



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ADRIVANIO BARANOSKI

**"A PIPERLONGUMINA INDUZ AUMENTO DE EROS,
CAUSANDO DANOS AO DNA, PARADA DE CICLO
CELULAR E APOPTOSE EM CÉLULAS TUMORAIS E NÃO
TUMORAIS DE MAMA E PULMÃO"**

Londrina
2018



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agronômico do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Adrivanio Baranoski

" A Piperlongumina induz aumento de EROs, causando danos ao DNA, parada de ciclo celular e apoptose em células tumorais e não tumorais de mama e pulmão "

Londrina
2018

ADRIVANIO BARANOSKI

**" A PIPERLONGUMINA INDUZ AUMENTO DE EROS,
CAUSANDO DANOS AO DNA, PARADA DE CICLO
CELULAR E APOPTOSE EM CÉLULAS TUMORAIS E NÃO
TUMORAIS DE MAMA E PULMÃO"**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular - Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Baranoski, Adrivanio .

A Piperlongumina induz aumento de EROs, causando danos ao DNA, parada de ciclo celular e apoptose em células tumorais e não tumorais de mama e pulmão / Adrivanio Baranoski. - Londrina, 2018.
115 f.

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, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Estresse Oxidativo - Tese. 2. Proliferação Celular - Tese. 3. Danos ao DNA - Tese. 4. Ciclo Celular - Tese. I. Sérgio Mantovani, Mário. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

ADRIVANIO BARANOSKI

" A PIPERLONGUMINA INDUZ AUMENTO DE EROS, CAUSANDO DANOS AO DNA, PARADA DE CICLO CELULAR E APOPTOSE EM CÉLULAS TUMORAIS E NÃO TUMORAIS DE MAMA E PULMÃO"

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

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Veronica Elisa Pimenta Vicentini
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Prof. Dr. Edson Luis Maistro
Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - UNESP

Profa. Dra. Daniele Sartori
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Sandra Regina Lepri
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 13 de Abril de 2018.

ADRIVANIO BARANOSKI. **A Piperlongumina induz aumento de EROs, causando danos ao DNA, parada de ciclo celular e apoptose em células tumorais e não tumorais de mama e pulmão.** 115 p. Tese de Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2018.

RESUMO

As plantas são fontes de diversas moléculas que apresentam propriedades terapêuticas e destacam-se na busca por drogas quimioterápicas alvo-específicas e/ou seletivas. A Piperlongumina (PLN), um alcaloide derivado da *Piper longum* Linn, apresenta importantes propriedades biológicas, entre elas, a seletividade antiproliferativa para células tumorais. Neste trabalho, avaliou-se diferentes parâmetros como a citotoxicidade, danos a membrana celular, interferência na cinética de proliferação e ciclo celular, indução de apoptose, danos ao DNA, capacidade de gerar estresse oxidativo e o padrão de expressão de mRNA e proteínas relacionados a esses processos em células não tumorais e tumorais de mama (HB4a e MCF-7) e pulmão humano (IMR-90 e NCI-H460), também foram avaliados a capacidade de PLN e ela combinada com Olaparib (inibidor de PARP) em gerar quebras de fita dupla no DNA, além de seus mecanismos de ação em linhagens tumorais de pulmão P53 positiva e negativa. A PLN apresentou citotoxicidade para todas as linhagens com concentrações e tempos distintos. Induziu danos a membrana celular e reduziu a proliferação celular em todas as linhagens estudadas, com efeitos mais pronunciados em células não tumorais e P53 negativas. Ocasionalmente ocorreu retenção de ciclo celular na fase G2/M em todas as linhagens excetuando-se a linhagem não tumoral de pulmão, na qual observamos retenção em G1. Além disso, induziu estresse oxidativo nas linhagens de mama, IMR-90 e NCI-H460, danos ao DNA e apoptose, sendo o estresse oxidativo a possível causa dos danos encontrados nas linhagens de pulmão A549 (p53 +/+) e H1299 (p53 -/-). Em linhagens de mama, a PLN induziu aumento de expressão de mRNA relacionados a apoptose, danos ao DNA e estresse oxidativo e diminuiu a expressão de mRNA de genes relacionados ao ciclo celular e do gene *TP53*, não havendo mudança na quantidade desta proteína após 24 h na linhagem HB4a e ativação na linhagem MCF-7. Em nível proteico, a PLN induziu redução das proteínas Catalase, TRx1, PRx1 e ATR e aumento de p21 nestas linhagens, em MCF-7, as proteínas Chk1 e p53 apresentaram redução e aumento de regulação respectivamente. A ação antiproliferativa apresentada em ambas linhagens, principalmente HB4a, se deve pela capacidade de PLN em causar inibição de proteínas relacionadas a proteção contra estresse oxidativo, levando a geração de danos ao DNA, inibindo o ciclo celular. Nas linhagens de pulmão IMR-90, vários genes relacionados ao ciclo celular tiveram expressão reduzidas assim como *TP53*, nesta linha, a retenção de ciclo foi mediada pelo gene *CDKN1B*, um precursor da proteína p27 que controla a progressão do ciclo celular na fase G1. Em IMR-90 também encontramos a proteína SOD2 aumentada além de redução em TRx1. Desta maneira, as mudanças nos padrões de índice celular observados foram atribuíveis à prisão do ciclo celular e apoptose devido ao aumento do estresse oxidativo e danos no DNA. Foi evidenciado que a PLN causa quebras de fita dupla, principalmente em células P53 negativas suplementadas com 10% de soro bovino fetal (SBF), ao mesmo tempo, observamos que a PLN potencializou sua ação com o Olaparib, provavelmente devido a capacidade de suprimir mecanismos da recombinação homóloga. Estes resultados nos chama a atenção para os efeitos colaterais que a PLN pode causar nas células não tumorais, principalmente *in vivo*, visto que é descrita em muitos artigos como seletiva para células tumorais.

Palavras Chaves: Estresse Oxidativo. Olaparib. P53. *Piper Longum*.

ADRIVANO BARANOSKI. **Piperlongumina induces an increase in EROs, causing damage to DNA, cell-cycle stop and apoptosis in tumoral cells and non-tumor of breast and lung.** 115 p. Doctoral Thesis- Postgraduate Program in Genetics and Molecular Biology - Londrina State University, Londrina-PR, 2018.

ABSTRACT

Plants are sources of several molecules that present therapeutic properties and are highlighted in the search for target-specific and/or selective chemotherapy drugs. Piperlongumine (PLN), an alkaloid derived from *Piper longum* Linn, presents important biological properties, among them, antiproliferative selectivity for tumor cells. In this work, different parameters such as cytotoxicity, cell membrane damage, interference in the kinetics of proliferation and cell cycle, apoptosis induction, DNA damage, ability to generate oxidative stress and the pattern of expression of mRNA and proteins related to these processes in non-tumor and tumoral cells (HB4a and MCF-7) and human lung (IMR-90 and NCI-H460), also evaluated the capacity of PLN and it combined with Olaparib (PARP inhibitor) in generating dual tape breaks in the DNA, in addition to their action mechanisms in tumoral lung lineages positive and negative P53. PLN has presented cytotoxicity for all strains with distinct concentrations and times. It induced damage to the cell membrane and reduced cell proliferation in all the lineages studied, with more pronounced effects on non-tumor cells and negative P53. Occasioned cell cycle retention phase G2/M in all as lineages excepting no tumor cell line lung, in which we observe retention in G1. In addition, it induced oxidative stress in the breast, IMR-90 and NCI-H460 lineages, DNA and apoptosis damage, oxidative stress is the possible cause of the damage found in the pulmonary lineage A549 (p53 +/+) and H1299 (p53 -/-). In breast lineage, PLN induced increased expression of mRNA related to apoptosis, DNA damage and oxidative stress and decreased the mRNA expression of genes related to the cell cycle and the TP53 gene, there is no change in the amount of this protein after 24 h in the HB4a lineage and activation in the MCF-7 lineage. On a protein level, PLN induced a reduction in the proteins Catalase, TRx1, PRx1 and ATR and increase in p21 in these lineages, in MCF-7, the Chk1 and p53 proteins have reduced and increased regulation respectively. The antiproliferative action presented in both lineages, mainly HB4a, is due to the capacity of PLN in causing inhibition of proteins related to oxidative stress protection, leading to the generation of damage to DNA, inhibiting the cell cycle. In the IMR-90 lung cell line, several genes related to the cellular cycle had reduced expression as well as TP53, in this line, the cycle retention was mediated by the gene *CDKN1B*, a precursor of the p27 protein that controls the progression of the cell cycle in the G1 phase. In IMR-90 we also found the SOD2 protein increased in addition to a reduction in TRx1. In this way, changes in the observed cell index patterns were attributable to the arrest of the cell and apoptosis cycle due to increased oxidative stress and DNA damage. It was evidenced that PLN causes double-strand breaks, mainly in negative P53 supplemented cells with 10% fetal bovine serum (SBF), at the same time, we observe that PLN has enhanced its action with Olaparib, probably due to the ability to suppress mechanisms of homologous recombination. These results draw attention to the side effects that PLN can cause in non-tumor cells, especially *in vivo*, since it is described in many articles as selective for tumor cells.

Keywords: Oxidative Stress. Olaparib. P53. *Piper Longum*.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1.	Estrutura química da Piperlongumina.....	6
------------------	--	---

CAPÍTULO-1

Piperlongumina inibe a proliferação em células tumorais e não tumorais de mama por indução de estresse oxidativo levando a danos ao DNA e parada de ciclo celular

Figura 1.	Valores de Viabilidade Celular obtidos pelo ensaio do MTT após 24 h de tratamento para ambas linhagens de mama. IC50 das linhagens HB4a e MCF-7 estimados em 27,4 μ M e > 40 μ M respectivamente. (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$	27
Figura 2.	A contagem celular foi obtida por citometria de fluxo. a) contagem após 24 h de tratamento para as linhagens não tumoral (HB4a) e tumoral (MCF-7), (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$. b) Fotomicrografias das células após 24 h de tratamento com 0, 10 ou 20 μ M.....	28
Figura 3.	Perfil de índice celular em tempo real obtido pelo aparelho xCELLigence SP (ROCHE), e monitorada durante 72 h após o tratamento para as linhagens não tumoral (A) e tumoral (B). C + = 1 μ M de Camptotecina.	30
Figura 4.	Perfil de índice celular em tempo real obtido pelo aparelho xCELLigence SP (ROCHE), e monitorada durante 72 h após o tratamento para as linhagens não tumoral (A) e tumoral (B). C + = 1 μ M de Camptotecina. 5	31
Figura 5.	O percentual de morte celular por apoptose foi obtido por citometria de fluxo após 24 h de tratamento para as linhagens não tumoral (A) e tumoral (B). (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$	32
Figura 6.	Estimativa de geração de EROs por H ₂ DCFDA obtido por citometria de fluxo após 3 h. de tratamento para ambas linhagens	

	não tumoral (HB4a) e tumoral (MCF-7). (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$. 7.....	33
Figura 7.	Expressão relativas de genes relacionados a morte celular (a), danos ao DNA (b), estresse oxidativo (c), ciclo celular (b), autofagia (e) e estresse de reticulo (f) após tratamento com 10 μ M de PLN durante 12 h. (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$, e fator de expressão acima ou a baixo de 2 x.....	34
Figura 8.	Regulação de proteínas avaliadas por MagPix (Tecnologia Luminox). (a) Proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (SOD1, Catalase, SOD2, TRx1 e PRX2). (b) Proteínas relacionadas ao dano do DNA (ATR, Chk1, Chk2, p53, MDM2 e p21). "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$	35
 CAPÍTULO-2		
O tratamento de células pulmonares não tumorais e cancerosas com piperlongumina prende o ciclo celular, inibe a proliferação celular e induz apoptose, estresse oxidativo e dano ao DNA		
Figura 1.	Valores de viabilidade celular obtidos pelo teste MTT após 24 h de tratamento para ambas as linhagens celulares. IC50 de PLN para células IMR-90 e NCI-H460 foi estimado em 21,4 e 30,3 μ M, respectivamente. "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$. Curva de tendência: IMR-90, $R^2 = 0,9983$; NCI-H460, $R^2 = 0,9785$	58
Figura 2.	Concentrações celulares obtidas por citometria de fluxo após 24 h de tratamento para (a) IMR-90 e (b) NCI-H460; (c) micrografias de ambas as linhagens com os respectivos tratamentos. "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$	60
Figura 3.	O perfil de índice de células em tempo real foi obtido pelo aparelho xCELLigence SP (ROCHE) e monitorado por 72 h após o tratamento para ambas as linhagens [C +: 1 camptotecina 1 μ M].....	61
Figura 4.	O perfil do ciclo celular foi obtido por citometria de fluxo após 24 h de tratamento para ambas as cepas. "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$	62
Figura 5.	Geração estimada de ROS por H2DCFDA após 3 h de tratamento. "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$	64

Figura 6.	Expressão relativa de genes relacionados à morte celular (a), dano do DNA (b), estresse oxidativo (c) e ciclo celular (b) após o tratamento com PLN 10 μ M durante 12 h. "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$ e fator de expressão acima ou abaixo de 2 \times	65
Figura 7.	Regulação de proteínas avaliadas por MagPix (Tecnologia Luminex). (a) Proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (SOD1, Catalase, SOD2: TRx1 e PRX2). (b) Proteínas relacionadas ao dano do DNA (ATR, MDM2 e p21). "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$	66

CAPÍTULO-3

Piperlongumina potencializa citotoxicidade de Olaparib, causa retenção ode ciclo e danos ao DNA em células P53 positivas e negativas

Figura 1.	Integridade de Membrana. (*) - Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. (#) - Estatisticamente diferente em relação s PLN. ($p \leq 0,05$).....	86
Figura 2.	Ciclo celular foi obtido por citometria de fluxo após 12, 24, 36 e 48 h de tratamento para as linhagens a549 (a) e H1299 (b). (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$	87
Figura 3.	Quantificação de proteínas por Western Blot nas linhagens a549 e H1299 após 12, 24 e 48 h suplementadas com 0,5% ou 10% de SBF.....	89
Figura 4.	Determinação de formação de focos de 53BP1 e Gamma-H2Ax em células a549 suplementadas com 0,5% de SBF durante 12, 24, 36 e 48 h. (*) indica estatisticamente significativo em relação ao controle negativo $p \leq 0,05$. (#) indica estatisticamente significativo em relação a PLN $p \leq 0,05$	91
Figura 5.	Determinação de formação de focos de 53BP1 e Gamma-H2Ax em células a549 suplementadas com 10% de SBF durante 12, 24, 36 e 48 h. (*) indica estatisticamente significativo em relação ao controle negativo $p \leq 0,05$. (#) indica estatisticamente significativo em relação a PLN $p \leq 0,05$	93
Figura 6.	Determinação de formação de focos de 53BP1 e Gamma-H2Ax em células H1299 suplementadas com 0,5% de SBF durante 12, 24, 36	

	e 48 h. (*) indica estatisticamente significativo em relação ao controle negativo $p \leq 0,05$. (#) indica estatisticamente significativo em relação a PLN $p \leq 0,05$	94
Figura 7.	Determinação de formação de focos de 53BP1 e Gamma-H2Ax em células H1299 suplementadas com 10% de SBF durante 12, 24, 36 e 48 h. (*) indica estatisticamente significativo em relação ao controle negativo $p \leq 0,05$. (#) indica estatisticamente significativo em relação a PLN $p \leq 0,05$	95
Figura S1.	Quantificação de proteínas por Western Blot nas linhagens A549, p53+/+ e H1299, p53-/- após 12, 24 e 48 h em células suplementadas com 0,5% ou 10% de SBF. (*) indica estatisticamente significativo em relação ao controle negativo $p \leq 0,05$	102
Figura S2.	Número de focos de 53BP1 em células A549 suplementada com 0,5 ou 10% de soro bovino fetal. Doxo: doxorubicina 3 μ M durante 3 h. (*) – Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. (#) - Estatisticamente diferente em relação a PLN. ($p \leq 0,05$).	104
Figura S3.	Número de focos de 53BP1 em células H1299 suplementada com 0,5 ou 10% de soro bovino fetal. Doxo: doxorubicina 3 μ M durante 3 h. (*) – Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. (#) - Estatisticamente diferente em relação a PLN. ($p \leq 0,05$).	105
Figura S4.	Número de focos de Gamma-H2AX em células A549 suplementada com 0,5 ou 10% de soro bovino fetal. Doxo: doxorubicina 3 μ M durante 3 h. (*) – Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. (#) - Estatisticamente diferente em relação a PLN. ($p \leq 0,05$).	106
Figura S5.	Número de focos de Gamma-H2AX em células H1299 suplementada com 0,5 ou 10% de soro bovino fetal. Doxo: doxorubicina 3 μ M durante 3 h. (*) – Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. (#) - Estatisticamente diferente em relação a PLN. ($p \leq 0,05$).	107

Figura S6.	Imagem representativa de campo dos diferentes tempos de tratamentos na linhagem a549 suplementada com 0,5% de SBF. Doxo: Doxorrubicina 3 μ M durante 3 h.	108
Figura S7.	Imagem representativa de campo dos diferentes tempos de tratamentos na linhagem a549 suplementada com 10% de SBF. Doxo: Doxorrubicina 3 μ M durante 3 h.	109
Figura S8.	Imagem representativa de campo dos diferentes tempos de tratamentos na linhagem H1299 suplementada com 0,5% de SBF. Doxo: Doxorrubicina 3 μ M durante 3 h.....	110
Figura S9.	Imagem representativa de campo dos diferentes tempos de tratamentos na linhagem H1200 suplementada com 10% de SBF. Doxo: Doxorrubicina 3 μ M durante 3 h.....	111

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO-1

Piperlongumina inibe a proliferação em células tumorais e não tumorais de mama por indução de estresse oxidativo levando a danos ao DNA e parada de ciclo celular

Tabela 1 -	Integridade de Membranas (%). Percentagem de células com membranas integras.....	27
Tabela 2 -	Comprimento total do cometa e percentagem de DNA na cauda por ensaio do cometa	32
Tabela S1 -	Viabilidade Celular obtidos para cada linhagem pelo ensaio do MTT em 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M.....	46
Tabela S2 -	Contagem celular. Número de células por mL (*10000) obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M.....	46
Tabela S3 -	Índices Celulares obtidos por RTCA no estudo da cinética de proliferação celular. C+ = Camptotecina 1 μ M.	47
Tabela S4 -	Ciclo Celular. Percentual de células em fase G1, S e G2/M obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M.....	47
Tabela S5 -	Morte celular por apoptose. Percentual de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M	48
Tabela S6 -	Estresse Oxidativo por H ₂ DCFDA. Valores de fluorescência (RFU) obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 3 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN.....	48
Tabela S7 -	Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real.....	48

Tabela S8 -	Valores de expressão relativas de genes relacionados a morte celular (a), danos ao DNA (b), estresse oxidativo (c) e ciclo celular (b) em ambas linhagens.....	49
--------------------	--	----

CAPÍTULO-2

O tratamento de células pulmonares não tumorais e cancerosas com piperlongumina prende o ciclo celular, inibe a proliferação celular e induz apoptose, estresse oxidativo e dano ao DNA

Tabela 1 -	Integridade das Membranas. Porcentagem de células com membranas intactas tratadas com PLN durante 24 h.	59
Tabela 2 -	A porcentagem de morte celular por apoptose obtida por citometria de fluxo após 24 h de tratamento para ambas as linhagens celulares	62
Tabela 3 -	Genotoxicidade por Ensaio Cometa.....	63
Tabela S1 -	Viabilidade Celular obtidos para cada linhagem pelo ensaio do MTT em 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M.....	74
Tabela S2 -	Integridade de Membrana. Percentual de células com membranas integras obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M em NCI-h460 e 5 μ M em IMR-90.	74
Tabela S3 -	Contagem celular. Número de células por mL (*10000) obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M em NCI-h460 e 5 μ M em IMR-90.	75
Tabela S4 -	Índices Celulares obtidos por RTCA no estudo da cinética de proliferação celular. C+ = Camptotecina 1 μ M.	75
Tabela S5 -	Ciclo Celular. Percentual de células em fase G1, S e G2/M obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M em NCI-h460 e 5 μ M em IMR-90.	76
Tabela S6 -	Morte celular por apoptose. Percentual de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com	

	diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M em NCI-h460 e 5 μ M em IMR-90.	77
Tabela S7 -	Genotoxicidade. Comprimento total do Cometa /Cauda e percentagem de DNA na cauda obtidos pelo ensaio do Cometa para cada linhagem após 3 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Doxorubicina 1 μ M	77
Tabela S8 -	Estresse Oxidativo por H ₂ DCFDA. Valores de fluorescência (RFU) obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 3 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN.	78
Tabela S9 -	Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real.	79
Tabela S10 -	Valores de expressão relativas de genes relacionados a morte celular (a), danos ao DNA (b), estresse oxidativo (c) e ciclo celular (b) em ambas linhagens.	79

SUMÁRIO

I-	INTRODUÇÃO GERAL	4
1-	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	6
1.1-	Piperlongumina	6
1.2-	PLN Eleva Níveis de Estresse Oxidativo	7
1.3-	PLN Induz Morte Celular	8
1.4-	Retenção de Ciclo Celular	9
1.5-	Piperlongumina <i>In Vivo</i>	11
2-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
II-	OBJETIVOS.....	16
1.1-	Objetivos Específicos	16
III-	CAPÍTULO - 1	18
1-	INTRODUÇÃO.....	19
2-	MATERIAIS E MÉTODOS	21
2.1-	Agentes Químicos	21
2.2-	Cultura Celular	21
2.3-	Viabilidade Celular.....	21
2.4-	Integridade de Membranas e Contagem Celular	21
2.5-	Perfil de índice celular em Tempo Real	22
2.6-	Ciclo Celular.....	22
2.7-	Morte Celular por Apoptose.....	22
2.8-	Genotoxicidade.....	23
2.9-	Avaliação de EROs por H ₂ DCFDA	23
2.10-	Expressão Gênica	24
2.11-	Análise de Proteínas	25
2.12-	Análise Estatística	25
3-	RESULTADOS	26
3.1-	Viabilidade celular por MTT.....	26
3.2-	Integridade de Membrana.....	27
3.3-	Contagem Celular.....	28
3.4-	Perfil de Índice Celular em Tempo Real	29
3.5-	Ciclo Celular.....	30
3.6-	Morte Celular por Apoptose.....	31

3.7-	Genotoxicidade.....	32
3.8-	Estresse Oxidativo por H ₂ DCFDA.....	33
3.9-	Expressão Gênica	33
3.10-	Regulação de Proteínas	35
4-	DISCUSSÃO.....	36
5-	5. AGRADECIMENTOS.....	40
6-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	41
7-	MATERIAL SUPLEMENTAR	46
IV-	CAPÍTULO - 2.....	50
1-	INTRODUÇÃO.....	51
2-	MATERIAIS E METODOS	53
2.1-	Agentes Químicos	53
2.2-	Cultura Celular	53
2.3-	Viabilidade Celular.....	53
2.4-	Integridade da Membrana e Contagem de células.....	53
2.5-	Perfil do índice de célula em tempo real (IC)	54
2.6-	Ciclo Celular.....	54
2.7-	Apoptose.....	54
2.8-	Genotoxicidade.....	55
2.9-	Estresse Oxidativo por H ₂ DCFDA.....	55
2.10-	Expressão Gênica	56
2.11-	Análise de Proteínas	57
2.12-	Análise Estatística	57
3-	RESULTADOS	58
3.1-	Viabilidade celular por MTT.....	58
3.2-	Integridade da Membrana.....	58
3.3-	Quantificação de número de células.....	59
3.4-	Perfil de IC em tempo real	60
3.5-	Ciclo Celular.....	61
3.6-	Apoptose.....	62
3.7-	Genotoxicidade.....	63
3.8-	Estresse Oxidativo por H ₂ DCFDA.....	63
3.9-	Expressão Gênica	64

3.10-	Análise de Proteínas	65
4-	DISCUSSÃO.....	67
5.	AGRADECIMENTOS.....	69
6-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
7-	MATERIAL SUPLEMENTAR	74
V-	CAPÍTULO-3.....	80
1-	INTRODUÇÃO.....	81
2-	MATERIAIS E MÉTODOS	83
2.1-	Agentes Químicos	83
2.2-	Cultura Celular	83
2.3-	Integridade de Membranas e Ciclo Celular	83
2.4-	Extratos de Células para Western Blot.....	84
2.6-	Análise Estatística	85
3-	RESULTADOS	86
3.1-	Integridade de Membranas	86
3.2-	Ciclo Celular.....	86
3.3-	Western Blot.....	88
3.4-	Imunofluorescência	89
4-	DISCUSSÃO.....	96
5.	AGRADECIMENTOS.....	98
6-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99
7-	MATERIAL SUPLEMENTAR	102
VI-	CONSIDERAÇÕES FINAIS	112

I-INTRODUÇÃO GERAL

O câncer é atualmente um dos maiores problemas de saúde pública no mundo. Nos últimos anos, ocorreram cerca de 14,1 milhões de novos casos anualmente, causando 8,2 milhões de mortes. Deste montante, excetuando o câncer de pele não-melanoma, o câncer de pulmão foi o mais comum, contando com 1,8 milhões de casos, 13% do total, e causou 1,6 milhões de mortes devido à alta letalidade. O câncer de mama foi o segundo mais comum, e o mais incidente entre as mulheres, com 1,7 milhões de casos (aproximadamente 12% do total) ocasionando 522 mil mortes, quinto lugar em causas de morte devido ao prognóstico relativamente favorável. Em seguida há os cânceres colorretal, de próstata, estômago e hepático representando 55% do total de mortes por câncer no mundo (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015). As transições demográficas e epidemiológicas apontam para um aumento na incidência de câncer na próxima década, com mais de 20 milhões de novos casos esperados anualmente já em 2025, particularmente em países de baixa e média renda (Bray 2014).

