagia. Inicialmente, ocorre a formação do fagóforo, onde o complexo ULK/Atg1 ativa o complexo *class III phosphatidylinositol 3 kinase*, que recruta novas proteínas para formar uma membrana de isolamento. No próximo estágio, ocorre a conjugação das proteínas *Atg5-Atg12* e a conversão de LC3-I a sua forma *phosphatidylethanolamine-conjugated* (LC3-II). Então, a membrana do autofagossomo maduro se funde com um lisossomo para formar um autolisossomo a fim de degradar o material citoplasmático que está na vesícula (LEVINE; SINHA; KROEMER, 2008; GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010). Em 2008, de Fátima et al. relataram que a S-GNT (IC<sub>50</sub>: 4 nM) estimula o processamento de LC3-I em LC3-II, sugerindo a participação do processo de autofagia na inibição da proliferação celular das células de adenocarcinoma renal 786-O.

### d) Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é o estado no qual a oxidação excede os sistemas de defesas antioxidantes. Alguns átomos e moléculas possuem elétrons não-pareados e são chamados de radicais livres. Esses elétrons não-pareados tendem a formar pares com outros elétrons e, por isso, essas moléculas são altamente reativas. Alguns exemplos de espécies reativas de oxigênio (EROS) são o superóxido, peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila, óxido nítrico, entre outros. As EROS são capazes de causar danos às proteínas, DNA, RNA e lipídeos (YE et al., 2014).

A exposição das células SK-Hep1 (IC<sub>50</sub>: 10 µM) e Hep-3B à GNT (IC<sub>50</sub>: 25 µM) induziu a formação intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROS). O tratamento com

das células com NAC (N-acetyl-L-cysteine), um potente inibidor de EROS, reduziu a formação de EROS e aumentou o índice de danos ao DNA das células SK-Hep1 (KUO et al., 2011)

Inayat-Hussain et al. (2010) também sugeriram que a capacidade da GNT em induzir danos ao DNA se deve à ocorrência de estresse oxidativo. Neste trabalho, quando as células Jurkat T foram tratadas com 50  $\mu\text{M}$  de GNT por 2 horas, notou-se um aumento significativo na produção de EROS (espécies reativas de oxigênio) e perda de GSH. Depois disso, também se analisou os danos ao DNA através do Ensaio do Cometa, e consistente com a perda de GSH e aumento na produção de ROS, os resultados mostraram aumento significativo de danos ao material genético.

Chan et al. (2010) relataram um aumento nos níveis de peróxido, mas não de ânions superóxido nas células CAsMCs. Os autores sugerem que a GNT induz a redução no consumo de oxigênio pelas células, causa redução nos níveis de ATP com concomitante aumento nos níveis de peróxido. O nível de GSH reduzido diminuiu nas células expostas à GNT.

O tripeptídeo glutathiona (GSH,  $\gamma$ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) é o principal modulador do estado redox das células, que as protege do estresse oxidativo gerado por radicais livres (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003; MARÍ et al., 2009). O pré-tratamento com GSH exógena levou à redução da citotoxicidade da GNT (1-100  $\mu\text{M}$ ), mesmo em altas concentrações, contra as células PANC-1. Os autores também relataram um aumento nos níveis intracelulares de EROS após exposição à GNT (BARCELOS et al., 2014b).

Esse aumento nos níveis de EROS e redução nos níveis intracelulares do conteúdo intracelular de tiol livre também foi observado para as células MDA-MB-231. Nesse trabalho, o tratamento das células com NAC e com GSH reduziu a capacidade da GNT em induzir apoptose, sugerindo que a citotoxicidade se deve às suas propriedades pró-oxidantes (CHEN et al., 2005).

#### **e) Genotoxicidade**

Lesões ao DNA podem perturbar a integridade genômica e, por isso, moléculas com potencial genotóxico que causam danos extensos no DNA, não passíveis de reparo, induzem apoptose e, desse modo, bloqueiam o crescimento tumoral (RIEDL; SHI, 2004). Alguns autores atribuem o efeito citotóxico da goniotalamina à sua genotoxicidade (RAJAB et al., 2005; INAYAT-HUSSAIN et al., 2009; KUO et al., 2011; SEMPREBON et al., 2014),

A exposição das células de ovário CHO à GNT (10 e 5  $\mu\text{M}$ ) levou à indução de danos ao DNA. Os principais tipos de aberrações encontrados foram gaps em cromátides e em

cromossomos inteiros, quebras e trocas, endoreduplicação e anéis cromossômicos (UMAR-TSAFE et al., 2004).

Rajab et al. (2005) avaliaram a genotoxicidade da GNT, nas concentrações do IC10 e do IC25, para as linhagens de células leucêmicas HL-60 (IC50: 4,5 µg/mL) e CEM-SS (IC50: 2,4 µg/mL) através do Ensaio do cometa com duas horas de tratamento. Em ambos os tratamentos houve indução de genotoxicidade e a GNT foi mais citotóxica e genotóxica para a linhagem CEMSS do que para HL-60.

Em um estudo anterior do nosso grupo sobre a atividade da S-GNT sob as células câncer de pulmão NCI-H460, observou-se indução de danos ao DNA em todas as concentrações de testadas (2,5; 12,5 e 25 µM) de modo concentração-dependente (SEMPREBON et al., 2014).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar os mecanismos antiproliferativos da (R)-Goniotalamina e (S)-Goniotalamina nas linhagens mamárias de adenocarcinoma MCF-7 e epitélio não-tumoral HB4a.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o potencial antiproliferativo da (R)-goniotalamina e (S)-goniotalamina para as células MCF-7 e HB4a;
- Avaliar os efeitos da (R)-goniotalamina e (S)-goniotalamina na progressão do ciclo celular por citometria de fluxo;
- Investigar o potencial dessas moléculas em induzir morte celular por apoptose por meio da análise da exposição de fosfatidilserina (marcação com Anexina V) por citometria de fluxo;
- Avaliar o potencial da (R)-goniotalamina e (S)-goniotalamina em induzir danos ao material genético através do Ensaio do Cometa;
- Avaliar os níveis de expressão de genes envolvidos com o bloqueio da proliferação celular, indução de apoptose e genotoxicidade através do ensaio de RT-qPCR após a exposição das células HB4a e MCF-7 à (R)-goniotalamina.

**4 Manuscrito** - Antiproliferative activity of goniothalamine enantiomers involves DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis induction in MCF-7 and HB4a cells

**ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF GONIOTHALAMIN ENANTIOMERS  
INVOLVES DNA DAMAGE, CELL CYCLE ARREST AND APOPTOSIS  
INDUCTION IN MCF-7 AND HB4A CELLS**

**Simone Cristine Semprebon**<sup>1\*</sup>; Lilian Areal Marques<sup>1</sup>, Gláucia Fernanda Rocha D'Epiro<sup>1</sup>, Elaine Aparecida de Camargo<sup>2</sup>, Glenda Nicioli da Silva<sup>2</sup>, Andressa Megumi Niwa<sup>1</sup>, Fernando Macedo Junior<sup>3</sup>, Mário Sérgio Mantovani<sup>1</sup>

1. Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.
2. Departamento de Patologia, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho, Botucatu, SP, Brasil.
3. Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil

*\*Corresponding author:*

Departamento de Biologia Geral – CCB  
Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário  
P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brasil.  
CEP: 86051-990  
Tel: 55 43 3371-4977  
Fax: 55 43 3371-4207 21

*E-mail address:* [sc.semprebon@gmail.com](mailto:sc.semprebon@gmail.com) (S.C. Semprebon)

## Abstract

(R)-goniothalamin (R-GNT) is a styryl lactone that exhibits antiproliferative property against several tumor cell lines. (S)-goniothalamin (S-GNT) is the synthetic enantiomer of R-GNT, and their biological properties are poorly understood. The aim of this study was evaluate the antiproliferative mechanisms of (R)-goniothalamin and (S)-goniothalamin in MCF-7 breast cancer cells and HB4a epithelial mammary cells. To determine the mechanisms of cell growth inhibition, we analyzed the ability of R-GNT and S-GNT to induce DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis. Moreover, the gene expression of cell cycle components, including cyclin, CDKs and CKIs, as well as of genes involved in apoptosis and the DNA damage response were evaluated. The natural enantiomer R-GNT proved more effective in both cell lines than did the synthetic enantiomer S-GNT, inhibiting cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis induction, likely in response to DNA damage. The cell cycle inhibition caused by R-GNT was mediated through the upregulation of CIP/KIP cyclin-kinase inhibitors and through the downregulation of cyclins and CDKs. S-GNT, in turn, was able to cause G0/G1 cell cycle arrest and DNA damage in MCF-7 cells and apoptosis induction only in HB4a cells. Therefore, goniothalamin may represent a new therapeutic agent for the treatment of breast cancer.

*Keywords:* goniothalamin; genotoxicity; cyclins; CDKs; cell cycle arrest; apoptosis

**Highlights**

- R- and S-GNT exhibit antiproliferative activity in MCF-7 and HB4a cells.
- R-GNT proved most effective in both cell lines relative to S-GNT.
- Goniothalamine induces DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis.
- R-GNT induces the downregulation of cyclins and CDK genes and the upregulation of *CDKN1A*.

## 1. Introduction

Breast cancer is the second most common cancer among women worldwide. Although breast cancer exhibits good prognosis, mortality rates remain high. In developed countries, the average survival rate at 5 years is 85%, whereas the survival rate in developing countries is approximately 60% (WHO, 2012). Of all breast cancer patients, approximately 20-30% develop metastatic disease and exhibit an average survival between 2 and 4 years depending of the subtype of the disease (Eroles et al., 2012). Therefore, new therapeutic strategies with fewer side effects, greater selectivity and a more effective response are required.

Several natural compounds with potent cytotoxic effects have been used as anticancer drugs. One such molecule obtained from natural source with potent antiproliferative activity is goniiothalamine (GNT), a styryl lactone found in members of the family Annonaceae, in the *Goniiothalamus sp.* (Wiert, 2007). The *R* configuration (Right) is accepted as the absolute configuration of this molecule in its natural form. (*S*)-goniiothalamine is the synthetic form of this molecule (Fatima et al., 2006).

Among all of the bioactive properties of goniiothalamine that have been described, one of the most notable is its anti-proliferative activity against various tumor cell lines, including breast cancer (Alabsi et al., 2012; Chen et al., 2005; de Fatima et al., 2005; Wattanapiromsakul et al., 2005), liver cancer (Al-Qubaisi et al., 2011; Tian et al., 2006), leukemic cells (Inayat-Hussain et al., 1999; Inayat-Hussain et al., 2009; Petsophonsakul et al., 2013; Rajab et al., 2005), colon cancer (Alabsi et al., 2012; de Fatima et al., 2005; Wattanapiromsakul et al., 2005), lung cancer (de Fatima et al., 2005; Semprebon et al., 2014; Wattanapiromsakul et al., 2005); kidney cancer (de Fatima et al., 2008; Wattanapiromsakul et al., 2005), ovarian and prostate cancer (de Fatima et al., 2005). Furthermore, the synthetic enantiomer, (*S*)-goniiothalamine, also exhibits antiproliferative potential (de Fatima et al., 2008; Fatima et al., 2006; Semprebon et al., 2014), but its mechanism of action remains poorly understood. (*R*)-goniiothalamine (*R*-GNT) and (*S*)-goniiothalamine (*S*-GNT) reportedly exhibit antitumor activity in Ehrlich solid tumors without evidence of toxicity or weight loss in the experimental animals (Vendramini-Costa et al., 2010). Several reports suggest that induction of the intrinsic apoptosis pathway is the primary mechanism by which (*R*)-goniiothalamine exert its antiproliferative activity *in vitro* (Alabsi et al., 2013; Barcelos et al., 2014; Kuo et al., 2011; Petsophonsakul et al., 2013). However, little is known about its effects on the cell cycle.

The cell cycle machinery promotes the progression of the cell from a quiescent state (*G*<sub>0</sub>) to a proliferative state while ensuring genomic fidelity. The cyclin-dependent kinases

(CDKs) associate with cyclins to drive the progression of the cell through the cell cycle. CDKs 4, 6, 2 and 1 phosphorylate proteins responsible for cell cycle events. The cyclic changes in the activities of these complexes are regulated by cyclins (D, E, A and B). Mitogenic stimuli cause the accumulation of cyclin D1. The complex of this cyclin with CDK4/6 phosphorylates the Rb protein. Rb phosphorylation causes its dissociation of E2F, a transcriptional factor that regulates the expression of genes that encode components of subsequent cell cycle events, such as cyclins E, A and B1 and CDK1, among others. The next cyclin to be induced is cyclin E, which associates with CDK2 to promote the G1-S transition. The cyclin A/CDK2 complex is required for the entry and completion of S phase, and cyclin A associates with CDK1 promote entry into M phase. Mitosis, in turn, is regulated by the cyclin B/CDK1 complex (Malumbres and Barbacid, 2005).

Cyclin-kinase inhibitors (CKIs) can counteract CDK activity. The CIP/KIP family of CKIs includes p21, p27 and p57 (Romanov et al., 2012). *CDKN1A* is a transcriptional target of p53 that encodes the p21<sup>Kip1</sup> protein, a member of the CIP/KIP family of CKIs (Gartel and Tyner, 1999; Macleod et al., 1995). The protein encoded by this gene is involved in G1 and S checkpoint and inhibits cell cycle activity by directly interacting with cyclin E/CDK2, cyclin A/CDK2, PCNA and also with the transcriptional factors E2F, cMyc and STAT3 (Besson et al., 2008). p21 can also induce G2/M cell cycle arrest through transcriptional repression of *Emi1*, an inhibitor of the APC/C ubiquitin-ligase complex (Lee et al., 2009).

The malignant phenotype results from the manifestation of essential alterations in cell physiology that allow cancer cells survive, proliferate and spread, such as sustained proliferative signaling, evasion of growth suppressors and resistance of cell death, among others (Hanahan and Weinberg, 2011). Genetic alterations in regulators of CDKs such as cyclins and CKIs, or in its substrates such as the Rb protein are common in human cancer (Malumbres; Barbacid, 2005). Therefore, compounds with the ability to modulate the cell cycle machinery and induce cell cycle arrest and apoptosis can be good targets for cancer treatment. In this context, the aim of this study was evaluate the antiproliferative mechanisms of (R)-goniothalamin and (S)-goniothalamin in breast cancer MCF-7 cells and epithelial mammary HB4a cells, comparing their effects in tumoral and non-tumoral cells. To determine the mechanisms of cell growth inhibition, we analyzed the ability of R-GNT and S-GNT in induce DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis. Moreover, the gene expression of cell cycle components, such as cyclins, CDKs and CKIs, as well as genes involved in the DNA damage response (*GADD45a*) and apoptosis (*CASP8* and *CASP9*) were evaluated. Our study provides novel insight into the role of goniothalamin as a cell cycle regulator in breast cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals

(R)-goniothalamin (R-GNT) and (S)-goniothalamin (S-GNT) (Fig. 1) were synthesized in the Laboratório de Pesquisas de Moléculas Bioativas (LPMBA) of the Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL) in collaboration with the Prof. Dr. Ângelo de Fátima of Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), as previously described (Fatima et al., 2006). The test substance was solubilized in dimethylsulfoxide (DMSO) (Mallinckrodt Chemicals, USA) at a concentration of 20.000  $\mu\text{M}$  and stored at  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Upon use, the solution was diluted in culture medium at experimental concentrations. The composition of the GNT solutions was monitored through the study by high resolution  $^1\text{H}$  NMR (Bruker spectrometer, Model Avance III) which showed that the test compounds had been intact at above 97.5% purity. The DMSO concentration did not exceed 0.5% in culture. The control group received the amount of DMSO equivalent to the treated group. The chemotherapeutic agent doxorubicin (Zodiac, Brazil) was used at concentration of 1  $\mu\text{M}$  as a positive control.

### 2.2. Cell culture

The human breast adenocarcinoma MCF-7 cell line was obtained from Cell Bank of the Universidade Federal do Rio de Janeiro (BCRJ/UFRJ), and the normal mammary epithelial HB4a cell line was kindly provided by AC Camargo Hospital (SP). These cell lines were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®, Life Technologies, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco®) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco®) and maintained in a humidified incubator containing 5%  $\text{CO}_2$  at  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . The HB4a cell line was also supplemented with 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of insulin (Gibco®) and 5  $\text{mg}/\text{ml}$  of hydrocortisone. Under these conditions, the cell viability remained  $>90\%$ .

### 2.3. Cell viability assay

The cell viability assay was based on the conversion of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Invitrogen Life Technologies, USA) to formazan crystals by mitochondrial dehydrogenase in living cells, as described by Mosmann (1983) with

some modifications. Exponentially growing cells were seeded in 96-well plates at a density of  $5 \times 10^3$  cells/well in 100  $\mu\text{L}$  of culture medium. After 24 h of incubation, R-GNT and S-GNT (1, 10, 20, 30, 40, 50, 100 and 150  $\mu\text{M}$ ) were added and remained in culture for 24 h and 48 h. After exposure, the treatments were removed, and 100  $\mu\text{L}$  of MTT reagent (0.5 mg/ml) was added to each well and kept at  $37^\circ\text{C}$  for 4 h to form formazan crystals. The cell culture medium was aspirated, and 100  $\mu\text{L}$  of DMSO was added to dissolve the crystals. The absorbance was measured at 570 nm using a spectrophotometer (Thermo Plate). Assays were performed in four replicates and three experiments. Cell viability (CV) was expressed as a percentage of the negative control.

#### *2.4. Real-time cell growth kinetics xCELLigence*

The real-time growth kinetics of the cells was examined by an impedance-based Real-Time Cell Analysis (RTCA) system xCELLigence (Roche Diagnostic, Germany). This system monitors the cell biological status through impedance measurements. Alterations in cellular biological status, including the number of cells, cell viability, morphology and adhesion, changes the impedance values, which are expressed through the Cell Index (CI), as produced by xCELLigence. Changes in impedance are proportional to the number of cells in the well, the morphological changes and adhesion. Thus, larger cell numbers are reflected in greater impedance values (Xing et al., 2005). The RTCA station remained in a humidified incubator containing 5%  $\text{CO}_2$  at  $37^\circ\text{C}$ . Briefly, 50  $\mu\text{L}$  of medium was added to the 96-well E-plate, and background readings were recorded. The cells were seeded at a density of 6250 MCF-7 cells/well or 3125 HB4a cells/well, according to data obtained in the titration experiment. The E-plate containing the cells was incubated at room temperature for 30 min and thereafter placed in the RTCA station. After 24 h, when the cells were in a logarithmic growth phase, 100  $\mu\text{L}$  R-GNT and S-GNT (1, 10, 20, 30, 40, 50 and 100  $\mu\text{M}$ ) were added and kept in culture for 96 h. The impedance was monitored every 30 min for 96 h. The experiment was designed according to the manufacturer's recommendations and was performed in triplicate. The cell growth curves were normalized to the Cell Index (CI) at the last time point before treatment addition using the RTCA software (Roche Diagnostic, Germany).

### 2.5. Cell cycle analysis

Briefly, cells were seeded in 6-well plates at a density of  $10^5$  cells/well. After 24 h of incubation, R-GNT and S-GNT (10 and 50  $\mu$ M) were added. After 3 h and 24 h of exposure, cells were trypsinized, resuspended in DMEM and centrifuged for 5 min. The cell suspension was resuspended in 100  $\mu$ L HFS (50 mg/ml propidium iodide, 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100) (Sigma Aldrich, USA) and incubated for 30 min. After staining, the DNA content based on the fluorescence intensity of PI was estimated by flow cytometry (Guava easyCyte™, Millipore, USA). The data were analyzed using a Guava software (Millipore, USA). The percentages of cells in different phases of the cycle (G1, S and G2/M) as well as the percentage of cells with fragmented DNA (sub-G1 region) were estimated. For each sample examined, 5000 events were analyzed in three experiments.