Neste contexto, a busca por drogas alvo-específico e/ou com inibição seletiva de proliferação de células tumorais vem crescendo, e as plantas têm sido fonte de diversas moléculas que são utilizadas em tratamentos de cânceres (Newman and Cragg 2016). Entre as plantas, os membros da família Piperaceae, devido à presença de vários alcaloides, apresentam um enorme potencial, sendo amplamente utilizados em xaropes herbáceos para tosse, anti-inflamatório, antimalária, entre outros (Reshmi, Sathya et al. 2010). A *Piper longum* Linn. (Pimenta longa) é um membro desta família com origem na Índia, suas raízes e frutos são frequentemente utilizados na medicina popular para prevenção e cura de doenças crônicas e para tratamento de tumores (Manoj, Soniya et al. 2004). Entre os princípios ativos desta planta encontra-se a piperlongumina (PLN) (Wang, Morris-Natschke et al. 2014).

A PLN já demonstrou ter propriedades biológicas importantes. Em células tumorais de pulmão, induziu apoptose e autofagia (Wang, Mao et al. 2015), além de inibir a proliferação em células tumorais de próstata, rim e mama (Makhov, Golovine et al. 2014) e potencializar a doxorrubicina em células leucêmicas (Kang and Yan 2015), além de reduzir crescimento de tumores *in vivo* (Basak, Punganuru et al. 2016, Zou, Chen et al. 2015; Li, Sharkey et al. 2015).

O gene supressor tumoral *P53* está envolvido em diversas atividades celulares tais como controle de ciclo celular para reparos de DNA em casos de danos, morte celular programada e senescência celular, entre outros (Levav-Cohen, Goldberg et al. 2014). Em média, cerca de 50% dos cânceres possuem o gene *p53* mutado, o que pode levar ao aumento de progressão de

tumores, aumento de potencial metastático ou mesmo a resistência a fármacos (Morandell, Reinhardt et al. 2013, Rivlin, Koifman et al. 2015). Neste sentido, a PLN também foi capaz de induzir apoptose em várias linhagens independente do estado mutacional de p53, induzindo as células a morte sem afetar as células não tumorais (Roh, Kim et al. 2014)

Muitos destes eventos foram correlacionados a capacidade de PLN em induzir aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs). Níveis elevados de EROs são tóxicos para células podendo levar a morte celular (Glasauer and Chandel 2014). A elevação de EROs por indução com PLN causou inibição de proliferação em várias linhagens celulares (Raj, Ide et al. 2011). Por exemplo, em câncer pancreático (Dhillon, Chikara et al. 2014) e em células de glioblastoma multiforme (GBM) (Liu, Pan et al. 2013). Além de induzir apoptose de forma dose-tempo dependente em células B de leucemia linfoblástica aguda (Han, Han et al. 2014) e em várias linhagens de células de câncer de cabeça e pescoço (HNC) e em xenoenxerto com HT29 independente do estado mutacional de p53, induzindo as células a morte sem afetar as células não tumorais (Roh, Kim et al. 2014), assim, demonstrando seu potencial contra linhagens cancerosas de maneira seletiva, além disso, a PLN apresentou reativação de funções de vias de p53 (Basak, Punganuru et al. 2016).

Considerando o impacto de patologias como o câncer de mama e pulmão, importância do p53 mutante em canceres e os importantes resultados que a PLN já apresentou, além da relativa falta de conhecimento de muitos mecanismos por ela utilizado, nós avaliamos a PLN em células tumorais e não tumorais de mama e pulmão visando elucidar a capacidade de gerar estresse oxidativo e seu efeito antiproliferativo, e avaliamos sua capacidade de influenciar na proliferação de células p53 negativas pela geração de danos, buscando contribuir no entendimento de seus efeitos e mecanismos de ação.

1-FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1-Piperlongumina

A piperlongumina (PLN) (Figura 1) é um alcaloide e está entre os constituintes ativos de *Piper longum* Linn (pimenta longa), planta com origem na Índia, pertence à família Piperaceae, cujos frutos são utilizados em vários países asiáticos como condimentos e na medicina popular para prevenir e curar doenças crônicas e tratar tumores (Manoj, Soniya et al. 2004, Wang, Morris-Natschke et al. 2014, Yadav, Chatterjee et al. 2016).

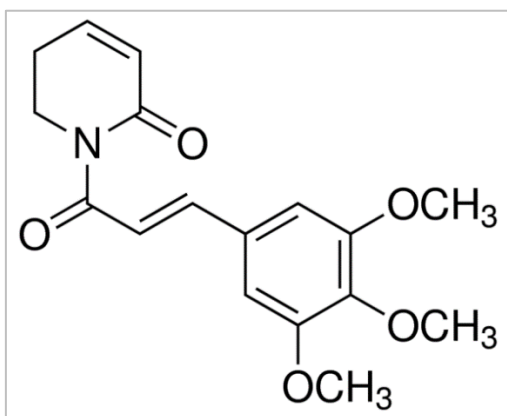


Figura 1. Estrutura química da Piperlongumina.
(Fonte: Sigma-Aldrich).

Importantes propriedades foram atribuídas à PLN, tais como atividades antibacterianas (Srinivasa Reddy, Jamil et al. 2001), propriedades antifúngica e anti-inflamatórias (Han, Han et al. 2014) e inibição seletiva de proliferação para células tumorais (Raj, Ide et al. 2011), induzindo apoptose e autofagia em células tumorais de pulmão (Wang, Mao et al. 2015), além de inibir a proliferação em células tumorais de próstata, rim e mama (Makhov, Golovine et al. 2014). Também potencializou os efeitos quando associada a outros compostos, como a doxorubicina em células leucêmicas (Kang and Yan 2015). *In vivo*, apresentou efeitos sinérgicos com drogas antitumorais, PLN quando associado com Carmustine em xenoenxertos de HT29 (Basak, Punganuru et al. 2016) e Auranofina em xenoenxertos de células de câncer gástrico (Zou, Chen et al. 2015), entre outros. Muitos dos efeitos observados são atribuídos à capacidade da PLN de elevar os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Dhillon, Chikara et al. 2014).

1.2-PLN Eleva Níveis de Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido por um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os sistemas antioxidantes que protegem destes e pode ocorrer como resultado do aumento da produção de EROs ou da diminuição da proteção destes (Hayashi and Cortopassi 2015). Em células eucarióticas, mais de 90% das EROs são produzidas pelas mitocôndrias devido a respiração oxidativa normal (Lushchak 2014) existindo mecanismos de proteção antioxidante que envolve proteínas tais como a catalase, tiorredoxina 1 (TRx1), Peroxirredoxina 2 (PRX2), ATR serina/treonina quinase (ATR), Peroxido Dismutase (SOD), Glutathione Peroxidase (GPX), entre outras (Abraham 2001, Nordberg and Arner 2001, Sobotta, Liou et al. 2015). Perturbações no equilíbrio redox celular podem provocar a produção de peróxidos e radicais livres que danificam diversos componentes celulares, incluindo proteínas e DNA, podendo levar a enfermidades (Agarwal, Durairajanayagam et al. 2014, Chen and Zhong 2014).

As células tumorais têm como característica o aumento da taxa de produção de EROs e como consequência, um ambiente redox alterado em comparação com células não tumorais. EROs podem atuar na progressão tumoral através da instabilidade genômica devido a indução de danos ao DNA, mutações, entre outros, porém, níveis elevados de EROs são tóxicos para as células e podem também levar a morte celular (Glasauer and Chandel 2014). Frente ao exposto, é importante o desenvolvimento de novas terapias anticâncer com o propósito de modular os níveis de redox celular, o que torna a terapia do câncer com compostos pró-oxidantes uma área interessante de estudo.

Neste contexto, a PLN induz estresse oxidativo mediado pelo aumento de EROs principalmente em células tumorais, apresentando ação inibitória de proliferação nestas, com baixa ou ausência de interferência em células não tumorais. Este efeito foi observado no estudo de Raj e colaboradores (Raj, Ide et al. 2011) que demonstraram PLN induzindo de modo significativo a morte em células tumorais, e isto foi associado a indução da expressão e acetilação de *TP53* independente da sua forma (mutante ou selvagem). PLN também se mostrou seletiva às células de câncer de pescoço e cabeça (HNC), células B de leucemia linfoblástica aguda e células de glioblastoma multiforme (GBM) (Roh, Kim et al. 2014). Estes efeitos estiveram associados a capacidade da PLN em gerar a elevação de EROs levando ao aumento de estresse e com isso, a inibição de proliferação e indução de apoptose de forma dose-tempo dependentes (Han, Han et al. 2014), e a ativação da via JNK e p38, proteínas estas que controlam a morte celular quando em estresse oxidativo (Liu, Pan et al. 2013). Além disso, em

células de câncer pancreático, PLN inibiu a proliferação e causou danos ao DNA (Dhillon, Chikara et al. 2014).

1.3-PLN Induz Morte Celular

Existem vários tipos de mortes celulares programadas, as mais comuns e conhecidas são a Apoptose e a Autofagia, diferentemente da necrose, estes processos são bem controlados (Booth, Tavallai et al. 2014). Autofagia é um processo de reciclagem celular altamente conservado, opera através da degradação de organelas citoplasmáticas, proteínas e macromoléculas e a reciclagem dos produtos de degradação, a autofagia desempenha importantes papéis na sobrevivência e manutenção das células. Durante este processo, parte do citoplasma são envoltas por membranas originando os autofagossomos, os quais irão fundir com os lisossomos onde seu conteúdo é degradado pelas hidrolases lisossomais (Parzych and Klionsky 2014).

Dentro dos organismos multicelulares, a apoptose desempenha um papel importante removendo as células danificadas, envelhecidas, entre outras. O processo apoptótico pode ser dividido na via extrínseca e intrínseca (Othman and Nagoor 2014). A via intrínseca é caracterizada pela própria célula dar início ao processo de morte, que é ativado por diferentes fatores químicos, físicos ou biológicos. Caso seja constatado danos celulares, falta de nutrientes ou oxigênio, erros deletérios, etc., o processo intrínseco é iniciado pela liberação do Citocromo C das mitocôndrias através da permeabilização da membrana desencadeada pelo estresse intracelular, ele se liga ao fator de ativação da protease apoptótica 1 (Apaf-1) para formar um complexo de proteína denominado apoptossoma. Esse complexo ativa a pro-caspase iniciadora (pro-caspase-9), a qual cliva a pro-caspase executora (pro-caspase-3) para formar caspase efetora ativa onde a resposta apoptótica é irreversivelmente desencadeada (Ooi and Ma 2013). A via extrínseca converge para a mesma via de execução, a diferença que é desencadeada por vias de sinalização dos receptores de morte. Existem vários tipos de receptores de morte celular tais como CD95 (Faz/Apo1), receptor relacionado ao fator TNF (TRAIL) entre outros, para cada receptor, existem ligantes específicos. Assim, ao ser ativado, o receptor induz a caspase-8 a clivar diretamente outras caspases incluindo a caspase-3 ativando a resposta apoptótica (Fulda 2015).

No entanto as células cancerosas têm a capacidade de evitar a apoptose para promover sua sobrevivência sob as condições de estresse ambiental utilizando vários mecanismos. O gene supressor de tumor *TP53* é um gene amplamente mutado em tumores, isso pode inibir a ativação

de proteínas de reparo do DNA, levando as células a não entrarem em apoptose, permitindo que se dividam e cresçam incontrolavelmente, possibilitando a formação de cânceres (Othman and Nagoor 2014). Além disso, as células tumorais podem perturbar o equilíbrio entre os fatores pró-apoptóticos (BCL-2, BCL-XL) e antiapoptóticos (BAX, BIM e PUMA), contribuindo para o desenvolvimento de câncer e resistência contra uma ampla variedade de agentes anticancerígenos, como cisplatina (DDP) e paclitaxel (Fisher, Milner et al. 1993, Daniel and Smythe 2004).

As mitocôndrias são fontes e alvos de EROs, e têm importante papel na indução de apoptose sob condições fisiológicas e patológicas. A liberação de citocromo c pode ser mediada por ação de EROs, e desencadeia a ativação da via das caspases levando as células à apoptose (Simon, Haj-Yehia et al. 2000). A redução da proliferação celular por PLN está relacionada com a indução de apoptose em vários tipos celulares. Em linhagem HepG2, PLN levou 20% das células à apoptose, devido à elevação de EROs (Chen, Liu et al. 2015). Em células B de leucemia linfoblástica aguda, a PLN induziu apoptose de forma dose-tempo dependente (Han, Han et al. 2014), em MCF-7, após 36 h de tratamento, houve indução de 21,9% de células à apoptose (Lee, Jin et al. 2015), em células não pequenas de câncer de pulmão, a PLN induziu as células tumorais A549 e NCI-H460 à apoptose e autofagia (Wang, Mao et al. 2015, Zheng, Son et al. 2016) e em linhagem tumoral de mama, MDA-MB-231, PLN acarretou na ativação da via apoptótica mitocondrial por regulação negativa da via NF-KB (Shrivastava, Kulkarni et al. 2014).

1.4-Retenção de Ciclo Celular

Cânceres são o conjunto de mais de 100 doenças que tem em característica a proliferação celular desordenada (Torre, Bray et al. 2015). O ciclo celular é distinguido pelas fases que as células passam no processo de divisão celular, sendo a mitose e a interfase, sendo esta última dividida em três fases distintas: G1; S e G2, as transições entre estas fases são controladas de maneira rigorosa para garantir que todos os eventos ocorram de maneira ordenada (Barnum and O'Connell 2014). A fase G1 é caracterizada pela intensa síntese de enzimas, RNA e componentes estruturais, nesta fase as células crescem em tamanho. A duplicação do DNA ocorre na fase S. A G2 é última fase antes da mitose, nesta fase, as células sintetizam RNA e proteínas necessárias para a divisão celular, também podem ser reparados possíveis erros durante a duplicação do DNA na fase anterior (Yasutis and Kozminski 2013, Dalton 2015). Em

contrapartida, as células também podem permanecer indefinidamente em repouso, podendo retornar ou não ao ciclo celular, estas células encontram-se em fase G0.

Durante a progressão do ciclo celular, existe pontos de verificações (*Checkpoints*), entre as fases G1 e S, e fases G2 e Mitose. No ponto de checagem G1, as células examinam a existência de problemas inesperados como tamanho celular, reserva de nutrientes, se recebe sinais de fatores de crescimento e a integridade do DNA, entre outros. No ponto de checagem G2, as células verificam a integridade do DNA e se este foi completamente duplicado durante a fase S, na existência de erros, o ciclo celular será retido para reparos, na impossibilidade de reparos, as células ativam a sinalização para apoptose. Posteriormente as células entram em mitose, processo de divisão das células propriamente dita em células filhas (Barnum and O'Connell 2014).

As fases do ciclo celular são controladas por complexos quinases dependente de ciclinas (CDKs), estas proteínas quinases são responsáveis por fosforilar substratos chaves para promover a síntese de DNA e a progressão mitótica. Durante a fase G1, os complexos CDK4/ciclina D e CDK2/ciclina E fosforilam RB Transcricional Corepressor (RB) a qual ativa a expressão de genes responsivos a E2F ativando a transcrição de genes que codifica os reguladores necessários para a transição G1/S (Ciclinas A, E e CDK1), síntese de biomoléculas e componentes responsáveis pela replicação do DNA. Durante a fase G2 do ciclo celular, os complexos CDK2/ciclina A e CDK1/ciclina B fosforilam FoxM1, levando a ativação de expressão dos genes alvo de FoxM1, levando a transcrição de reguladores do ciclo celular necessários para a execução da mitose (ciclina B) e demais proteínas cruciais para a segregação cromossômica adequada (Lim and Kaldis 2013). Assim, as CDKs são ativadas pelas ciclinas, as quais possuem níveis variados durante as fases do ciclo celular. A ciclina A esta implicada nas transições de fases G1/S e G2/M ativando as CDKs 1 e 2 (Bogdanow, Weisbach et al. 2013), ciclina B é implicada na entrada em mitose durante a transição G2/M ativando CDK2 (Nakayama and Yamaguchi 2013), a ciclina E esta implicada nas transições de G1 para S ativando CDK2, ciclina E é degradada a medida que as células entras na fase S (Möröy and Geisen 2004) e a ciclina D está associada a transição de fases G1 para S ativando CDKs 4 e 6 (Shimura, Fukumoto et al. 2013).

Alterações no DNA conduzem a inibição de CDK, levando a retenção no ciclo celular, não havendo reparação do dano, as células podem entrar em senescência ou sofrer apoptose (Malumbres and Barbacid 2009). Shrivastava, Kulkarni et al. (2014) demonstraram que os

tratamentos com PLN em diferentes tipos de células de câncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-453 e BT-549) resultaram em inibição de crescimento, de maneira dose-tempo dependente, associada a retenção de células na fase G1 e levaram as células a morte pela repressão da via NF- κ B ativando as vias de apoptose. Em baixas concentrações, a PLN inibiu a proliferação de células de linfoma de Burkitt sem afetar os linfócitos normais por redução da atividade de NF- κ B (Han, Tompkins et al. 2013). Em células de câncer de pulmão, a retenção de proliferação por PLN se deu por inibição da via PI3K/Akt/mTOR (Wang, Mao et al. 2015). Esta via de sinalização atua na regulação do ciclo celular, estando diretamente relacionada a proliferação celular (King, Yeomanson et al. 2015). Em células tumorais de próstata, rim, mama e células leucêmicas K562/A02 resistentes a doxorrubicina, a PLN inibiu eficazmente a fosforilação de proteínas-alvo de Akt, diminuindo a atividade mTORC1 e estimulando a autofagia (Makhov, Golovine et al. 2014, Kang and Yan 2015).

1.5-Piperlongumina *In Vivo*

A PLN foi capaz de diminuir significativamente a taxa de crescimento de tumores de câncer e cabeça (HNC) além de ter aumentada sua eficácia quando utilizado em combinação com cisplatina (Roh, Kim et al. 2014). Apresenta efeito sinérgico quando combinado com Auranofina, inibindo significativamente o peso e volume dos tumores sem afetar o peso corporal dos ratos com xenoinxertos de células de câncer gástrico (SGC-7901) (Zou, Chen et al. 2015). Em modelos de câncer de mama, a PLN apresentou regressão dos xenoinxertos em ratos devido seu efeito inibitório sobre a fosforilação de transdutor de STAT3 (fatores de transcrição ativados por tirosinas quinases em resposta a diversas citocinas e receptores de fatores de crescimento, envolvido principalmente em proliferação celular) (Johnston and Grandis 2011, Bharadwaj, Eckols et al. 2015). PLN em combinação com o indutor de apoptose relacionado com TNF (TRAIL), mostrou efeitos antiproliferativos em modelo de xenoinxertos de MDA-MB-231 (Li, Sharkey et al. 2015). Além disso, causou redução no crescimento do tumor em modelo de xenoinxerto de câncer pancreático humano. Os tumores tratados apresentaram diminuição da expressão do marcador de proliferação celular Ki-67 e aumento em 8-OHdG (8-hidroxi-2'-desoxiguanosina, um produto da oxidação do DNA danificado), sugerindo que a PLN inibiu a proliferação celular e aumentou o estresse oxidativo (Dhillon, Chikara et al. 2014). O que demonstra que a PLN pode ser utilizado como adjuvante em futuras terapias anticâncer.

2-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." Genes & development **15**(17): 2177-2196.
- Agarwal, A., et al. (2014). "Proteomics, oxidative stress and male infertility." Reproductive biomedicine online **29**(1): 32-58.
- Barnum, K. J. and M. J. O'Connell (2014). Cell cycle regulation by checkpoints. Cell Cycle Control, Springer: 29-40.
- Basak, D., et al. (2016). "Piperlongumine exerts cytotoxic effects against cancer cells with mutant p53 proteins at least in part by restoring the biological functions of the tumor suppressor." Int J Oncol **48**(4): 1426-1436.
- Bharadwaj, U., et al. (2015). "Drug-repositioning screening identified piperlongumine as a direct STAT3 inhibitor with potent activity against breast cancer." Oncogene **34**(11): 1341.
- Bogdanow, B., et al. (2013). "Human cytomegalovirus tegument protein pp150 acts as a cyclin A2-CDK-dependent sensor of the host cell cycle and differentiation state." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(43): 17510-17515.
- Booth, L. A., et al. (2014). "The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis." Cellular signalling **26**(3): 549-555.
- Bray, F. (2014). "Transitions in human development and the global cancer burden." World cancer report: 54-68.
- Chen, Y., et al. (2015). "Piperlongumine selectively kills hepatocellular carcinoma cells and preferentially inhibits their invasion via ROS-ER-MAPKs-CHOP." Oncotarget **6**(8): 6406.
- Chen, Z. and C. Zhong (2014). "Oxidative stress in Alzheimer's disease." Neuroscience bulletin **30**(2): 271-281.
- Dalton, S. (2015). "Linking the cell cycle to cell fate decisions." Trends in cell biology **25**(10): 592-600.
- Daniel, J. C. and W. R. Smythe (2004). The role of Bcl-2 family members in non-small cell lung cancer. Seminars in thoracic and cardiovascular surgery, Elsevier.
- Dhillon, H., et al. (2014). "Piperlongumine induces pancreatic cancer cell death by enhancing reactive oxygen species and DNA damage." Toxicology reports **1**: 309-318.
- Ferlay, J., et al. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." Int J Cancer **136**(5): E359-386.
- Fisher, T. C., et al. (1993). "bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways." Cancer research **53**(14): 3321-3326.
- Fulda, S. (2015). Targeting extrinsic apoptosis in cancer: Challenges and opportunities. Seminars in cell & developmental biology, Elsevier.
- Glasauer, A. and N. S. Chandel (2014). "Targeting antioxidants for cancer therapy." Biochemical pharmacology **92**(1): 90-101.
- Han, S.-S., et al. (2013). "Piperlongumine inhibits LMP1/MYC-dependent mouse B-lymphoma cells." Biochemical and biophysical research communications **436**(4): 660-665.

- Han, S. S., et al. (2014). "Piperlongumine inhibits the proliferation and survival of B-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines irrespective of glucocorticoid resistance." Biochem Biophys Res Commun **452**(3): 669-675.
- Hayashi, G. and G. Cortopassi (2015). "Oxidative stress in inherited mitochondrial diseases." Free radical biology and medicine **88**: 10-17.
- Johnston, P. A. and J. R. Grandis (2011). "STAT3 signaling: anticancer strategies and challenges." Molecular interventions **11**(1): 18.
- Kang, Q. and S. Yan (2015). "Piperlongumine reverses doxorubicin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in K562/A02 human leukemia cells." Experimental and therapeutic medicine **9**(4): 1345-1350.
- King, D., et al. (2015). "PI3King the lock: targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway as a novel therapeutic strategy in neuroblastoma." Journal of pediatric hematology/oncology **37**(4): 245-251.
- Lee, H.-N., et al. (2015). "Heme oxygenase-1 determines the differential response of breast cancer and normal cells to piperlongumine." Molecules and cells **38**(4): 327.
- Levav-Cohen, Y., et al. (2014). The p53-Mdm2 loop: a critical juncture of stress response. Mutant p53 and MDM2 in Cancer, Springer: 161-186.
- Li, J., et al. (2015). "Piperlongumine and immune cytokine TRAIL synergize to promote tumor death." Sci Rep **5**: 9987.
- Lim, S. and P. Kaldis (2013). "Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation." Development **140**(15): 3079-3093.
- Liu, J. M., et al. (2013). "Piperlongumine selectively kills glioblastoma multiforme cells via reactive oxygen species accumulation dependent JNK and p38 activation." Biochem Biophys Res Commun **437**(1): 87-93.
- Lushchak, V. I. (2014). "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification." Chemico-biological interactions **224**: 164-175.
- Makhov, P., et al. (2014). "Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signalling and mediates cancer cell death." Br J Cancer **110**(4): 899-907.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-166.
- Manoj, P., et al. (2004). "Recent studies on well-known spice, *Piper longum* Linn."
- Morandell, S., et al. (2013). "A reversible gene-targeting strategy identifies synthetic lethal interactions between MK2 and p53 in the DNA damage response in vivo." Cell reports **5**(4): 868-877.
- Möröy, T. and C. Geisen (2004). "Cyclin e." The international journal of biochemistry & cell biology **36**(8): 1424-1439.
- Nakayama, Y. and N. Yamaguchi (2013). Role of cyclin B1 levels in DNA damage and DNA damage-induced senescence. International review of cell and molecular biology, Elsevier. **305**: 303-337.

- Newman, D. J. and G. M. Cragg (2016). "Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014." J. Nat. Prod **79**(3): 629-661.
- Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1." Free radical biology and medicine **31**(11): 1287-1312.
- Ooi, H. K. and L. Ma (2013). "Modeling heterogeneous responsiveness of intrinsic apoptosis pathway." BMC systems biology **7**(1): 65.
- Othman, N. and N. H. Nagoor (2014). "The role of microRNAs in the regulation of apoptosis in lung cancer and its application in cancer treatment." BioMed research international **2014**.
- Parzych, K. R. and D. J. Klionsky (2014). "An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation." Antioxidants & redox signaling **20**(3): 460-473.
- Raj, L., et al. (2011). "Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS." Nature **475**(7355): 231-234.
- Reshmi, S., et al. (2010). "Isolation of piperidine from *Piper nigrum* and its antiproliferative activity." Journal of Medicinal Plants Research **4**(15): 1535-1546.
- Rivlin, N., et al. (2015). p53 orchestrates between normal differentiation and cancer. Seminars in cancer biology, Elsevier.
- Roh, J.-L., et al. (2014). "Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer." Oncotarget **5**(19): 9227.
- Shimura, T., et al. (2013). "The role of cyclin D1 in response to long-term exposure to ionizing radiation." Cell cycle **12**(17): 2738-2743.
- Shrivastava, S., et al. (2014). "Piperlongumine, an alkaloid causes inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling axis to induce caspase-dependent apoptosis in human triple-negative breast cancer cells." Apoptosis **19**(7): 1148-1164.
- Simon, H.-U., et al. (2000). "Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction." Apoptosis **5**(5): 415-418.
- Sobotta, M. C., et al. (2015). "Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling." Nature chemical biology **11**(1): 64.
- Srinivasa Reddy, P., et al. (2001). "Antibacterial activity of isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*." Pharmaceutical biology **39**(3): 236-238.
- Torre, L. A., et al. (2015). "Global cancer statistics, 2012." CA: a cancer journal for clinicians **65**(2): 87-108.
- Wang, F., et al. (2015). "Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway." International journal of immunopathology and pharmacology **28**(3): 362-373.
- Wang, Y.-H., et al. (2014). "Anticancer principles from medicinal Piper (胡椒 Hú Jiāo) plants." Journal of traditional and complementary medicine **4**(1): 8-16.
- Yadav, V., et al. (2016). "Preventive potentials of piperlongumine and a *Piper longum* extract against stress responses and pain." Journal of traditional and complementary medicine **6**(4): 413-423.

Yasutis, K. and K. Kozminski (2013). "Cell cycle checkpoint regulators reach a zillion." Cell cycle **12**(10): 1501-1509.

Zheng, J., et al. (2016). "Piperlongumine inhibits lung tumor growth via inhibition of nuclear factor kappa B signaling pathway." Scientific reports **6**: 26357.

Zou, P., et al. (2015). "Auranofin induces apoptosis by ROS-mediated ER stress and mitochondrial dysfunction and displayed synergistic lethality with piperlongumine in gastric cancer." Oncotarget **6**(34): 36505.

II-OBJETIVOS

Verificar os efeitos da PLN em Linhagens de células não tumorais e tumorais de mama e pulmão humano (HB4a, MCF-7, IMR-90 e NCI-H460 respectivamente) com relação a citotoxicidade, geração de EROs e indução de danos no DNA, interferência na proliferação e/ou morte celular, além dos níveis de expressão de transcritos e proteínas relacionados ao estresse oxidativo, danos no DNA, ciclo celular e apoptose. Avaliar a capacidade de PLN em induzir danos ao DNA em linhagens tumorais de pulmão A549 e H1299 (p53 $+/+$ e P53 $-/-$ respectivamente).

1.1-Objetivos Específicos

- Verificar a viabilidade celular nas quatro linhagens pelo ensaio de citotoxicidade (MTT), utilizando as concentrações de 1, 2,5, 5, 10, 20 e 40 μM da PLN após 24 h de tratamento.
- Avaliar o perfil de índice celular em tempo real, nos tratamentos com PLN nas concentrações de 1, 2,5, 5, 10, 20 e 40 μM durante 72 h de tratamento.
- Avaliar as fases do ciclo celular nos tratamentos com as concentrações de 10 e 20 μM da PLN após 24 h de tratamento, e 25 μM durante 48 h em 4 tempos por citometria de fluxo.
- Avaliar o perfil de morte celular nas concentrações de 10 e 20 μM da PLN após 24 h de tratamento, por citometria de fluxo.
- Mensurar o número de células e a indução de danos em membrana nas linhagens tratadas com as concentrações de 10 e 20 μM da PLN após 24 h e 25 μM durante 48 h em 4 tempos, por citometria de fluxo.
- Verificar a genotoxicidade induzida por PLN nas concentrações de 5, 10 e 20 μM após 3 h de tratamento, pelo ensaio do cometa.
- Avaliar os níveis de EROs induzido por PLN nas concentrações de 10 e 20 μM após 3 h de tratamento, utilizando o marcador H₂DCFDA, por citometria de fluxo.
- Avaliar o perfil de expressão de mRNA dos genes relacionados ao ciclo celular, danos no DNA, apoptose e estresse oxidativo após o tratamento de 10 μM de PLN durante 12 h por RT-qPCR nas quatro linhagens.
- Avaliar proteínas relacionadas com defesas antioxidantes, danos e ciclo celular.
- Avaliar a capacidade de PLN em causar quebras de fita simples ou dupla em linhagens P53 $+/+$ e P5 $-/-$.

III- CAPÍTULO - 1

Piperlongumina inibe a proliferação em células tumorais e não tumorais de mama por indução de estresse oxidativo levando a danos ao DNA e parada de ciclo celular

Adriano Baranoski¹; Bruna Isabela Biazzi¹; Thalita Alves Zanetti¹; Amanda Cristina Corveloni¹; Lilian Areal Marques¹; Natanael Andrew Souto Maior Torres Bonfim¹; Giuliana Castello Coatti²; Mário Sérgio Mantovani¹.

¹Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

² Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células Tronco, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

RESUMO

Busca-se a cada dia mais drogas alvo específico e/ou seletivas para células tumorais, das quais as plantas compreendem fontes de diversas moléculas que apresentam estas propriedades. Neste sentido, a Piperlongumina (PLN), um alcaloide derivado da *Piper longum* Linn tem sido descrito por apresentar importantes propriedades biológicas, principalmente, seletividade antiproliferativa e elevação de EROs. Neste trabalho, avaliou-se a citotoxicidade, danos a membrana celular, interferência na cinética de proliferação e ciclo celular, capacidade de gerar estresse oxidativo, indução danos ao DNA, apoptose, o padrão de expressão de mRNA de genes e proteínas relacionados a estes em células não tumorais (HB4a) e tumorais (MCF-7) de mama. A PLN foi citotóxica a partir das concentrações de 2,5 e 10 µM em HB4a e MCF-7, respectivamente. Também causou danos a membrana celular e reduziu a proliferação celular em ambas linhagens. Em ambas linhagens, aumentou o estresse oxidativo, causou danos ao DNA e induziu parada na fase S e G2/M em HB4a e G2/M em ambas linhagens. Porém, somente induziu apoptose em HB4a. PLN induziu aumento de expressão de mRNA de *GADD45A* e *SOD1* e redução de mRNA de *TP53* em ambas linhagens. Também induziu aumento de mRNA dos genes *BBC3*, *H2AFX* e *NFE2L2* e diminuiu a expressão mRNA de *CCNB2* e *IGF1R* na linhagem HB4a, em MCF-7, mRNA de *CDKN1A* e *CHEK1* foram aumentados e reduzidos respectivamente. A nível proteico, a PLN induziu redução das proteínas Catalase, TRx1, PRx1 e ATR e aumento de p21 em ambas linhagens, em MCF-7, as proteínas Chk1 e p53 apresentaram redução e aumento de regulação respectivamente. A ação antiproliferativa apresentada em ambas linhagens, principalmente HB4a, se deve pela capacidade de PLN em causar inibição de proteínas relacionadas a proteção contra estresse oxidativo, levando a geração de danos ao DNA, inibindo ciclo celular.

1-INTRODUÇÃO

Ocorrem-se cerca de 14,1 milhões de novos casos de cânceres em todo o mundo. Excetuando o câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama é o tipo de neoplasia mais incidente entre as mulheres e foi o segundo mais comum com 1,7 milhões de casos, quase 12% do total, causando 522 mil mortes, sendo o quinto em causas de morte (Ferlay, Soerjomataram et al. 2015). Patologias como câncer trazem penosos tratamentos aos acometidos, muitas vezes com baixa eficiência e muitos efeitos colaterais, oferecendo assim, resultados insatisfatórios. Neste contexto, a busca por drogas alvo específico e/ou seletivas para células tumorais vem crescendo constantemente, e as plantas representam ricas fontes de diversas moléculas que são utilizadas em tratamentos de cânceres (Newman and Cragg 2016).

Metabólitos secundários fornecem grande parte do sabor e cor as plantas e seus derivados e alguns estudos têm focado na possibilidade destas moléculas exercerem atividade anticarcinogênica (Zhang, Tao et al. 2010). A quimioprevenção utilizando estes fitoquímicos ou compostos isolados pode revelar-se valiosa, porém é necessário a compreensão completa dos efeitos biológicos dos compostos ativos, pois muitos surgem como moduladores das várias vias celulares, alterando ciclo celular ou mesmo levando a morte celular (Johnson 2007). Neste sentido, a Piperlongumina (PLN), um alcaloide derivado da *Piper longum* Linn (Wang, Morris-Natschke et al. 2014), tem apresentado propriedades biológicas importantes.

A PLN apresentou propriedades antibacterianas (Srinivasa Reddy, Jamil et al. 2001), anti-inflamatória (Han, Gupta et al. 2014), induziu apoptose e autofagia em células tumorais de pulmão (Wang, Mao et al. 2015), além de inibir a proliferação em células tumorais de próstata, rim e mama (Makhov, Golovine et al. 2014). A PLN também apresentou efeitos coadjuvantes, potencializando a doxorubicina em células leucêmicas (Kang and Yan 2015). *In vivo*, apresentou efeitos sinérgicos quando associado com Carmustine em xenoinxertos de HT29 (Basak, Punganuru et al. 2016), Auranofina em xenoinxertos de células de câncer gástrico (Zou, Chen et al. 2015) e em combinação com o indutor de apoptose relacionado com TNF (TRAIL) em xenoinxertos de células MDA-MB-231 (Li, Sharkey et al. 2015). Muitos destes eventos foram correlacionados a capacidade de PLN em induzir aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) nestas células. Níveis elevados de EROs são tóxicos para células podendo levar a morte celular (Glasauer and Chandel 2014). A elevação de EROs por indução com PLN causou inibição de proliferação em várias linhagens celulares (Raj, Ide et al. 2011), como por exemplo em câncer pancreático tanto *in vitro* como *in vivo* (Dhillon, Chikara et al. 2014), em células de glioblastoma multiforme (GBM) (Liu, Pan et al. 2013), além de induzir apoptose de

forma dose-tempo dependente em células B de leucemia linfoblástica aguda (Han, Han et al. 2014), e em várias linhagens de células de câncer de cabeça e pescoço (HNC) independente do estado mutacional de p53, induzindo as células a morte sem afetar as células não tumorais (Roh, Kim et al. 2014) demonstrando seu potencial contra linhagens cancerosas de maneira seletiva.

O uso de ferramentas como a citometria de fluxo no estudo do crescimento e morte celular, e técnicas de biologia molecular são de grande importância na avaliação de propriedades anticancerígenas e os possíveis mecanismos moleculares de novos fármacos. A utilização de parâmetros como ciclo celular, morte celular, genotoxicidade, capacidade de gerar estresse oxidativo e avaliação da expressão de genes relacionados a estes eventos tais como as ciclinas, *TP53*, *BBC3*, *GADD45A* e *NFE2L2* auxiliam na determinação das funções de tais drogas. Para isso são utilizadas linhagens celulares, como a HB4a que é uma originada de epitélio mamário humano não tumoral que foi condicionalmente imortalizada por transfecção com vírus SV40 (Stamps, Davies et al. 1994) e a linhagem tumoral MCF-7 que possui várias características do epitélio mamário, incluindo a capacidade de processar estradiol através de receptores citoplasmáticos de estrogênio. Estas linhagens celulares já estão bem consolidadas como modelos de estudo de mama (Rouquette, Page et al. 1998, Tsuboy, Marcarini et al. 2014, Tanaka, Suzuki et al. 2017).

Neste sentido, e considerando os impactos do câncer de mama e os importantes resultados já apresentados pela PLN, torna-se importante o entendimento dos mecanismos antiproliferativos usado por esta molécula em células tumorais e não tumorais, contribuindo para a possível utilização como agente quimioterápico.

2-MATERIAIS E MÉTODOS

2.1-Agentes Químicos

A Piperlongumina (PLN) ($C_{17}H_{19}NO_5$) foi obtida da Sigma-Aldrich ($\geq 97\%$ - CAS 20069-09-4) e utilizada nas concentrações de 1 a 40 μM . Foram utilizados como controle positivo a Doxorubicina (DXR – Pharmacia - CAS 23214-92-8) no teste do cometa e a Camptotecina (CPT – Merck Millipore - CAS 7689-03-4) nos demais.

2.2-Cultura Celular

Foram utilizadas as linhagens humanas HB4a e MCF-7, não tumoral e tumoral de mama, livres de micoplasma. A linhagem HB4a foi fornecida pelo Hospital AC Camargo, e a linhagem MCF-7 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram mantidas em frascos para cultura de 25 cm^2 com meio DMEM (Gibco, CAT- 12800-017) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco, CAT - 12657-029) e 0,1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen CAT- 15240-096). A linhagem HB4a também recebeu suplementação de Insulina e Hidrocortisona (1 mg/mL). As células foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO_2 à 37° C. Em todos os testes as células foram plaqueadas e mantidas durante 24 h para estabilização antes de receber os tratamentos e todos os experimentos foram realizados em ambas as linhagens.

2.3-Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi obtida pelo ensaio do MTT, segundo Mosmann (Mosmann 1983), com modificações. Em placas de 96 poços, 10^4 células foram semeadas por poço e após a estabilização, foram adicionados os tratamentos (0, 1, 2,5, 5, 10, 20 ou 40 μM de PLN e 1 μM de CPT). Após 24 h de tratamento, as células foram incubadas durante 4 h em meio de cultura celular sem soro com 500 $\mu g/mL$ de solução de MTT. Os cristais formados foram diluídos em Dimetilsulfóxido e realizado leitura em comprimento de onda de 540 nm em espectrofotômetro (TP Reader – Thermo Plate, China). A viabilidade celular (%) foi obtida utilizando a equação: [(absorbância média do tratado/ absorbância média do controle) * 100]. Os experimentos foram realizados em três repetições contendo seis réplicas/tratamento.

2.4-Integridade de Membranas e Contagem Celular

A verificação de integridade de membranas e contagem celular foi realizada por citometria de fluxo. Em tubo 10 cm^2 (TPP), foram semeadas 3×10^5 células, após estabilização, foi adicionado meio contendo 0, 10 ou 20 μM de PLN e 1 μM de CPT. Após 24 h de tratamento,

as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em 200 μL de PBS. Para avaliação da integridade de membrana, 25 μL de Iodeto de Propídio (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ – PI – Sonda fluorescente de elevado peso molecular) foi adicionado em 100 μL da suspensão, aguardado 5 minutos e realizado a leitura onde 5000 eventos por tratamento foram analisados em citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore). Para realizar a contagem celular, foi determinado a população celular no citômetro (SSC x FSC), onde 5000 eventos foram analisados para obter a concentração em células/mL. Foram realizados 3 experimentos.

2.5-Perfil de índice celular em Tempo Real

Para determinar o perfil de índice celular em tempo real (IC – índice em relação à menor impedância) foi utilizado o equipamento xCELLigence RTCA SP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha), segundo as especificações do fabricante. 5×10^3 células foram semeadas por poço em placa de cultura de 96 poços específica do aparelho (E-plate), foram adicionados os tratamentos (0, 1, 2,5, 5, 10, 20 e 40 μM de PLN e 1 μM de CPT), durante 72 h o IC foi monitorado com intervalos de 30 minutos. Foram realizadas 6 repetições de cada concentração em ambas linhagens.

2.6-Ciclo Celular

O perfil do ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo. 3×10^5 células foram semeadas em tubos 10 cm^2 (TPP), após a estabilização, os tratamentos foram adicionados (0, 10 ou 20 μM de PLN e 1 μM de CPT). Após 24 h, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em 100 μL de PBS. 5 μL de RNase (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Invitrogen - CAT: 12091-021) foi adicionado na suspensão celular e mantidas à 37° C durante 30 minutos. Para a lise celular e marcação do DNA, foi utilizado o kit *Guava Cell Cycle Reagent* (CAT - 4500-0220) segundo o protocolo do fabricante. 5000 eventos por tratamento foram avaliados em citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore) para determinar as percentagens de células nas diferentes fases do ciclo (G1, S e G2/M). Foram realizados 3 experimentos.

2.7-Morte Celular por Apoptose

Os níveis de morte celular por apoptose foram avaliados por citometria de fluxo. 3×10^5 células foram semeadas em tubos 10 cm^2 (TPP), após a estabilização, 0, 10 ou 20 μM de PLN e 1 μM de CPT foram adicionados. Após 24 h de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em 100 μL de PBS. Foi utilizado o kit *BD Pharmingen™ – PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (CAT- 559763) segundo o

protocolo do fabricante onde foram avaliados 5000 eventos por tratamento em citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore). Foi estimado as percentagens de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose. As células com ausência de marcação por anexina e 7-AAD foram consideradas viáveis. Marcadas somente com a anexina foram consideradas em apoptose inicial, e células com dupla marcação ou apenas marcadas com 7-AAD foram consideradas em apoptose tardia/necrose. Foram realizados 3 experimentos.

2.8-Genotoxicidade

A genotoxicidade da PLN foi avaliada através do ensaio do Cometa conforme descrito por Collins e colaboradores (Collins, Oscoz et al. 2008). 3×10^5 células foram semeadas em tubos 10 cm² (TPP), após a estabilização, os tratamentos foram adicionados (0, 5, 10 ou 20 μ M de PLN e 1 μ M de DXR). Após 3 h (tempo insuficiente para correção de possíveis danos), as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspensas, 20 μ L desta suspensão foi diluída em 120 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) e distribuídas em lâminas pré-gelatinizadas com agarose (1,5%). As células foram lisadas (NaCl 2,25 M, EDTA 90 mM, Tris-HCl 9 mM, DMSO a 10% e Triton X-100 a 1%) durante 60 minutos à 4° C e submetidas a condições alcalinas (EDTA Titriplex 1 mM, NaOH 0,3 N) durante 20 minutos, a eletroforese foi realizada em pH >13, 25 V, 300 mA durante 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 N pH 7,5 corrigido com HCl), fixadas com etanol absoluto, secadas e estocadas à 4° C. Para a análise, 100 μ L de brometo de etídio (2 μ g/mL) foram utilizados para corar o DNA. As imagens foram obtidas por EVOS Microscópio FL Auto *Cell Imaging System* (Thermo Fisher) com ampliação 100X. As imagens dos cometas foram analisadas no programa CometScore© para avaliar os parâmetros comprimento do cometa e percentagem de DNA na cauda.

2.9-Avaliação de EROs por H₂DCFDA

A avaliação de estresse oxidativo por geração de EROs foi realizado por citometria de fluxo 3×10^5 células foram semeadas por poço em placas de 6 poços (KASVI), após a estabilização, os tratamentos foram adicionados (0, 10 ou 20 μ M de PLN). Após 3 h (início de geração de EROs) de tratamento, 25 μ M de H₂DCFDA foi adicionado após 20 minutos, posteriormente as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em 100 μ L de PBS. Foi analisado 5000 eventos por tratamento em citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore). Foram realizados 3 experimentos.

2.10-Expressão Gênica

Para avaliação de expressão gênica foi utilizado a técnica RT-qPCR. 10^6 células foram semeadas por frasco de 25 cm². Após a estabilização, os tratamentos foram adicionados (0 ou 10 μ M de PLN). Após 12 h o RNA total foi extraído utilizando o RNeasy® Mini Kit Qiagen (Cat. N° 74106), segundo o protocolo do fabricante. Concentrações maiores ou mais tempo de tratamento induziram inibição de genes constitutivos utilizados, não sendo possível sua utilização no estudo. O RNA foi estocado em freezer -80° C. As amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro (BioDrop μ LITE, UK), e sua pureza foi estimada com base na razão de absorbância a 260 nm/280 nm, sendo aceitas somente amostras com razão entre 1,8 e 2,1. A integridade do RNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose (1%). A síntese de cDNA foi realizada utilizando 1000 ng de RNA total em reação com volume final de 20 μ L realizada em triplicata. Para a síntese, o RNA total diluído em água DEPC livre de RNase, 2 μ L de dNTP (10 mM) e 10 pMol de oligo dT₁₂₋₁₈, e incubados em termociclador T100™ Thermal Cycler BIO-RAD à 65° C/ 5 mim. Posteriormente foi adicionado 0,1 μ L RNase out (4 unidades), 4 μ L de tampão M-MLV 5x, 0,5 μ L M-MLV-RT (100 unidades) e mantidas por 37° C/50', 70° C/15' e a etapa final à 10° C. O cDNA foi diluído à concentração de 50 μ g/ μ L para a utilização na PCR em tempo real. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em termociclador CFX96 Touch™ *Real-Time PCR Detection System* (Bio-Rad), utilizando 11 μ L de solução contendo 250 ng de cDNA, 5 μ L de *FastStart SYBR Green Master* (Ref. 04673484001 - ROCHE) e 5 pmol de cada oligonucleotídeos, sob as seguintes condições: 95° C por 5 minutos e 45 ciclos de 95° C/15 segundos, 60° C/20 segundos e 72° C/20 segundo. A análise da curva de *Melting* foi realizada no final de cada reação com temperatura de 55° C à 95° C a cada 0,5 graus por 5 segundos. O gene *RPL13A* (*Ribosomal Protein L13a*) foi utilizado como constitutivo. As reações foram realizadas em triplicata. Os genes utilizados então relacionados a ciclo celular: *CCNA2* (*Ciclin A2*), *CCNB2* (*Ciclin B2*), *CCNB1* (*Ciclin B2*), *CHEK1* (*Checkpoint Kinase 1*), *CHEK2* (*Checkpoint Kinase 2*), *ABL-1* (*ABL Proto-Oncogene 1, Non-Receptor Tyrosine Kinase*), *TP53* (*Tumor Protein P53*), *c-MYC* (*Proto-Oncogene C-Myc*), *mTOR* (*Mechanistic Target of Rapamycin*) e *CDKN1A* (*Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1^a*); danos ao DNA: *GADD45A* (*Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha*) e *H2AFX* (*H2A Histone Family Member X*); apoptose: *BAX* (*BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator*), *BAK* (*BCL2 Antagonist/Killer 1*), *BCL-2* (*BCL2, Apoptosis Regulator*) e *BBC3* (*BCL2 Binding Component 3*); estresse oxidativo: *NFE2L2* (*Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2*), *GPX* (*Glutathione Peroxidase 1*), *SOD1* (*Superoxide Dismutase 1, Soluble*) e *CAT*

(*Catalase*); autofagia: *BECN1* (*Beclin 1*), *IGF1R* (*Insulin Like Growth Factor 1 Receptor*) e *PPIB* (*Peptidylprolyl Isomerase B*); e estresse de reticulo: *EIF2AK3* (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3*) e *ERN1* (*Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1*).

2.11-Análise de Proteínas

Para quantificação de proteínas, utilizamos o aparelho MAGPIX® (Merck Millipore). Em placas de 24 poços (KASVI), foram semeadas 8×10^4 células/poço, após a estabilização, adicionou-se 0 ou 10 μM de PLN e aguardado 24 h de tratamento. Foram utilizados os kits *MILLIPLEX MAP Oxidative Stress Magnetic Bead (h0xstmag-18k)* e *MILLIPLEX MAP DNA Damage/Genotoxicity Beaded Bead (48-621mag)* para avaliação de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e ao dano ao DNA respectivamente. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os protocolos do fabricante. Foram utilizadas três experiências e três repetições por experimentos.

2.12-Analise Estatística

Os valores mensurados para a viabilidade celular, genotoxicidade, ciclo celular, morte celular, integridade de membranas, concentração celular e estresse oxidativo foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett ($p < 0,05$) e regulação de proteínas foi realizado teste t ($p < 0,05$) através do programa GraphPad Prism 5. As análises dos dados de expressão gênica foram realizadas com o método *Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test* inserido no programa Rest 2009 (Pfaffl, Horgan et al. 2002) tendo significância estatística estabelecida em $p < 0,05$, considerando ainda apenas e um fator de expressão inferior a -2 ou superior a 2.

3-RESULTADOS

3.1-Viabilidade celular por MTT

A linhagem não tumoral (HB4a) apresentou redução de viabilidade de maneira dose-dependente a partir de 2,5 μM de PLN com IC_{50} estimado em 27,4 μM . A linhagem tumoral (MCF-7) apresentou redução significativa de viabilidade somente a partir de 10 μM de PLN, seu IC_{50} não foi atingido, porém a concentração mais alta avaliada (40 μM) reduziu a viabilidade celular para 51,7% (Figura 1).

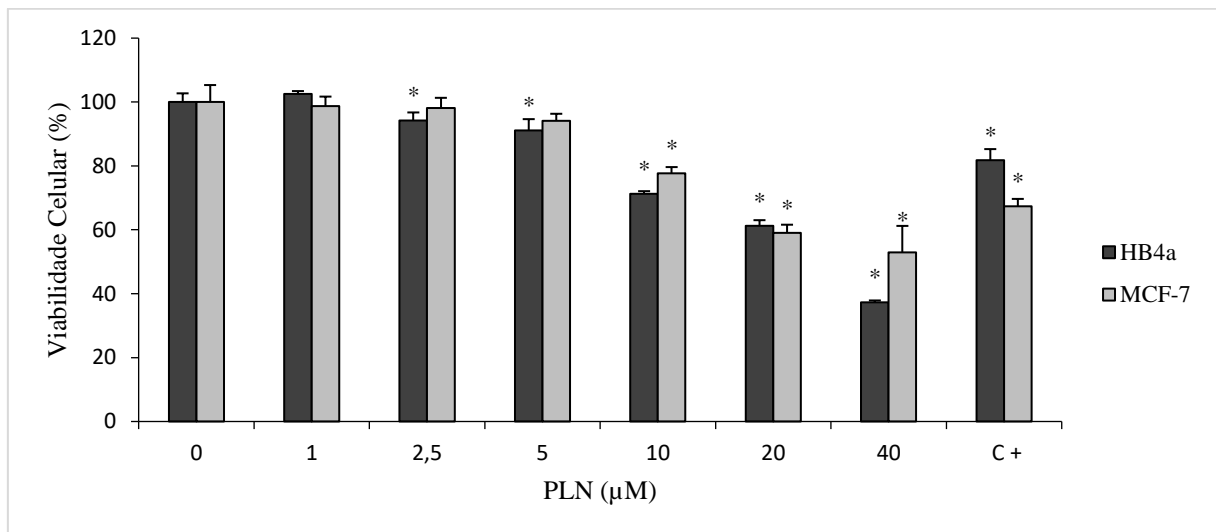


Figura 1. Valores de Viabilidade Celular obtidos pelo ensaio do MTT após 24 h de tratamento para ambas linhagens de mama. IC_{50} das linhagens HB4a e MCF-7 estimados em 27,4 μM e > 40 μM respectivamente. (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$. C+ = Camptotecina 1 μM .