### 2.6. Apoptosis assay

The apoptosis-inducing potential analyses of R and S-GNT were performed using an annexin V assay kit (Guava Nexin®, Millipore, USA). The cells were seeded in 6-well plates at a density of  $10^5$  cells/well. After 24 h of incubation, R-GNT and S-GNT (10 and 50  $\mu$ M) were added. After 3 h and 24 h of exposure, the cells were trypsinized, resuspended in DMEM and centrifuged for 5 min. The cell suspension was resuspended in annexin V-PE (AV) and 7-amino-actinomycin-D (7-AAD)-labeled and incubated for 30 min. The data were collected and analyzed using a Guava easyCyte™ flow cytometer and Guava software (Millipore, USA). Three cell populations were detected: viable cells (AV-/7-AAD-), early apoptotic cells (AV+/7-AAD-), and late-stage apoptotic and dead cells (AV+/7-AAD+). For each sample examined, 5000 events were analyzed in three experiments.

### 2.7. Hoechst 33342 staining assay

Hoechst 33342 is a DNA-specific dye. Hoechst 33342 staining was performed to visualize morphologic characteristics of apoptosis, including nuclear condensation and the formation of apoptotic bodies. The cells were seeded in 6-well plates at a density of  $10^5$  cells/well. After 24 h of incubation, R-GNT and S-GNT (10 and 50  $\mu$ M) were added. After 24 h and 48 h of exposure, the cells were stained with Hoechst 33342 (5  $\mu$ g/mL) for 30 min at room temperature and observed immediately using a FLoid® Cell Imaging Station

(magnification of 460x, blue filter, 390/40 nm excitation and 446/33 nm emission - Life Technologies, USA).

### *2.8. Single-cell gel electrophoresis assay (Comet assay)*

The alkaline comet assay was performed to investigate the genotoxic potential of goniotalamin according to the protocol of Tice et al. (2000) with some modification. The cells were seeded in 6-well plates at a density of  $10^5$  cells/well. After 24 h of incubation, R-GNT and S-GNT (10 and 50  $\mu$ M) were added. After 3 h of exposure, the cells were trypsinized, resuspended in DMEM and centrifuged for 5 min. Subsequently, 20  $\mu$ L of the cell suspension was mixed with 120  $\mu$ L of low-melting point agarose (0.5%) and deposited onto a slide pregelatinized with agarose (normal melting point, 1.5%), and then covered with a coverslip and left to solidify. The slides were subject to 1 h lysis (2.5 M sodium chloride, 100 mM EDTA, 10 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris), pH 10; 1% Triton X-100, and 10% DMSO). Alkaline denaturation for DNA unwinding (20 min) and electrophoresis (300 mA, 25 V, 20 min) were performed in a high pH buffer solution (200 mM EDTA, 10 N sodium hydroxide, and pH > 13). After electrophoresis, the slides were neutralized (0.4 M Tris and pH 7.5), dehydrated with ethanol, stained with 100  $\mu$ L of 0.002 mg/mL ethidium bromide solution and scored using a fluorescence microscope equipped with a 420-490-nm UV excitation filter and a 520-nm barrier filter (Leica). The comets were classified by visual scoring into four categories based on the length of DNA migration (Collins et al., 2008): class 0, undamaged cells and nucleoids without tails; class 1, cells with damage and a tail smaller than the diameter of the nucleoid; class 2, cells with damage and a tail twice the diameter of the nucleoid; and class 3, cells with damage and a tail greater than twice the diameter of the nucleoid. The damage index (DI) was calculated as follows:  $DI = N1 + (2 \times N2) + (2 \times N3)$ , where N1, N2, and N3 represent the numbers of cells of damage levels 1, 2, and 3, respectively. For each sample examined, 100 cells were analyzed in three experiments. The cell viability analysis was conducted using the trypan blue stain exclusion method, and only treatments with an index greater than 80% were considered.

### *2.9. RT-qPCR*

Cells were seeded in 6-well plates at a density of  $10^5$  cells/well. After 24 h of incubation, R-GNT (50  $\mu$ M) was added and remained in culture for 12 h. After the treatment, total RNA

was isolated using the RNeasy mini kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's recommendations. The RNA integrity was tested by agarose gel (1%) electrophoresis, and the concentration and purity (A260/A280) were quantified on a NanoDrop® 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Isolated RNA was stored at -80°C until processing. cDNA synthesis was performed using reverse transcriptase M-MLV (Invitrogen Life Technologies, USA) and total RNA using oligo (dT) primers (Invitrogen Life Technologies, USA) according to the protocol of the enzyme. Each RT-qPCR reaction was performed in a final volume of 11 µL containing 5 µL of cDNA, 5 µL of SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (Bio-rad Laboratories, USA) and 1 µL of oligonucleotides. Quantitative PCR measurement reactions were performed using the real-time detection system CFX96 TOUCH™ (Bio-rad Laboratories, USA) and the following conditions: 50°C for 2 min, 95°C for 2:15 min, 60°C for 15 sec, and 72°C for 30 sec. The melting point analysis was performed at the end of the reaction at a temperature of 55°C to 95°C every 0.5°C for 5 sec. The relative expression of each target gene was calculated using the average value of the CT between the target gene and the reference genes glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and ribosomal protein L13a (*RPL13A*) (Table 1). The reference genes were selected according to the stability of gene expression among groups.

### *2.10. Statistical analysis*

Data are presented as averages  $\pm$  standard deviations of the three experiments. Differences were considered significant for P values less than 0.05. The cell viability, cell cycle, apoptosis and comet assay data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test. The IC50 values were calculated by non-linear regression (variable slope). RT-qPCR data were normalized and analyzed according to Pfaffl et al. (2002) using REST 2009 software (Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test©). To filter out unreliable data and to identify genes with significantly different expression, a standard 2-fold change in expression was used as the cut-off point. The real-time PCR efficiencies were estimated by LinRegPCR software.

### 3. Results

#### 3.1. GNT reduces viability and cell growth

The MTT and Real-Time Cell Analyzer (RTCA) assays revealed that both R and S-GNT reduced the cell viability and growth of MCF-7 cells and HB4a in a dose- and time-dependent manner (Fig. 2 and Fig. 3). Both the MTT assay and cell growth kinetics analysis revealed that the natural enantiomer R-GNT is more effective in reduces the cell viability and cell growth than the enantiomer S-GNT.

Assessment of HB4a and MCF-7 cell viability was performed by MTT assay (Fig. 2). There was a significant reduction in the cell viability of HB4a cells at all tested concentrations of R-GNT after 24 h (Fig. 2a) and 48 h (Fig. 2b). MCF-7 cells also exhibited reduced viability after 24 h (Fig. 2a) and 48 h (Fig. 2b) of exposure at all concentrations of R-GNT tested, except at 1  $\mu\text{M}$ . S-GNT reduced HB4a cell viability after exposure at all concentrations, except at 1 and 30  $\mu\text{M}$  after 24 h (Fig. 2c) and 1  $\mu\text{M}$  after 48 h (Fig. 2d). MCF-7 cells exhibited reduced cell viability after 24 h of exposure at all concentration of S-GNT (Fig. 2c). After 48 h, 1 and 10  $\mu\text{M}$  of S-GNT did not reduce MCF-7 cell viability (Fig. 2d).

The half-maximal inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) defined by the MTT assay of R-GNT after 48 h was 11.7  $\mu\text{M}$  ( $R^2 > 0.9$ ) for HB4a and 52.12  $\mu\text{M}$  for MCF-7 ( $R^2 > 0.9$ ), and the  $\text{IC}_{50}$  of S-GNT was 50.86  $\mu\text{M}$  ( $R^2 > 0.8$ ) for HB4a and  $> 100$   $\mu\text{M}$  for MCF-7 cells ( $R^2 = 0.8$ ). Therefore, for subsequent experiments, R and S-GNT were used at concentrations of 10  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ .

The assessment of real-time cell growth kinetics performed using the xCELLigence Real Time Cell Analyzer (RTCA) equipment (Fig. 3) revealed that the R-GNT (50  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{M}$ ) caused a great reduction in the cell index as early as 3 h after treatment of HB4a (Fig. 3a) and MCF-7 cells (Fig. 3d). The HB4a cells treated with R-GNT (1  $\mu\text{M}$ ) showed a cell growth similar to the control group. Upon 10  $\mu\text{M}$ , there was a reduction in normalized cell index according to the concentration of R-GNT (Fig. 3a). Also the S-GNT showed a decrease in cell growth compared to the control group from the concentration of 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 3b). MCF-7 cells presented a dose-dependent cell growth inhibition when treated with R-GNT from the concentration of 20  $\mu\text{M}$  (Fig. 3d). Already only the highest concentration (100  $\mu\text{M}$ ) of S-GNT reduced the MCF-7 cell growth (Fig. 3e). Consistent to the cell growth curves, the photomicrographs showed that there was a reduction in cell density and morphological changes such as rounding and shrinkage of HB4a (R-GNT: 10 and 50  $\mu\text{M}$ ; S-GNT: 50  $\mu\text{M}$ ) and of MCF-7 cells (R-GNT: 50  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 3c and 3f).

### 3.2. Goniotalamin induces cell cycle arrest

To investigate the mechanisms by which goniotalamin inhibits cell growth, cell cycle (G1, S, G2, and sub-G1) analysis by flow cytometry was performed after 3 and 24 h of treatment with R and S-GNT (10 and 50  $\mu$ M).

There was a slight reduction in the number of HB4a cells in the G0/G1 cell cycle phase ( $p < 0.05$ ) and a small, though not significant, increase in the number of cells in G2/M phase after 3 h of treatment with R-GNT (10 and 50  $\mu$ M) and S-GNT (50  $\mu$ M) (Fig. 4a and 4b). After 24 h of treatment with 50  $\mu$ M R-GNT, we observed an increase in the G2/M phase cell population (control: 35.15%; 50  $\mu$ M R-GNT: 48.30%) ( $p < 0.001$ ) and a decrease in the number of cells in the G0/G1 phase (control: 46.56%; 50  $\mu$ M R-GNT: 24.22%) ( $p < 0.001$ ) (Fig. 4a and 4c).

The analysis of the cell cycle distribution of MCF-7 cells demonstrates that after 3 h of treatment with R-GNT (10  $\mu$ M) and S-GNT (10  $\mu$ M) there was a slight decrease in the number of cells in G0/G1 phase ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4d and 4e). After 24 hours of treatment (Fig. 4d e Fig. 4f), we observed a significant increase in the number of MCF-7 cells in G0/G1 phase after treatment with R-GNT (10  $\mu$ M) and S-GNT (10 and 50  $\mu$ M) (Control: 44.10%; 10  $\mu$ M R-GNT: 59.24%; 10  $\mu$ M S-GNT: 54.51%; 50  $\mu$ M de S-GNT: 57.63%) ( $p < 0,001$ ). This increase in the G0/G1 phase cell population was accompanied by a reduction in the number of S phase cells in the groups treated with 10  $\mu$ M R-GNT ( $p < 0.001$ ) and 50  $\mu$ M S-GNT ( $p < 0.01$ ) (Control: 13.17%; 10  $\mu$ M R-GNT: 1.67%; 50 S-GNT: 5.76). In the group treated with 10  $\mu$ M S-GNT, the increase in the G0/G1 cell population was accompanied by a decrease in the number of G2/M cells (Control: 34.76%; 10  $\mu$ M S-GNT: 25.85%) ( $p < 0.001$ ). In addition, we observed a slight but not significant increase in the population of cells in the G2/M phase after treatment with 50  $\mu$ M R-GNT (Control: 34.7%; 50  $\mu$ M R-GNT: 40%) as well as a slight reduction in cell population in the S phase (Control: 13%; 50  $\mu$ M R-GNT: 9.8%).

These results suggest that the treatment of HB4a cells with 50  $\mu$ M R-GNT induced G2/M cell cycle arrest, whereas the treatment of MCF-7 cells with R-GNT (10  $\mu$ M) and S-GNT (10 and 50  $\mu$ M) induced cell cycle arrest in the G0/G1 phase.

### 3.3. Goniotalamin induces apoptosis

To investigate the mechanisms of goniotalamin cytotoxicity, the induction of apoptotic cell death was measured by annexin V-7AAD assay after 24 h of treatment with R- and S-GNT

(10 and 50  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 5). The treatment of HB4a cells with R-GNT (10 and 50  $\mu\text{M}$ ) and S-GNT (50  $\mu\text{M}$ ) caused a decrease in the number of viable cells (Control: 87.83%; 10  $\mu\text{M}$  R-GNT: 81.13%; 50  $\mu\text{M}$  R-GNT: 62.70%; 50  $\mu\text{M}$  S-GNT: 81.10%) ( $p < 0.001$ ) and an increase in cells in the early stage of apoptosis (Control: 7.67%; 10  $\mu\text{M}$  R-GNT: 11.90%; 50  $\mu\text{M}$  R-GNT: 17.57%; 50  $\mu\text{M}$  S-GNT: 12.23%) ( $p < 0.001$ ). Moreover, treatment with R-GNT (50  $\mu\text{M}$ ) caused an increase in the number of cells in the late stages of apoptosis (Control: 3.80%; 50  $\mu\text{M}$  R-GNT: 19.30% -  $p < 0.001$ ) (Fig. 5a and 5b).

The analysis of the MCF-7 cells demonstrates that there was a little decrease in the number of cells in late apoptosis (Control: 8.10%; 50  $\mu\text{M}$  S-GNT: 4.87%) ( $p < 0.01$ ). Treatment with 50  $\mu\text{M}$  R-GNT induced a decrease in the number of viable cells (Control: 90.20%; 50  $\mu\text{M}$ : 83.20%) ( $p < 0.001$ ) and an increase in the number of cells in late-stage apoptosis (Control: 8.10%; 50  $\mu\text{M}$ : 15.17%) ( $p < 0.001$ ) (Fig. 5c and 5d).

The total proportion of apoptotic cells labeled with annexin V (AV+/7-AAD+ and AV+/7-AAD-) after treatment with 50  $\mu\text{M}$  R-GNT was 36.87% for HB4a cells and 16.34% for MCF-7 cells. The Hoechst 33342 staining showed that the most of the HB4a (Fig. 5a) cells and MCF-7 cells (Fig. 5c) in the control group exhibited normal staining of chromatin and normal nuclear morphology, whereas there was an increase in the number of cells that exhibited strong fluorescence, chromatin condensation, and fragmented nuclei in the MCF-7 cells treated with R-GNT (50  $\mu\text{M}$ ) and in HB4a cells treated with R-GNT and S-GNT (10 and 50  $\mu\text{M}$ ).

### 3.4. Goniotalamin induces DNA damage

DNA damage can result in cell cycle arrest and cell death by apoptosis. To investigate the potential of goniotalamin to induce DNA damage in HB4a and MCF-7 cells, a Comet Assay was performed after 3 h of treatment with R-GNT and S-GNT (10  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ ). The analysis of the damage index (DI) showed that treatment of HB4a cells with R-GNT (50  $\mu\text{M}$ ) ( $p < 0.01$ ) (Fig.6a) and of MCF-7 cells with R-GNT (10  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ ) and S-GNT (10  $\mu\text{M}$  and 50  $\mu\text{M}$ ) resulted in induction of DNA damage ( $p < 0.01$ ) (Fig.6b). The S-GNT was not genotoxic to HB4a cells.

### 3.5. (R)-goniotalamin changes the expression of cell cycle control genes

R-GNT dramatically changed the cell cycle dynamic and induced apoptosis in both mammary cell lines examined. Thus, to analyze the effects of R-GNT in the regulation of genes

involved in the cell cycle and apoptosis pathway, cells were treated with 50  $\mu$ M R-GNT for 12 h, followed by measurement of mRNA levels by RT-qPCR. The analysis of HB4a cells (Fig. 7a) revealed that the mRNA levels of cyclins (*CCNB1*: 5.2-fold-change and *CCNB2*: 5.2-fold-change) and CDKs (*CDK1*: 2.3-fold-change and *CDK4*: 2.82-fold-change) were downregulated. The mRNA levels of the cyclin-dependent kinase inhibitor *CDKN1A* was upregulated (14-fold-change). In MCF-7 cells (Fig. 7b), the mRNA levels of cyclins (*CCND1*: 2.79-fold-change; *CCNB1*: 4.5-fold-change, *CCNB2*: 6.7-fold-change) and CDKs (*CDK1*: 8.3-fold-change, *CDK2*: 4.3-fold-change and *CDK4*: 2-fold-change) were downregulated, whereas the levels of the cyclin-dependent kinase inhibitor *CDKN1A* (16.6-fold-change) and *CDKN1C* (3.5-fold-change) were upregulated. *CDKN1A* was the most responsive gene after treatment with R-GNT, with a greater than sixteen- and fourteen-fold increase in expression in MCF-7 and HB4a cells, respectively. The mRNA levels of genes that encode caspase 8 (*CASP8*) and caspase 9 (*CASP9*) were unchanged (Fig. 8).

The mRNA levels of *GADD45a* was investigated by RT-qPCR after 3 h and 12 h of exposure to genotoxic concentrations of R-GNT (50  $\mu$ M) (Fig. 9). The mRNA levels of the *GADD45a* gene were upregulated after 12 h of exposure to R-GNT in both cell lines (HB4a: 4.74-fold-change; MCF-7: 9-fold-change).

## 4 Discussion

Evidence obtained from *in vitro* (Alabsi et al., 2012; de Fatima et al., 2008) and *in vivo* experiments (Vendramini-Costa et al., 2010) indicates that goniothalamin might have therapeutic potential for the treatment of cancer. In this study, we determined that goniothalamin exhibits dose- and time-dependent antiproliferative activity against HB4a and MCF-7 cells. Both cell viability and cell growth kinetic analysis revealed that the natural enantiomer R-GNT was more effective than the synthetic enantiomer S-GNT. The antiproliferative activity of goniothalamin against the MCF-7 and HB4a cells appeared to be the result of cell cycle arrest and the induction of cell death by apoptosis, probably in response to the induction of DNA damage. This is the first study that demonstrated the influence of GNT in the regulation of the expression of genes involved in cell cycle control.

Among all of the bioactive properties described, the anti-proliferative activity of goniothalamin against cancer cells is most notable. Moreover, some authors have suggested a possible selectivity of goniothalamin against tumor cell lines with limited activity against normal cells, which has attracted interest in this molecule in the last two decades (Pihie et al., 1998; Tian et al., 2006; Wattanapiromsakul et al., 2005). In the present study, we observed a potent cytotoxic and antiproliferative effect of goniothalamin against breast cell lines at low concentrations in a dose- and time-dependent manner. However, there was no selective cytotoxicity for MCF-7 tumor cells relative HB4a non-tumor cells.

The analysis of real-time cell growth allows us to verify the effects of a given compound at several points of time, permitting dynamic monitoring of the effects of a compound on cell growth (Abassi et al., 2009). Cell growth inhibition after exposure to R-GNT began within the first 3 hours, demonstrating an early cellular response to treatment. In both the MTT assay and RTCA analysis, the natural enantiomer R-GNT proved more effective against both cell lines relative to the synthetic enantiomer S-GNT. Although both enantiomeric forms exhibit the same chemical and physical properties, their biological activities differ considerably, likely due to the specific interactions of enantiomers with biological receptors (Tucker, 2000).