3.2-Integridade de Membrana

O tratamento com 10 μM de PLN, ocasionou redução significativa da população de células com membranas íntegras apenas na linhagem HB4a (92,6%), já o tratamento com 20 μM causou redução significativa de população celular com membranas íntegras em ambas linhagens, reduzindo para 87,83% na HB4a e 90,48% na MCF-7 de células viáveis (Tabela 1).

Tabela 1. Integridade de Membranas (%).

Percentagem de células com membranas íntegras obtidos por citometria de fluxo.

PLN	HB4a	MCF-7
0 μM	96,8 \pm 0,3	95,81 \pm 0,84
10 μM	92,68 \pm 0,88 *	97,05 \pm 1,1
20 μM	87,83 \pm 1,37 *	90,48 \pm 2,07 *

* = $P \leq 0.05$ - ANOVA seguida do pós-teste Dunnett.

3.3-Contagem Celular

Na contagem celular (Figura 2A), observou-se que a concentração de 10 μM causou redução significativa de concentração celular apenas na linhagem não tumoral HB4a, apresentando redução de 45,3% de células em relação ao controle. Já na concentração de 20 μM , além de alteração morfológica em HB4a, ambas linhagens celulares apresentaram redução significativa de concentração celular (HB4a: 51,9% e MCF-7: 26%) em relação ao controle, é possível notar esta diferença nas fotomicrográficas das células (Figura 2B).

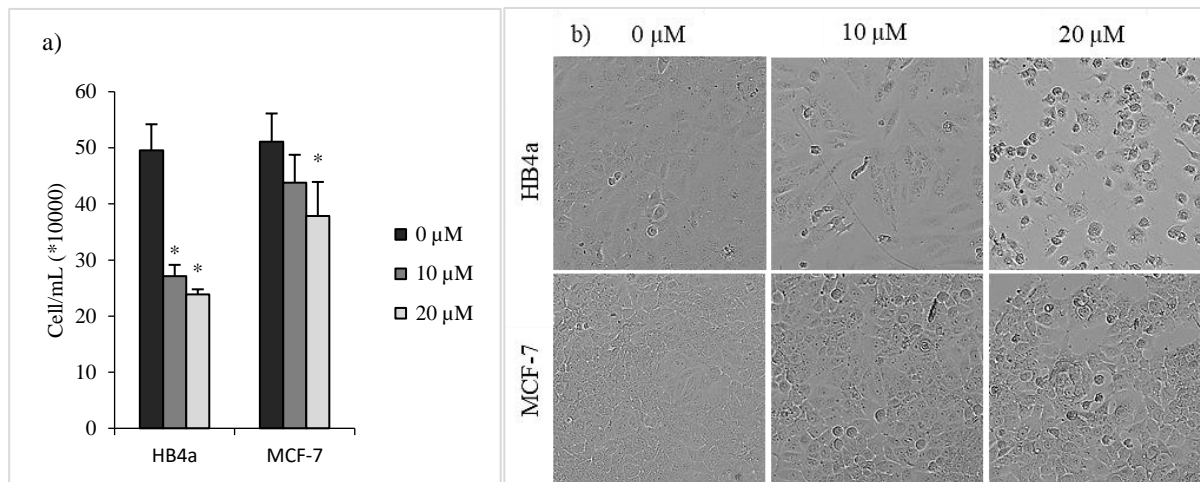


Figura 2. a) contagem após 24 h de tratamento para as linhagens não tumoral (HB4a) e tumoral (MCF-7), (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$. b) Fotomicrografias das células após 24 h de tratamento com 0, 10 ou 20 μM .

3.4-Perfil de Índice Celular em Tempo Real

O estudo de perfil de índice celular em tempo real demonstrou que a PLN atrasou o IC em ambas linhagens. Em HB4a, as concentrações $\geq 5 \mu\text{M}$ demonstraram redução do IC a partir de 1 – 6 h de tratamento, onde a concentração de $5 \mu\text{M}$ apresentou recuperação do IC em momentos mais tardios após o tratamento; $10 \mu\text{M}$ apresentou retenção de proliferação; e 20 e $40 \mu\text{M}$ apresentaram redução do índice celular a partir do início do tratamento, sem recuperação da proliferação (Figura 3A). Na linhagem MCF-7, $5 \mu\text{M}$ de PLN induziu uma leve retenção com rápida recuperação dos ICs; as concentrações de 10 e $20 \mu\text{M}$ de PLN apresentaram atraso na proliferação com recuperação; e $40 \mu\text{M}$ de PLN causou redução do índice celular a partir do início do tratamento, sem recuperação da proliferação (Figura 3B).

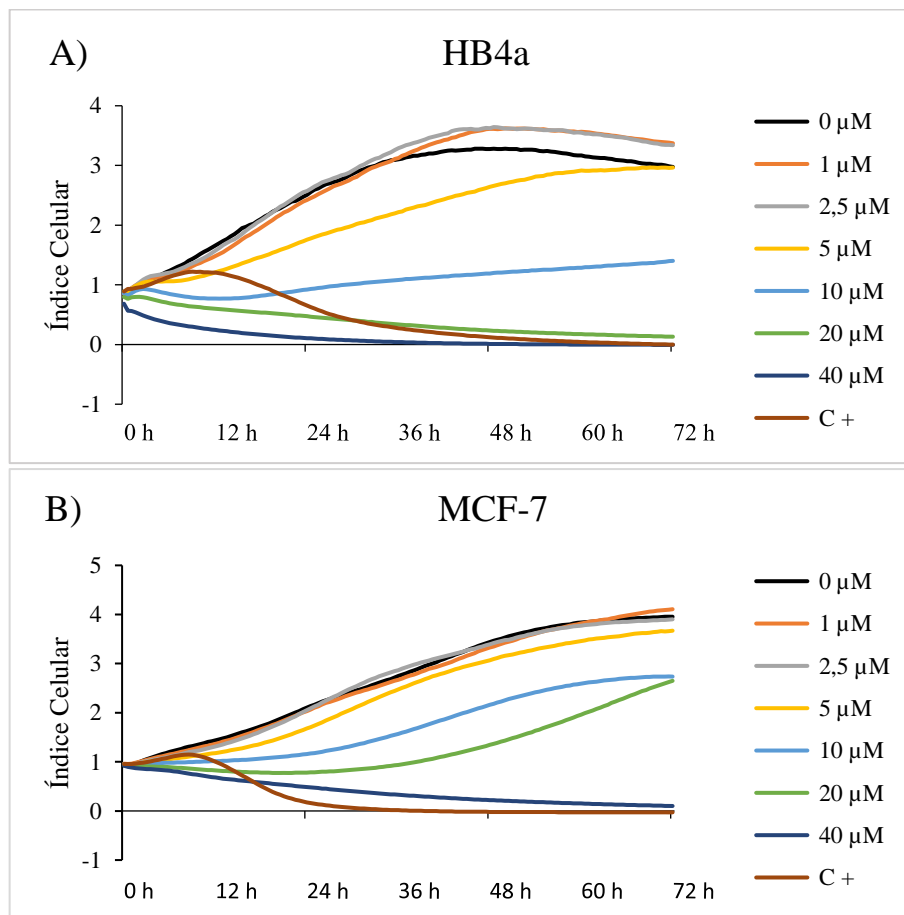


Figura 3. Perfil de índice celular em tempo real obtido pelo aparelho xCELLigence SP (ROCHE), e monitorada durante 72 h a cada 30 minutos após o tratamento para as linhagens não tumoral (A) e tumoral (B). C + = 1 μM de Camptotecina.

3.5-Ciclo Celular

Na análise do perfil de distribuição do ciclo celular, ambas linhagens apresentaram aumento de número de células em fase G2/M. Na linhagem HB4a (Figura 4A), as concentrações 10 e 20 μM apresentaram como consequência, redução em G1 e aumento na fase S para a concentração mais alta. Já na linhagem MCF-7 (Figura 4B), os tratamentos apresentaram redução de S, e da fase G1 na concentração mais alta.

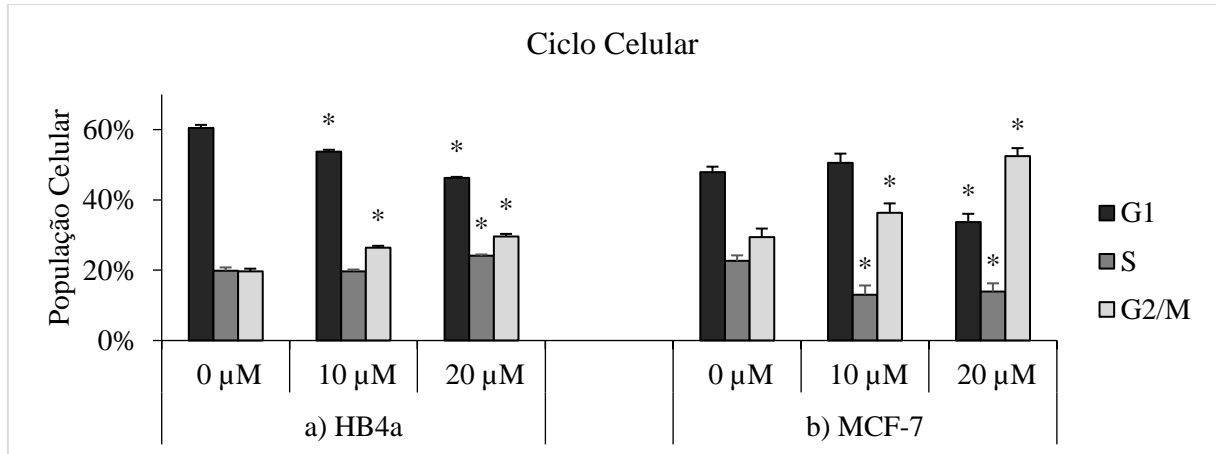


Figura 4. O ciclo celular foi obtido por citometria de fluxo após 24 h de tratamento para as linhagens não tumoral (A) e tumoral (B). (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

3.6-Morte Celular por Apoptose

A linhagem não tumoral (HB4a) tratada com 10 μM de PLN apresentou aumento significativo de apoptose inicial e quando tratada com 20 μM de PLN, também apresentou aumento de apoptose tardia/necrose (Figura 5A) com consequente redução do controle negativo no tratamento. A linhagem tumoral (MCF-7) não apresentou aumento significativo de apoptose em nenhuma das condições estudadas (Figura 5B).

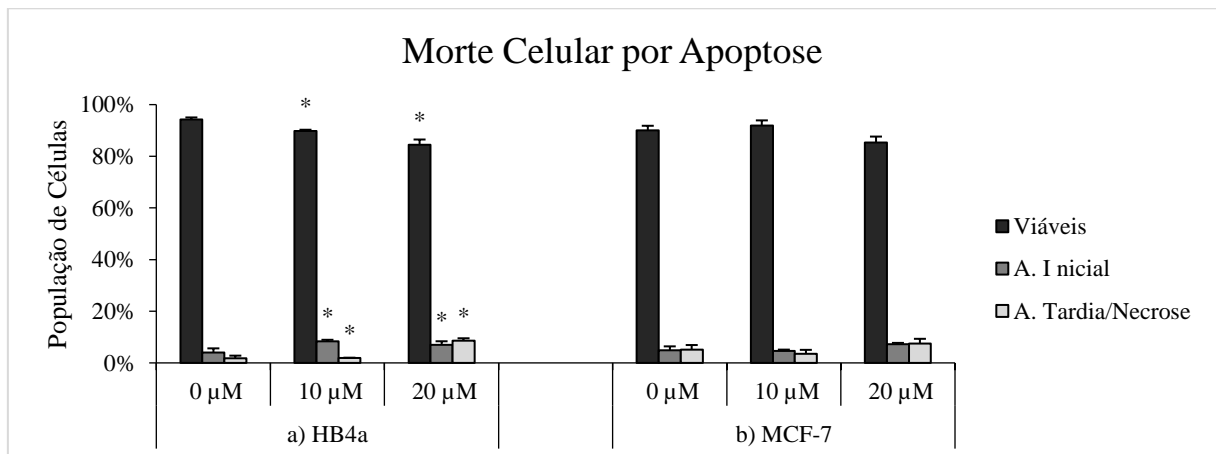


Figura 5. O percentual de morte celular por apoptose foi obtido por citometria de fluxo após 24 h de tratamento para as linhagens não tumoral (A) e tumoral (B). (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

3.7-Genotoxicidade

No ensaio de genotoxicidade (tabela 2), apenas o tratamento com 20 μM de PLN induziu danos no DNA em ambas linhagens, com aumento de 16,6% e 20,4% do comprimento total do Cometa nas linhagens HB4a e MCF-7, respectivamente, com consequente aumento de comprimento da cauda. O tratamento com 20 μM causou um leve aumento de DNA na cauda de maneira significativa em ambas linhagens.

Tabela 2. Comprimento total do cometa e percentagem de DNA na cauda obtidas pelo ensaio do cometa após 3 h de tratamento com 0, 5, 10 ou 20 μM de PLN. C+: Doxorrubicina 1 μM .

PLN	HB4a		MCF-7	
	Comprimento Total do Cometa (Px)	DNA na Cauda	Comprimento Total do Cometa (Px)	DNA na Cauda
0 μM	53,97 \pm 4,31	0,88% \pm 0,16%	50,98 \pm 1,42	0,6% \pm 0,12%
5 μM	53,73 \pm 0,76	0,63% \pm 0,14%	52,55 \pm 0,95	0,94% \pm 0,71%
10 μM	50,99 \pm 1,95	0,71% \pm 0,29%	49,49 \pm 0,13	1,44% \pm 0,41%
20 μM	62,95 \pm 5,87 *	3,05% \pm 1,39% *	61,39 \pm 2,27 *	2,83% \pm 1,20% *
C+	105,18 \pm 0,05 *	21,02% \pm 0,06% *	89,07 \pm 1,42 *	6,16% \pm 0,72% *

* = $P \leq 0.05$ - ANOVA seguida do pós-teste Dunnett.

3.8-Estresse Oxidativo por H₂DCFDA

Na análise de estresse oxidativo por geração de EROs (Figura 6), as concentrações de 10 e 20 μM de PLN foram capazes de aumentar significativamente EROs em HB4a (1,4 e 1,2 x) e MCF-7 (1,3 e 1,4 x) em relação ao controle.

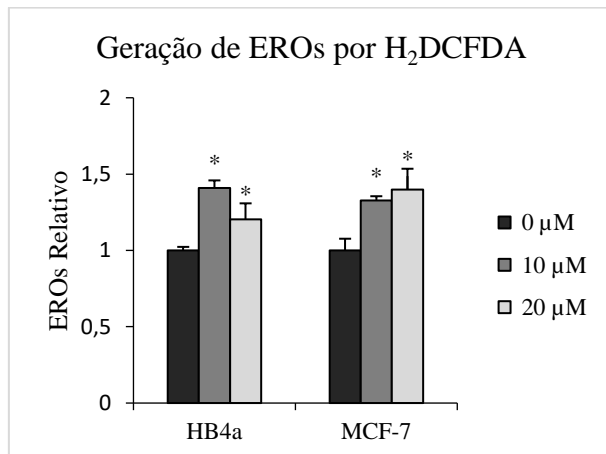


Figura 6. Estimativa de geração de EROs por H₂DCFDA obtido por citometria de fluxo após 3 h de tratamento com 0, 10 ou 20 μM de PLN para ambas linhagens não tumoral (HB4a) e tumoral (MCF-7). (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

3.9-Expressão Gênica

Na expressão gênica relativa, após o tratamento com 10 μ M, a linhagem não tumoral (HB4a) apresentou aumento significativo de expressão de mRNA dos genes relacionados à morte celular, *BBC3* (6,8 x), danos ao DNA, *GADD45A* (2,3 x) e *H2AFX* (2,1 x), estresse oxidativo, (*NFE2L2* (4,2 x), *SOD1* (3,1 x) e redução de expressão de mRNA nos genes relacionados à proliferação celular, *CCNB2* (3 x) e *TP53* (2,1 x) e relacionados a autofagia, *IGF1R* (5 x), nesta linhagem, não houve amplificação de mRNA de *CDKN1A* em nenhuma repetição. Na linhagem tumoral MCF-7, observou-se aumento de expressão relativa dos genes *GADD45A* (5,6 x), *SOD1* (2,4 x) e *CDKN1A* (3,4x) e redução de expressão dos mRNA nos genes *TP53* (2,1 x) e *CHEK1* (2,6 x) (Figura 7).

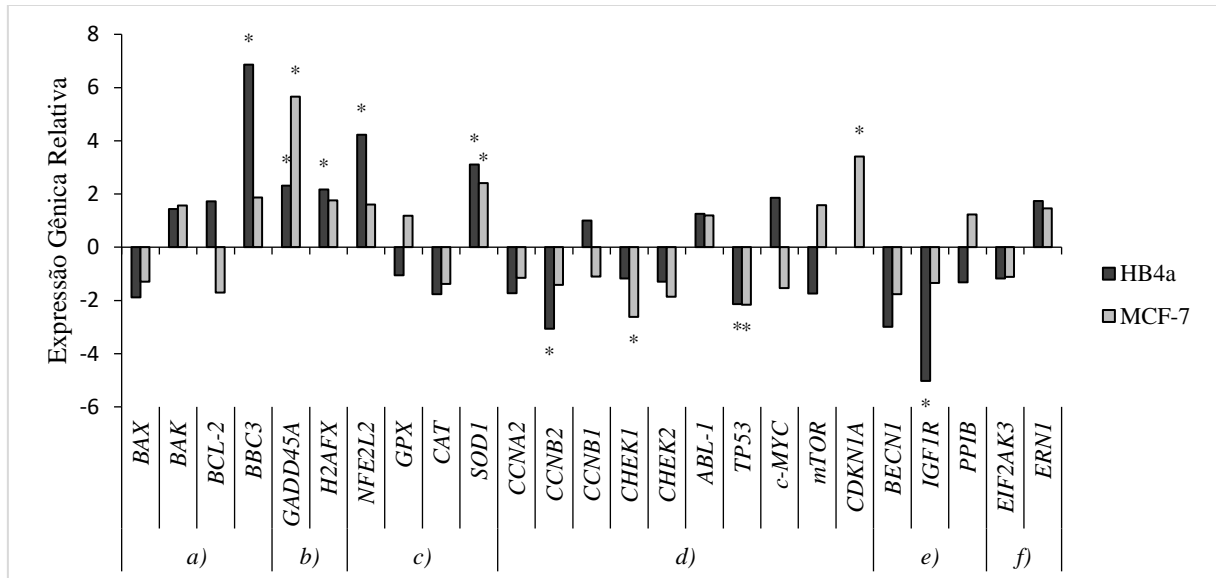


Figura 7. Expressão relativas de genes relacionados a morte celular (a), danos ao DNA (b), estresse oxidativo (c), ciclo celular (d), autofagia (e) e estresse de retículo (f) após tratamento com 10 μ M de PLN durante 12 h. (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$, considerando ainda apenas e um fator de expressão inferior a -2 ou superior a 2.

3.10-Regulação de Proteínas

Após 24 h de tratamento com PLN 10 μM , na linhagem HB4a, observamos redução na quantidade de proteínas Catalase, tioredoxina1 (TRx1), Peroxirredoxina 2 (PRX2), ATR serina/treonina quinase (ATR), e aumento na quantidade de proteína p21 (Figura 8ab). Na linhagem MCF-7, observamos redução na quantidade de proteínas Catalase, TRx1, PRX2, ATR e Chk1 e aumento na quantidade de p21 e p53 (Figura 8ab).

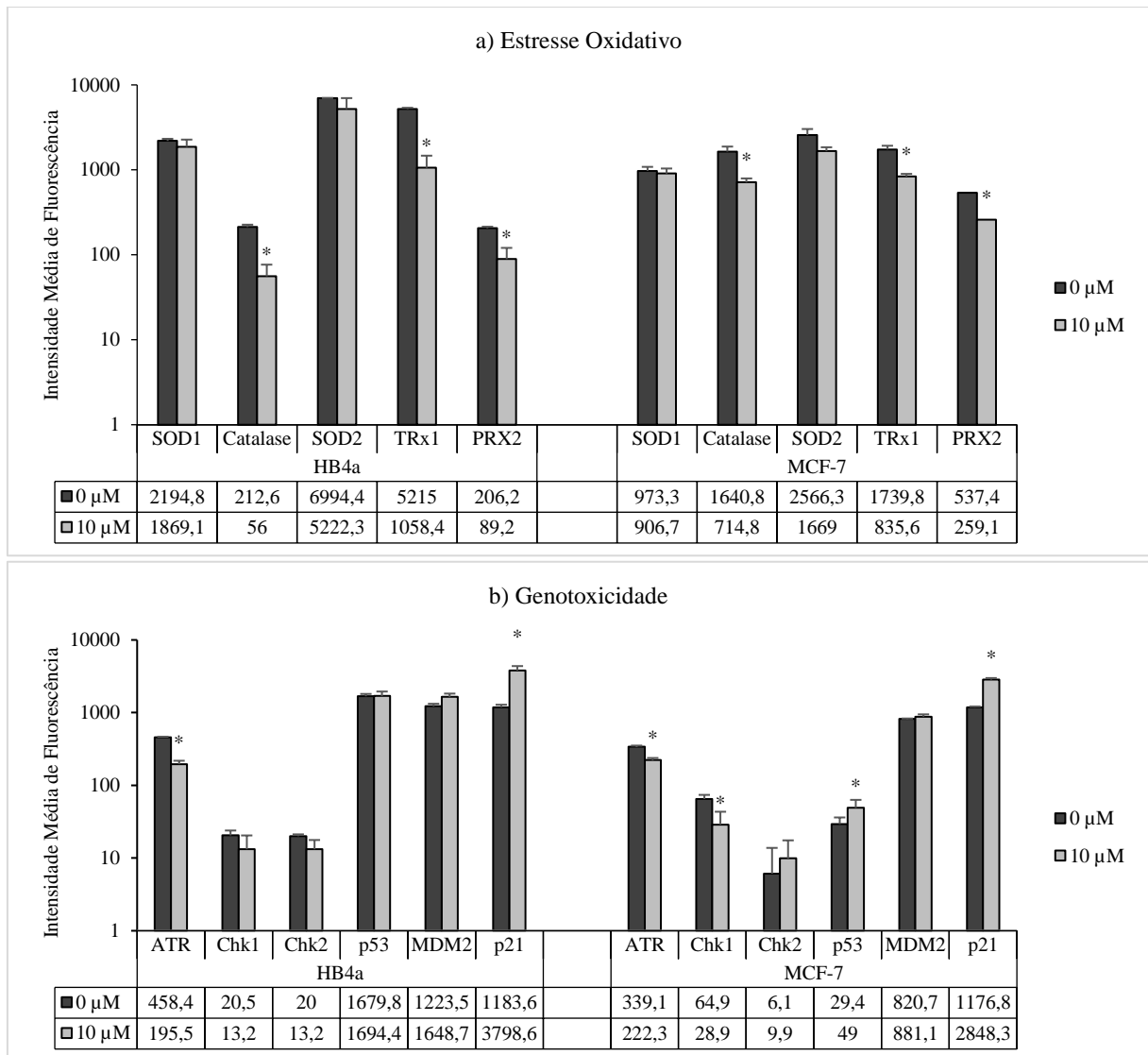


Figura 8. Regulação de proteínas avaliadas por MagPix (Tecnologia Luminex). (a) Proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (SOD1, Catalase, SOD2, TRx1 e PRX2). (b) Proteínas relacionadas ao dano do DNA (ATR, Chk1, Chk2, p53, MDM2 e p21). "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$.

4-DISCUSSÃO

A PLN tem apresentado importantes efeitos biológicos, como a redução de crescimento tumoral e principalmente, a seletividade por células tumorais (Raj, Ide et al. 2011). Desta maneira torna-se importante investigar os mecanismos de ação utilizados por esta droga em linhagem tumorais e não tumorais para maior segurança em seus propósitos terapêuticos, identificando papéis chave que possam diferenciar a ação nesses dois tipos celulares, tumoral e não tumoral.

Nossos resultados demonstraram que a PLN apresentou efeito citotóxico em ambas linhagens estudadas, entretanto, observou-se IC_{50} menor na linhagem não tumoral indicando ausência de seletividade à linhagem tumoral. Como os ensaios foram realizados com 24 h de tratamento, essa diferença pode estar relacionada a uma resposta mais tardia de MCF-7 para a PLN, visto que esta linhagem, por ser tumoral, apresenta maior resistência. Shashikant e colaboradores (Shashikant, Patnaik et al. 2015), observaram que a linhagem MCF-7 após 48 h de tratamento, apresentou IC_{50} próximo a 3 μ M. No entanto, estes valores podem variar em diferentes tipos celulares, em células de Leucemia promielocítica aguda NB4, são necessários 8,97 μ M de PLN para atingir o IC_{50} , enquanto que as linhagens de Leucemia de células T (Jurkat) e de Leucemia crônica de células B (Mec1) não apresentam qualquer redução de viabilidade com 30 μ M de PLN em 24 h (Alpay, Yurdakok-Dikmen et al. 2016). Sugerindo que a PLN pode ser melhor aplicada em determinados tipos celulares.

Além do ensaio do MTT, avaliamos neste trabalho a integridade de membranas como um segundo parâmetro de viabilidade celular e encontramos maior percentagem de células com membranas danificadas na linhagem não tumoral, neste caso, a concentração de 10 μ M de PLN já interferiu na integridade de membranas em HB4a, sendo necessário 20 μ M de PLN para interferir na MCF-7 significativamente. Han e colaboradores (Han, Han et al. 2014) também observaram a redução de células com membrana íntegra pelo tratamento com PLN em células de Leucemia mielóide crônica humana (KBM-5) após 24 h. Além disso, em células MCF-7, também foi observado, através do ensaio do LDH, aumento de danos em membranas após 48 h de tratamento (Shashikant, Patnaik et al. 2015), indicando que a redução de viabilidade celular por PLN, verificada no ensaio do MTT, pode estar relacionada à danos na membrana celular. Além disso, a elevação de EROs induzida por PLN pode causar danos diretos aos lipídios, gerando danos a membrana (Jarvis, Fryknäs et al. 2013). Neste trabalho, observamos aumento de EROs em ambas linhagens.

Visto que a PLN tem a capacidade de inibir a proliferação celular em várias linhagens (Han, Tompkins et al. 2013, Han, Han et al. 2014), e a contagem celular por citometria de fluxo resultou em uma redução de aproximadamente 50% da concentração celular de HB4a (10 e 20 μM), enquanto apenas a concentração mais alta de PLN induziu redução significativa na concentração celular de MCF-7, nós avaliamos o perfil do índice celular em tempo real durante 72 h por RTCA. Observamos que foram necessárias concentrações maiores de PLN na linhagem MCF-7 para ter efeitos semelhantes ao da linhagem não tumoral. Em células de câncer epitelial de ovário, a redução de proliferação foi devido a retenção celular em fase G2/M por aumento de EROs intracelular causado por PLN (Gong, Chen et al. 2014). Nossos resultados demonstraram que as concentrações 10 e 20 μM de PLN causam, na linhagem HB4a, retenção celular em fase G2/M e fase S na concentração mais alta e redução de expressão dos mRNA dos genes *CCNB2* e *TP53*, e na linhagem MCF-7, retenção em G2/M e redução de expressão de mRNA de *CHEK1* e *TP53*, com elevação de expressão de mRNA de *CDKN1A* (gene precursor de p21), também observamos em ambas linhagens um aumento de proteína p21, responsável por regular a progressão de ciclo principalmente em G1, mas que pode parar o ciclo celular em G2/M na presença de danos ao DNA (Bunz, Dutriaux et al. 1998, Dash and El-Deiry 2005). O gene *CCNB2* é um membro da família Ciclina B, o qual desempenha um papel chave na progressão da fase G para M pela formação do complexo Ciclina B/CDK1 (Qian, Song et al. 2015). Este complexo está localizado no complexo de Golgi, atua na fragmentação deste, durante a divisão celular (Gong and Ferrell 2010). A redução de expressão de mRNA do gene *CCNB2* em HB4a pode inibir a formação do complexo Ciclina B/CDK1 e inibir fragmentação do complexo de Golgi. Diferente resposta foi observada para a linhagem MCF-7, onde não foi encontrado diferença na expressão relativa do gene *CCNB2*, provavelmente devido ao menor tempo de ciclo celular (*double time*) na MCF-7 e menor potência de ação da PLN nesta linhagem, no entanto, foi detectado a redução da expressão de mRNA do gene *CHEK1* e na regulação de proteínas (Chk1), o qual atua na retenção do ciclo celular em resposta a danos ou não replicação do DNA, sua inibição pode induzir perda de capacidade de reparar o DNA danificado nas células (Toledo, Murga et al. 2011). O gene *TP53* codifica uma proteína relacionado a várias funções celulares como retenção do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo ao DNA ou mesmo alteração no metabolismo devido a vários fatores como quebra de DNA, estresse oxidativo, entre outros (Petitjean, Achatz et al. 2007). Observamos expressão do mRNA de *TP53* reduzido em ambas linhagens, o que pode ter diminuído a capacidade das células de se protegerem destes fatores. Também há relatos de que a PLN é capaz de induzir morte celular independente do status de expressão deste gene (Basak, Punganuru et al. 2016).

No entanto, observamos na linhagem MCF-7 um aumento na quantidade de proteínas p53 após 24 h de tratamento, indicando que houve ativação posterior de p53 na linhagem tumoral.

Em linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 tratada com PLN, a inibição da proliferação foi associada a parada celular em fase G1 com regulação negativa da via NF-KB, levando a ativação da via apoptótica mitocondrial (Shrivastava, Kulkarni et al. 2014). Em nosso trabalho, observamos que a linhagem HB4a apresentou apoptose inicial com 10 μ M de PLN e apoptose inicial e tardia/necrose com 20 μ M, porém não encontramos apoptose em células MCF-7, possivelmente pela maior resistência de células tumorais. Em linhagem de mama MDA-MB-468, a PLN induziu apoptose após diminuir os níveis de cinco proteínas anti-apoptóticas principais (Bcl-2, Bcl-xL, Survivina, XIAP e CIAP) e aumentando os níveis de PUMA (codificado pelo gene *BBC3*) e BCL-2 (Bharadwaj, Eckols et al. 2015). No presente estudo, o gene *BBC3*, o qual codifica uma proteína pró-apoptótica e está ligado a ativação de P53, teve sua expressão aumentada na linhagem HB4a. Nesta linhagem encontramos redução de expressão do gene *TP53*, o que indica que o aumento da expressão do *BBC3* foi induzido de forma independente da ativação de P53, isso pode ocorrer por outros estímulos, tais como, estresse no retículo endoplasmático e alteração no estado Redox (Reimertz, Kögel et al. 2003). Os baixos níveis de células apoptóticas detectadas pode estar relacionado ao tempo experimental de 24h, onde PLN teria respostas mais rápidas para a morte em tempo menores, correlacionando-se aos dados obtidos no RTCA onde em 12 h já é expressiva a redução dos índices celulares na linhagem HB4a e também em MCF-7. No entanto, esta redução em MCF-7 se deve principalmente por parada em G2/M, visto que em outro estudo, Lee e colaboradores (Lee, Jin et al. 2015) observaram que em 36 h, 5 μ M de PLN induziu 21,9% de células MCF-7 à apoptose. Avaliamos genes referente a autofagia, não encontramos expressão elevada de nenhum nas condições estudadas, no entanto, encontramos em HB4a uma redução de expressão d mRNA de *IGF1R*, receptor tirosina quinase que medeia ações do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF1), o *IGF1R* está envolvido no crescimento celular e controle de sobrevivência (Slaaby, Schäffer et al. 2006). Neste trabalho, HB4a é suplementada com insulina para manter sua sobrevivência, a redução de expressão deste gene pode ter contribuído para a redução de número de células observado.

A indução de apoptose em linhagem HepG2 foi relacionado à elevação dos níveis de EROs mediada por PLN (Chen, Liu et al. 2015). As EROs estão entre as principais fontes causadoras de danos no DNA e são fatores substanciais que contribuem para o acúmulo de mutações, deleções e instabilidade cromossômica, que pode levar ao bloqueio do ciclo celular,

apoptose ou mesmo câncer (Xu, Zhai et al. 2015). Já foi demonstrado que a PLN causa elevação de EROs em várias linhagens de células de câncer de cabeça e pescoço (HNC) independente de p53, induzindo morte das células malignas de maneira seletiva (Roh, Kim et al. 2014). Além disso, Dhillon e colaboradores (Dhillon, Chikara et al. 2014) utilizaram a PLN como agente gerador de EROs para induzir a morte de células de câncer pancreático *in vitro* e *in vivo*, além de causar danos no DNA. Em nosso estudo, a PLN induziu quebras de fita de DNA em ambas linhagens estudadas quando tratadas com 20 μ M de PLN durante 3 h, com aumento significativo de DNA na cauda. Nossos dados também demonstram aumento na expressão de mRNA do gene *GADD45A*, um indicador de danos, em ambas linhagens, porém de maneira mais evidente na linhagem MCF-7. Este gene também foi encontrado com expressão elevada em células de Linfoma de Burkitt (Han, Tompkins et al. 2013), e de câncer gástrico tratadas com PLN, além de parada destas células em G2/M (Duan, Zhang et al. 2016). Danos ao DNA também podem estimular a expressão do gene *H2AFX*, que está relacionado com a histona H2A e atuante no reparo do DNA (Cornelissen, Kersemans et al. 2011), como observado em nosso estudo para a linhagem HB4a.

Nós observamos que a PLN apresentou indução de EROs, desta maneira, avaliamos a expressão do genes e regulação de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo. Nossos resultados demonstram que ambas linhagens apresentaram aumento de expressão de mRNA de *SOD1* de maneira significativa (12 h), principalmente na linhagem não tumoral, no entanto, os níveis de proteínas SOD1 em 24 h não foram alterados, indicando ativação mais inicial deste mecanismo, SOD1 está relacionado com a eliminação de EROs (Milani, Gagliardi et al. 2011). Também observamos em linhagem HB4a, aumento significativo de expressão de mRNA do gene *NFE2L2*, o qual codifica uma proteína que regula a expressão de proteínas antioxidantes que protegem contra danos oxidativos e lesão ao DNA (Kumagai, Kanda et al. 2013) indicando que a PLN deve aumentar o estresse oxidativo nestas linhagens. Aparte disso, o tratamento com 10 μ M de PLN induziu após 24 a redução da quantidade de proteínas catalase, TRx1, PRX2 e ATR em ambas linhagens. A Catalase é uma enzima chave na defesa contra o estresse oxidativo, esta enzima é presente no peroxissoma, atuando na conversão de espécies reativas de oxigênio em água (Nahon, Sutton et al. 2009). A TRx1 é envolvida em muitas reações redox, atuando na redução de dissulfetos (Nordberg and Arner 2001), e a PRx2 age reduzindo peróxidos de hidrogênio e hidroperóxidos de alquilo, desempenhando papel protetor antioxidante (Sobotta, Liou et al. 2015). ATR desempenha papel na regulação das respostas de danos ao DNA, está envolvida na inibição de replicação, e também na ativação de vias

apoptóticas (Abraham 2001). A redução na quantidade destas proteínas em ambas linhagens demonstra que a PLN interfere nos mecanismos de defesa antioxidante elevando o estresse oxidativo e a inibição de ATR pode ter sensibilizado as células para danos.

Em conclusão, a redução da viabilidade celular observada no MTT, integridade de membrana e a alterações nos padrões de cinética de proliferação se devem principalmente por parada de ciclo celular na fase G2/M em ambas linhagens, provavelmente devido à elevação de EROs causado pela PLN em ambas linhagens em consequência da regulação negativa de proteínas antioxidantes, levando a danos ao DNA. Estes resultados demonstram que a PLN também pode afetar células não tumorais, sendo necessário cautela em sua utilização, principalmente *in vivo*.

5.AGRADECIMENTOS.

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham, R. T. (2001). "Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases." Genes & development **15**(17): 2177-2196.

Alpay, M., et al. (2016). "Antileukemic effects of piperlongumine and alpha lipoic acid combination on Jurkat, MEC1 and NB4 cells in vitro." Journal of cancer research and therapeutics **12**(2): 556.

Basak, D., et al. (2016). "Piperlongumine exerts cytotoxic effects against cancer cells with mutant p53 proteins at least in part by restoring the biological functions of the tumor suppressor." Int J Oncol **48**(4): 1426-1436.

Bharadwaj, U., et al. (2015). "Drug-repositioning screening identified piperlongumine as a direct STAT3 inhibitor with potent activity against breast cancer." Oncogene **34**(11): 1341.

Bunz, F., et al. (1998). "Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage." Science **282**(5393): 1497-1501.

Chen, Y., et al. (2015). "Piperlongumine selectively kills hepatocellular carcinoma cells and preferentially inhibits their invasion via ROS-ER-MAPKs-CHOP." Oncotarget **6**(8): 6406.

Collins, A. R., et al. (2008). "The comet assay: topical issues." Mutagenesis **23**(3): 143-151.

Cornelissen, B., et al. (2011). "Imaging DNA damage in vivo using γ H2AX-targeted immunoconjugates." Cancer research **71**(13): 4539-4549.

Dash, B. C. and W. S. El-Deiry (2005). "Phosphorylation of p21 in G2/M promotes cyclin B-Cdc2 kinase activity." Molecular and cellular biology **25**(8): 3364-3387.

Dhillon, H., et al. (2014). "Piperlongumine induces pancreatic cancer cell death by enhancing reactive oxygen species and DNA damage." Toxicol Rep **1**: 309-318.

Duan, C., et al. (2016). "Piperlongumine induces gastric cancer cell apoptosis and G2/M cell cycle arrest both in vitro and in vivo." Tumor Biology **37**(8): 10793-10804.

Ferlay, J., et al. (2015). "Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012." Int J Cancer **136**(5): E359-386.

Glasauer, A. and N. S. Chandel (2014). "Targeting antioxidants for cancer therapy." Biochemical pharmacology **92**(1): 90-101.

Gong, D. and J. E. Ferrell (2010). "The roles of cyclin A2, B1, and B2 in early and late mitotic events." Molecular biology of the cell **21**(18): 3149-3161.

Gong, L.-H., et al. (2014). "Piperlongumine induces apoptosis and synergizes with cisplatin or paclitaxel in human ovarian cancer cells." Oxidative medicine and cellular longevity **2014**.

Han, J. G., et al. (2014). "Piperlongumine chemosensitizes tumor cells through interaction with cysteine 179 of IkappaBalpha kinase, leading to suppression of NF-kappaB-regulated gene products." Mol Cancer Ther **13**(10): 2422-2435.

Han, S.-S., et al. (2013). "Piperlongumine inhibits LMP1/MYC-dependent mouse B-lymphoma cells." Biochemical and biophysical research communications **436**(4): 660-665.

Han, S. S., et al. (2014). "Piperlongumine inhibits the proliferation and survival of B-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines irrespective of glucocorticoid resistance." Biochem Biophys Res Commun **452**(3): 669-675.

Jarvis, M., et al. (2013). "Piperlongumine induces inhibition of the ubiquitin–proteasome system in cancer cells." Biochemical and biophysical research communications **431**(2): 117-123.

Johnson, I. T. (2007). "Phytochemicals and cancer." Proceedings of the Nutrition Society **66**(2): 207-215.

Kang, Q. and S. Yan (2015). "Piperlongumine reverses doxorubicin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in K562/A02 human leukemia cells." Experimental and therapeutic medicine **9**(4): 1345-1350.

Kumagai, Y., et al. (2013). "The role of the Keap1/Nrf2 pathway in the cellular response to methylmercury." Oxidative medicine and cellular longevity **2013**.

Lee, H.-N., et al. (2015). "Heme oxygenase-1 determines the differential response of breast cancer and normal cells to piperlongumine." Molecules and cells **38**(4): 327.

Li, J., et al. (2015). "Piperlongumine and immune cytokine TRAIL synergize to promote tumor death." Sci Rep **5**: 9987.

Liu, J. M., et al. (2013). "Piperlongumine selectively kills glioblastoma multiforme cells via reactive oxygen species accumulation dependent JNK and p38 activation." Biochem Biophys Res Commun **437**(1): 87-93.

Makhov, P., et al. (2014). "Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signalling and mediates cancer cell death." Br J Cancer **110**(4): 899-907.

Milani, P., et al. (2011). "SOD1 transcriptional and posttranscriptional regulation and its potential implications in ALS." Neurology research international **2011**.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of immunological methods **65**(1-2): 55-63.

Nahon, P., et al. (2009). "Myeloperoxidase and superoxide dismutase 2 polymorphisms comodulate the risk of hepatocellular carcinoma and death in alcoholic cirrhosis." Hepatology **50**(5): 1484-1493.

Newman, D. J. and G. M. Cragg (2016). "Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014." J. Nat. Prod **79**(3): 629-661.

Nordberg, J. and E. S. Arner (2001). "Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system1." Free radical biology and medicine **31**(11): 1287-1312.

Petitjean, A., et al. (2007). "TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes." Oncogene **26**(15): 2157.

Pfaffl, M. W., et al. (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**(9): e36-e36.

Qian, X., et al. (2015). "CCNB2 overexpression is a poor prognostic biomarker in Chinese NSCLC patients." Biomedicine & Pharmacotherapy **74**: 222-227.

Raj, L., et al. (2011). "Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS." Nature **475**(7355): 231-234.

Reimertz, C., et al. (2003). "Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway." The Journal of cell biology **162**(4): 587-597.

Roh, J.-L., et al. (2014). "Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer." Oncotarget **5**(19): 9227.

Rouquette, M., et al. (1998). "Xanthine oxidoreductase is asymmetrically localised on the outer surface of human endothelial and epithelial cells in culture." FEBS letters **426**(3): 397-401.

Shashikant, K. P., et al. (2015). "Piperlonguimine induces cell death via ros generation, atp depletion, glutathione depletion and dissipation of mitochondrial membrane potential in

human breast cancer cell line." International Journal of Pharma and Bio Sciences **6**(2): 293-302.

Shrivastava, S., et al. (2014). "Piperlongumine, an alkaloid causes inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling axis to induce caspase-dependent apoptosis in human triple-negative breast cancer cells." Apoptosis **19**(7): 1148-1164.

Slaaby, R., et al. (2006). "Hybrid receptors formed by insulin receptor (IR) and insulin-like growth factor I receptor (IGF-IR) have low insulin and high IGF-1 affinity irrespective of the IR splice variant." Journal of Biological Chemistry **281**(36): 25869-25874.

Sobotta, M. C., et al. (2015). "Peroxisome oxidoreductase-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling." Nature chemical biology **11**(1): 64.

Srinivasa Reddy, P., et al. (2001). "Antibacterial activity of isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*." Pharmaceutical biology **39**(3): 236-238.

Stamps, A. C., et al. (1994). "Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct." International journal of cancer **57**(6): 865-874.

Tanaka, S., et al. (2017). "The prolyl oligopeptidase inhibitor SUAM-14746 attenuates the proliferation of human breast cancer cell lines in vitro." Breast Cancer **24**(5): 658-666.

Toledo, L. I., et al. (2011). "Targeting ATR and Chk1 kinases for cancer treatment: a new model for new (and old) drugs." Molecular oncology **5**(4): 368-373.

Tsuboy, M. S., et al. (2014). "Genistein at maximal physiologic serum levels induces G₀/G₁ arrest in MCF-7 and HB4a cells, but not apoptosis." Journal of medicinal food **17**(2): 218-225.

Wang, F., et al. (2015). "Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway." International journal of immunopathology and pharmacology **28**(3): 362-373.

Wang, Y.-H., et al. (2014). "Anticancer principles from medicinal Piper (胡椒 Hú Jiāo) plants." Journal of traditional and complementary medicine **4**(1): 8-16.

Xu, H.-G., et al. (2015). "LKB1 reduces ROS-mediated cell damage via activation of p38." Oncogene **34**(29): 3848.

Zhang, J.-y., et al. (2010). "Anthracenedione derivatives as anticancer agents isolated from secondary metabolites of the mangrove endophytic fungi." Marine drugs **8**(4): 1469-1481.

Zou, P., et al. (2015). "Auranofin induces apoptosis by ROS-mediated ER stress and mitochondrial dysfunction and displayed synergistic lethality with piperlongumine in gastric cancer." Oncotarget **6**(34): 36505.

6-MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 - Viabilidade Celular obtidos para cada linhagem pelo ensaio do MTT em 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M.

VIABILIDADE CELULAR							
Concentração de PLN (μ M)	HB4a				MCF-7		
0	100%	\pm	2,72%		100%	\pm	5,31%
1	102,52%	\pm	0,90%	-	98,70%	\pm	3,00%
2,5	94,24%	\pm	2,49%	*	98,11%	\pm	3,20%
5	91,08%	\pm	3,57%	**	94,13%	\pm	2,19%
10	71,32%	\pm	0,77%	***	77,68%	\pm	1,95%
20	61,25%	\pm	1,76%	***	59,05%	\pm	2,55%
40	37,25%	\pm	0,63%	***	52,92%	\pm	8,31%
C+	81,79%	\pm	3,48%	***	67,39%	\pm	2,29%

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Dunnett*.

Tabela S2 – Contagem celular. Número de células por mL (*10000) obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M

CONTAGEM CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO							
Concentração de PLN (μ M)	HB4a				MCF-7		
0	49,54	\pm	4,65		51,08	\pm	5,04
10	27,12	\pm	2,01	***	43,80	\pm	4,95
20	23,85	\pm	0,92	***	37,83	\pm	6,08
C+	21,53	\pm	1,60	***	54,14	\pm	3,09

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Dunnett*.

Tabela S3 – Índices Celulares obtidos por RTCA no estudo da cinética de proliferação celular. C+ = Camptotecina 1 μ M.

ÍNDICES CELULARES OBTIDOS POR RTCA								
	Concentração de PLN (μ M)	Tempo de Tratamento						
		0 h	12 h	24 h	35 h	48 h	60 h	72 h
HB4a	0	0,8705	1,6616	2,509	3,1019	3,2769	3,1699	2,9764
	1	0,8534	1,4833	2,4206	3,1273	3,6126	3,5638	3,3693
	2,5	0,8539	1,5769	2,5742	3,2912	3,6241	3,5471	3,3404
	5	0,8874	1,2096	1,7549	2,2164	2,6422	2,9146	2,9632
	10	0,8537	0,7687	0,923	1,0827	1,1914	1,2878	1,4013
	20	0,7964	0,5998	0,4729	0,3377	0,2341	0,1733	0,1313
	40	0,6835	0,2445	0,1066	0,0405	0,0107	-0,0003	-0,0058
	C +	0,8884	1,2038	0,6548	0,274	0,1217	0,0421	-0,0017
MCF-7	0	0,9263	1,4353	2,1044	2,7469	3,4395	3,8334	3,9529
	1	0,9627	1,3678	2,0343	2,6732	3,328	3,8138	4,1073
	2,5	0,9504	1,3137	2,0482	2,8674	3,3932	3,7728	3,9013
	5	0,9534	1,1803	1,678	2,4755	3,0698	3,4595	3,6701
	10	0,9538	1,0127	1,1584	1,5673	2,159	2,5901	2,7357
	20	0,9367	0,8255	0,783	0,9378	1,3439	1,9597	2,6492
	40	0,9213	0,6792	0,4864	0,3292	0,2213	0,1515	0,1011
	C +	0,9546	1,0045	0,1766	0,0147	-0,0185	-0,0259	-0,0292

Tabela S4 – Ciclo Celular. Percentual de células em fase G1, S e G2/M obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M

CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO										
	Concentração de PLN (μ M)	Percentual de Células em Fase								
		G1		S		G2/M				
HB4a	0	60,44%	\pm 0,91%		19,88%	\pm 1,18%	19,66%	\pm 0,78%		
	10	53,76%	\pm 0,50%	***	19,69%	\pm 0,35%	26,44%	\pm 0,50%	***	
	20	46,24%	\pm 0,31%	***	24,16%	\pm 0,76%	**	29,59%	\pm 0,74%	***
	C+	61,75%	\pm 2,23%		22,84%	\pm 1,38%		15,40%	\pm 0,85%	***
MCF-7	0	47,88%	\pm 1,58%		22,64%	\pm 1,53%		29,45%	\pm 2,40%	
	10	50,57%	\pm 2,60%		13,06%	\pm 0,05%	***	36,36%	\pm 2,65%	**
	20	33,67%	\pm 2,38%	***	13,89%	\pm 1,15%	***	52,44%	\pm 2,29%	***
	C+	57,63%	\pm 1,19%	***	24,79%	\pm 0,38%		17,35%	\pm 1,35%	**

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste Dunnett.

Tabela S5 – Morte celular por apoptose. Percentual de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M

MORTE CELULAR POR APOPTOSE										
	Concentração de PLN (μ M)	Percentual de Células								
		Viáveis		Apoptose Inicial		Apoptose Tardia/Necrose				
HB4a	0	94,19%	\pm 0,84%		4,02%	\pm 1,61%	1,78%	\pm 1,03%		
	10	89,74%	\pm 0,53%	***	8,36%	\pm 0,59%	**	1,9%	\pm 0,12%	*
	20	84,45%	\pm 2,04%	***	6,97%	\pm 1,41%	**	8,57%	\pm 0,96%	***
	C+	86,96%	\pm 0,48%	***	10,08%	\pm 0,69%	***	2,96%	\pm 0,39%	
MCF-7	0	90,05%	\pm 1,75%		4,84%	\pm 1,56%		5,11%	\pm 1,81%	
	10	91,84%	\pm 2,05%		4,58%	\pm 0,56%		3,56%	\pm 1,49%	
	20	85,27%	\pm 2,35%		7,21%	\pm 0,54%		7,51%	\pm 1,82%	
	C+	69,48%	\pm 4,9%	***	9,43%	\pm 0,37%	*	21,08%	\pm 4,67%	**

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste Dunnett.

Tabela S6 – Estresse Oxidativo por H₂DCFDA. Valores de fluorescência (RFU) obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 3 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN.