Cell index (CI) variations reflect alterations in cellular biological status, including the number of cells, cell viability, morphology and adhesion. The cell viability determined by MTT assay can be defined as the number of healthy cells; however, it is not possible distinguish whether the cells are actively dividing or are quiescent. Therefore, we investigated the effects of GNT in the range close to the IC<sub>50</sub> of R-GNT values for HB4a (10  $\mu$ M) and MCF-7 (50  $\mu$ M) on the ability to induce cell death by apoptosis and to cause cell cycle arrest. Consistent with

the observation of a decrease in the cell index, we observed that goniotalamin was able to induce DNA damage, cell cycle arrest and apoptosis.

The cellular DNA damage response (DDR) detects DNA lesions and initiates DNA damage checkpoints. DNA damage checkpoints occur throughout the cell cycle, and the cells may transiently arrest in the G1/S or G2/M transitions or may permanently arrest (senescence) and activate DNA repair mechanisms in response to genotoxic insults. If the DNA damage is not amenable to repair, the cells may undergo death by apoptosis (Cheung-Ong et al., 2013). R-GNT was able to induce genotoxicity in HB4a and MCF-7 cells. S-GNT, in turn, was genotoxic only for the tumor cell line MCF-7. These results are consistent with previous reports that attribute the cytotoxic effect of goniotalamin to its genotoxicity (Inayat-Hussain et al., 2009; Kuo et al., 2011; Rajab et al., 2005). In addition, the gene *GADD45a*, which is regulated in response to DNA damage, was upregulated after R-GNT exposure. Accumulating evidence suggests that the overexpression of the growth arrest and DNA damage (Gadd) 45a gene (*GADD45a*) suppress cell proliferation through cell cycle arrest and apoptosis induction (Tamura et al., 2012). Numerous studies have found a correlation between the upregulation of *GADD45a* and G2/M cell cycle arrest (Jin et al., 2002; Li et al., 2009; Wang et al., 1999). This response occurs because the *Gadd45a* protein strongly inhibits the kinase activity of the complex CDK1/Cyclin B1, which is responsible for transitioning the G2 cell to mitosis (Jin et al., 2000).

After DNA damage, p53 protein is activated and upregulates target genes that control the cellular response, such as *CDKN1A*, a gene that encodes the p21 protein. Our gene expression analysis revealed that the mRNA levels of *CDKN1A* were markedly up-regulated after R-GNT treatment in both cell lines. *CDKN1C*, which also belongs to the CIP/KIP cyclin-kinase inhibitor family, was also up-regulated in MCF-7 cells after treatment with R-GNT. It is well established that induction of the p21 response associated with DNA damage causes cell cycle arrest in the G1 and G2 phases. This occur because the p21 protein acts as an inhibitor of cell cycle progression through direct interaction with PCNA, inhibiting the kinase activity of cyclin-CDK complexes, directly inhibiting the phosphorylation of CDK1 and CDK2, disrupting the interactions between CDKs and their substrates, and directly interacting with transcriptional factors (Abbas and Dutta, 2009).

R-GNT (50  $\mu$ M) induced cell cycle arrest in the G2/M phase in HB4a cells. In MCF-7 cells, we observed G1 arrest when the cells were exposed to R-GNT (10  $\mu$ M) and to S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M). Moreover, the treatment of MCF-7 cells with a higher concentration of R-GNT (50  $\mu$ M) caused a slight increase in the population of cells in the G2/M phase. Other

authors has been attributed the antiproliferative activity of goniiothalamine to cell cycle arrest at the G0/G1 (Barcelos et al., 2014), G2/M (Chen et al., 2005; Tian et al., 2006) and S phase (Alabsi et al., 2012). Exposure of HepG2 cells and HepG2-R to GNT (15  $\mu$ M) caused G2/M cell cycle arrest and increased the sub-G1 population (Tian et al., 2006). The treatment of MDA-MB-231 cells with GNT (30  $\mu$ M) also led to cell cycle arrest at the G2/M phase with a concomitant reduction in G1 (Chen et al., 2005). On the other hand, Barcelos et al. (2014) suggested that PANC-1 cells exposed to GNT exhibit G0/G1 cell cycle arrest.

Analysis of the expression levels of cell cycle machinery components by RT-qPCR revealed the downregulation of some cyclins and CDKs. The mRNA levels of *CCND1* and *CDK4* were downregulated in MCF-7 cells, but only *CDK4* was downregulated in non-tumoral HB4a cells. The downregulation of *CCND1*, a gene that encodes cyclin D1, observed in MCF-7 cells is consistent with a previous study reporting that the exposure of PANC-1 cells to GNT led to a decrease in the cyclin D1 protein levels and in the phosphorylation of Rb protein (Barcelos et al., 2014). The overexpression of cyclin D1 is a feature of breast cancer, occurring in 50% of cases, and MCF-7 breast cancer cells express high levels of cyclin D1 (Zhou et al., 1997). Thus, cyclin D is partially responsible for the excessive proliferation of cancer cells in many human cancers and is therefore a good target for the development of anticancer drugs (Musgrove et al., 2011). Moreover, the cyclin E/CDK2 complex is required for cells to transition from G1 to S. This complex contributes to the maintenance of hyperphosphorylated Rb and the positive feedback stimulating the accumulation of E2F. The association of CDK2 with cyclin A also contributes to DNA replication (Malumbres and Barbacid, 2009). Although there were no changes in the mRNA levels of cyclin E1, the levels of CDK2 were drastically reduced in MCF-7 cells.

The G2-M cell cycle phase transition is regulated by CDK1 in association with cyclins A, B1 and B2. These complexes phosphorylate cytoskeletal proteins and mitotic spindle components (Nigg, 2001). In both cells, we observed the downregulation of genes that encode cyclins B1 and B2 as well as CDK1. Therefore, the reduced expression of cyclin D1 and CDK4 mRNA in addition to the downregulation of CDK2 in MCF-7 cells, both positive regulators of the G1-S transition, could be related to G1 cell cycle arrest. However, R-GNT induced G0/G1 cell cycle arrest in MCF-7 cells only at the lower tested concentration of R-GNT (10  $\mu$ M). On the other hand, the downregulation of *CCNB1*, *CCNB2* and *CDK1* in both cell lines may contribute to the evident G2/M cell cycle arrest after R-GNT treatment in HB4a cells and to the slight increase in the population of cells in the G2/M phase after treatment of MCF-7 cells with 50  $\mu$ M R-GNT. This finding suggests that the relative contribution of G1 arrest or G2/M arrest

may vary according to the cell line, treatment time and dose. Moreover, the *CDKN1A* upregulation might contribute to downregulation of cyclins and CDKs genes. Microarray-based studies suggest that induction of p21 is correlated with the suppression of genes involved in cell cycle progression, such as *CDK1* (Chang et al., 2000), *CCNB1*, *CCNB2* and *CDK2* (Ferrandiz et al., 2012).

In addition to the cytostatic activity of R-GNT, we also observe cytotoxicity by inducing cell death by apoptosis in HB4a and MCF-7 cells. MCF-7 cells exhibited greater resistance to cell death induced by goniotalamin relative to HB4a cells. Consistent with our study, breast cancer MDA-MB-231 cells exposed to GNT (30  $\mu$ M) have been reported to exhibit an increase in the population of apoptotic cells with mitochondrial efflux of cytochrome-c and activation of the effector caspase-3 (Chen et al., 2005). The induction of cell death by apoptosis is one of the most established mechanisms of action for GNT, and other authors have reported its potential to induce apoptosis (Alabsi et al., 2013; Barcelos et al., 2014; Kuo et al., 2011; Petsophonsakul et al., 2013). Most studies report that apoptosis induced by GNT occurs through by intrinsic pathway, with activation of initiator caspase-9 (Alabsi et al., 2013; Inayat-Hussain et al., 2003), decrease in mitochondrial membrane potential, and mitochondrial release of cytochrome-c (Kuo et al., 2011) and of SMAC/DIABLO (Petsophonsakul et al., 2013). Some reports also suggest that the extrinsic pathway participates in GNT-induced apoptosis, as demonstrated by the activation of the initiator caspase of the extrinsic pathway, caspase-8 (Kuo et al., 2011; Petsophonsakul et al., 2013). However, in this study, there was no differential gene expression of *CASP8* and *CASP9*, the genes that encoding to caspase-8 and to caspase-9, respectively. S-GNT, unlike R-GNT, exhibited low cytotoxicity and did not induce cell death by apoptosis in MCF-7 cells. There is a report that this enantiomer induced cell death mainly by autophagy in kidney 786-O cells (de Fatima et al., 2008). However, S-GNT at 50  $\mu$ M was able to induce apoptosis in HB4a cells.

## 5. Conclusion

In summary, in the current study, we observed the potent antiproliferative activity of goniothalamine against breast cell lines in a dose- and time-dependent manner. Indeed, there was no selective cytotoxicity for MCF-7 tumor cells relative to HB4a non-tumor cells. The natural enantiomer R-GNT proved most effective for both cell lines relative to the synthetic enantiomer S-GNT. R-GNT can inhibit cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis induction, likely in response to DNA damage and upregulation of *GADD45a* gene. R-GNT induced G0/G1 and G2/M cell cycle arrest in MCF-7 cells, according to the concentration, as well as G2/M cell cycle arrest in HB4a cells. The cell cycle inhibition induced by R-GNT was mediated by the upregulation of CIP/KIP cyclin-kinase inhibitors and by the downregulation of cyclins and CDKs. S-GNT, in turn, was able to induce G0/G1 cell cycle arrest and DNA damage in MCF-7 cells and to induce apoptosis only in HB4a cells. Therefore, goniothalamine may represent a new therapeutic agent for the treatment of breast cancer. However, exposure to this goniothalamine brings some undesirable effects to non-tumor cells, including genotoxicity and apoptosis induction, and further studies are needed to clarify their potential toxic effects.

## 6. References

- Abassi, Y.A., Xi, B., Zhang, W., Ye, P., Kirstein, S.L., Gaylord, M.R., Feinstein, S.C., Wang, X., Xu, X., 2009. Kinetic cell-based morphological screening: prediction of mechanism of compound action and off-target effects. *Chem Biol* 16, 712-723.
- Abbas, T., Dutta, A., 2009. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 9, 400-414.
- Al-Qubaisi, M., Rozita, R., Yeap, S.K., Omar, A.R., Ali, A.M., Alitheen, N.B., 2011. Selective cytotoxicity of goniothalamine against hepatoblastoma HepG2 cells. *Molecules* 16, 2944-2959.
- Alabsi, A.M., Ali, R., Ali, A.M., Al-Dubai, S.A., Harun, H., Abu Kasim, N.H., Alsalahi, A., 2012. Apoptosis induction, cell cycle arrest and in vitro anticancer activity of goniothalamine in a cancer cell lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 13, 5131-5136.
- Alabsi, A.M., Ali, R., Ali, A.M., Harun, H., Al-Dubai, S.A., Ganasegeran, K., Alshagga, M.A., Salem, S.D., Abu Kasim, N.H., 2013. Induction of caspase-9, biochemical assessment and morphological changes caused by apoptosis in cancer cells treated with goniothalamine extracted from *Goniothalamus macrophyllus*. *Asian Pac J Cancer Prev* 14, 6273-6280.
- Barcelos, R.C., Pastre, J.C., Vendramini-Costa, D.B., Caixeta, V., Longato, G.B., Monteiro, P.A., de Carvalho, J.E., Pilli, R.A., 2014. Design and Synthesis of N-Acylated Aza-Goniothalamine Derivatives and Evaluation of Their in vitro and in vivo Antitumor Activity. *ChemMedChem* 9, 2725-2743.
- Besson, A., Dowdy, S.F., Roberts, J.M., 2008. CDK inhibitors: cell cycle regulators and beyond. *Dev Cell* 14, 159-169.
- Brandimarto, J.A., 2009. Molecular regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 by signaling molecules downstream of the igf-1 receptor in mammary epithelial cells. State University of New Jersey, p. 61.
- Castaneda, F., Rosin-Steiner, S., 2006. Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: role of various signal transduction pathways. *Int J Med Sci* 3, 160-167.
- Chang, B.D., Watanabe, K., Broude, E.V., Fang, J., Poole, J.C., Kalinichenko, T.V., Roninson, I.B., 2000. Effects of p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup> on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 4291-4296.
- Chen, W.Y., Wu, C.C., Lan, Y.H., Chang, F.R., Teng, C.M., Wu, Y.C., 2005. Goniothalamine induces cell cycle-specific apoptosis by modulating the redox status in MDA-MB-231 cells. *Eur J Pharmacol* 522, 20-29.
- Cheung-Ong, K., Giaever, G., Nislow, C., 2013. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. *Chem Biol* 20, 648-659.
- Collins, A.R., Oscoz, A.A., Brunborg, G., Gaivao, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M., Smith, C.C., Stetina, R., 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 23, 143-151.
- de Fatima, A., Kohn, L.K., Antonio, M.A., de Carvalho, J.E., Pilli, R.A., 2005. (R)-Goniothalamine: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. *Bioorg Med Chem* 13, 2927-2933.
- de Fatima, A., Zambuzzi, W.F., Modolo, L.V., Tarsitano, C.A., Gadelha, F.R., Hyslop, S., de Carvalho, J.E., Salgado, I., Ferreira, C.V., Pilli, R.A., 2008. Cytotoxicity of goniothalamine enantiomers in renal cancer cells: involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy. *Chem Biol Interact* 176, 143-150.
- Eroles, P., Bosch, A., Perez-Fidalgo, J.A., Lluch, A., 2012. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat Rev* 38, 698-707.
- Fatima, A., Kohn, L.K., Carvalho, J.E., Pilli, R.A., 2006. Cytotoxic activity of (S)-goniothalamine and analogues against human cancer cells. *Bioorg Med Chem* 14, 622-631.
- Ferrandiz, N., Caraballo, J.M., Garcia-Gutierrez, L., Devgan, V., Rodriguez-Paredes, M., Lafita, M.C., Bretones, G., Quintanilla, A., Munoz-Alonso, M.J., Blanco, R., Reyes, J.C., Agell, N., Delgado, M.D., Dotto, G.P., Leon, J., 2012. p21 as a transcriptional co-repressor of S-phase and mitotic control genes. *PLoS One* 7, e37759.
- Gartel, A.L., Tyner, A.L., 1999. Transcriptional regulation of the p21<sup>(WAF1/CIP1)</sup> gene. *Exp Cell Res* 246, 280-289.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.

- Inayat-Hussain, S.H., Annuar, B.O., Din, L.B., Ali, A.M., Ross, D., 2003. Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniiothalamine in HL-60 leukemia cells. *Toxicol In Vitro* 17, 433-439.
- Inayat-Hussain, S.H., Osman, A.B., Din, L.B., Ali, A.M., Snowden, R.T., MacFarlane, M., Cain, K., 1999. Caspases-3 and -7 are activated in goniiothalamine-induced apoptosis in human Jurkat T-cells. *FEBS Lett* 456, 379-383.
- Inayat-Hussain, S.H., Wong, L.T., Chan, K.M., Rajab, N.F., Din, L.B., Harun, R., Kizilors, A., Saxena, N., Mourtada-Maarabouni, M., Farzaneh, F., Williams, G.T., 2009. RACK-1 overexpression protects against goniiothalamine-induced cell death. *Toxicol Lett* 191, 118-122.
- Jin, S., Antinore, M.J., Lung, F.D., Dong, X., Zhao, H., Fan, F., Colchagie, A.B., Blanck, P., Roller, P.P., Fornace, A.J., Jr., Zhan, Q., 2000. The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J Biol Chem* 275, 16602-16608.
- Jin, S., Tong, T., Fan, W., Fan, F., Antinore, M.J., Zhu, X., Mazzacurati, L., Li, X., Petrik, K.L., Rajasekaran, B., Wu, M., Zhan, Q., 2002. GADD45-induced cell cycle G2-M arrest associates with altered subcellular distribution of cyclin B1 and is independent of p38 kinase activity. *Oncogene* 21, 8696-8704.
- Kuo, K.K., Chen, Y.L., Chen, L.R., Li, C.F., Lan, Y.H., Chang, F.R., Wu, Y.C., Shiu, Y.L., 2011. Involvement of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 in goniiothalamine-induced TP53-dependent and -independent apoptosis in hepatocellular carcinoma-derived cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 256, 8-23.
- Lee, J., Kim, J.A., Barbier, V., Fotedar, A., Fotedar, R., 2009. DNA damage triggers p21WAF1-dependent Emi1 down-regulation that maintains G2 arrest. *Mol Biol Cell* 20, 1891-1902.
- Li, Y., Qian, H., Li, X., Wang, H., Yu, J., Liu, Y., Zhang, X., Liang, X., Fu, M., Zhan, Q., Lin, C., 2009. Adenoviral-mediated gene transfer of Gadd45a results in suppression by inducing apoptosis and cell cycle arrest in pancreatic cancer cell. *J Gene Med* 11, 3-13.
- Macleod, K.F., Sherry, N., Hannon, G., Beach, D., Tokino, T., Kinzler, K., Vogelstein, B., Jacks, T., 1995. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9, 935-944.
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2005. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends Biochem Sci* 30, 630-641.
- Malumbres, M., Barbacid, M., 2009. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer* 9, 153-166.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Musgrove, E.A., Caldon, C.E., Barraclough, J., Stone, A., Sutherland, R.L., 2011. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nat Rev Cancer* 11, 558-572.
- Nigg, E.A., 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 21-32.
- Petsophonsakul, P., Pompimon, W., Banjerdpongchai, R., 2013. Apoptosis induction in human leukemic promyelocytic HL-60 and monocytic U937 cell lines by goniiothalamine. *Asian Pac J Cancer Prev* 14, 2885-2889.
- Pfaffl, M.W.H., G. W.; Dempfle, L., 2002. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, 1-10.
- Pihie, A.H., Stanslas, J., Din, L.B., 1998. Non-steroid receptor-mediated antiproliferative activity of styrylpyrone derivative in human breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 18, 1739-1743.
- Rajab, N.F., Zariyantey, A.H., Hassan, H., Ali, A.M., Din, L.B., Inayat-Hussain, S.H., 2005. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of goniiothalamine in leukemic cell lines. *Environ. Mutagen. Res.* 27, 161-164.
- Romanov, V.S., Pospelov, V.A., Pospelova, T.V., 2012. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Waf1): contemporary view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 77, 575-584.
- Semprebon, S.C., de Fatima, A., Lepri, S.R., Sartori, D., Ribeiro, L.R., Mantovani, M.S., 2014. (S)-Goniiothalamine induces DNA damage, apoptosis, and decrease in BIRC5 messenger RNA levels in NCI-H460 cells. *Hum Exp Toxicol* 33, 3-13.

- Sugaya, S., Nakanishi, H., Tanzawa, H., Sugita, K., Kita, K., Suzuki, N., 2005. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. *Mutat Res* 578, 327-332.
- Tamura, R.E., de Vasconcellos, J.F., Sarkar, D., Libermann, T.A., Fisher, P.B., Zerbini, L.F., 2012. GADD45 proteins: central players in tumorigenesis. *Curr Mol Med* 12, 634-651.
- Tian, Z., Chen, S., Zhang, Y., Huang, M., Shi, L., Huang, F., Fong, C., Yang, M., Xiao, P., 2006. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. *Phytomedicine* 13, 181-186.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.
- Tucker, G.T., 2000. Chiral switches. *Lancet* 355, 1085-1087.
- Vendramini-Costa, D.B., de Castro, I.B., Ruiz, A.L., Marquissolo, C., Pilli, R.A., de Carvalho, J.E., 2010. Effect of goniotalamin on the development of Ehrlich solid tumor in mice. *Bioorg Med Chem* 18, 6742-6747.
- Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr., Harris, C.C., 1999. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3706-3711.
- Wattanapiromsakul, C., Wangsintaweekul, B., Sangprapan, P., Itharat, A., Keawpradub, N., 2005. Goniotalamin, a cytotoxic compound, isolated from *Goniotalamus macrophyllus* (Blume) Hook. f. & Thomson var. *macrophyllus*. *Songklanakarin J. Sci. Technol* 27, 479-487.
- WHO, W.H.O.-. 2012. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
- Wiert, C., 2007. *Goniotalamus* species: a source of drugs for the treatment of cancers and bacterial infections? *Evid Based Complement Alternat Med* 4, 299-311.
- Xing, J.Z., Zhu, L., Jackson, J.A., Gabos, S., Sun, X.J., Wang, X.B., Xu, X., 2005. Dynamic monitoring of cytotoxicity on microelectronic sensors. *Chem Res Toxicol* 18, 154-161.
- Zhou, Q., Stetler-Stevenson, M., Steeg, P.S., 1997. Inhibition of cyclin D expression in human breast carcinoma cells by retinoids in vitro. *Oncogene* 15, 107-115.