ESTRESSE OXIDATIVO POR H ₂ DCFDA						
Concentração de PLN (µM)	HB4a			MCF-7		
0	576,31	±	13,33		617,92	± 47,28
10	812,57	±	28,02	***	819,68	± 17,6 **
20	693,41	±	60,55	*	864,58	± 83,9 **

* = P ≤ 0.05 / ** = P ≤ 0.01/ *** = P ≤ 0.001 - ANOVA seguida de pós-teste *Dunnett*.

Tabela S7 – Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real.

GENE	FORWARD (5' → 3')	REVERSE (5' → 3')
<i>RPL13a</i>	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA
<i>BAX</i>	TTTCTGACGGCAACTTCAACTGGG	TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT
<i>BAK</i>	CAAGATTGCCACCAGCCTGTTTGA	ATGCAGTGATGCAGCATGAAGTCG
<i>BCL-2</i>	GATTGTGGCCTTCTTTGAG	GTTCCACAAAGGCATCC
<i>BBC3</i>	GTAAGATACTGTATATGCGCTG	TTTTCCACTGTTCCAATCTG
<i>GADD45A</i>	TCAGCGCACGATCACTGTC	CCAGCAGGCACAACACCAC
<i>H2AFX</i>	AATCCAAGCACCTAGATAACC	CAGAATTCCAGTTCAGAAGC
<i>NFE2L2</i>	CGTTTGTAGATGACAATGAGG	AGAAGTTTCAGGTGACTGAG
<i>GPX</i>	CTCCCCTTACAGTGCTTGTTTCG	CGATGTCAATGGTCTGGAAG
<i>CAT</i>	CATCGCCACATGAATGGATA	CCAAGTGGGATGAGAGGGTA
<i>SOD-1</i>	CTAGCGACTTATGGCGAC	GAATGTTTATTGGGCGATC
<i>CCNA2</i>	GACCCTGCATTTGGCTGTG	ACAAACTCTGCTACTTCTGG
<i>CCNB2</i>	ATTTTTACAGGTTTCCAGCCAG	ATCTCCTCATACTTGGAAAGC
<i>CCNB1</i>	AGAGCATCTAAGATTGGAGAG	CCATGTCATAGTCCAACATAG
<i>CHEK1</i>	GGTGAATATAGTGCTGCTATGTTGACA	TTGGATAAACAGGGAAGTGAACAC
<i>CHEK2</i>	CCCAAGGCTCCTCTCACA	AGTGAGAGGACTGGCTGGAGTT
<i>ABL-1</i>	CGAAGGGAGGGTGTACCATTAC	CGTTGAATGATGATGAACCAACTC
<i>TP53</i>	TACCACCATCCACTACAACCT	GACAGGCACAAACACGCAC
<i>c-MYC</i>	TGAGGAGGAACAAGAAGATG	ATCCAGACTCTGACCTTTTG
<i>mTOR</i>	GGAGGAGAAATTTGATCAGG	GGGCAACAAATTAAGGATTG

Tabela S8 – Valores de expressão relativas de genes relacionados a morte celular (a), danos ao DNA (b), estresse oxidativo (c) e ciclo celular (b) em ambas linhagens.

	Genes	HB4a	MCF-7
a)	<i>BAX</i>	-1,879	-1,297
	<i>BAK</i>	1,434	1,564
	<i>BCL-2</i>	1,722	-1,709
	<i>BBC3</i>	6,862 *	1,864
b)	<i>GADD45A</i>	2,315 *	5,662 *
	<i>H2AFX</i>	2,166 *	1,755
c)	<i>NFE2L2</i>	4,225 *	1,604
	<i>GPX</i>	-1,054	1,187
	<i>CAT</i>	-1,76	-1,379
	<i>SOD1</i>	3,107 *	2,408 *
d)	<i>CDKN1A</i>	-	3,409 *
	<i>CCNA2</i>	-1,727	-1,156
	<i>CCNB2</i>	-3,067 *	-1,412
	<i>CCNB1</i>	1	-1,106
	<i>CHEK1</i>	-1,175	-2,617 *
	<i>CHEK2</i>	-1,302	-1,858
	<i>ABL-1</i>	1,255	1,196
	<i>TP53</i>	-2,141 *	-2,159 *
	<i>c-MYC</i>	1,861	-1,54
<i>mTOR</i>	-1,742	1,584	

(*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$, e fator de expressão acima ou a baixo de 2 x.

IV-CAPÍTULO - 2

O tratamento de células pulmonares não tumorais e tumorais com piperlongumina para o ciclo celular, inibe a proliferação celular e induz apoptose, eleva estresse oxidativo e dano ao DNA

Adriaviano Baranoski¹; Bruna Isabela Biazzi¹; Thalita Alves Zanetti¹; Amanda Cristina Corveloni¹; Lilian Areal Marques¹; Natanael Endrew Souto Maior Torres Bonfim¹; Giuliana Castello Coatti²; Mário Sérgio Mantovani¹.

¹ Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina/PR.

² Centro de Pesquisa Sobre o Genoma Humano e Células Tronco, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.

Resumo

O câncer de pulmão é uma das causas mais comuns de morte relacionada ao câncer e possui alta taxa de mortalidade. A Piperlongumina (PLN), uma molécula isolada de pimenta longa, foi recentemente identificada como um possível agente antitumoral seletivo. No entanto, sua atividade em células pulmonares é mal compreendida. Nosso objetivo no presente estudo foi avaliar a citotoxicidade da PLN, sua interferência na cinética da proliferação e do ciclo celular, e sua capacidade de induzir apoptose, dano ao DNA e estresse oxidativo. Além dos mecanismos moleculares utilizados pela PLN, tentamos elucidar o padrão de expressão gênica e regulação de proteínas relacionadas a essas vias nas linhagens celulares pulmonares não tumorais (IMR-90) e câncer (NCI-H460). A PLN não foi apenas citotóxica, mas também inibiu a viabilidade celular, causando danos da membrana celular e reduzindo a proliferação celular em ambas as linhagens celulares, com maior intensidade em células IMR-90. PLN prendeu o ciclo celular na fase G2/M em células NCI-H460 e na fase G1 em células IMR-90. Além disso, PLN induziu apoptose em ambas as linhagens celulares, mas mais forte em células NCI-H460. As células IMR-90 apresentaram expressão de mRNA reduzida de *BAK*, *BAX*, *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CCNE1* e *TP53* mas aumentaram a expressão de mRNA de *ABL-1* e *CDKN1B*. Em ambas as linhagens celulares, PLN reduziu a expressão de *CHEK1*. A prisão do ciclo celular em células IMR-90 foi mediada pelo gene *CDKN1B*, um precursor da proteína p27 que controla a progressão do ciclo celular na fase G1, nesta linhagem também encontramos a proteína SOD2 aumentada além de redução em TRx1, confirmando o papel de PLN na geração de estresse oxidativo. A redução da viabilidade celular e as mudanças nos padrões de índice celular observados foram atribuíveis à prisão do ciclo celular e apoptose devido ao aumento do estresse oxidativo e ao dano no DNA, o que demonstra a capacidade do PLN para inibir a proliferação celular.

1- INTRODUÇÃO

O câncer de pulmão está entre os cânceres mais comuns e letais em todo o mundo. As plantas medicinais têm sido frequente e amplamente utilizadas contra vários tipos de câncer, principalmente devido aos metabolitos secundários presentes, que também foram amplamente estudados com o objetivo de desenvolver os medicamentos modernos (Johnson 2007, Hong, Guo et al. 2015). Os pesquisadores também estão buscando cada vez mais novas drogas que inibem a proliferação celular sem danificar células saudáveis, sendo as plantas a principal fonte de vários desses compostos (Newman and Cragg 2016). A *Piper longum* Linn (pimenta longa), com origem na Índia, pertence à família Piperaceae, seus frutos são usados em vários países asiáticos como condimentos e são frequentemente usadas em medicina popular para prevenir e curar doenças crônicas e tratar tumores (Manoj, Soniya et al. 2004, Yadav, Chatterjee et al. 2016). O alcaloide piperlongumina (PLN) está entre os constituintes ativos de *P. longum* (Wang, Morris-Natschke et al. 2014).

A PLN possui diversas atividades biológicas tais como antibacterianas (Srinivasa Reddy, Jamil et al. 2001), anti-inflamatório (Han, Gupta et al. 2014) e propriedades anticancerígenas. Também se demonstrou que inibe a proliferação de células de próstata, rim, mama e câncer de pâncreas, bem como glioblastoma multiforme (Liu, Pan et al. 2013, Dhillon, Chikara et al. 2014, Makhov, Golovine et al. 2014), com seletividade para células tumorais (Raj, Ide et al. 2011). Além disso, o PLN induz a apoptose em células de câncer de pulmão não pequenas e células B de leucemia linfoblástica aguda de uma maneira dose-dependente (Han, Han et al. 2014, Zheng, Son et al. 2016). *In vivo*, o PLN reduz o volume e o crescimento de tumores gástricos, mamários e pancreáticos (Dhillon, Chikara et al. 2014, Bharadwaj, Eckols et al. 2015, Li, Sharkey et al. 2015, Zou, Chen et al. 2015). Algumas dessas propriedades são atribuíveis à capacidade do PLN para aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROz) em uma variedade de tipos de células (Chen, Liu et al. 2015, Jin, Park et al. 2017, Karki, Hedrick et al. 2017), que por sua vez causa danos ao DNA e outras disfunções celulares.

O dano do DNA causado por fatores exógenos, como produtos químicos que produzem radicais livres ou subprodutos do metabolismo intracelular, que induzem mudanças de DNA leva à inibição de quinases dependentes de ciclina quando detectadas, que prende o ciclo celular para reparo, senescência ou apoptose (Malumbres and Barbacid 2009). O ciclo celular possui pontos de controle rigorosos que controlam a transição entre as fases G1, S e G2/M; esses pontos de controle são regulados por proteínas, como Chk1, Chk2 e ciclinas, que, em conjunto, regulam a progressão do ciclo celular e impedem a propagação de erros de DNA, de modo a

direcionar as células aberrantes até a morte por apoptose e conseqüentemente manter a estabilidade celular (Flaggs, Plug et al. 1997, Bucher and Britten 2008). Sabe-se amplamente que a redução ou o bloqueio do crescimento tumoral por quimioterapia ocorre principalmente por morte celular apoptótica, envolvendo várias alterações morfológicas, incluindo perda de volume celular, condensação cromática e fragmentação nuclear. Muitas proteínas, como BAX, BAK, PUMA e BCL-2, estão envolvidas na apoptose (Wang, Mao et al. 2015).

O crescimento celular e a indução programada de morte celular (apoptose) podem ser bem explorados devido a técnicas de biologia molecular, como a citometria de fluxo, que nos permitem estudar os aspectos morfológicos e moleculares das vias celulares. A este respeito, as linhagens de células do pulmão humano IMR-90 e NCI-H460 são amplamente utilizadas como modelos de células não tumorais e cancerígenas, respectivamente (Matschke, Riffkin et al. 2016, Fehrholz, Glaser et al. 2017).

Como a avaliação de novos fármacos deve levar em consideração sua toxicidade em células não tumorais e cancerígenas, além dos mecanismos celulares com os quais eles podem interferir, neste sentido, avaliamos o papel do PLN em relação ao ciclo celular, apoptose e proliferação celular nas linhagens IMR-90 e NCI-H460. Além disso, analisamos os mecanismos moleculares modulados pelo PLN para esclarecer seu possível uso como agente antitumoral na terapia do câncer.

2- MATERIAIS E METODOS

2.1-Agentes Químicos

PLN (C17H19NO5) foi adquirido de Sigma-Aldrich ($\geq 97\%$; CAS 20069-09-4). A doxorubicina (CAS 23214-92-8; Pharmacia) foi utilizada como controle positivo no teste de cometas, enquanto a camptotecina (CPT, CAS 7689-03-4; Merck Millipore) foi utilizada em outros.

2.2-Cultura Celular

As células IMR-90 e NCI-H460 foram utilizadas livres de micoplasma. As células foram mantidas em frascos de cultura (25 cm²) usando o meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (CAT: 12800-017; Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (CAT: 12657-029; Gibco) e 0,1% de penicilina/estreptomicina/anfotericina (CAT: 15240-096; Invitrogen). As células foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37° C. Para todas as experiências, as células foram plaqueadas e estabilizadas durante 24 h antes de iniciar os tratamentos.

2.3-Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o ensaio MTT de acordo com Mosmann (Mosmann 1983), com algumas modificações. As células (1×10^4 / Poço) foram semeadas em placas de 96 poços. Após a estabilização, adicionou-se PLN em quantidades variáveis de 0, 1, 2,5, 5, 10, 20 ou 40 μ M. Após 24 h de tratamento, as células foram incubadas em meio de cultura isento de soro com solução de MTT de 500 μ g/mL durante 4 h. Utilizou-se dimetilsulfóxido (DMSO) para diluição de cristais de formazan, e subsequentemente, a absorvência foi medida a 540 nm utilizando um espectrofotômetro (TP Reader, Thermo Plate, China). A porcentagem de viabilidade celular foi medida usando a equação: [(absorbância média do tratado/absorbância média do controle) \times 100]; realizamos três experiências contendo seis repetições cada.

2.4-Integridade da Membrana e Contagem de células

A citometria de fluxo foi utilizada para avaliar a integridade das membranas celulares e para contar o número de células. As células foram semeadas em uma quantidade de 3×10^5 células/tubo de 10 cm² (TPP) e foram estabilizadas; posteriormente, foram tratados com 0, 10 ou 20 μ M de PLN. Após 24 h de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min, e foram ressuspensas em 200 μ l de PBS. O iodeto de propídio (PI; CAT: 556463, BD Pharmingen TM) foi utilizado para avaliar a integridade das membranas celulares

(Martin, Reutelingsperger et al. 1995). Foram adicionados 25 μL (2 μg / mL) de PI a uma suspensão de células de 100 μL e, após 5 min, foram lidos 5000 eventos por tratamento utilizando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore). Para a contagem de células, determinou-se a população celular (FSC x SSC) e 5000 eventos foram lidos para estimar a concentração (células/mL). O experimento foi realizado em triplicata.

2.5-Perfil do índice de célula em tempo real (IC)

Para determinar o perfil de IC em tempo real, o equipamento xCELLigence RTCA SP (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) foi utilizado de acordo com as especificações do fabricante. As células (5×10^3 /poço) foram semeadas em placa de 96 poços específica do aparelho (E-Plate) e a IC foi monitorado durante 72 h de tratamento tomando uma leitura a cada 30 min; A PLN foi utilizada em concentrações de 0, 1, 2,5, 5, 10, 20 ou 40 μM , e foram utilizadas seis repetições de cada concentração para ambas as linhagens celulares.

2.6-Ciclo Celular

A distribuição de células em diferentes fases do ciclo celular foi avaliada usando citometria de fluxo. As células (3×10^5 células/tubo de 10 cm^2 , TPP) foram semeadas e estabilizadas e foram então tratadas com 0, 10 ou 20 μM de PLN. Após 24 h, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min e ressuspensas em 100 μL de PBS. Foram adicionados 5 μL de RNase (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CAT: 12091-021; Invitrogen) à suspensão celular, que foi ainda incubada a 37° C durante 30 min. Para a lise celular e marcar o DNA, utilizou-se o Kit de Reagente do Ciclo Celular de Guava (CAT: 4500-0220) de acordo com as instruções do fabricante. Cinco mil eventos foram analisados usando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore) para determinar as percentagens de células nas diferentes fases do ciclo (G1, S e G2/M). Os experimentos foram realizados em triplicado.

2.7-Apoptose

A morte celular por apoptose foi avaliada usando citometria de fluxo. As células (3×10^5 células/tubo de 10 cm^2 , TPP) foram semeadas e estabilizadas. Subsequentemente, os meios de cultura contendo 0, 10 ou 20 μM de PLN foram adicionados às células. Após 24 h de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min e ressuspensas em 100 μL de PBS. Para avaliar a apoptose, utilizou-se o Kit de Detecção de Apoptose com Anexina V FITC (CAT: 556547; BD Pharmingen™) de acordo com as instruções do fabricante. Cinco mil eventos foram analisados utilizando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore), e as porcentagens de células viáveis, além da das células que apresentam

apoptose inicial e apoptose tardia/necrose, foram estimadas. As células não marcadas por anexina ou 7-AAD foram consideradas viáveis. As células marcadas apenas com anexina foram consideradas como apresentando apoptose inicial, e aqueles marcados com rotulagem dupla ou com 7-AAD apenas foram considerados como células em apoptose tardia/necrose. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.8-Genotoxicidade

A genotoxicidade foi avaliada usando o ensaio do cometa como descrito por Collins, Oscoz et al. (2008). As células (3×10^5 células/tubo 10 cm², TPP) foram semeadas e estabilizadas. Subsequentemente, foram adicionados meios de cultura contendo 0, 5, 10 ou 20 µM de PLN às células. Após 3 h de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min e ressuspensas em 100 µL de PBS. Posteriormente, diluiu-se 20 µL desta suspensão com 120 µL de agarose com baixo ponto de fusão (0,5%) e distribuiu-se em lâminas com agarose (1,5%) pré-gelatinizada. As células foram então lisadas em tampão de lise (2,25 M de NaCl, 90 mM de EDTA, 9 mM de Tris-HCl, 10% de DMSO e 1% de Triton X-100) durante 60 minutos a 4° C e foram expostas a condições alcalinas (1 mM Titriplex EDTA, NaOH 0,3 N) durante 20 min, com eletroforese adicional a pH > 13, 25 V, 300 mA durante 20 min. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas (0,4 N Tris corrigido com HCl, pH 7,5), fixado com etanol absoluto, secadas e armazenado a 4° C. A análise foi realizada utilizando brometo de etídio de 100 µL (2 µg/mL) para marcar o DNA. As imagens foram obtidas usando o microscópio EVOS FLauto (Thermo Fisher) com uma ampliação de 100 ×. As imagens dos cometas foram analisadas usando CometScore para avaliar o comprimento do cometa e a percentagem de DNA na cauda, os experimentos foram realizados em triplicata.

2.9-Estresse Oxidativo por H₂DCFDA

A análise do estresse oxidativo devido à geração de ROS foi realizada utilizando a sonda de 2,7-Diclorodihidrofluoresceína-diacetato não fluorescente (H₂DCFDA, CAT: 4091-99-0; Sigma-Aldrich) por citometria de fluxo de acordo com instruções de Bissinger, Malik et al. (2014). As células (3×10^5 células/placas de 6 poços, TPP) foram semeadas e estabilizadas. Os meios de cultura contendo 0, 10 ou 20 µM de PLN foram adicionados. Após 3 h de tratamento, o meio foi retirado e novo meio contendo 25 µM de H₂DCFDA foi adicionado e aguardado 20 min. as células foram então colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min e ressuspensas em 100 µL de PBS. Cinco mil eventos foram analisados usando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.10-Expressão Gênica

Para avaliar a expressão gênica, foi utilizada RT-qPCR. As células (10^6 células/frasco de 25 cm²) foram semeadas. Após a estabilização, o tratamento com PLN foi realizado a concentração de 0 ou 10 µM. Os experimentos foram realizados em triplicata. Após 12 h, o RNA total foi extraído usando o RNeasy® Mini Kit QIAGEN (CAT: 74106) de acordo com o protocolo do fabricante. Concentração ou maior tempo de tratamento causaram inibição de genes constitutivos, tornando impossível analisá-los. O RNA total foi armazenado em congelador a -80 ° C. As amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro (BioDrop µLITE, UK), e a sua pureza foi estimada com base na razão de absorvência a 260 nm/280 nm; apenas as amostras com uma proporção de 1,8-2,1 foram aceitas para posterior análise. A integridade do RNA total foi determinada por eletroforese em gel de agarose (1%). A síntese de cDNA foi realizada em triplicata usando 1000 ng de RNA total em reação com o volume final de 20 µL. Para síntese, o RNA total, diluído em água DEPC RNase-livre, 2-µL de dNTP (10 mM) e 10 pmol de oligo dT₁₂₋₁₈, foi incubado em termociclador térmico BIO-RAD T100™ a 65° C/5 min. Posteriormente, adicionou-se 0,1 µL de RNase (4 unidades), 4 µL de tampão M-MLV e 0,5 µL MMLV-RT (100 unidades) e a amplificação foi realizada a 37° C durante 50 min e 70° C durante 15 minutos, com o passo final a 10° C. O cDNA foi diluído para uma concentração de 50 ng/µL para qPCR, cujas reações foram realizadas utilizando o aparelho termociclador CFX96 Touch™ (Bio- Rad) com 11 µL de solução final contendo 250 ng de cDNA, 5 µL de FastStart SYBR Green Master (Ref. 04673484001; ROCHE) e 5 pmol de cada oligonucleotídeos nas seguintes condições: 95° C durante 5 min e 45 ciclos de 95° C durante 15 s, 60° C durante 20 s e 72° C durante 20 s. A análise da curva de fusão foi realizada no final de cada reação com uma temperatura de 55° C a 95° C a cada 0,5° C durante 5 s; O gene da proteína Ribossomal L13a (RPL13A) foi utilizado como constitutivo. As reações foram realizadas em triplicata. Foram analisados os seguintes genes relacionados ao ciclo celular: ABL Proto-Oncogene 1, Tirosina quinase não receptora (*ABL-1*), Ciclina A2 (*CCNA2*), Ciclina B1 (*CCNB1*), Ciclina B2 (*CCNB2*), Ciclina D1 (*CCND1*), Ciclina E1 (*CCNE1*), inibidor de cinase dependente de ciclina 1A (*CDKN1A*), inibidor de quinase dependente de ciclina 1B (*CDKN1B*), Checkpoint Kinase 1 (*CHEK1*), Checkpoint Kinase 2 (*CHEK2*), Proto-Oncogene C-Myc (*c-MYC*) e Tumor Protein P53 (*TP53*). Genes relacionados ao dano do DNA: H2A Histone Family Member X (*H2AFX*) e Growth Arrest e DNA Damage Inducible Alpha (*GADD45A*). Genes relacionados à apoptose: BCL2 Antagonist / Killer 1 (*BAK*), BCL2 Associated X, Regulador de Apoptose (*BAX*), BCL2 Binding Component 3 (*BBC3*) e BCL-2

Apoptosis Regulator (*BCL-2*). E genes relacionados ao estresse oxidativo: Glutathione Peroxidase 1 (*GPX*), Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2 (*NFE2L2*) e Superoxide Dismutase 1, Soluble (*SOD1*). As sequências dos oligonucleótidos utilizados são mostradas nos dados suplementares.

2.11-Análise de Proteínas

A avaliação da proteína foi realizada utilizando o aparelho MAGPIX® (Merck Millipore). Em placas de 24 poços (KASVI), 8×10^4 células foram semeadas por poço, e após a estabilização, adicionou-se 0 ou 10 μ M de PLN, as células foram incubadas durante 24 h. As proteínas relacionadas ao estresse oxidativo e ao dano ao DNA foram avaliadas usando os kits *MILLIPLEX MAP Oxidative Stress Magnetic Bead (h0xstmag-18k)* e *MILLIPLEX MAP DNA Damage/Genotoxicity Beaded Bead (48-621mag)*. Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Foram utilizadas três experiências e três repetições/experiências.

2.12-Análise Estatística

Os valores medidos para viabilidade celular, genotoxicidade, ciclo celular, apoptose, integridade da membrana, contagem celular, estresse oxidativo e regulação proteica foram comparados com ANOVA, seguido do teste de Dunnett ($p < 0,05$) usando o programa GraphPad Prism 5. A análise da expressão de genes foi realizada utilizando o método *Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test* (Pfaffl, Horgan et al. 2002), no programa REST 2009 com significância estatística de $p < 0,05$ e um fator de expressão inferior a - 2 ou superior a 2.

3- RESULTADOS

3.1-Viabilidade celular por MTT

A viabilidade das células IMR-90 e NCI-H460 diminuiu de maneira dose-dependente após o tratamento com PLN 10 ou 20 μM , respectivamente. A concentração inibidora (IC_{50}) de PLN foi estimada em 21,4 e 30,3 μM para células IMR-90 e NCI-H460, respectivamente (Figura 1).

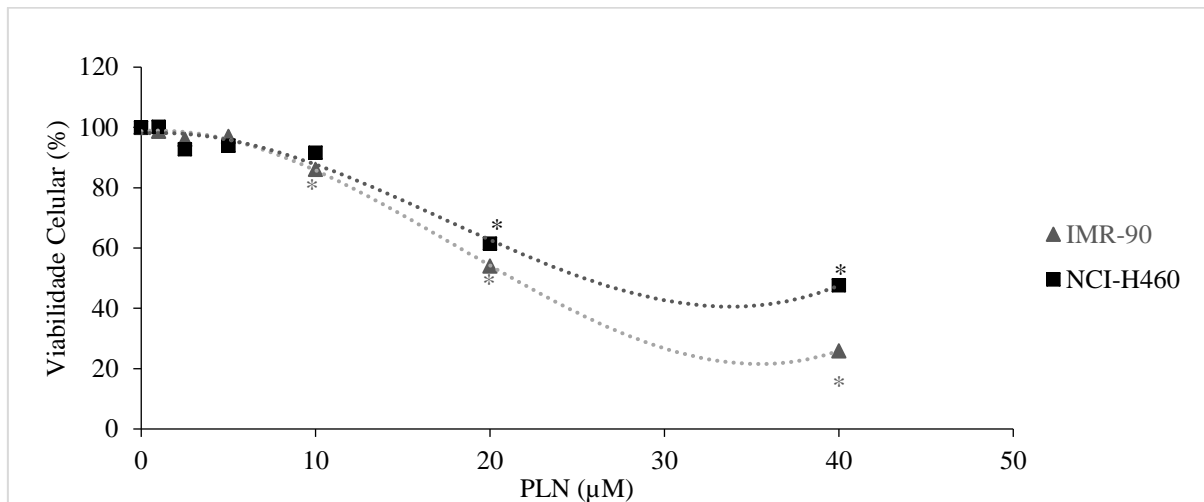


Figura 1. Valores de viabilidade celular obtidos pelo teste MTT após 24 h de tratamento para ambas as linhagens celulares. IC_{50} de PLN para células IMR-90 e NCI-H460 foi estimado em 21,4 e 30,3 μM , respectivamente. "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$. Curva de tendência: IMR-90, $R^2 = 0,9983$; NCI-H460, $R^2 = 0,9785$.