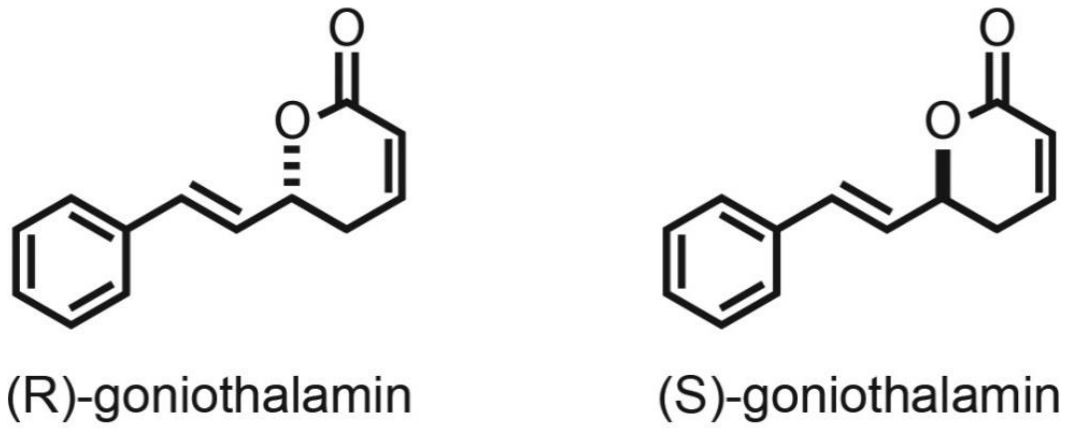
**Table****Table 1** – Sequences of primers used in RT-qPCR.

<b>Symbol</b>		<b>Oligonucleotide</b>	<b>Ref.Seq ID</b>
<i>CCNB1</i>	<i>Forward</i>	AGA GCA TCT AAG ATT GGA GAG	Sigma
	<i>Reverse</i>	CCA TGT CAT AGT CCA ACA TAG	
<i>CCNB2</i>	<i>Forward</i>	ATT TTT ACA GGT TCA GCC AG	Sigma
	<i>Reverse</i>	ATC TCC TCA TAC TTG GAA GC	
<i>CCND1</i>	<i>Forward</i>	GCC TCT AAG ATG AAG GAG AC	Sigma
	<i>Reverse</i>	CCA TTT GCA GCA GCT C	
<i>CCNE1</i>	<i>Forward</i>	GAC TTA CAT GAA GTG CTA CTG	Sigma
	<i>Reverse</i>	GAC GAG AAA TGA TAC AAG GC	
<i>CDK1</i>	<i>Forward</i>	ATG AGG TAG TAA CAC TCT GG	Sigma
	<i>Reverse</i>	CCT ATA CTC CAA ATG TCA ACT G	
<i>CDK2</i>	<i>Forward</i>	GAG ACC TTA AAC CTC AGA ATC	Sigma
	<i>Reverse</i>	TGG AAT AAT ATT TGC AGC CC	
<i>CDK4</i>	<i>Forward</i>	GAA CAT TCT GGT GAC AAG TG	Sigma
	<i>Reverse</i>	CAA AGA TAC AGC CAA CAC TC	
<i>CDK6</i>	<i>Forward</i>	GGA TAT GAT GTT TCA GCT TCT C	Sigma
	<i>Reverse</i>	TCT GGA AAC TAT AGA TGC GG	
<i>CDK7</i>	<i>Forward</i>	CTA GGA TGT ATG GTG TAG GTG	Sigma
	<i>Reverse</i>	AAG GAA CCC TTA GAA GTA ACT C	
<i>CDKN1A</i>	<i>Forward</i>	CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC	Sigma
	<i>Reverse</i>	CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG	
<i>CDKN1B</i>	<i>Forward</i>	AAC CGA CGA TTC TTC TAC TC	Sigma
	<i>Reverse</i>	TGT TTA CGT TTG ACG TCT TC	
<i>CDKN1C</i>	<i>Forward</i>	CAA GTC TGT TAA AAT GGT TCC	Sigma
	<i>Reverse</i>	TTT TTG CAG CAT TTT TCG G	
<i>CASP9</i>	<i>Forward</i>	CTC TAC TTT CCC AGG TTT	Sigma
	<i>Reverse</i>	TTT CAC CGA AAC AGC ATT	

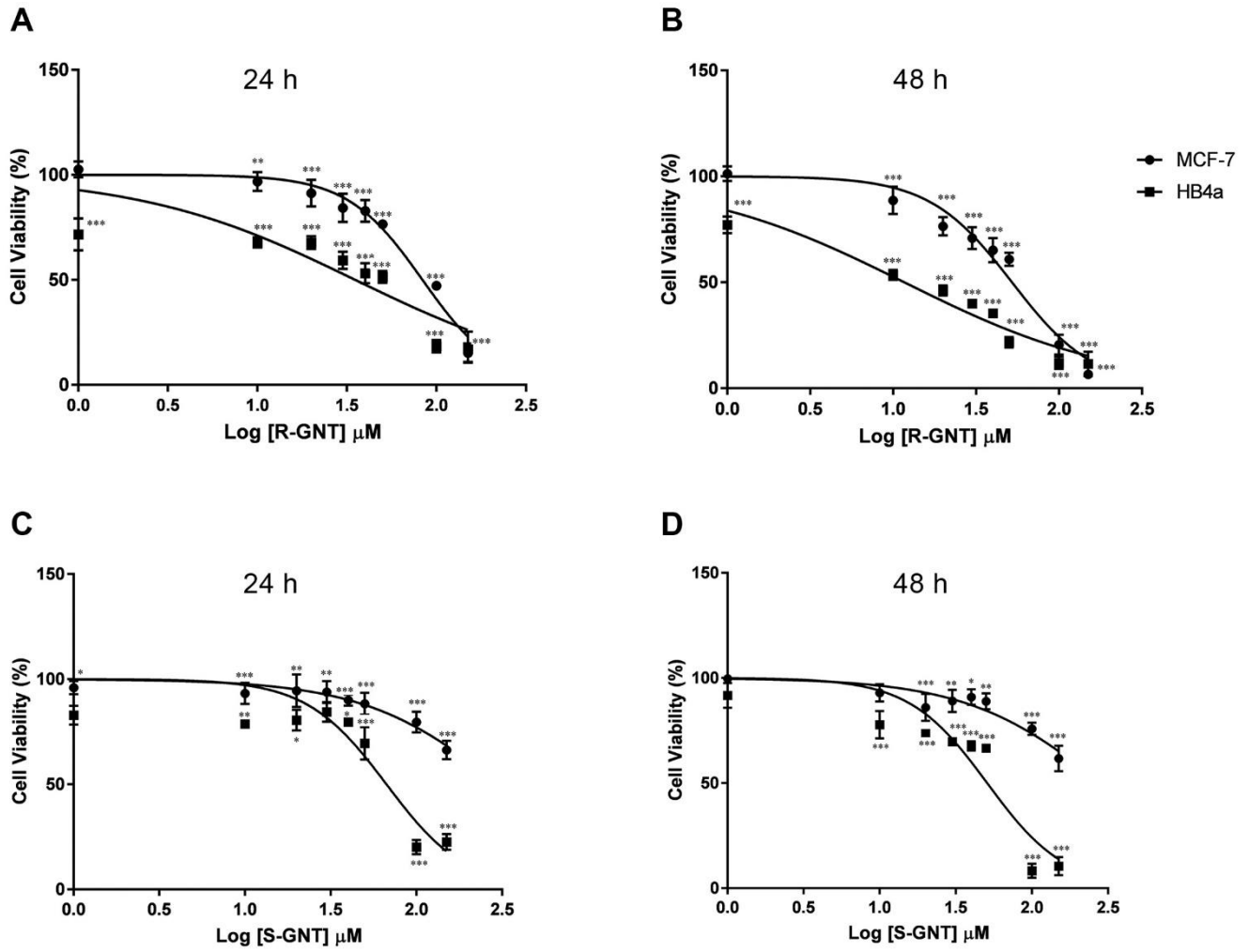
<i>CASP8</i>	<i>Forward</i>	GCA AAA GCA CGG GAG AAA GT	Castaneda and Rosin-Steiner (2006)
	<i>Reverse</i>	TGC ATC CAA GTG TGT TCC ATT C	
<i>GADD45a</i>	<i>Forward</i>	TCA GCG CAC GAT CAC TGT C	Constructed
	<i>Reverse</i>	CCA GCA GGC ACA ACA CCA C	
<i>GAPDH</i>	<i>Forward</i>	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	Sugaya et al. (2005) with modifications
	<i>Reverse</i>	GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT	
<i>RPL13A</i>	<i>Forward</i>	CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA	Brandimarto (2009)
	<i>Reverse</i>	TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A	

---

## Figures

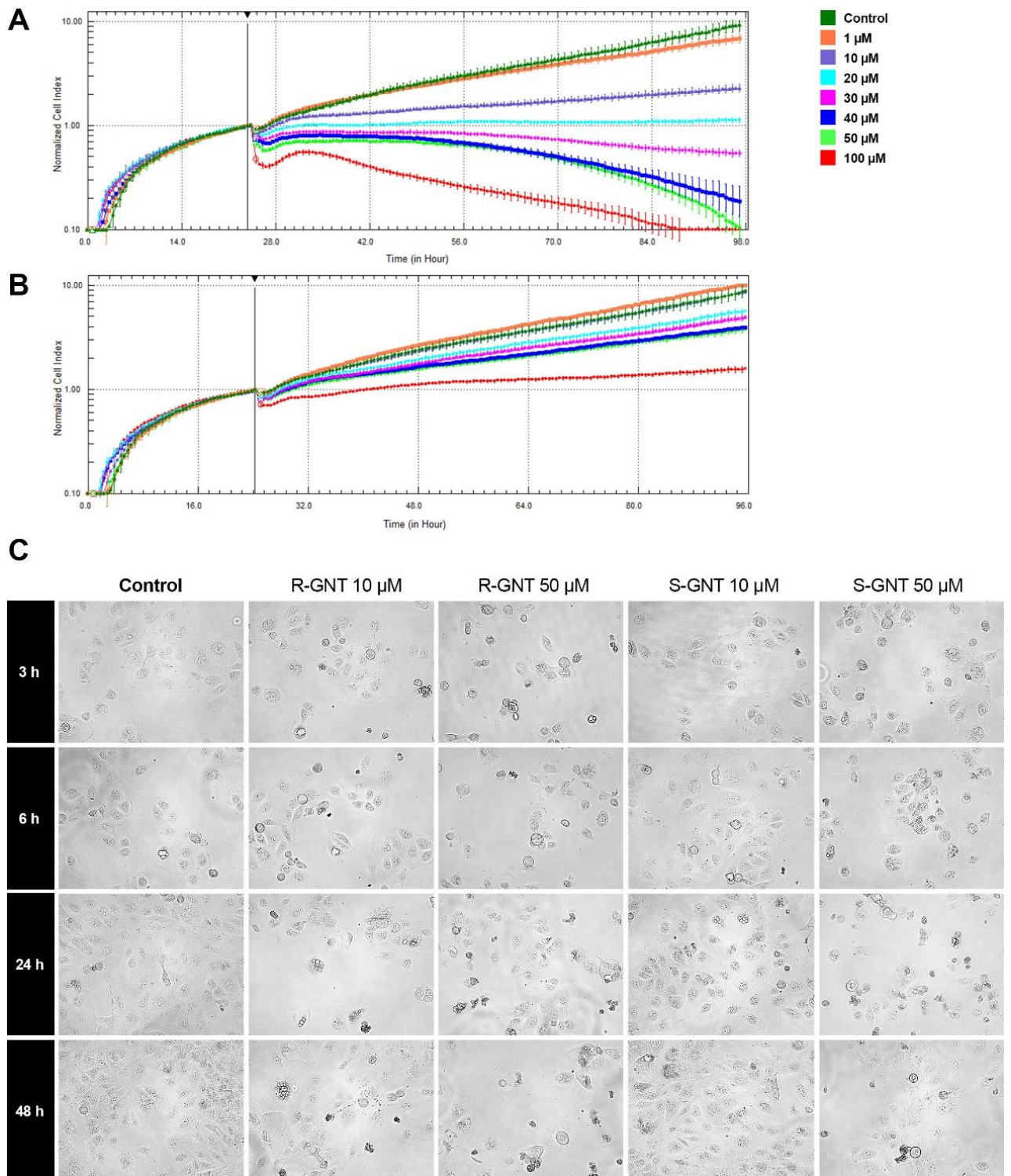


**Fig. 1.** Chemical structures of (R)-goniothalamin and (S)-goniothalamin.

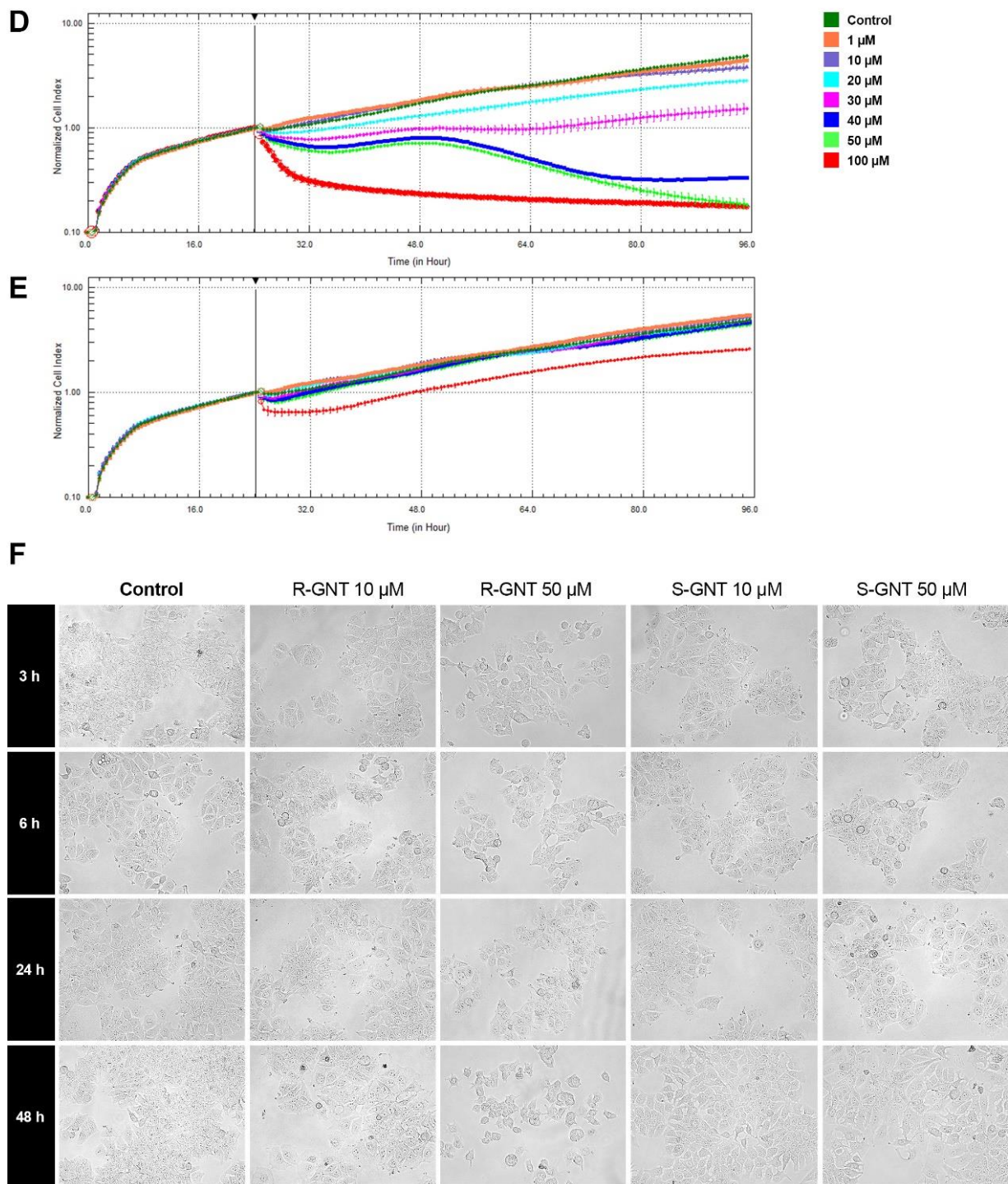


**Fig. 2.** Cell viability (%) of MCF-7 and HB4a breast cell lines after 24 and 48 h of incubation with 1-150  $\mu\text{M}$  of R-GNT and S-GNT measured using the MTT assay. (A) Cell viability (%) after exposure to R-GNT for 24 h and (B) 48 h. (C) Cell viability (%) after exposure to S-GNT for 24 h and (D) 48 h. Results are presented as the mean  $\pm$  SD of three experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  relative to control using ANOVA followed by Dunnett.

## HB4a

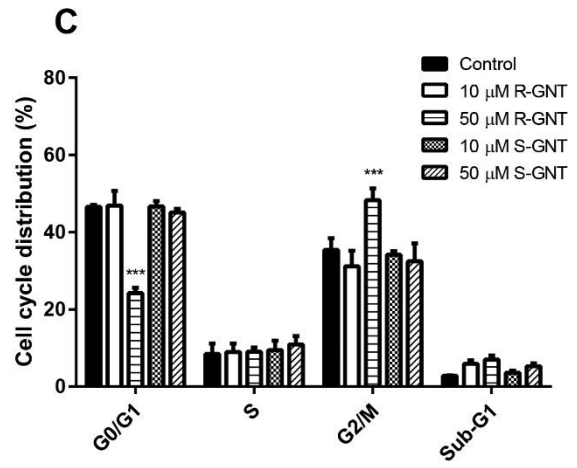
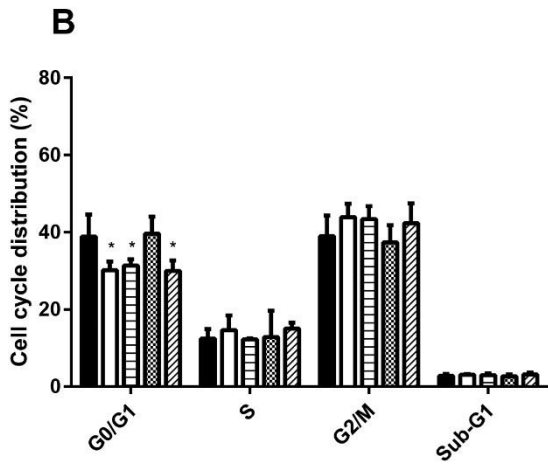
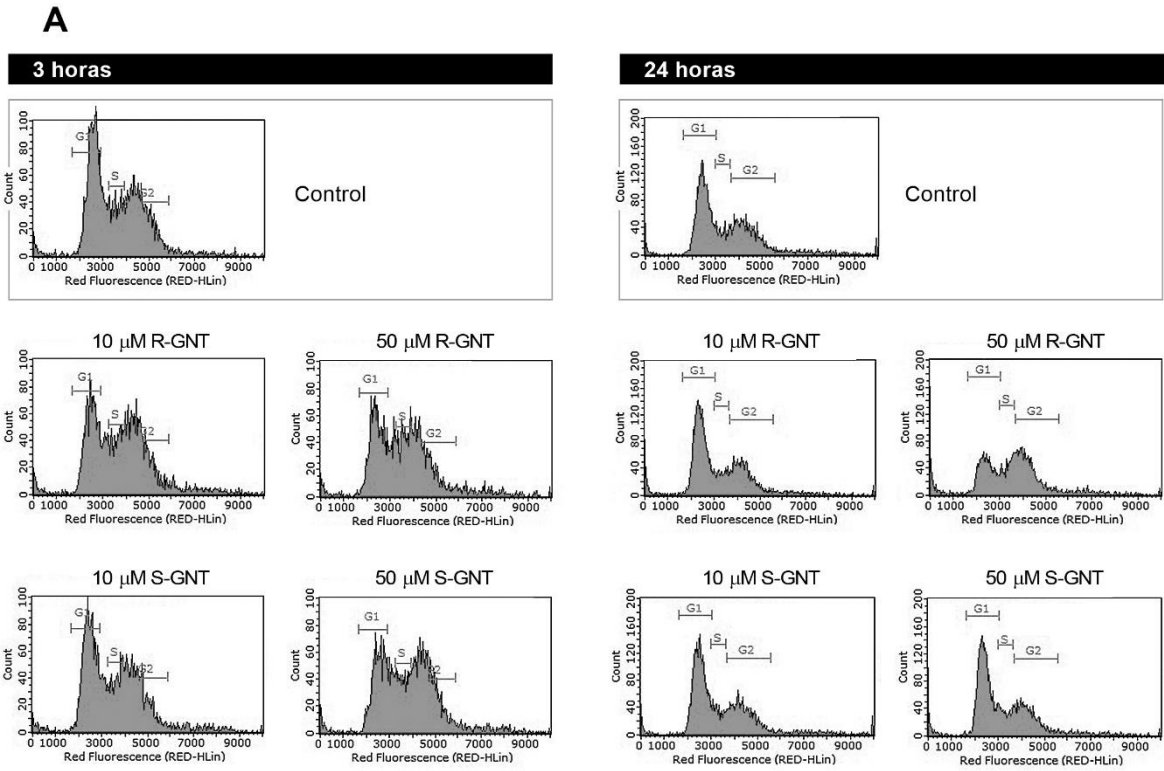


## MCF-7

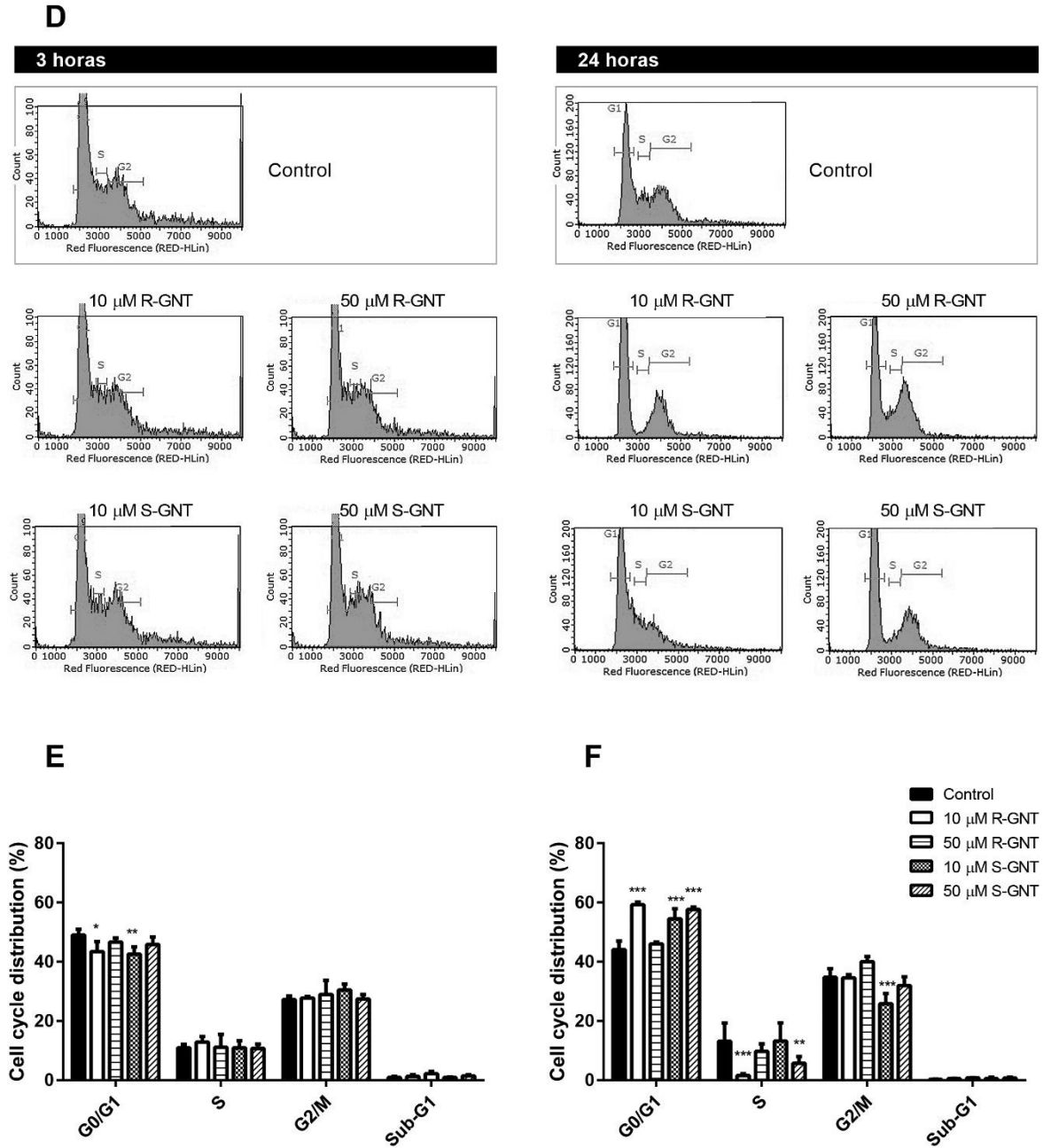


**Fig. 3.** Real-time monitoring of HB4a and MCF-7 cells obtained using the xCELLigence system demonstrating the kinetics of cell growth after exposure to R-GNT and S-GNT (1, 10, 20, 30, 40, 50 and 100  $\mu$ M). (A) Growth curves of HB4a cells exposed to R-GNT and (B) S-GNT. (C) Photomicrograph of HB4a cells after treatment with R-GNT and S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) for 3, 6, 24 and 48 h. (D) Growth curves of MCF-7 cells exposed to R-GNT and (E) S-GNT. (F) Photomicrograph of MCF-7 cells after treatment with R-GNT and S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) for 3, 6, 24 and 48 h (460x magnification). The results are presented as the means of three replicates with standard error bars.

# HB4a



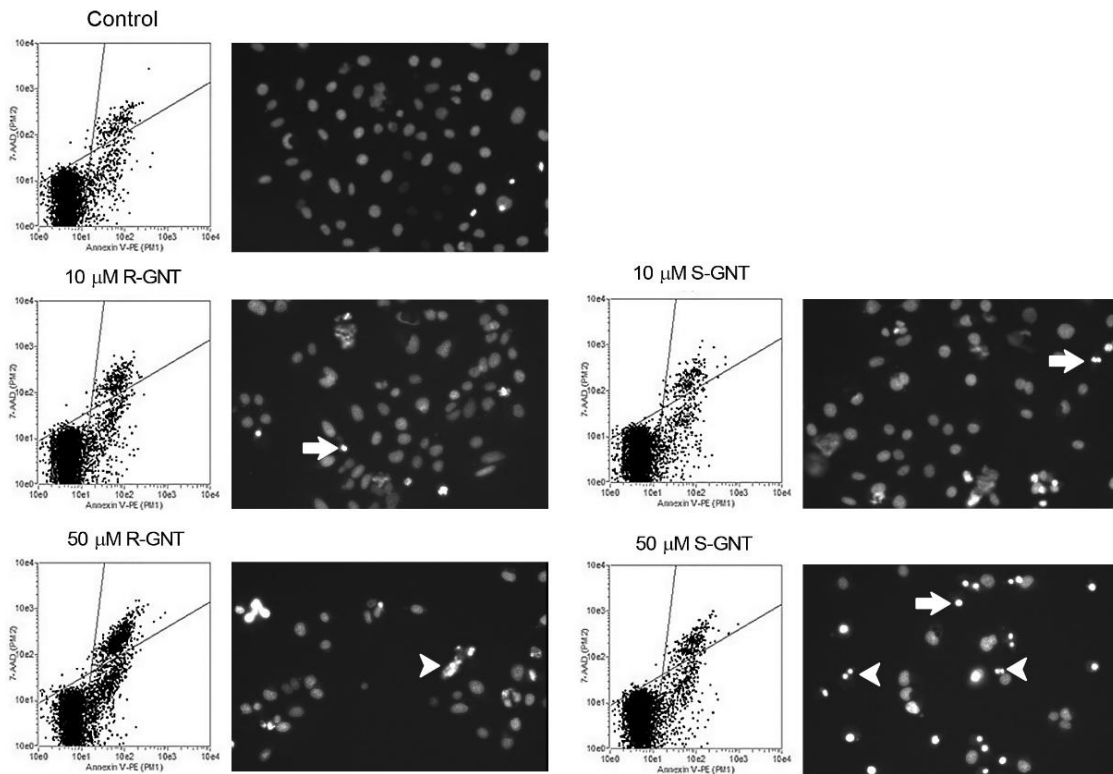
## MCF-7



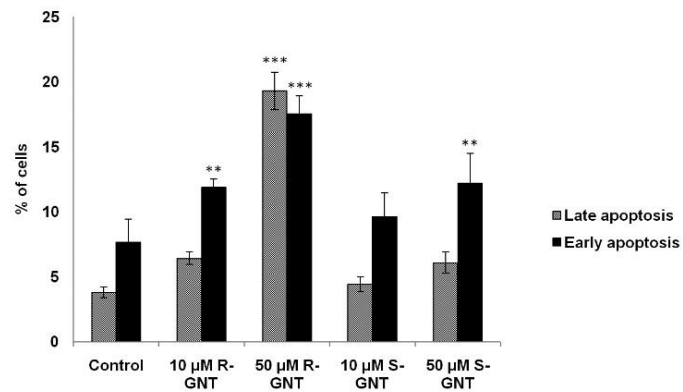
**Fig. 4.** Cell cycle analysis (G0/G1, S, G2/M and subG1) of HB4a and MCF-7 cells after exposure to R and S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) by flow cytometry using propidium iodide labeling. (A) Representative histograms indicate the number of cells (vertical axis) vs. DNA content (horizontal axis) after 3 and 24 h of treatment of HB4a cells with R and S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M). (B) HB4a cell cycle distribution after 3 h of exposure to R and S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) and (C) after 24 h. (D) Representative histograms depict the number of cells (vertical axis) vs. DNA content (horizontal axis) after 3 and 24 h of treatment of MCF-7 cells with R and S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M). (E) MCF-7 cell cycle distribution after 3 h of exposure to R and S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) and (F) after 24 h. Results are presented as the mean  $\pm$  SD of three experiments. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  relative to control using ANOVA followed by Dunnett.