3.2-Integridade da Membrana

O tratamento com PLN 10 μM durante 24 h induziu perda significativa de integridade da membrana em células IMR-90 (2,4%). O tratamento com PLN 20 μM induziu uma redução significativa a percentagem de células de ambas as linhagens com as membranas celulares integras, com redução de 12,5% nas células IMR-90 e redução de 2,4% nas células NCI-H460. A Tabela 1 apresenta a percentagem de células com membranas integradas após 24 h de tratamento.

Tabela 1. Integridade das Membranas. Percentagem de células com membranas intactas tratadas com PLN durante 24 h.

PLN	IMR-90	NCI-H460
0 μM	94,31 \pm 0,93	96,04 \pm 0,88
10 μM	92,01 \pm 1,13 *	95,48 \pm 0,36
20 μM	82,48 \pm 1,15 *	93,66 \pm 0,67 *

* = $P \leq 0.05$ - ANOVA seguida do pós-teste Dunnett.

3.3-Quantificação de número de células

A contagem de células mostrou que 10 μM de PLN diminuiu significativamente a concentração de células IMR-90 (10%). E a concentração de 20 μM , o PLN reduziu significativamente o número de células das duas linhagens (IMR-90, 19,4%, NCI-H460, 31,1%) (Figura 2a e b). A Figura 2c mostra as micrografias de ambas as linhagens celulares com os respectivos tratamentos.

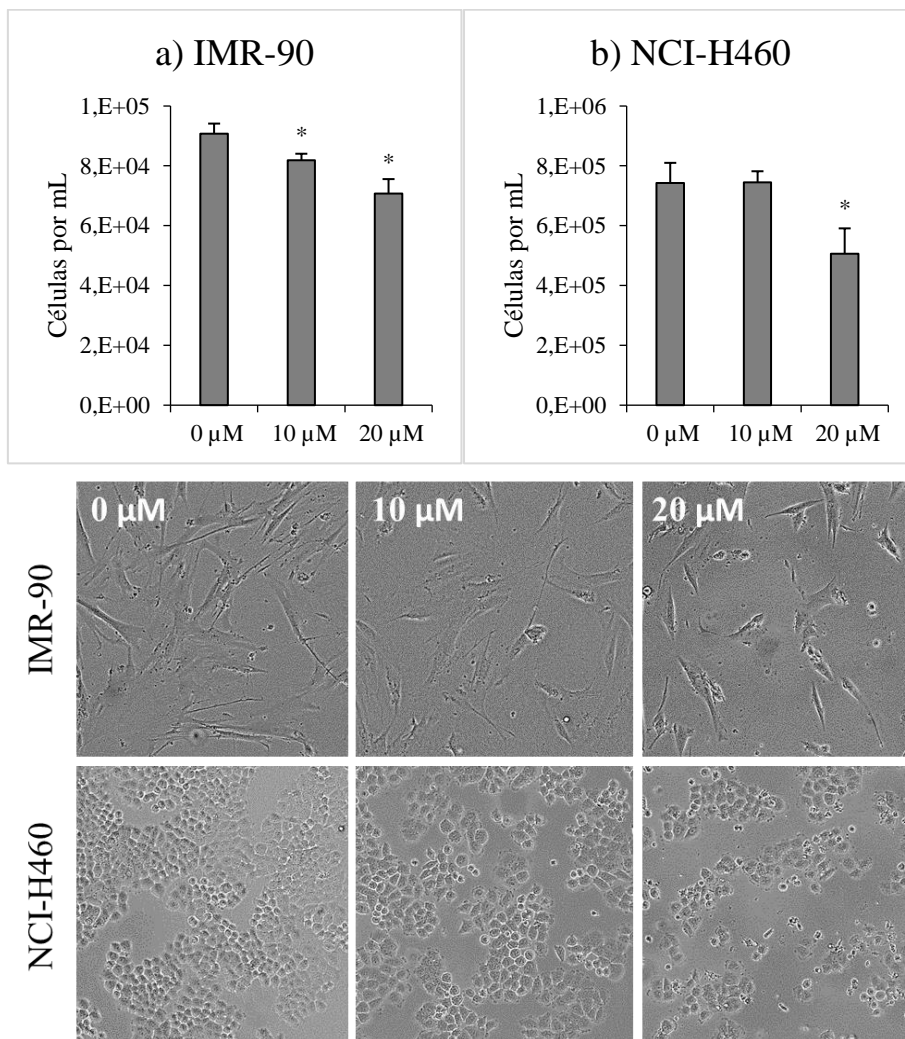


Figura 2. Número de celulares obtidas por citometria de fluxo após 24 h de tratamento para (a) IMR-90 e (b) NCI-H460; (c) micrografias de ambas as linhagens com os respectivos tratamentos. "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$.

3.4-Perfil de IC em tempo real

O perfil de IC em tempo real confirmou que PLN induziu atraso em ambas as linhagens celulares. A 10 μM , o PLN inibiu a proliferação de células IMR-90 sem recuperação posterior após 24 h (Figura 3a) e causou atraso de proliferação nas células NCI-H460 (Figura 3b) após 12 h de tratamento. As concentrações de PLN de 20 e 40 μM reduziram significativamente o índice celular desde o início do tratamento, sem recuperação de proliferação em qualquer linhagem celular.

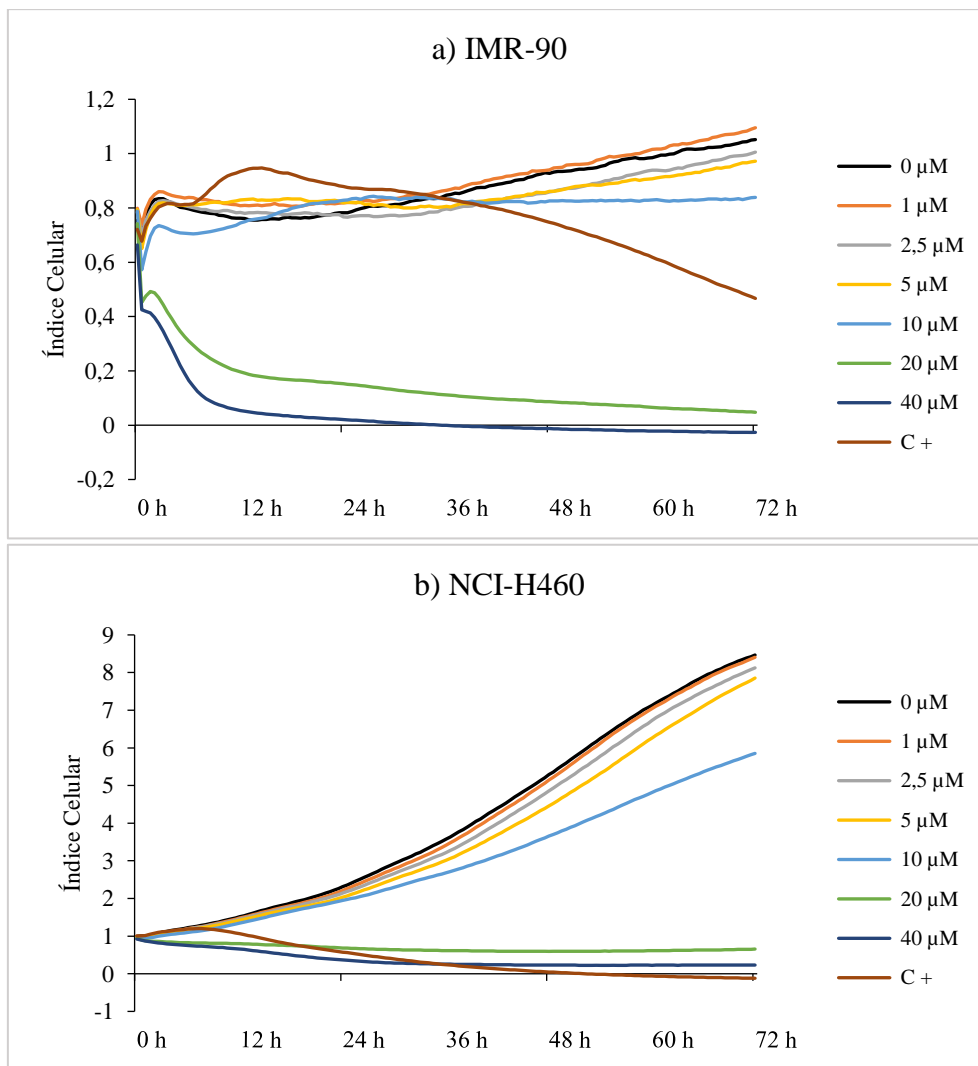


Figura 3. O perfil de índice de células em tempo real foi obtido pelo aparelho xCELLigence SP (ROCHE) e monitorado por 72 h após o tratamento para ambas as linhagens [C +: camptotecina 5 μM para IMR-90 e 1 μM para NCI-H460].

3.5-Ciclo Celular

Nas células IMR-90, 24 h de tratamento com 20 μM de PLN induziram a parada de ciclo em fase G1 com consequente redução de G2/M (Figura 4a). Em células NCI-H460, 10 e 20 μM induziram parada em fase G2/M com consequente redução de fase S (Figura 4b).

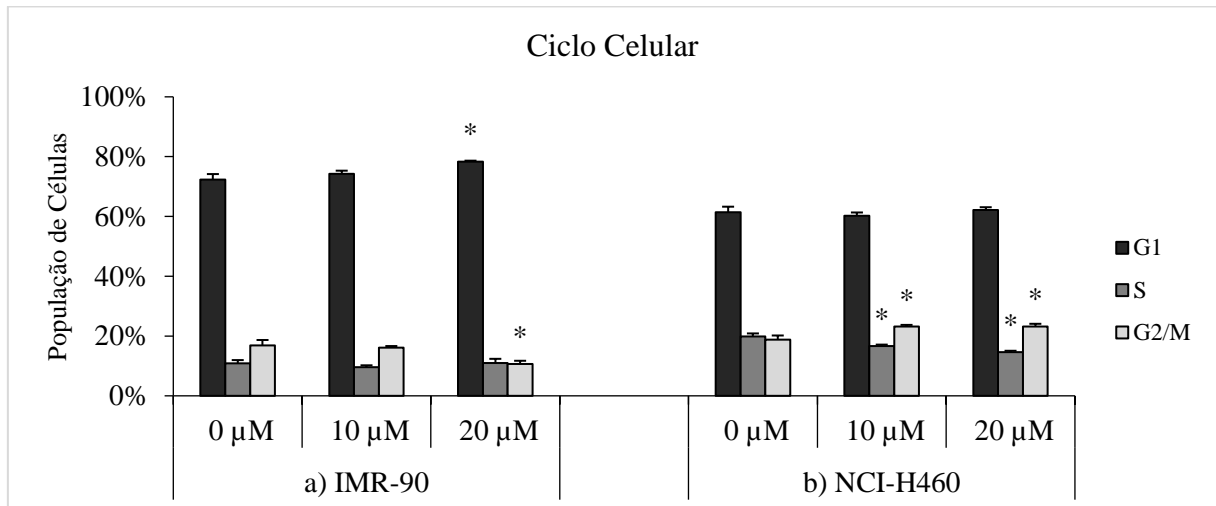


Figura 4. O perfil do ciclo celular foi obtido por citometria de fluxo após 24 h de tratamento para ambas as cepas. "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$.

3.6-Apoptose

Nas células IMR-90, 24 h de tratamento com PLN 10 μM induziram um aumento pequeno, mas significativo, no número de células que apresentaram apoptose/necrose tardia, além de maior apoptose/necrose inicial e tardia com 20 μM de PLN. Nas células NCI-H460, PLN 20 μM aumentou significativamente o número de células em apoptose inicial. A Tabela 2 mostra a percentagem de células viáveis, em apoptose inicial ou apoptose tardia/necrose após 24 h de tratamento.

Tabela 2. Percentagem de morte celular por apoptose obtida por citometria de fluxo após 24 h de tratamento para ambas as linhagens celulares

	PLN	Viável	Apoptose Inicial	A. Tardia/Necrose
IMR-90	0 μM	83,91 \pm 2,33	14,97 \pm 2,46	1,11 \pm 0,31
	10 μM	81,66 \pm 1,39	16,48 \pm 1,27	1,85 \pm 0,15 *
	20 μM	72,42 \pm 1,49 *	23,64 \pm 1,97 *	3,93 \pm 0,51 *
NCI-H460	0 μM	91,54 \pm 0,91	4,56 \pm 1,44	3,9 \pm 1,93
	10 μM	91,05 \pm 0,84	6,1 \pm 0,34	2,84 \pm 0,53
	20 μM	71,22 \pm 1,88 *	24,84 \pm 1,4 *	3,93 \pm 0,53

* = $P \leq 0.05$ - ANOVA seguida do pós-teste Dunnett.

3.7-Genotoxicidade

Apenas o tratamento com 20 μM de PLN por 3 h induziu danos ao DNA em ambas as linhagens celulares, com aumento de 25% e 15,7% no comprimento total do cometa em células IMR-90 e NCI-H460, respectivamente, em comparação com o controle; no entanto, os aumentos no DNA na cauda não foram significativos em ambas linhagens (Tabela 3).

Tabela 3. Comprimento total do cometa e percentagem de DNA na cauda obtidas pelo ensaio do cometa após 3 h de tratamento com 0, 5, 10 ou 20 μM de PLN. C+: Doxorubicina 1 μM . Px: Pixels.

PLN	IMR-90		NCI-H460	
	Comprimento do Cometa (Px)	DNA na cauda	Comprimento do Cometa (Px)	DNA na cauda
0 μM	43,21 \pm 2,37	1,15% \pm 0,29%	45,04 \pm 1,3	0,51% \pm 0,45%
5 μM	43,67 \pm 1,75	1,84% \pm 1,43%	46,74 \pm 1,41	1,16% \pm 0,38%
10 μM	43,16 \pm 4,18	0,61% \pm 0,20%	47,48 \pm 0,6	1,64% \pm 1,04%
20 μM	54,02 \pm 0,74 *	3,84% \pm 0,20%	52,15 \pm 2,1 *	2,26% \pm 0,44%
C+	79,29 \pm 5,52 *	14,67% \pm 3,85% *	96,94 \pm 1,05 *	25,33% \pm 1,20% *

* = $P \leq 0.05$ - ANOVA seguida de pós-teste Dunnett.

3.8- Estresse Oxidativo por H₂DCFDA

Nas células IMR-90, PLN 10 e 20 μM aumentaram o estresse oxidativo devido à geração de EROs (1,6 \times e 2,2 \times , respectivamente). Nas células NCI-H460, o PLN 20 μM induziu um aumento de 1,3 \times no estresse oxidativo devido à geração de EROs (Figura 5).

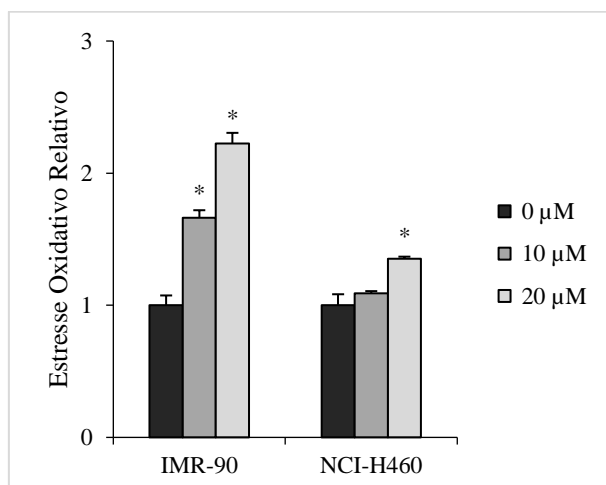


Figura 5. Geração estimada de EROs por H₂DCFDA após 3 h de tratamento. "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$.

3.9-Expressão Gênica

A análise de expressão relativa revelou que o tratamento de células IMR-90 com PLN 10 μ M por 12 h reduziu a expressão relativa de genes relacionados à morte celular [*BAX* (2,3 \times) e *BAK* (3 \times)] e ciclo celular [*CCNA2* (6,3 \times), *CCNB2* (4,1 \times), *CCNB1* (3,1 \times), *CCNE1* (2,4 \times), *CHEK1* (2,1 \times) e *TP53* (3,2 \times)] e aumentou a expressão relativa de *CDKN1B* (3,5 \times) e *ABL-1* (3,5 \times). Contudo, as células NCI-H460 apresentaram redução na expressão relativa de apenas *CHEK1* (2,2 \times) (Figura 6).

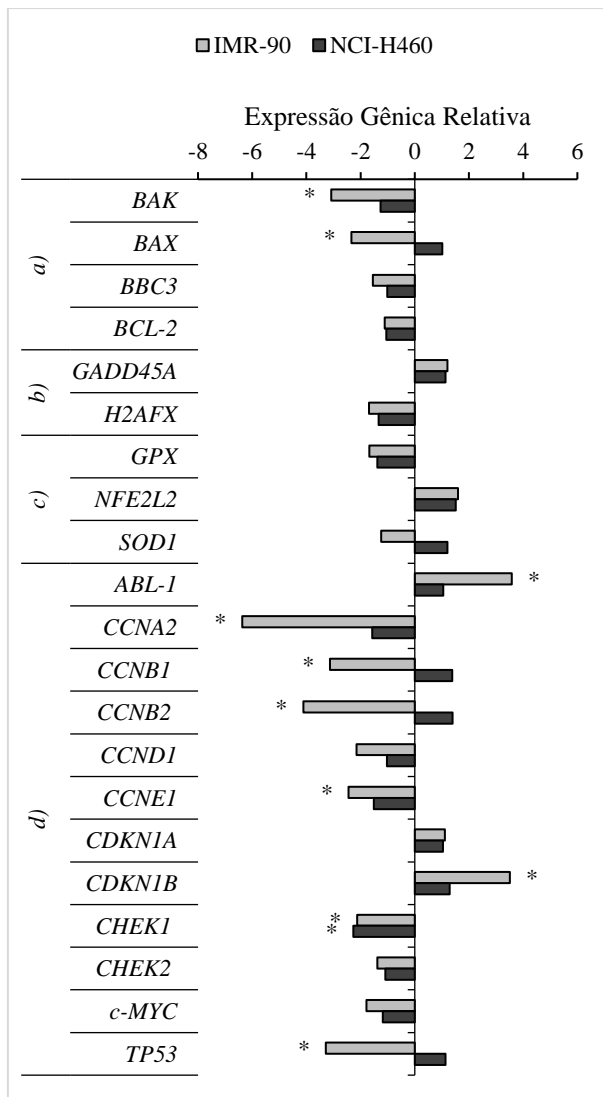


Figura 6. Expressão relativa de genes relacionados à morte celular (a), dano ao DNA (b), estresse oxidativo (c) e ciclo celular (b) após o tratamento com PLN 10 μ M durante 12 h. "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$ e fator de expressão acima ou abaixo de 2 \times .

3.10-Análise de Proteínas

O tratamento com PLN 10 μ M durante 24 h aumentou significativamente os níveis de proteínas SOD2 e reduziu os níveis de TRx1 em células IMR-90. Não houve alteração na regulação das outras proteínas avaliadas em células IMR-90 ou NCI-H460 (Figura 7a e b).

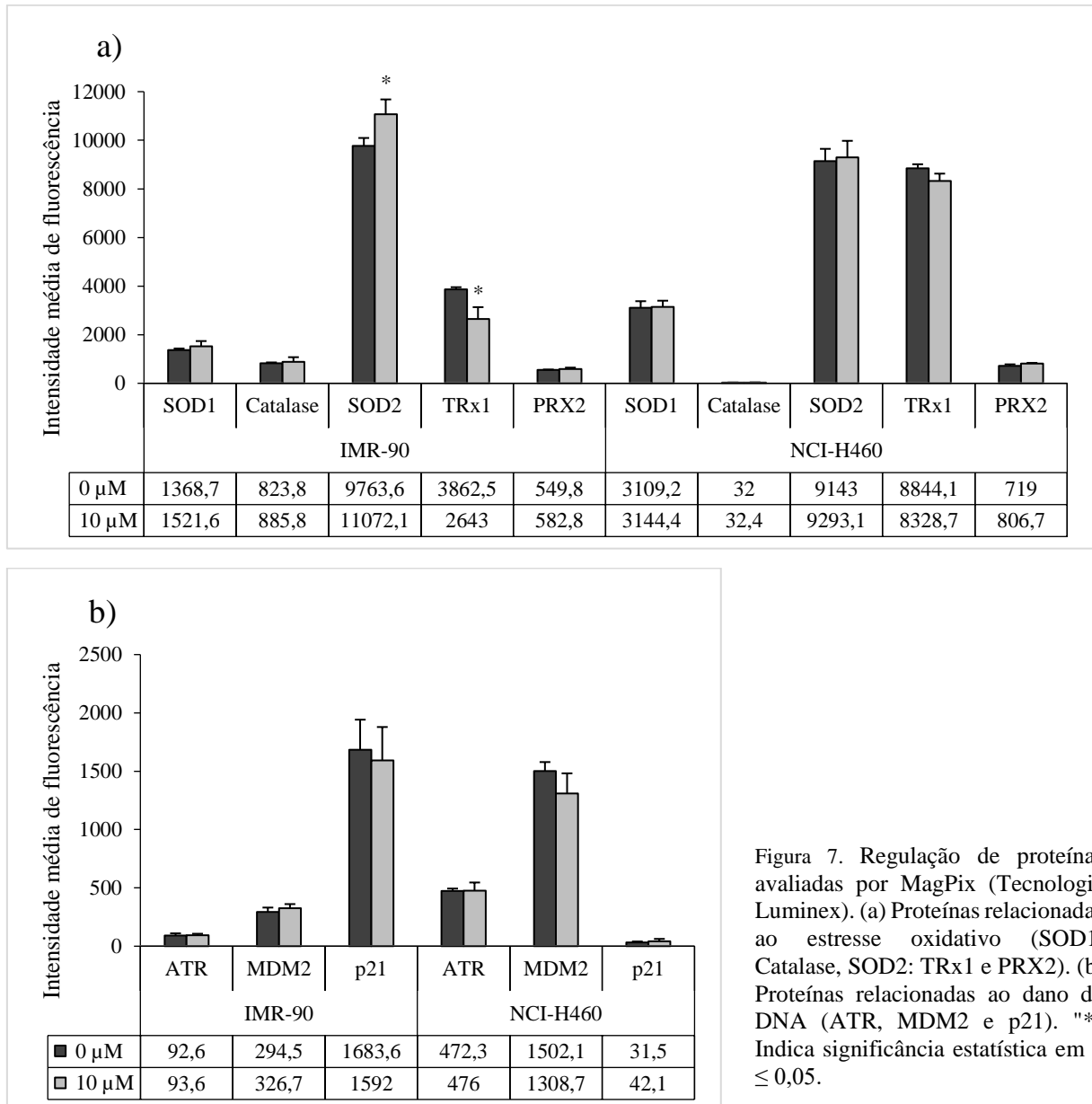


Figura 7. Regulação de proteínas avaliadas por MagPix (Tecnologia Luminex). (a) Proteínas relacionadas ao estresse oxidativo (SOD1, Catalase, SOD2; TRx1 e PRX2). (b) Proteínas relacionadas ao dano do DNA (ATR, MDM2 e p21). "*" Indica significância estatística em $p \leq 0,05$.

4- DISCUSSÃO

Várias atividades biológicas já foram atribuídas a PLN, incluindo a inibição da proliferação celular. No presente estudo, avaliamos a capacidade antiproliferativa da PLN usando células pulmonares não tumorais e tumorais de pulmão, IMR-90 e NCI-H460, respectivamente. Observamos que PLN, em concentrações de 10 μM em células IMR-90 e 20 μM em células NCI-H460, reduziram significativamente a viabilidade celular, com IC50 de 21,4 μM (IMR-90) e 30,3 μM (NCI-H460). Em outra linhagem celular de tumor de pulmão, A549, 3 μM de PLN reduziu a viabilidade celular significativamente em 48 e 72 h (Wang, Mao et al. 2015). Nas linhagens celulares do tumor ovariano A2780, OVCAR3 e SKOV3, foi necessário 6,1-8,2 μM de PLN para atingir a IC50 após 72 h de tratamento (Gong, Chen et al. 2014), demonstrando a potência de ação variável da PLN dependendo do tipo de células.

No presente estudo, a contagem de células por citometria mostrou uma redução significativa no número de células em ambas linhagens celulares. Apesar desta redução significativa com concentração de 10 μM na linhagem IMR-90, observamos uma maior redução no número de células NCI-H460 com maior concentração (20 μM), provavelmente devido ao fato de que esta linhagem possui um ciclo celular mais rápido (23 h) quando comparado ao IMR-90 que tem um tempo mais longo (Nichols, Murphy et al. 1977), (veja a Figura 3). Observamos a parada do ciclo celular em ambas as linhagens celulares após o tratamento com PLN, principalmente na concentração de 20 μM . Em particular, a parada do ciclo celular ocorreu na fase G1 em células IMR-90 e na fase G2/M em células NCI-H460, demonstrando os diferentes modos de ação do PLN. A prisão do ciclo celular também pode estar relacionada a danos no DNA, o que leva à ativação de caminhos, como o reparo do DNA. Nas células de câncer de mama MDA-MB-231, o PLN induz a parada G1 com regulação negativa da via NF- κB , levando à ativação da via apoptótica mitocondrial (Shrivastava, Kulkarni et al. 2014).