# HB4a

## A

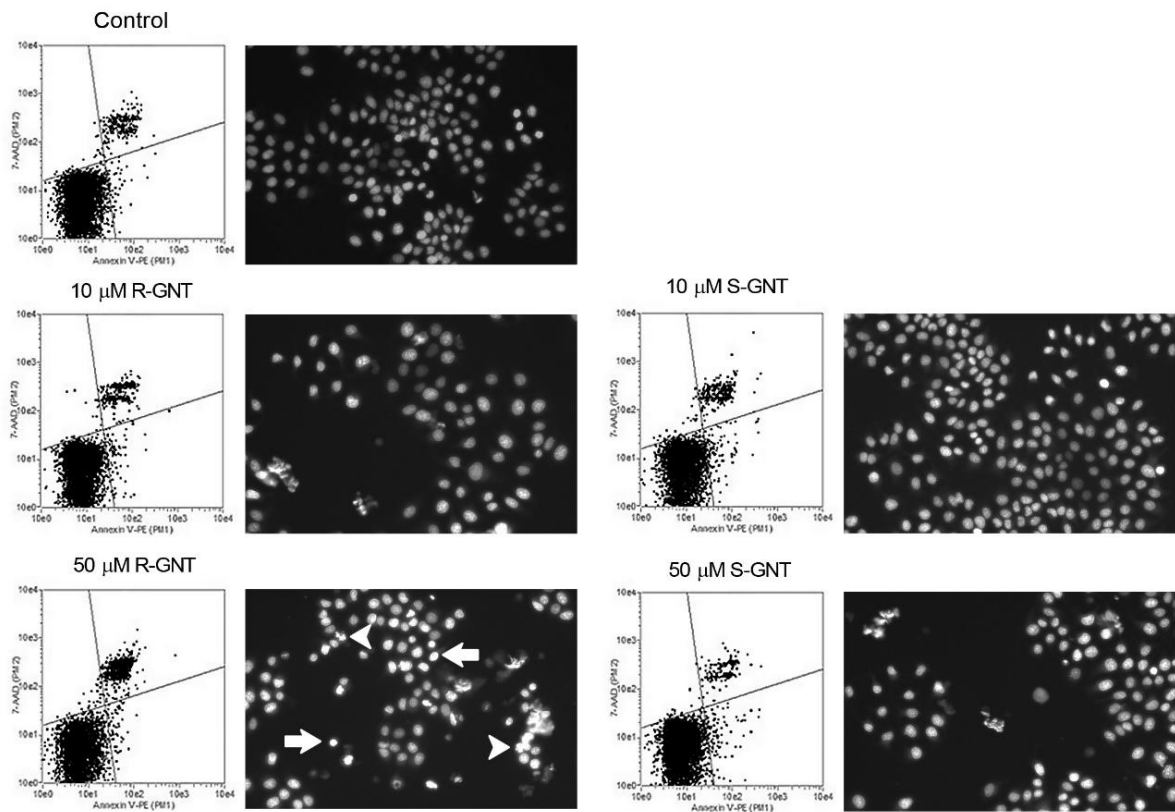


## B

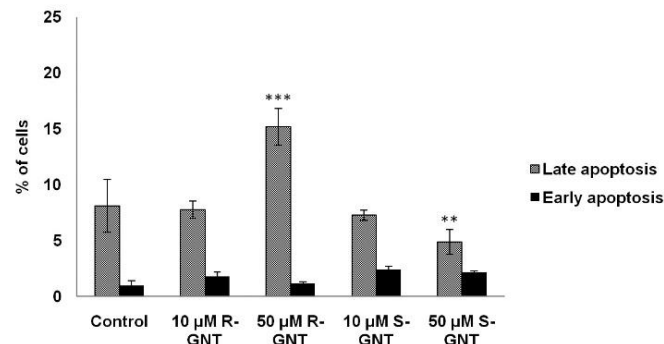


# MCF-7

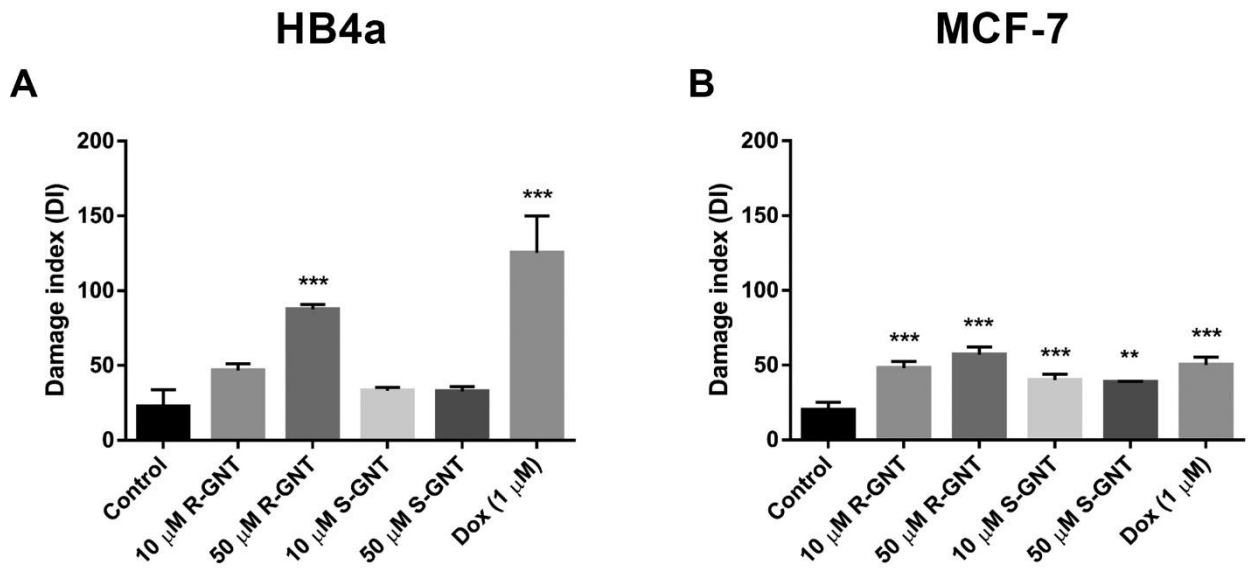
C



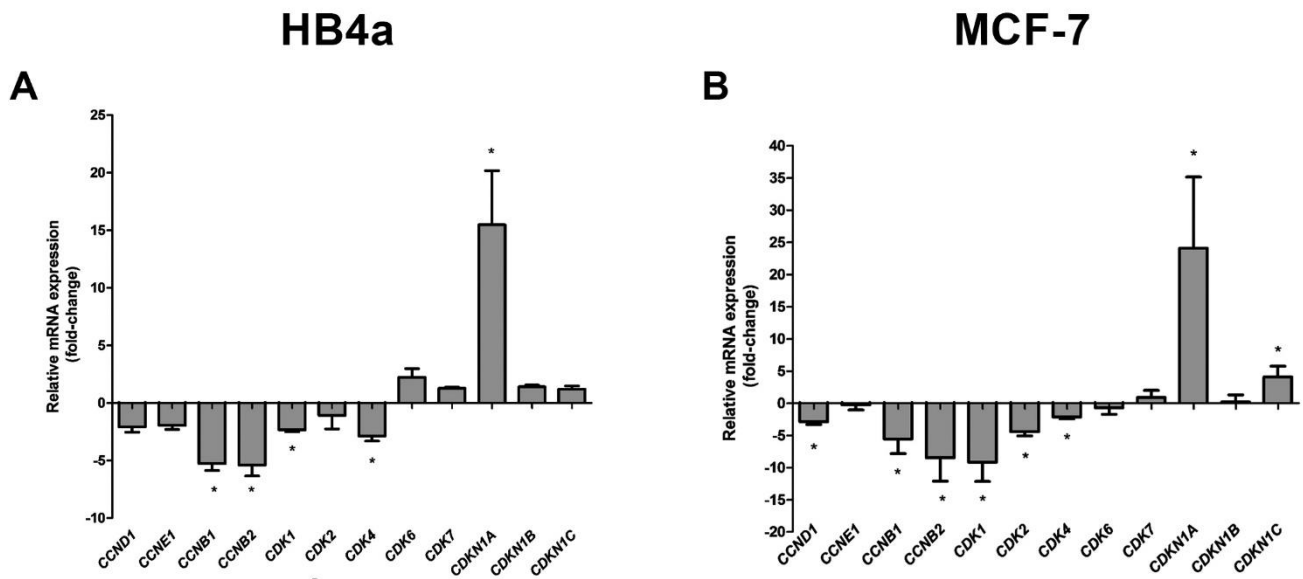
D



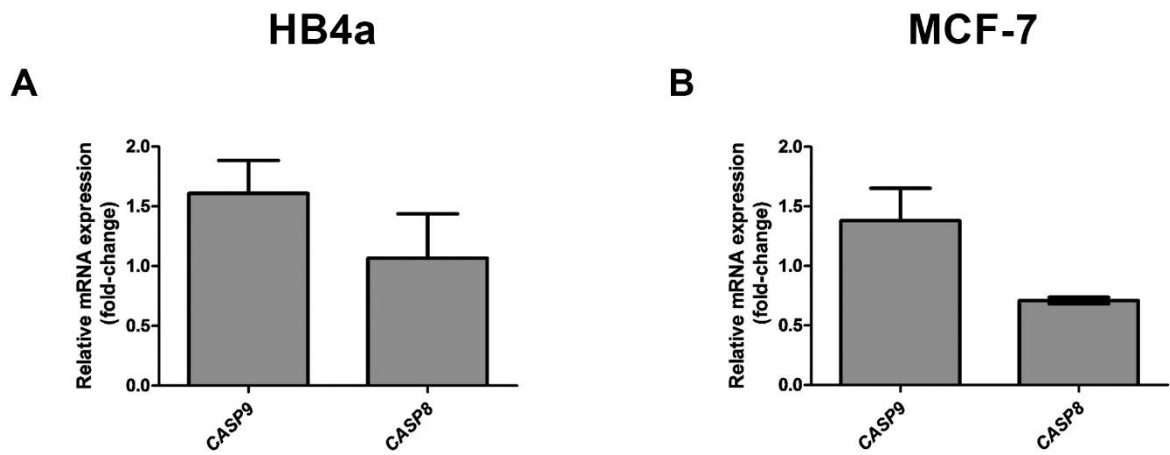
**Fig. 5.** Effects of R-GNT and S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M) on apoptosis induction. The apoptosis analysis was performed by flow cytometry using Annexin V-PE (AV) and 7-amino-actinomycin D (7-AAD), and the events were classified into three cell populations: viable cells (AV-/7-AAD-), early apoptotic cells (AV+/7-AAD-), and late stage apoptotic and dead cells (AV+/7-AAD+). (A) Representative graphs of quantification of annexin V (AV) and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) staining and photomicrographs showing morphology and the staining with Hoechst 33342 of HB4a cells. (B) Percentage of HB4a cells in early and late apoptosis after 24 h of treatment with R-GNT and S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M). (C) Representative graphs of quantification of annexin V (AV) and 7-amino-actinomycin D (7-AAD) staining and photomicrographs showing morphology and the staining with Hoechst 33342 of MCF-7 cells. (D) Percentage of MCF-7 cells in early and late apoptosis after 24 h of treatment with R-GNT and S-GNT (10  $\mu$ M and 50  $\mu$ M). Results are mean  $\pm$  SD of three experiments. \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001 compared to control using ANOVA followed by Dunnett. Arrow indicates cells with condensed chromatin and arrowhead indicates the apoptotic bodies (Magnification = 460x).



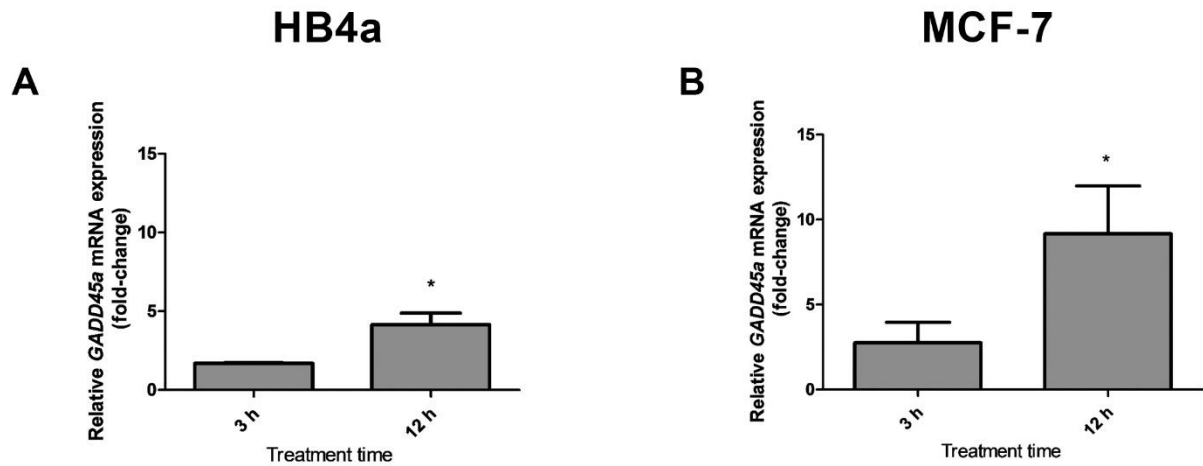
**Fig. 6.** Evaluation of the damage index (DI) after 3 h of exposure of HB4a and MCF-7 cells to R-GNT and S-GNT (10 μM and 50 μM) measured using the Comet Assay. (A) Damage Index (DI) in HB4a and (B) MCF-7 cells. Data are presented as the mean  $\pm$  SD of three experiments. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  relative to the control group using ANOVA followed by Dunnett.



**Fig. 7.** RT-qPCR analysis of genes involved in cell cycle regulation. Graphs shown the relative gene expression (fold-change) of cyclins, CDKs and CKIs genes in (A) HB4a and (B) MCF-7 cells after 12h of exposure to R-GNT 50  $\mu$ M. The relative expression of each target gene was normalized with the reference genes Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) and ribosomal protein L13a (*RPL13A*). Data are expressed as fold changes relative to control group in three experiments (mean  $\pm$  SEM). Statistical differences compared to control are indicated by \* (REST 2009 software  $\text{\textcircled{R}}$ ).



**Fig. 8.** RT-qPCR analysis of genes involved apoptosis pathway. Graphs shown the relative gene expression (fold-change) of *CASP9* and *CASP8* in (A) HB4a and (B) MCF-7 cells after 12h of exposure to R-GNT 50  $\mu$ M. The relative expression of each target gene was normalized with the reference genes Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Data are expressed as fold changes relative to control group in three experiments (mean  $\pm$  SEM). Statistical differences compared to Control are indicated by \* (REST 2009 software  $\text{\textcircled{R}}$ ).



**Fig. 9.** RT-qPCR analysis of Growth Arrest and DNA Damage (Gadd) 45a gene (*GADD45a*). Graphs shown the relative gene expression (fold-change in (A) HB4a and (B) MCF-7 cells after 3 h and 12 h of exposure to R-GNT 50  $\mu$ M. The relative expression of target gene was normalized with the reference genes Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*). Data are expressed as fold changes relative to control group in three experiments (mean  $\pm$  SEM). Statistical differences compared to Control are indicated by \* (REST 2009 software  $\text{\textcircled{R}}$ ).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Evidências obtidas em experimentos *in vitro* e *in vivo* apontam que a goniotalamina pode ter papel terapêutico no tratamento do câncer devido à sua potente atividade antiproliferativa contra inúmeras linhagens tumorais e também à sua atividade antitumoral *in vivo*. No presente estudo, observamos que a GNT exerce sua atividade antiproliferativa de forma dependente da dose e do tempo contra as linhagens mamárias tumoral MCF-7 e não-tumoral HB4a. A forma natural, R-GNT, se mostrou mais efetiva em causar citotoxicidade e inibir o crescimento celular do que o enantiômero sintético, S-GNT.

A investigação dos mecanismos de ação dessas moléculas mostrou que a atividade antiproliferativa da R-GNT é, em parte, resultado do bloqueio no ciclo celular nas fases G1 e G2/M em resposta aos danos genotóxicos. Além da atividade citostática, a R-GNT também exerceu atividade citotóxica às células através da indução de morte celular por apoptose. A S-GNT também induziu o bloqueio na fase G1 do ciclo celular e causou genotoxicidade às células MCF-7. Por outro lado, a S-GNT não induziu genotoxicidade às células não-tumorais HB4a.

A análise da expressão gênica de componentes regulatórios da maquinaria do ciclo celular demonstrou que a inibição da progressão do ciclo causada pela R-GNT foi mediada pela regulação positiva dos inibidores de quinase (CKIs) da família CIP/KIP e de *GADD45a* e pela regulação negativa de ciclinas e CDKs. A hiperativação de reguladores positivos do ciclo celular e a inativação dos inibidores é frequente nas neoplasias humanas e contribui para a proliferação celular fora do controle. Sendo assim, drogas que, assim como a goniotalamina, atuem causando a inibição dos reguladores positivos, tais como ciclinas e CDKs, e a ativação dos inibidores, como as CKIs, são bons alvos para a terapêutica anticâncer. Novos estudos poderão contribuir para a compreensão do papel da GNT como um possível inibidor da atividade das proteínas quinases e fosfatases reguladoras do ciclo celular.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, T.; DUTTA, A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400-414, 2009.

ADAMS, J. M.; CORY, S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. **Curr Opin Immunol**, v. 19, n. 5, p. 488-496, 2007.

AJCC, A. J. C. O. C. **AJCC Cancer Staging Manual**. New York: Springer Verlag, 2002

AL-QUBAISI, M.; ROZITA, R.; YEAP, S. K.; OMAR, A. R.; ALI, A. M.; ALITHEEN, N. B. Selective cytotoxicity of goniothalamine against hepatoblastoma HepG2 cells. **Molecules**, v. 16, n. 4, p. 2944-2959, 2011.

ALABSI, A. M.; ALI, R.; ALI, A. M.; AL-DUBAI, S. A.; HARUN, H.; ABU KASIM, N. H.; ALSALAH, A. Apoptosis induction, cell cycle arrest and in vitro anticancer activity of goniothalamine in a cancer cell lines. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 13, n. 10, p. 5131-5136, 2012.

ALABSI, A. M.; ALI, R.; ALI, A. M.; HARUN, H.; AL-DUBAI, S. A.; GANASEGERAN, K.; ALSHAGGA, M. A.; SALEM, S. D.; ABU KASIM, N. H. Induction of caspase-9, biochemical assessment and morphological changes caused by apoptosis in cancer cells treated with goniothalamine extracted from *Goniothalamus macrophyllus*. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 11, p. 6273-6280, 2013.

BALMAIN, A.; GRAY, J.; PONDER, B. The genetics and genomics of cancer. **Nat Genet**, v. 33 Suppl, n., p. 238-244, 2003.

BARCELOS, R. C.; PASTRE, J. C.; VENDRAMINI-COSTA, D. B.; CAIXETA, V.; LONGATO, G. B.; MONTEIRO, P. A.; DE CARVALHO, J. E.; PILLI, R. A. Design and Synthesis of N-Acylated Aza-Goniothalamine Derivatives and Evaluation of Their in vitro and in vivo Antitumor Activity. **ChemMedChem**, v. 9, n. 12, p. 2725-2743, 2014a.

BARCELOS, R. C.; PELIZZARO-ROCHA, K. J.; PASTRE, J. C.; DIAS, M. P.; FERREIRA-HALDER, C. V.; PILLI, R. A. A new goniothalamine N-acylated aza-derivative strongly downregulates mediators of signaling transduction associated with pancreatic cancer aggressiveness. **Eur J Med Chem**, v. 87, n., p. 745-758, 2014b.

BOUCARD, V.; GARANCE, B.; CAMPAGNE, J. M. Synthetic Approaches to  $\alpha,\beta$ -Unsaturated  $\delta$ -Lactones and Lactols. **Eur. J. Org. Chem.**, v., n., p. 225-236, 2007.

BUCK, S. B.; HARDOUIN, C.; ICHIKAWA, S.; SOENEN, D. R.; GAUSS, C. M.; HWANG, I.; SWINGLE, M. R.; BONNESS, K. M.; HONKANEN, R. E.; BOGER, D. L. Fundamental role of the fostriecin unsaturated lactone and implications for selective protein phosphatase inhibition. **J Am Chem Soc**, v. 125, n. 51, p. 15694-15695, 2003.

CANCER GENOME ATLAS, N. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, 2012.

CATSBURG, C.; MILLER, A. B.; ROHAN, T. E. Active cigarette smoking and risk of breast cancer. **Int J Cancer**, v., n., p., 2014.

CHAN, K. M.; RAJAB, N. F.; ISHAK, M. H.; ALI, A. M.; YUSOFF, K.; DIN, L. B.; INAYAT-HUSSAIN, S. H. Goniothalamine induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. **Chem Biol Interact**, v. 159, n. 2, p. 129-140, 2006.

CHAN, K. M.; RAJAB, N. F.; SIEGEL, D.; DIN, L. B.; ROSS, D.; INAYAT-HUSSAIN, S. H. Goniiothalamine induces coronary artery smooth muscle cells apoptosis: the p53-dependent caspase-2 activation pathway. **Toxicol Sci**, v. 116, n. 2, p. 533-548, 2010.

CHEN, W. Y.; WU, C. C.; LAN, Y. H.; CHANG, F. R.; TENG, C. M.; WU, Y. C. Goniiothalamine induces cell cycle-specific apoptosis by modulating the redox status in MDA-MB-231 cells. **Eur J Pharmacol**, v. 522, n. 1-3, p. 20-29, 2005.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. DNA-damaging agents in cancer chemotherapy: serendipity and chemical biology. **Chem Biol**, v. 20, n. 5, p. 648-659, 2013.

CHIU, C. C.; LIU, P. L.; HUANG, K. J.; WANG, H. M.; CHANG, K. F.; CHOU, C. K.; CHANG, F. R.; CHONG, I. W.; FANG, K.; CHEN, J. S.; CHANG, H. W.; WU, Y. C. Goniiothalamine inhibits growth of human lung cancer cells through DNA damage, apoptosis, and reduced migration ability. **J Agric Food Chem**, v. 59, n. 8, p. 4288-4293, 2011.

COHEN, S. M.; ELLWEIN, L. B. Genetic errors, cell proliferation, and carcinogenesis. **Cancer Res**, v. 51, n. 24, p. 6493-6505, 1991.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST, C. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. **Lancet**, v. 358, n. 9291, p. 1389-1399, 2001.

COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST, C. Menarche, menopause, and breast cancer risk: individual participant meta-analysis, including 118 964 women with breast cancer from 117 epidemiological studies. **Lancet Oncol**, v. 13, n. 11, p. 1141-1151, 2012.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DE FATIMA, A.; KOHN, L. K.; ANTONIO, M. A.; DE CARVALHO, J. E.; PILLI, R. A. (R)-Goniiothalamine: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines. **Bioorg Med Chem**, v. 13, n. 8, p. 2927-2933, 2005.

DE FATIMA, A.; MARQUISSOLO, C.; DE ALBUQUERQUE, S.; CARRARO-ABRAHAO, A. A.; PILLI, R. A. Trypanocidal activity of 5,6-dihydropyran-2-ones against free trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. **Eur J Med Chem**, v. 41, n. 10, p. 1210-1213, 2006.

DE FATIMA, A.; ZAMBUZZI, W. F.; MODOLO, L. V.; TARSITANO, C. A.; GADELHA, F. R.; HYSLOP, S.; DE CARVALHO, J. E.; SALGADO, I.; FERREIRA, C. V.; PILLI, R. A. Cytotoxicity of goniiothalamine enantiomers in renal cancer cells: involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy. **Chem Biol Interact**, v. 176, n. 2-3, p. 143-150, 2008.

DE FATIMA, A.; MARTINS, C. V. B.; RESENDE, M. A.; MAGALHAES, T. F. F.; LIMA, B. H. S.; WATANABE, G. A.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; PILLI, R. A. Antifungal Activity of Goniiothalamine Enantiomers. **Letters in Drug Design & Discovery**, v. 5, n. 1, p. 74-88, 2008.

DEVITA, V. T., JR.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. **Cancer Res**, v. 68, n. 21, p. 8643-8653, 2008.

DIPAOLA, R. S. To arrest or not to G(2)-M Cell-cycle arrest : commentary re: A. K. Tyagi et al., Silibinin strongly synergizes human prostate carcinoma DU145 cells to doxorubicin-

induced growth inhibition, G(2)-M arrest, and apoptosis. *Clin. cancer res.*, 8: 3512-3519, 2002. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 11, p. 3311-3314, 2002.

DOS SANTOS, M. L.; PALANCH, C. G.; SALAORNI, S.; DA SILVA, W. A., JR.; NAGAI, M. A. Transcriptome characterization of human mammary cell lines expressing different levels of ERBB2 by serial analysis of gene expression. **Int J Oncol**, v. 28, n. 6, p. 1441-1461, 2006.

DUMITRESCU, L.; MAI HUONG, D. T.; VAN HUNG, N.; CROUSSE, B.; BONNET-DELPON, D. Synthesis and cytotoxic activity of fluorinated analogues of Goniiothalamus lactones. Impact of fluorine on oxidative processes. **Eur J Med Chem**, v. 45, n. 7, p. 3213-3218, 2010.

EROLE, P.; BOSCH, A.; PEREZ-FIDALGO, J. A.; LLUCH, A. Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 6, p. 698-707, 2012.

FATIMA, A.; KOHN, L. K.; CARVALHO, J. E.; PILLI, R. A. Cytotoxic activity of (S)-goniothalamine and analogues against human cancer cells. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 3, p. 622-631, 2006.

FULDA, S.; DEBATIN, K. M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798-4811, 2006.

GHATGE, M.; PALANIAPPAN, N.; DAS CHOUDHURI, S.; REYNOLDS, K. Genetic manipulation of the biosynthetic process leading to phoslactomycins, potent protein phosphatase 2A inhibitors. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v. 33, n. 7, p. 589-599, 2006.

GIT, A.; SPITERI, I.; BLENKIRON, C.; DUNNING, M. J.; POLE, J. C.; CHIN, S. F.; WANG, Y.; SMITH, J.; LIVESEY, F. J.; CALDAS, C. PMC42, a breast progenitor cancer cell line, has normal-like mRNA and microRNA transcriptomes. **Breast Cancer Res**, v. 10, n. 3, p. R54, 2008.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **J Pathol**, v. 221, n. 1, p. 3-12, 2010.

HAMAJIMA, N.; HIROSE, K.; TAJIMA, K.; ROHAN, T.; CALLE, E. E.; HEATH, C. W., JR.; COATES, R. J.; LIFF, J. M.; TALAMINI, R.; CHANTARAKUL, N.; KOETSAWANG, S.; RACHAWAT, D.; MORABIA, A.; SCHUMAN, L.; STEWART, W.; SZKLO, M.; BAIN, C.; SCHOFIELD, F.; SISKIND, V.; BAND, P.; COLDMAN, A. J.; GALLAGHER, R. P.; HISLOP, T. G.; YANG, P.; KOLONEL, L. M.; NOMURA, A. M.; HU, J.; JOHNSON, K. C.; MAO, Y.; DE SANJOSE, S.; LEE, N.; MARCHBANKS, P.; ORY, H. W.; PETERSON, H. B.; WILSON, H. G.; WINGO, P. A.; EBELING, K.; KUNDE, D.; NISHAN, P.; HOPPER, J. L.; COLDITZ, G.; GAJALANSKI, V.; MARTIN, N.; PARDTHAISONG, T.; SILPISORNKOSOL, S.; THEETRANONT, C.; BOOSIRI, B.; CHUTIVONGSE, S.; JIMAKORN, P.; VIRUTAMASEN, P.; WONGSRICHANALAI, C.; EWERTZ, M.; ADAMI, H. O.; BERGKVIST, L.; MAGNUSSON, C.; PERSSON, I.; CHANG-CLAUDE, J.; PAUL, C.; SKEGG, D. C.; SPEARS, G. F.; BOYLE, P.; EVSTIFEEVA, T.; DALING, J. R.; HUTCHINSON, W. B.; MALONE, K.; NOONAN, E. A.; STANFORD, J. L.; THOMAS, D. B.; WEISS, N. S.; WHITE, E.; ANDRIEU, N.; BREMOND, A.; CLAVEL, F.; GAIRARD, B.; LANSAC, J.; PIANA, L.; RENAUD, R.; IZQUIERDO, A.; VILADIU, P.; CUEVAS, H. R.; ONTIVEROS, P.; PALET, A.; SALAZAR, S. B.; ARISTIZABEL, N.; CUADROS, A.; TRYGGVADOTTIR, L.; TULINIUS, H.; BACHELOT, A.; LE, M. G.; PETO, J.; FRANCESCHI, S.; LUBIN, F.; MODAN, B.; RON, E.; WAX, Y.; FRIEDMAN, G. D.; HIATT, R. A.; LEVI, F.; BISHOP, T.; KOSMELJ, K.; PRIMIC-ZAKELJ, M.; RAVNIHAR, B.; STARE, J.; BEESON, W. L.; FRASER, G.; BULLBROOK, R. D.; CUZICK, J.; DUFFY, S. W.; FENTIMAN, I. S.; HAYWARD, J. L.; WANG, D. Y.; MCMICHAEL, A. J.; MCPHERSON, K.; HANSON, R. L.; LESKE, M. C.; MAHONEY, M. C.; NASCA, P. C.; VARMA, A. O.; WEINSTEIN, A. L.;

MOLLER, T. R.; OLSSON, H.; RANSTAM, J.; GOLDBOHRM, R. A.; VAN DEN BRANDT, P. A.; APELO, R. A.; BAENS, J.; DE LA CRUZ, J. R.; JAVIER, B.; LACAYA, L. B.; NGELANGEL, C. A.; LA VECCHIA, C.; NEGRI, E.; MARUBINI, E.; FERRARONI, M.; GERBER, M.; RICHARDSON, S.; SEGALA, C.; GATEI, D.; KENYA, P.; KUNGU, A.; MATI, J. G.; BRINTON, L. A.; HOOVER, R.; SCHAIRER, C.; SPIRTAS, R.; LEE, H. P.; ROOKUS, M. A.; VAN LEEUWEN, F. E.; SCHOENBERG, J. A.; MCCREDIE, M.; GAMMON, M. D.; CLARKE, E. A.; JONES, L.; NEIL, A.; VESSEY, M.; YEATES, D.; APPLEBY, P.; BANKS, E.; BERAL, V.; BULL, D.; CROSSLEY, B.; GOODILL, A.; GREEN, J.; HERMON, C.; KEY, T.; LANGSTON, N.; LEWIS, C.; REEVES, G.; COLLINS, R.; DOLL, R.; PETO, R.; MABUCHI, K.; PRESTON, D.; HANNAFORD, P.; KAY, C.; ROSERO-BIXBY, L.; GAO, Y. T.; JIN, F.; YUAN, J. M.; WEI, H. Y.; YUN, T.; ZHIHENG, C.; BERRY, G.; COOPER BOOTH, J.; JELIHOVSKY, T.; MACLENNAN, R.; SHEARMAN, R.; WANG, Q. S.; BAINES, C. J.; MILLER, A. B.; WALL, C.; LUND, E.; STALSBERG, H.; SHU, X. O.; ZHENG, W.; KATSOUYANNI, K.; TRICHOPOULOU, A.; TRICHOPOULOS, D.; DABANCENS, A.; MARTINEZ, L.; MOLINA, R.; SALAS, O.; ALEXANDER, F. E.; ANDERSON, K.; FOLSOM, A. R.; HULKA, B. S.; BERNSTEIN, L.; ENGER, S.; HAILE, R. W.; PAGANINI-HILL, A.; PIKE, M. C.; ROSS, R. K.; URSIN, G.; YU, M. C.; LONGNECKER, M. P.; NEWCOMB, P.; BERGKVIST, L.; KALACHE, A.; FARLEY, T. M.; HOLCK, S.; MEIRIK, O.; COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST, C. Alcohol, tobacco and breast cancer--collaborative reanalysis of individual data from 53 epidemiological studies, including 58,515 women with breast cancer and 95,067 women without the disease. **Br J Cancer**, v. 87, n. 11, p. 1234-1245, 2002.

HANAHAAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARIKUMAR, B.; VARGHESE, H. T.; PANICKER, C. Y.; JAYAKUMAR, G. Vibrational spectroscopic studies and ab initio calculations of Goniiothalamine, a natural product. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 71, n. 2, p. 731-738, 2008.

HARSH, P.; O'DOHERTY, G. A. De Novo Asymmetric Syntheses of (+)-Goniiothalamine, (+)-Goniiothalamine oxide and 7,8-Bis-epi-Goniiothalamine using Asymmetric Allylations. **Tetrahedron**, v. 65, n. 26, p. 5051-5055, 2009.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HLUBUCEK, J. R.; ROBERTSON, A. V. (+)-(5S)- $\delta$ -Lactone of 5-Hydroxy-7-phenylhepta-2,6-dienoic acid, a Natural Product from *Cryptocarya caloneura*. **Aust. J. Chem.**, v. 20, n., p. 2199-2206, 1967.

HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 11, p. 910-916, 2008.

HOLLIDAY, D. L.; SPEIRS, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Res**, v. 13, n. 4, p. 215, 2011.

HUERTA, S.; GOULET, E. J.; HUERTA-YEPEZ, S.; LIVINGSTON, E. H. Screening and detection of apoptosis. **J Surg Res**, v. 139, n. 1, p. 143-156, 2007.

INAYAT-HUSSAIN, S. H.; OSMAN, A. B.; DIN, L. B.; ALI, A. M.; SNOWDEN, R. T.; MACFARLANE, M.; CAIN, K. Caspases-3 and -7 are activated in goniiothalamine-induced apoptosis in human Jurkat T-cells. **FEBS Lett**, v. 456, n. 3, p. 379-383, 1999.

INAYAT-HUSSAIN, S. H.; ANNUAR, B. O.; DIN, L. B.; ALI, A. M.; ROSS, D. Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniotalamin in HL-60 leukemia cells. **Toxicol In Vitro**, v. 17, n. 4, p. 433-439, 2003.

INAYAT-HUSSAIN, S. H.; WONG, L. T.; CHAN, K. M.; RAJAB, N. F.; DIN, L. B.; HARUN, R.; KIZILORS, A.; SAXENA, N.; MOURTADA-MAARABOUNI, M.; FARZANEH, F.; WILLIAMS, G. T. RACK-1 overexpression protects against goniotalamin-induced cell death. **Toxicol Lett**, v. 191, n. 2-3, p. 118-122, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: Incidência do Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

JEWERS, K.; DAVIS, J. B.; DOUGAN, J.; MANCHANDA, A. H.; BLUNDEN, G.; AYE, K. Goniotalamin and its distribution in four Goniotalamus species. **Phytochemistry**, v. 11, n., p. 2025-2030, 1972.

JIN, Z.; EL-DEIRY, W. S. Overview of cell death signaling pathways. **Cancer Biol Ther**, v. 4, n. 2, p. 139-163, 2005.

KASAPLAR, P.; YILMAZER, O.; CAGIR, A. 6-Bicycloaryl substituted (S)- and (R)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones: asymmetric synthesis, and anti-proliferative properties. **Bioorg Med Chem**, v. 17, n. 1, p. 311-318, 2009.

KASAPLAR, P.; CAKMAK, O. Y.; CAGIR, A. Michael acceptor properties of 6-bicycloaryl substituted (R)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-ones. **Bioorg Chem**, v. 38, n. 5, p. 186-189, 2010.

KUO, K. K.; CHEN, Y. L.; CHEN, L. R.; LI, C. F.; LAN, Y. H.; CHANG, F. R.; WU, Y. C.; SHIUE, Y. L. Involvement of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 in goniotalamin-induced TP53-dependent and -independent apoptosis in hepatocellular carcinoma-derived cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 256, n. 1, p. 8-23, 2011.

LEE, J.; KIM, J. A.; BARBIER, V.; FOTEDAR, A.; FOTEDAR, R. DNA damage triggers p21WAF1-dependent Emi1 down-regulation that maintains G2 arrest. **Mol Biol Cell**, v. 20, n. 7, p. 1891-1902, 2009.

LEE, S. M.; LEE, W. G.; KIM, Y. C.; KO, H. Synthesis and biological evaluation of alpha,beta-unsaturated lactones as potent immunosuppressive agents. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 21, n. 19, p. 5726-5729, 2011.

LEVINE, B.; SINHA, S.; KROEMER, G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy. **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 600-606, 2008.

LEWY, D. S.; GAUSS, C. M.; SOENEN, D. R.; BOGER, D. L. Fostriecin: chemistry and biology. **Curr Med Chem**, v. 9, n. 22, p. 2005-2032, 2002.

LOLLI, G.; JOHNSON, L. N. CAK-Cyclin-dependent Activating Kinase: a key kinase in cell cycle control and a target for drugs? **Cell Cycle**, v. 4, n. 4, p. 572-577, 2005.

LUTHI, A. U.; MARTIN, S. J. The CASBAH: a searchable database of caspase substrates. **Cell Death Differ**, v. 14, n. 4, p. 641-650, 2007.

MALHOTRA, G. K.; ZHAO, X.; BAND, H.; BAND, V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biol Ther**, v. 10, n. 10, p. 955-960, 2010.

- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends Biochem Sci**, v. 30, n. 11, p. 630-641, 2005.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nat Rev Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-166, 2009.
- MARQUISSOLO, C.; DE FATIMA, A.; KOHN, L. K.; RUIZ, A. L.; DE CARVALHO, J. E.; PILLI, R. A. Asymmetric total synthesis and antiproliferative activity of goniothalamine oxide isomers. **Bioorg Chem**, v. 37, n. 2, p. 52-56, 2009.
- MARTINS, C. V.; DE RESENDE, M. A.; DA SILVA, D. L.; MAGALHAES, T. F.; MODOLO, L. V.; PILLI, R. A.; DE FATIMA, A. In vitro studies of anticandidal activity of goniothalamine enantiomers. **J Appl Microbiol**, v. 107, n. 4, p. 1279-1286, 2009.
- MASSAGUE, J. G1 cell-cycle control and cancer. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 298-306, 2004.
- MOHD RIDZUAN, M. A.; RUENRUETAI, U.; NOOR RAIN, A.; KHOZIRAH, S.; ZAKIAH, I. Antimalarial properties of Goniothalamine in combination with chloroquine against Plasmodium yoelii and Plasmodium berghei growth in mice. **Trop Biomed**, v. 23, n. 2, p. 140-146, 2006.
- MOHIDEEN, M.; ZULKEPLI, S.; NIK-SALLEH, N. S.; ZULKEFELI, M.; WEBER, J. F.; RAHMAN, A. F. Design, synthesis, in vitro cytotoxicity evaluation and structure-activity relationship of goniothalamine analogs. **Arch Pharm Res**, v. 36, n. 7, p. 812-831, 2013.
- MOSADDIK, M. A.; HAQUE, M. E. Cytotoxicity and antimicrobial activity of goniothalamine isolated from Bryonopsis laciniosa. **Phytother Res**, v. 17, n. 10, p. 1155-1157, 2003.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.
- NIGG, E. A. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 2, n. 1, p. 21-32, 2001.
- ORLIKOVA, B.; SCHUMACHER, M.; JUNCKER, T.; YAN, C. C.; INAYAT-HUSSAIN, S. H.; HAJJOULI, S.; CERELLA, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Styryl-lactone goniothalamine inhibits TNF-alpha-induced NF-kappaB activation. **Food Chem Toxicol**, v. 59, n., p. 572-578, 2013.
- PERRY, J. A.; KORNBLUTH, S. Cdc25 and Wee1: analogous opposites? **Cell Div**, v. 2, n., p. 12, 2007.
- PETSOPHONSAKUL, P.; POMPIMON, W.; BANJERDPONGCHAI, R. Apoptosis induction in human leukemic promyelocytic HL-60 and monocytic U937 cell lines by goniothalamine. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 5, p. 2885-2889, 2013.
- PIHIE, A. H.; STANSLAS, J.; DIN, L. B. Non-steroid receptor-mediated antiproliferative activity of styrylpyrone derivative in human breast cancer cell lines. **Anticancer Res**, v. 18, n. 3A, p. 1739-1743, 1998.
- RAJAB, N. F.; ZARIYANTEY, A. H.; HASSAN, H.; ALI, A. M.; DIN, L. B.; INAYAT-HUSSAIN, S. H. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of goniothalamine in leukemic cell lines. **Environ. Mutagen. Res.**, v. 27, n., p. 161-164, 2005.
- REED, J. C. Apoptosis-based therapies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 1, n. 2, p. 111-121, 2002.

- RIEDL, S. J.; SHI, Y. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 5, n. 11, p. 897-907, 2004.
- ROUSSEL, M. F. The INK4 family of cell cycle inhibitors in cancer. **Oncogene**, v. 18, n. 38, p. 5311-5317, 1999.
- RUMBLE, J. M.; DUCKETT, C. S. Diverse functions within the IAP family. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 21, p. 3505-3507, 2008.
- SEMPREBON, S. C.; DE FATIMA, A.; LEPRI, S. R.; SARTORI, D.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. (S)-Goniothalamine induces DNA damage, apoptosis, and decrease in BIRC5 messenger RNA levels in NCI-H460 cells. **Hum Exp Toxicol**, v. 33, n. 1, p. 3-13, 2014.
- SENTHIL-NATHAN, S.; CHOI, M. Y.; PAIK, C. H.; KALAIVANI, K. The toxicity and physiological effect of goniothalamine, a styryl-pyrone, on the generalist herbivore, *Spodoptera exigua* Hubner. **Chemosphere**, v. 72, n. 9, p. 1393-1400, 2008.
- SHERR, C. J.; ROBERTS, J. M. Living with or without cyclins and cyclin-dependent kinases. **Genes Dev**, v. 18, n. 22, p. 2699-2711, 2004.
- SOULE, H. D.; VAZGUEZ, J.; LONG, A.; ALBERT, S.; BRENNAN, M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 51, n. 5, p. 1409-1416, 1973.
- STAMPS, A. C.; DAVIES, S. C.; BURMAN, J.; O'HARE, M. J. Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. **Int J Cancer**, v. 57, n. 6, p. 865-874, 1994.
- STOREY, S. Targeting apoptosis: selected anticancer strategies. **Nat Rev Drug Discov**, v. 7, n. 12, p. 971-972, 2008.
- STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v. 458, n. 7239, p. 719-724, 2009.
- SUBIK, K.; LEE, J. F.; BAXTER, L.; STRZEPEK, T.; COSTELLO, D.; CROWLEY, P.; XING, L.; HUNG, M. C.; BONFIGLIO, T.; HICKS, D. G.; TANG, P. The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. **Breast Cancer (Auckl)**, v. 4, n., p. 35-41, 2010.
- SURYADINATA, R.; SADOWSKI, M.; SARCEVIC, B. Control of cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinase (CDK) substrates. **Biosci Rep**, v. 30, n. 4, p. 243-255, 2010.
- TAYLOR, R. C.; CULLEN, S. P.; MARTIN, S. J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 3, p. 231-241, 2008.
- THEOBALD, B.; BONNESS, K.; MUSIYENKO, A.; ANDREWS, J. F.; URBAN, G.; HUANG, X.; DEAN, N. M.; HONKANEN, R. E. Suppression of Ser/Thr phosphatase 4 (PP4C/PPP4C) mimics a novel post-mitotic action of fostriecin, producing mitotic slippage followed by tetraploid cell death. **Mol Cancer Res**, v. 11, n. 8, p. 845-855, 2013.
- THOMPSON, C. L.; OWUSU, C.; NOCK, N. L.; LI, L.; BERGER, N. A. Race, age, and obesity disparities in adult physical activity levels in breast cancer patients and controls. **Front Public Health**, v. 2, n., p. 150, 2014.

- TIAN, Z.; CHEN, S.; ZHANG, Y.; HUANG, M.; SHI, L.; HUANG, F.; FONG, C.; YANG, M.; XIAO, P. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. **Phytomedicine**, v. 13, n. 3, p. 181-186, 2006.
- TOOKMAN, L.; ROYLANCE, R. New drugs for breast cancer. **Br Med Bull**, v. 96, n., p. 111-129, 2010.
- TRIMARCHI, J. M.; LEES, J. A. Sibling rivalry in the E2F family. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 3, n. 1, p. 11-20, 2002.
- TUCKER, G. T. Chiral switches. **Lancet**, v. 355, n. 9209, p. 1085-1087, 2000.
- UMAR-TSAFE, N.; MOHAMED-SAID, M. S.; ROSLI, R.; DIN, L. B.; LAI, L. C. Genotoxicity of goniiothalamine in CHO cell line. **Mutat Res**, v. 562, n. 1-2, p. 91-102, 2004.
- VENDRAMINI-COSTA, D. B.; DE CASTRO, I. B.; RUIZ, A. L.; MARQUISSOLO, C.; PILLI, R. A.; DE CARVALHO, J. E. Effect of goniiothalamine on the development of Ehrlich solid tumor in mice. **Bioorg Med Chem**, v. 18, n. 18, p. 6742-6747, 2010.
- WATTANAPIROMSAKUL, C.; WANGSINTAWEEKUL, B.; SANGPRAPAN, P.; ITHARAT, A.; KEAWPRADUB, N. Goniiothalamine, a cytotoxic compound, isolated from *Goniiothalamus macrophyllus* (Blume) Hook. f. & Thomson var. *macrophyllus*. **Songklanakarinn J. Sci. Technol**, v. 27, n., p. 479-487, 2005.
- WHO, W. H. O.-. GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence Mortality and Prevalence Worldwide in 2012., v., n., p., 2012.
- WIART, C. *Goniiothalamus* species: a source of drugs for the treatment of cancers and bacterial infections? **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 4, n. 3, p. 299-311, 2007.
- WIDSCHWENDTER, M.; JONES, P. A. The potential prognostic, predictive, and therapeutic values of DNA methylation in cancer. Commentary re: J. Kwong et al., Promoter hypermethylation of multiple genes in nasopharyngeal carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, 8: 131-137, 2002, and H-Z. Zou et al., Detection of aberrant p16 methylation in the serum of colorectal cancer patients. *Clin. Cancer Res.*, 8: 188-191, 2002. **Clin Cancer Res**, v. 8, n. 1, p. 17-21, 2002.
- WILLIS, S.; DAY, C. L.; HINDS, M. G.; HUANG, D. C. The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. **J Cell Sci**, v. 116, n. Pt 20, p. 4053-4056, 2003.
- WOO, R. A.; POON, R. Y. Cyclin-dependent kinases and S phase control in mammalian cells. **Cell Cycle**, v. 2, n. 4, p. 316-324, 2003.
- YE, Z. W.; ZHANG, J.; TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochim Biophys Acta**, v., n., p., 2014.
- YEN, C. Y.; CHIU, C. C.; HAUNG, R. W.; YEH, C. C.; HUANG, K. J.; CHANG, K. F.; HSEU, Y. C.; CHANG, F. R.; CHANG, H. W.; WU, Y. C. Antiproliferative effects of goniiothalamine on Ca9-22 oral cancer cells through apoptosis, DNA damage and ROS induction. **Mutat Res**, v. 747, n. 2, p. 253-258, 2012.
- YEN, H. K.; FAUZI, A. R.; DIN, L. B.; MCKELVEY-MARTIN, V. J.; MENG, C. K.; INAYAT-HUSSAIN, S. H.; RAJAB, N. F. Involvement of Seladin-1 in goniiothalamine-induced apoptosis in urinary bladder cancer cells. **BMC Complement Altern Med**, v. 14, n., p. 295, 2014.

YOKOTA, J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 497-503, 2000.

ZHOU, F. S.; TANG, W. D.; MU, Q.; YANG, G. X.; WANG, Y.; LIANG, G. L.; LOU, L. G. Semisynthesis and antitumor activities of new styryl-lactone derivatives. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 53, n. 11, p. 1387-1391, 2005.

## APÊNDICE

Tabela 1 - Média  $\pm$  Desvio Padrão das absorbâncias obtidas no ensaio de citotoxicidade MTT, após 24 e 48 horas de exposição à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT).

Tratamentos	Média $\pm$ Desvio Padrão							
	HB4a				MCF-7			
	24 horas		48 horas		24 horas		48 horas	
<b>Controle</b>	0,713 $\pm$ 0,0063		0,7912 $\pm$ 0,048		1,516 $\pm$ 0,13		1,496 $\pm$ 0,114	
<b>Doxorrubicina (1 <math>\mu</math>M)</b>	0,444 $\pm$ 0,048	***	0,271 $\pm$ 0,042	***	1,021 $\pm$ 0,074	***	0,1673 $\pm$ 0,018	***
<b>R-GNT 150 <math>\mu</math>M</b>	0,1529 $\pm$ 0,067	***	0,1096 $\pm$ 0,043	***	0,2171 $\pm$ 0,083	***	0,1069 $\pm$ 0,027	***
<b>R-GNT 100 <math>\mu</math>M</b>	0,1547 $\pm$ 0,036	***	0,1132 $\pm$ 0,024	***	0,6612 $\pm$ 0,049	***	0,309 $\pm$ 0,073	***
<b>R-GNT 50 <math>\mu</math>M</b>	0,4009 $\pm$ 0,041	***	0,1954 $\pm$ 0,03	***	1,07 $\pm$ 0,102	***	0,8946 $\pm$ 0,057	***
<b>R-GNT 40 <math>\mu</math>M</b>	0,4137 $\pm$ 0,042	***	0,3122 $\pm$ 0,022	***	1,156 $\pm$ 0,046	***	0,9588 $\pm$ 0,103	***
<b>R-GNT 30 <math>\mu</math>M</b>	0,4593 $\pm$ 0,032	***	0,3504 $\pm$ 0,019	***	1,178 $\pm$ 0,091	***	1,041 $\pm$ 0,093	***
<b>R-GNT 20 <math>\mu</math>M</b>	0,5237 $\pm$ 0,12	***	0,4037 $\pm$ 0,039	***	1,273 $\pm$ 0,052	***	1,123 $\pm$ 0,088	***
<b>R-GNT 10 <math>\mu</math>M</b>	0,5247 $\pm$ 0,036	***	0,4656 $\pm$ 0,027	***	1,352 $\pm$ 0,075	**	1,297 $\pm$ 0,076	***
<b>R-GNT 1 <math>\mu</math>M</b>	0,5512 $\pm$ 0,016	***	0,6666 $\pm$ 0,043	***	1,434 $\pm$ 0,117	ns	1,483 $\pm$ 0,112	ns
<b>S-GNT 150 <math>\mu</math>M</b>	0,1862 $\pm$ 0,041	***	0,1001 $\pm$ 0,033	***	0,932 $\pm$ 0,134	***	0,9056 $\pm$ 0,11	***
<b>S-GNT 100 <math>\mu</math>M</b>	0,1673 $\pm$ 0,039	***	0,08189 $\pm$ 0,025	***	1,113 $\pm$ 0,077	***	1,112 $\pm$ 0,064	***
<b>S-GNT 50 <math>\mu</math>M</b>	0,5352 $\pm$ 0,092	***	0,5774 $\pm$ 0,024	***	1,236 $\pm$ 0,118	***	1,302 $\pm$ 0,095	**
<b>S-GNT 40 <math>\mu</math>M</b>	0,6151 $\pm$ 0,072	*	0,5861 $\pm$ 0,03	***	1,262 $\pm$ 0,117	***	1,334 $\pm$ 0,106	*
<b>S-GNT 30 <math>\mu</math>M</b>	0,649 $\pm$ 0,073	ns	0,6036 $\pm$ 0,03	***	1,312 $\pm$ 0,093	**	1,306 $\pm$ 0,146	**
<b>S-GNT 20 <math>\mu</math>M</b>	0,6189 $\pm$ 0,037	*	0,6362 $\pm$ 0,06	***	1,319 $\pm$ 0,097	**	1,262 $\pm$ 0,157	***
<b>S-GNT 10 <math>\mu</math>M</b>	0,6071 $\pm$ 0,068	**	0,6726 $\pm$ 0,066	***	1,302 $\pm$ 0,087	***	1,36 $\pm$ 0,063	ns
<b>S-GNT 1 <math>\mu</math>M</b>	0,6371 $\pm$ 0,058	ns	0,7913 $\pm$ 0,07	ns	1,343 $\pm$ 0,131	*	1,46 $\pm$ 0,102	ns

A tabela apresenta os valores correspondentes à Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) das absorbâncias de três experimentos realizados em triplicata. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  comparado ao controle através da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett. A Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Tabela 2 - Média  $\pm$  Desvio Padrão das porcentagens de células HB4a nas fases G0/G1, S, G2/M e sub-G1 obtidas na análise do ciclo celular por citometria de fluxo após 3 e 24 horas de exposição à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT).

Tratamentos	Média $\pm$ Desvio Padrão (%)			
	G0/G1	S	G2/M	Sub-G1
<b>3 horas</b>				
Controle	38,8833 $\pm$ 5,69	12,43841 $\pm$ 2,47	38,98053 $\pm$ 5,30	2,77112 $\pm$ 0,53
R-GNT 10 $\mu$ M	30,148 $\pm$ 2,27 *	14,6118 $\pm$ 3,84	43,87097 $\pm$ 3,48	3,072113 $\pm$ 0,17
R-GNT 50 $\mu$ M	31,37822 $\pm$ 1,62 *	12,26283 $\pm$ 0,28	43,4047 $\pm$ 3,32	2,96988 $\pm$ 0,49
S-GNT 10 $\mu$ M	39,64147 $\pm$ 4,37	12,85068 $\pm$ 6,78	37,39167 $\pm$ 4,41	2,691043 $\pm$ 0,46
S-GNT 50 $\mu$ M	30,00667 $\pm$ 2,67 *	15,06283 $\pm$ 1,53	42,33693 $\pm$ 5,13	3,157583 $\pm$ 0,49
<b>24 horas</b>				
Controle	46,55733 $\pm$ 0,53	8,45635 $\pm$ 2,71	35,43267 $\pm$ 2,97	2,82746 $\pm$ 0,09
R-GNT 10 $\mu$ M	46,89013 $\pm$ 3,83	8,995817 $\pm$ 2,19	31,15257 $\pm$ 4,01	5,933403 $\pm$ 0,84
R-GNT 50 $\mu$ M	24,2228 $\pm$ 1,38 ***	9,045917 $\pm$ 1,09	48,29673 $\pm$ 3,04 ***	7,025237 $\pm$ 1,03
S-GNT 10 $\mu$ M	46,66963 $\pm$ 1,38	9,409639 $\pm$ 2,53	34,1142 $\pm$ 0,93	3,63562 $\pm$ 0,49
S-GNT 50 $\mu$ M	45,1118 $\pm$ 0,94	10,92652 $\pm$ 2,16	32,4884 $\pm$ 4,57	5,258483 $\pm$ 0,78

A tabela apresenta os valores correspondentes à Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) das porcentagens de células de três experimentos. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  comparado ao controle através da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett.

Tabela 3 - Média  $\pm$  Desvio Padrão das porcentagens de células MCF-7 nas fases G0/G1, S, G2/M e sub-G1 obtidas na análise do ciclo celular por citometria de fluxo após 3 e 24 horas de exposição à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT).

Tratamentos	Média $\pm$ Desvio Padrão			
	G0/G1	S	G2/M	Sub-G1
<b>3 horas</b>				
Controle	49,0258 $\pm$ 1,96	10,96435 $\pm$ 1,21	27,25203 $\pm$ 1,17	0,993316 $\pm$ 0,3
R-GNT 10 $\mu$ M	43,44213 $\pm$ 3,36 *	12,92437 $\pm$ 1,83	27,7383 $\pm$ 0,58	1,300383 $\pm$ 0,65
R-GNT 50 $\mu$ M	46,61873 $\pm$ 1,43	11,19913 $\pm$ 4,29	28,95487 $\pm$ 4,74	2,225167 $\pm$ 0,83
S-GNT 10 $\mu$ M	42,5617 $\pm$ 2,44 **	10,99995 $\pm$ 2,36	30,48473 $\pm$ 2,04	0,944362 $\pm$ 0,24
S-GNT 50 $\mu$ M	45,85137 $\pm$ 2,53	10,78112 $\pm$ 1,45	27,4633 $\pm$ 1,49	1,505787 $\pm$ 0,42
<b>24 horas</b>				
Controle	44,10394 $\pm$ 2,85	13,17 $\pm$ 6,12	34,75743 $\pm$ 2,93	0,3225613 $\pm$ 0,09
R-GNT 10 $\mu$ M	59,2359 $\pm$ 0,93 ***	1,66583 $\pm$ 0,53 ***	34,59993 $\pm$ 1,06	0,5669453 $\pm$ 0,09
R-GNT 50 $\mu$ M	46,05917 $\pm$ 0,58	9,799586 $\pm$ 2,48	40,03963 $\pm$ 1,75	0,8566816 $\pm$ 0,025
S-GNT 10 $\mu$ M	54,50637 $\pm$ 3,41 ***	13,20384 $\pm$ 6,19	25,8534 $\pm$ 3,47 ***	0,5689877 $\pm$ 0,45
S-GNT 50 $\mu$ M	57,6304 $\pm$ 0,78 ***	5,75856 $\pm$ 2,28 **	31,97097 $\pm$ 2,96	0,742752 $\pm$ 0,31

A tabela apresenta os valores correspondentes à Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) das porcentagens de células de três experimentos. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  comparado ao controle através da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett.

Tabela 4 - Média  $\pm$  Desvio Padrão do número de células HB4a viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia obtidas pelo ensaio da anexina V/7AAD por citometria de fluxo após 24 horas de exposição à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT).

Tratamentos	Média $\pm$ Desvio Padrão		
	Viáveis	Apoptose inicial	Apoptose tardia
Controle	4391 $\pm$ 87,07	384,3333 $\pm$ 78,13	191,6667 $\pm$ 20,5
R-GNT 10 $\mu$ M	4053,333 $\pm$ 30,0 ***	594 $\pm$ 26,85 **	322 $\pm$ 22,5
R-GNT 50 $\mu$ M	3133,667 $\pm$ 68,12 ***	878,6667 $\pm$ 106,68 ***	964 $\pm$ 72,81 ***
S-GNT 10 $\mu$ M	4267,333 $\pm$ 88,94	483,3333 $\pm$ 65,55	222 $\pm$ 29,10
S-GNT 50 $\mu$ M	4052 $\pm$ 113,02 ***	614,3333 $\pm$ 80,26 **	306 $\pm$ 39,66

A tabela apresenta os valores correspondentes à Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) de três experimentos. \* p<0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p<0.001 comparado ao controle através da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett.

Tabela 5 - Média  $\pm$  Desvio Padrão do número de células MCF-7 viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia obtidas pelo ensaio da anexina V/7AAD por citometria de fluxo após 24 horas de exposição à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT)

Tratamentos	Média $\pm$ Desvio Padrão		
	Viáveis	Apoptose inicial	Apoptose tardia
Controle	4509 $\pm$ 117,43	50 $\pm$ 22	405 $\pm$ 116,25
R-GNT 10 $\mu$ M	4473 $\pm$ 58,66	90,33334 $\pm$ 19,85	388,3333 $\pm$ 36,56
R-GNT 50 $\mu$ M	4159,667 $\pm$ 85,23 ***	56,66667 $\pm$ 7,77	756,6667 $\pm$ 81,86 ***
S-GNT 10 $\mu$ M	4482,667 $\pm$ 50,56	119,6667 $\pm$ 14,64	364,6667 $\pm$ 23,03
S-GNT 50 $\mu$ M	4630 $\pm$ 49	109 $\pm$ 6,24	243 $\pm$ 53,11 **

A tabela apresenta os valores correspondentes à Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) de três experimentos. \* p<0.05, \*\* p <0.01, \*\*\* p<0.001 comparado ao controle através da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett.

Tabela 6 - Média  $\pm$  Desvio Padrão do índice de danos (ID) obtido através do ensaio do cometa após 3 horas de exposição das células HB4a à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT).

<b>Tratamentos</b>	<b>Índice de danos (ID)</b>
	<b>Média <math>\pm</math> Desvio Padrão</b>
<b>Controle</b>	28,7 $\pm$ 13,52
<b>R-GNT 10 <math>\mu</math>M</b>	46,67 $\pm$ 3,21
<b>R-GNT 50 <math>\mu</math>M</b>	79,33 $\pm$ 12,22 ***
<b>S-GNT 10 <math>\mu</math>M</b>	32,67 $\pm$ 13,5
<b>S-GNT 50 <math>\mu</math>M</b>	14,00 $\pm$ 5,57
<b>Dox 1 <math>\mu</math>M</b>	125,33 $\pm$ 24,83 ***

A tabela apresenta os valores correspondentes à Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) de três experimentos.

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  comparado ao controle através da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett.

Tabela 7 - Média  $\pm$  Desvio Padrão do índice de danos (ID) obtido através do ensaio do cometa após 3 horas de exposição das células MCF-7 à (R)-goniotalamina (R-GNT) e (S)-Goniotalamina (S-GNT).

Tratamentos	Índice de danos (ID)
	Média $\pm$ Desvio Padrão
<b>Controle</b>	20 $\pm$ 5,29
<b>R-GNT 10 <math>\mu</math>M</b>	48 $\pm$ 4,58 ***
<b>R-GNT 50 <math>\mu</math>M</b>	57 $\pm$ 5,19 ***
<b>S-GNT 10 <math>\mu</math>M</b>	40 $\pm$ 4,00 **
<b>S-GNT 50 <math>\mu</math>M</b>	38,67 $\pm$ 0,57 ***
<b>Dox 1 <math>\mu</math>M</b>	50,33 $\pm$ 5,03 ***

A tabela apresenta os valores correspondentes à Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) de três experimentos. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  comparado ao controle através da Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett.

Tabela 8 - Eficiência, erro padrão e valores de expressão relativa obtidos através do experimento de RT-qPCR após 12 h de exposição das células HB4a à R-GNT (50 µM).

Gene	Eficiência da reação	Expressão relativa	Erro padrão	P(H1)	Resultado
<i>GAPDH</i>	2,00	1,046			
<i>RPL13A</i>	2,00	0,956			
<i>CCND1</i>	1,94	0,502	0,311 - 0,805	0	
<i>CCNE1</i>	2,00	0,535	0,398 - 0,717	0	
<i>CCNB1</i>	2,00	0,192	0,137 - 0,258	0	DOWN-REGULATED
<i>CCNB2</i>	2,00	0,192	0,148 - 0,269	0	DOWN-REGULATED
<i>CDK1</i>	1,98	0,431	0,296 - 0,603	0	DOWN-REGULATED
<i>CDK2</i>	1,93	0,643	0,372 - 1,119	0,038	
<i>CDK4</i>	1,99	0,355	0,266 - 0,472	0	DOWN-REGULATED
<i>CDK6</i>	1,97	1,952	0,886 - 4,909	0,025	
<i>CDK7</i>	1,98	1,252	0,926 - 1,624	0,038	
<i>CDKN1A</i>	1,95	14,232	9,130 - 21,743	0	UP-REGULATED
<i>CDKN1B</i>	1,97	1,391	1,021 - 1,815	0,005	
<i>CDKN1C</i>	1,97	1,132	0,763 - 1,544	0,368	
<i>GADD45a</i> (3 horas)	1,84	1,438	1,247 - 1,727	0	
<i>GADD45a</i> (12 horas)	1,84	4,736	3,430 - 7,823	0	UP-REGULATED
<i>CASP9</i>	2,00	1,557	1,073 - 2,190	0,147	
<i>CASP8</i>	2,00	0,954	0,465 - 2,684	0,949	

Os dados são apresentados como a média da expressão relativa e erro padrão de três experimentos. Os resultados foram obtidos através da comparação entre o grupo tratado em relação ao grupo controle através do software REST 2009 ® e considerando a expressão relativa acima de 2 como *up-regulation* e abaixo de 0,5 como *down-regulation*.

Tabela 9 - Eficiência, erro padrão e valores de expressão relativa obtidos através do experimento de RT-qPCR após 12 h de exposição das células MCF-7 à R-GNT (50  $\mu$ M).

Gene	Eficiência da reação	Expressão relativa	Erro padrão	P(H1)	Resultado
<i>GAPDH</i>	2,00	1,187			
<i>RPL13A</i>	2,00	0,842			
<i>CCNB1</i>	2,00	0,221	0,123 - 0,463	0	DOWN-REGULATED
<i>CCNB2</i>	2,00	0,149	0,080 - 0,383	0	DOWN-REGULATED
<i>CCND1</i>	1,96	0,359	0,274 - 0,520	0	DOWN-REGULATED
<i>CCNE1</i>	1,96	1,085	0,844 - 1,391	0,375	
<i>CDK1</i>	2,00	0,120	0,076 - 0,183	0	DOWN-REGULATED
<i>CDK2</i>	1,92	0,231	0,093 - 0,496	0	DOWN-REGULATED
<i>CDK4</i>	2,00	0,478	0,386 - 0,618	0	DOWN-REGULATED
<i>CDK6</i>	1,96	0,776	0,541 - 1,665	0,656	
<i>CDK7</i>	2,00	1,418	0,962 - 2,395	0,027	
<i>CDKN1A</i>	1,94	19,731	10,842 - 41,979	0	UP-REGULATED
<i>CDKN1B</i>	1,96	0,936	0,543 - 1,558	0,742	
<i>CDKN1C</i>	1,96	3,495	1,792 - 7,504	0	UP-REGULATED
<i>GADD45a</i> (3 horas)	1,84	1,868	0,506 - 4,548	0,297	
<i>GADD45a</i> (12 horas)	1,84	9,014	5,201 - 14,408	0	UP-REGULATED
<i>CASP9</i>	2,00	1,320	0,969 - 1,654	0,197	
<i>CASP8</i>	2,00	0,708	0,600 - 0,804	0	

Os dados são apresentados como a média da expressão relativa e erro padrão de três experimentos. Os resultados foram obtidos através da comparação entre o grupo tratado em relação ao grupo controle através do software REST 2009 ® e considerando a expressão relativa acima de 2 como *up-regulation* e abaixo de 0,5 como *down-regulation*.