Nas células IMR-90, encontramos expressão reduzida de mRNA de *CCNA2*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CCNE1*, *CHEK1* e *TP53*. *CCNA2* está envolvido na ativação do CDK2 durante a fase S e ativação do CDK1 durante a transição de fase G2/M (Pagano, Pepperkok et al. 1992). *CCNE1* está envolvido na transição de fase G1/S (Honda, Lowe et al. 2005). *CCNB1* e *CCNB2*, que estão envolvidos na fase G2/M (Ding, Li et al. 2014), também apresentaram expressões significativamente reduzidas em células IMR-90. Isso pode ser atribuído à prisão do ciclo celular devido a danos no DNA seguido de morte celular induzidos após o tratamento com PLN 10 μM . A redução nos níveis de mRNA *TP53* demonstra que a inibição do ciclo celular ocorreu através de um mecanismo independente do p53. Já foi confirmado que PLN induz a morte

celular independente do estado de expressão de p53 (Basak, Punganuru et al. 2016). Além disso, nenhuma alteração foi observada nos níveis de proteína de p21 e mRNA de *CDKN1A* em ambas as linhagens celulares; Contudo, Yao, Sun et al. (2016) mostraram que PLN (4 μM) aumenta os níveis de p27 (expressos por *CDKN1B*) em células NCI-H969, p27 inibe a ativação de complexos de ciclina E-CDK2 e ciclina D-CDK4, levando a prisão de fase G1. Na linhagem IMR-90, o *CDKN1B* mostrou expressão aumentada após o tratamento com PLN, esclarecendo assim um dos mecanismos moleculares para prender o ciclo celular na fase G1.

No presente estudo, a PLN induziu apoptose, especialmente em células NCI-H460, em concentração de 20 μM , onde a PLN causou aproximadamente 20% de aumento no número de células apresentando apoptose inicial em comparação com o controle. Isso está relacionado à maior redução no número de células observadas na contagem de células. Embora não tenha sido observada diferença na expressão de genes apoptóticos após 12 h de tratamento com PLN 10 μM , Zheng, Son et al. (2016) encontrou níveis aumentados de proteínas apoptóticas, como BAX e caspase-3 e 8 clivadas, além de níveis reduzidos da proteína anti-apoptótica BCL-2 após 24 h de tratamento com PLN (10-15 μM). A PLN também suprimiu a atividade de NF- κB , induzindo assim a apoptose em linhagens celulares de câncer de pulmão de células não pequenas, A549 e NCI-H460. Nas células de carcinoma hepatocelular HepG2, PLN 20 μM induz apoptose ao aumentar a produção de ERO (Chen, Liu et al. 2015).

Não encontramos expressão alterada de genes relacionados à apoptose em células NCI-H460, provavelmente por causa da concentração e tempo de tratamento com PLN usado (PLN 10 μM por 12 h, em períodos mais longos de tratamentos, não conseguimos encontrar expressão de genes constitutivos; dados não mostrados). Além disso, as células IMR-90 apresentaram níveis reduzidos de mRNA de *BAX* e *BAK*, ambos atuam como genes pró-apoptóticos e a expressão destes genes podem ser regulada e/ou interagem com p53 (Toshiyuki and Reed 1995, Leu, Dumont et al. 2004), *TP53* teve sua expressão reduzida em células IMR-90.

O aumento do estresse oxidativo pode causar danos no DNA, levando à prisão do ciclo celular ou mesmo à apoptose. Observamos que o PLN intensificou a quantidade de EROs, indicando aumento do estresse oxidativo, além de dano ao DNA (aumento do tamanho do cometa) após 3 h de tratamento, no entanto, a quantidade de DNA na cauda não foi significativa, demonstrando que o dano causado durante o tratamento foi pequeno quando comparado com quimioterápicos tais como doxorubicina. O gene *CHEK1* está envolvido com parada de ciclo celular em resposta a danos e/ou DNA não replicado. A redução na expressão de *CHEK1* em ambas as linhagens podem ter contribuído para a perda de capacidade de reparar o DNA

danificado. Além disso, a expressão aumentada do mRNA de *ABL1* em células IMR-90 indicou que PLN induziu danos ao DNA e/ou estresse oxidativo. Também encontramos níveis elevados de proteínas SOD2 em células IMR-90 após 24 h de tratamento com PLN. SOD2 desempenha um papel na conversão de superóxidos, resultantes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, ao peróxido de hidrogênio, que permite que o SOD2 diminua a quantidade de EROs (Becuwe, Ennen et al. 2014). Além disso, a tiorredoxina (TRx1) foi regulada negativamente nas células IMR-90. TRx1 atua como uma redutase no controle redox, protegendo assim as células de EROs (Collet and Messens 2010). Isso demonstra a capacidade do PLN para induzir o estresse oxidativo. Os danos das membranas observados em ambas as linhagens celulares podem ser atribuídos ao aumento dos níveis de EROs, que danificam diretamente os lipídios da membrana. Outros autores já demonstraram a capacidade do PLN para aumentar os níveis de EROs (Jarvius, Fryknas et al. 2013).

Em conclusão, a redução da proliferação celular observada, a redução da viabilidade celular e redução da integridade da membrana são decorrentes da indução de apoptose e da parada do ciclo celular. Nossos estudos confirmam que os níveis de EROs são aumentados por PLN em ambas as linhagens celulares, que podem ser responsáveis pelos danos ao DNA. Além disso, nas células IMR-90, o aumento da expressão de *CDKN1B* demonstra um dos mecanismos pelos quais o PLN prendeu o ciclo celular na fase G1.

5.AGRADECIMENTOS.

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e fundação Araucária pelo financiamento da pesquisa.

6- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basak, D., et al. (2016). "Piperlongumine exerts cytotoxic effects against cancer cells with mutant p53 proteins at least in part by restoring the biological functions of the tumor suppressor." Int J Oncol **48**(4): 1426-1436.

Becuwe, P., et al. (2014). "Manganese superoxide dismutase in breast cancer: from molecular mechanisms of gene regulation to biological and clinical significance." Free Radic Biol Med **77**: 139-151.

Bharadwaj, U., et al. (2015). "Drug-repositioning screening identified piperlongumine as a direct STAT3 inhibitor with potent activity against breast cancer." Oncogene **34**(11): 1341-1353.

Bissinger, R., et al. (2014). "Piperlongumine-induced phosphatidylserine translocation in the erythrocyte membrane." Toxins (Basel) **6**(10): 2975-2988.

Bucher, N. and C. D. Britten (2008). "G2 checkpoint abrogation and checkpoint kinase-1 targeting in the treatment of cancer." Br J Cancer **98**(3): 523-528.

Chen, Y., et al. (2015). "Piperlongumine selectively kills hepatocellular carcinoma cells and preferentially inhibits their invasion via ROS-ER-MAPKs-CHOP." Oncotarget **6**(8): 6406-6421.

Collet, J. F. and J. Messens (2010). "Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins." Antioxid Redox Signal **13**(8): 1205-1216.

Collins, A. R., et al. (2008). "The comet assay: topical issues." Mutagenesis **23**(3): 143-151.

Dhillon, H., et al. (2014). "Piperlongumine induces pancreatic cancer cell death by enhancing reactive oxygen species and DNA damage." Toxicol Rep **1**: 309-318.

Ding, K., et al. (2014). "CCNB1 is a prognostic biomarker for ER+ breast cancer." Med Hypotheses **83**(3): 359-364.

Fehrholz, M., et al. (2017). "Caffeine modulates glucocorticoid-induced expression of CTGF in lung epithelial cells and fibroblasts." Respir Res **18**(1): 51.

Flaggs, G., et al. (1997). "Atm-dependent interactions of a mammalian chk1 homolog with meiotic chromosomes." Curr Biol **7**(12): 977-986.

Gong, L. H., et al. (2014). "Piperlongumine induces apoptosis and synergizes with cisplatin or paclitaxel in human ovarian cancer cells." Oxid Med Cell Longev **2014**: 906804.

Han, J. G., et al. (2014). "Piperlongumine chemosensitizes tumor cells through interaction with cysteine 179 of IkappaBalpha kinase, leading to suppression of NF-kappaB-regulated gene products." Mol Cancer Ther **13**(10): 2422-2435.

Han, S. S., et al. (2014). "Piperlongumine inhibits the proliferation and survival of B-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines irrespective of glucocorticoid resistance." Biochem Biophys Res Commun **452**(3): 669-675.

Honda, R., et al. (2005). "The structure of cyclin E1/CDK2: implications for CDK2 activation and CDK2-independent roles." EMBO J **24**(3): 452-463.

Hong, L., et al. (2015). "Ethnobotanical study on medicinal plants used by Maonan people in China." J Ethnobiol Ethnomed **11**: 32.

Jarvius, M., et al. (2013). "Piperlongumine induces inhibition of the ubiquitin-proteasome system in cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **431**(2): 117-123.

Jin, H. O., et al. (2017). "Piperlongumine downregulates the expression of HER family in breast cancer cells." Biochem Biophys Res Commun **486**(4): 1083-1089.

Johnson, I. T. (2007). "Phytochemicals and cancer." Proceedings of the Nutrition Society **66**(2): 207-215.

Karki, K., et al. (2017). "Piperlongumine Induces Reactive Oxygen Species (ROS)-Dependent Downregulation of Specificity Protein Transcription Factors." Cancer Prev Res (Phila) **10**(8): 467-477.

Leu, J. I., et al. (2004). "Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex." Nat Cell Biol **6**(5): 443-450.

Li, J., et al. (2015). "Piperlongumine and immune cytokine TRAIL synergize to promote tumor death." Sci Rep **5**: 9987.

Liu, J. M., et al. (2013). "Piperlongumine selectively kills glioblastoma multiforme cells via reactive oxygen species accumulation dependent JNK and p38 activation." Biochem Biophys Res Commun **437**(1): 87-93.

Makhov, P., et al. (2014). "Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signalling and mediates cancer cell death." Br J Cancer **110**(4): 899-907.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-166.

Manoj, P., et al. (2004). "Recent studies on well-known spice, *Piper longum* Linn."

Martin, S., et al. (1995). "Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl." Journal of Experimental Medicine **182**(5): 1545-1556.

Matschke, J., et al. (2016). "Targeted inhibition of glutamine-dependent glutathione metabolism overcomes death resistance induced by chronic cycling hypoxia." Antioxidants & redox signaling **25**(2): 89-107.

Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." Journal of immunological methods **65**(1-2): 55-63.

Newman, D. J. and G. M. Cragg (2016). "Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014." J. Nat. Prod **79**(3): 629-661.

Nichols, W., et al. (1977). "Characterization of a new human diploid cell strain, IMR-90." Science **196**(4285): 60-63.

Pagano, M., et al. (1992). "Cyclin A is required at two points in the human cell cycle." The EMBO journal **11**(3): 961.

Pfaffl, M. W., et al. (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**(9): e36-e36.

Raj, L., et al. (2011). "Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS." Nature **475**(7355): 231-234.

Shrivastava, S., et al. (2014). "Piperlongumine, an alkaloid causes inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling axis to induce caspase-dependent apoptosis in human triple-negative breast cancer cells." Apoptosis **19**(7): 1148-1164.

Srinivasa Reddy, P., et al. (2001). "Antibacterial activity of isolates from *Piper longum* and *Taxus baccata*." Pharmaceutical biology **39**(3): 236-238.

Toshiyuki, M. and J. C. Reed (1995). "Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene." Cell **80**(2): 293-299.

Wang, F., et al. (2015). "Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway." International journal of immunopathology and pharmacology **28**(3): 362-373.

Wang, Y.-H., et al. (2014). "Anticancer principles from medicinal Piper (胡椒 Hú Jiāo) plants." Journal of traditional and complementary medicine **4**(1): 8-16.

Yadav, V., et al. (2016). "Preventive potentials of piperlongumine and a *Piper longum* extract against stress responses and pain." Journal of traditional and complementary medicine **6**(4): 413-423.

Yao, Y., et al. (2016). "Piperlongumine induces apoptosis and reduces bortezomib resistance by inhibiting STAT3 in multiple myeloma cells." Oncotarget **7**(45): 73497.

Zheng, J., et al. (2016). "Piperlongumine inhibits lung tumor growth via inhibition of nuclear factor kappa B signaling pathway." Scientific reports **6**: 26357.

Zou, P., et al. (2015). "Auranofin induces apoptosis by ROS-mediated ER stress and mitochondrial dysfunction and displayed synergistic lethality with piperlongumine in gastric cancer." Oncotarget **6**(34): 36505.

7-MATERIAL SUPLEMENTAR

Tabela S1 - Viabilidade Celular obtidos para cada linhagem pelo ensaio do MTT em 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M.

VIABILIDADE CELULAR							
Concentração de PLN (μ M)	IMR-90				NCI-H460		
0	100%	\pm	6,05%		100%	\pm	5,80%
1	98,79%	\pm	5,49%	-	100,28%	\pm	6,44%
2,5	96,14%	\pm	3,81%	-	92,77%	\pm	3,46%
5	97,11%	\pm	1,57%	-	93,98%	\pm	4,23%
10	86,09%	\pm	6,24%	*	91,66%	\pm	5,01%
20	54,02%	\pm	4,48%	***	61,54%	\pm	0,94%
40	25,98%	\pm	6,43%	***	47,70%	\pm	2,43%
C+	91,12%	\pm	4,07%	-	58,43%	\pm	8,16%

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Dunnett*.

Tabela S2 – Integridade de Membrana. Percentual de células com membranas integras obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μ M em NCI-h460 e 5 μ M em IMR-90.

INTEGRIDADE DE MEMBRANA POR CITOMETRIA DE FLUXO							
Concentração de PLN (μ M)	IMR-90				NCI-H460		
0	94,31%	\pm	0,93%		96,04%	\pm	0,88%
10	92,01%	\pm	1,13%	*	95,48%	\pm	0,36%
20	82,48%	\pm	1,15%	***	93,66%	\pm	0,67%
C+	96,93%	\pm	0,24%	-	70,96%	\pm	0,89%

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Dunnett*.

Tabela S3 – Contagem celular. Número de células por mL (*10000) obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 µM em NCI-h460 e 5 µM em IMR-90.

CONTAGEM CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO								
Concentração de PLN (µM)	IMR-90				NCI-H460			
0	8,65	±	0,98		74,31	±	6,69	
10	6,41	±	0,63	**	74,46	±	3,73	-
20	7,07	±	0,48	*	50,62	±	8,48	*
C+	7,92	±	0,44	-	28,18	±	1,30	***

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Dunnnett*.

Tabela S4 – Índices Celulares obtidos por RTCA no estudo da cinética de proliferação celular. C+ = Camptotecina 1 µM.

ÍNDICES CELULARES OBTIDOS POR RTCA								
	Concentração de PLN (µM)	Tempo de Tratamento						
		0 h	12 h	24 h	35 h	48 h	60 h	72 h
IMR-90	0	0,7551	0,7628	0,7824	0,8475	0,9268	0,9851	1,0518
	1	0,7988	0,8078	0,8186	0,8653	0,9402	1,0153	1,0954
	2,5	0,7851	0,7837	0,7673	0,796	0,8595	0,9385	1,0056
	5	0,7936	0,8296	0,8188	0,8056	0,8613	0,9078	0,9722
	10	0,7877	0,7447	0,8282	0,8313	0,8259	0,8294	0,8385
	20	0,7419	0,196	0,1523	0,1113	0,0864	0,0654	0,0475
	40	0,6638	0,054	0,0205	-0,0009	-0,0125	-0,0213	-0,0265
	C +	0,7209	0,9343	0,8784	0,8332	0,7469	0,619	0,4669
NCI-H460	0	0,993	1,5139	2,311	3,5714	5,2871	7,1299	8,4667
	1	0,9838	1,4789	2,2168	3,4093	5,1476	7,0393	8,4062
	2,5	0,9636	1,4527	2,1413	3,2196	4,8582	6,7283	8,1254
	5	0,9861	1,4223	2,0344	3,0107	4,4549	6,2635	7,8553
	10	0,9454	1,3425	1,9471	2,6812	3,655	4,8155	5,8537
	20	0,9506	0,7995	0,6844	0,6167	0,5946	0,6121	0,6529
	40	0,9233	0,6577	0,365	0,255	0,2303	0,2271	0,2334
	C +	1,0039	1,063	0,5745	0,2421	0,0463	-0,0608	-0,1193

Tabela S5 – Ciclo Celular. Percentual de células em fase G1, S e G2/M obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μM em NCI-h460 e 5 μM em IMR-90.

CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO									
	Concentração de PLN (μM)	Percentual de Células em Fase							
		G1		S		G2/M			
IMR-90	0	72,28%	\pm 1,89%	10,87%	\pm 1,09%	16,83%	\pm 1,85%		
	10	74,21%	\pm 1,09%	9,62%	\pm 0,59%	16,15%	\pm 0,50%		
	20	78,34%	\pm 0,31%	***	10,99%	\pm 1,39%	10,65%	\pm 1,08%	***
	C+	83,07%	\pm 1,00%	***	9,83%	\pm 1,21%	6,77%	\pm 0,57%	***
NCI-H460	0	61,36%	\pm 1,90%	19,84%	\pm 1,03%	18,74%	\pm 1,44%		
	10	60,23%	\pm 1,09%	16,62%	\pm 0,51%	*	23,14%	\pm 0,59%	*
	20	62,14%	\pm 0,94%	14,66%	\pm 0,41%	**	23,18%	\pm 0,91%	***
	C+	59,90%	\pm 0,43%	**	18,98%	\pm 1,74%	20,97%	\pm 1,52%	*

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Dunnnett*.

Tabela S6 – Morte celular por apoptose. Percentual de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 24 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Camptotecina 1 μM em NCI-h460 e 5 μM em IMR-90.

MORTE CELULAR POR APOPTOSE										
	Concentração de PLN (μM)	Percentual de Células								
		Viáveis		Apoptose Inicial		Apoptose Tardia/Necrose				
IMR-90	0	83,91%	\pm 2,33%	14,97%	\pm 2,46%	1,11%	\pm 0,31%			
	10	81,66%	\pm 1,39%	16,48%	\pm 1,27%	1,85%	\pm 0,15%	**		
	20	72,42%	\pm 1,49%	***	23,64%	\pm 1,97%	***	3,93%	\pm 0,51%	***
	C+	75,46%	\pm 0,38%	***	23,43%	\pm 0,51%	***	1,1%	\pm 0,14%	
NCI-H460	0	91,54%	\pm 0,91%	4,56%	\pm 1,44%	3,9%	\pm 1,93%			
	10	91,05%	\pm 0,84%	6,1%	\pm 0,34%	2,84%	\pm 0,53%			
	20	71,22%	\pm 1,88%	***	24,84%	\pm 1,4%	***	3,93%	\pm 0,53%	
	C+	54,13%	\pm 1,69%	***	35,14%	\pm 2,39%	***	10,72%	\pm 0,82%	***

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Dunnnett*.

Tabela S7 – Genotoxicidade. Comprimento total do Cometa /Cauda e percentagem de DNA na cauda obtidos pelo ensaio do Cometa para cada linhagem após 3 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN. C+ = Doxorubicina 1 μ M

GENOTOXICIDADE POR SINGLE CELL GEL ELECTROPHORESIS (COMETA)												
	Concentração de PLN (μ M)	Comprimento do Cometa (Px)			Comprimento da Cauda (Px)		% de DNA na Cauda					
IMR-90	0	43,21	\pm	2,37	1,24	\pm	0,07	1,15%	\pm	0,29%		
	5	43,67	\pm	1,75	2,93	\pm	0,84	1,84%	\pm	1,43%		
	10	43,16	\pm	4,18	1,9	\pm	0,77	0,61%	\pm	0,20%		
	20	52,17	\pm	3,24	**	6,79	\pm	3,62	*	3,84%	\pm	0,20%
	C+	62,5	\pm	1,67	***	15,93	\pm	1,55	***	14,67%	\pm	3,85%
NCI-H460	0	45,04	\pm	1,3	0,71	\pm	0,16	0,51%	\pm	0,45%		
	5	46,74	\pm	1,41	1,85	\pm	0,66	1,16%	\pm	0,38%		
	10	47,48	\pm	0,6	1,48	\pm	0,73	1,64%	\pm	1,04%		
	20	52,15	\pm	2,1	***	4,31	\pm	1	***	2,26%	\pm	0,44%
	C+	96,94	\pm	1,05	***	34	\pm	0,93	***	25,33%	\pm	1,20%

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Dunnnett*.

Tabela S8 – Geração de EROs por H₂DCFDA. Valores de fluorescência (RFU) obtidos por citometria de fluxo para cada linhagem após 3 horas de tratamento com diferentes concentrações de PLN.

ESTRESSE OXIDATIVO POR H ₂ DCFDA								
Concentração de PLN (μ M)	IMR-90			NCI-H460				
0	851,36	\pm	63,32	130,33	\pm	10,88		
10	1414,42	\pm	49,41	***	142,06	\pm	2,21	-
20	1894,25	\pm	68,12	***	176,09	\pm	2,18	***

* = $P \leq 0.05$ / ** = $P \leq 0.01$ / *** = $P \leq 0.001$ - ANOVA seguida de pós-teste *Dunnnett*.

Tabela S9 – Sequências de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real.

GENE	FORWARD (5' → 3')	REVERSE (5' → 3')
<i>RPL13a</i>	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA
<i>BAX</i>	TTTCTGACGGCAACTTCAACTGGG	TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT
<i>BAK</i>	CAAGATTGCCACCAGCCTGTTTGA	ATGCAGTGATGCAGCATGAAGTCG
<i>BCL-2</i>	GATTGTGGCCTTCTTTGAG	GTTCCACAAAGGCATCC
<i>BBC3</i>	GTAAGATACTGTATATGCGCTG	TTTTCCACTGTTCCAATCTG
<i>GADD45A</i>	TCAGCGCACGATCACTGTC	CCAGCAGGCACAACACCAC
<i>H2AFX</i>	AATCCAAGCACCTAGATACC	CAGAATTCCAGTTCAGAAGC
<i>NFE2L2</i>	CGTTTGTAGATGACAATGAGG	AGAAGTTTCAGGTGACTGAG
<i>GPX</i>	CTCCCCTTACAGTGCTTGTTCC	CGATGTCAATGGTCTGGAAG
<i>SOD-1</i>	CTAGCGACTTATGGCGAC	GAATGTTTATTGGGCGATC
<i>CCNA2</i>	GACCCTGCATTTGGCTGTG	ACAACTCTGCTACTTCTGG
<i>CCNB2</i>	ATTTTTACAGGTTTACGCCAG	ATCTCCTCATACTTGGAAAGC
<i>CCNB1</i>	AGAGCATCTAAGATTGGAGAG	CCATGTCATAGTCCAACATAG
<i>CCND1</i>	GCCTCTAAGATGAAGGAGAC	CCATTTGCAGCAGCTC
<i>CCNE1</i>	GACTTACATGAAGTGCTACTG	GACGAGAAATGATACAAGGC
<i>CDKN1A</i>	CAGCATGACAGATTTCTACC	CAGGGTATGTACATGAGGAG
<i>CHEK1</i>	GGTGAATATAGTGCTGCTATGTTGACA	TTGGATAAACAGGGAAGTGAACAC
<i>CHEK2</i>	CCCAAGGCTCCTCCTCACA	AGTGAGAGGACTGGCTGGAGTT
<i>ABL-1</i>	CGAAGGGAGGGTGTACCATTAC	CGTTGAATGATGATGAACCAACTC
<i>TP53</i>	TACCACCATCCACTACAAC	GACAGGCACAAACACGCAC
<i>c-MYC</i>	TGAGGAGGAACAAGAAGATG	ATCCAGACTCTGACCTTTTG

Tabela S10 – Valores de expressão relativos de genes relacionados a morte celular (a), danos ao DNA (b), estresse oxidativo (c) e ciclo celular (d) em ambas linhagens.

	Genes	IMR-90	NCI-H460
a)	<i>BAX</i>	-2,336 *	1,019
	<i>BAK</i>	-3,076 *	-1,257
	<i>BCL-2</i>	-1,109	-1,046
	<i>BBC3</i>	-1,552	-1,013
b)	<i>GADD45A</i>	1,211	1,139
	<i>H2AFX</i>	-1,690	-1,329
c)	<i>NFE2L2</i>	1,598	1,513
	<i>GPX</i>	-1,675	-1,381
	<i>SOD1</i>	-1,236	1,206
d)	<i>CCNA2</i>	-6,369 *	-1,572
	<i>CCNB2</i>	-4,115 *	1,396
	<i>CCNB1</i>	-3,125 *	1,38
	<i>CCND1</i>	-2,150	-1,030
	<i>CCNE1</i>	-2,439 *	-1,512
	<i>CDKN1A</i>	1,116	1,045
	<i>CHEK1</i>	-2,123 *	-2,267 *
	<i>CHEK2</i>	-1,383	-1,091
	<i>ABL-1</i>	3,579 *	1,053
	<i>TP53</i>	-3,278 *	1,131
	<i>c-MYC</i>	-1,779	-1,177

(*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$, e fator de expressão acima ou a baixo de 2 x.

V- CAPÍTULO-3

Piperlongumina potencializa citotoxicidade de Olaparib, causa retenção de ciclo celular e danos ao DNA em células P53 positivas e negativas

Adrivanio Baranoski¹; Ignacio Campillo Marcos²; Elena Navarro Carrasco²; Raul García González²; Patricia Morejón García²; Elena Martín Doncel²; Mário Sérgio Mantovani¹; Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena².

¹Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil. ²Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Castilla y León, España.

RESUMO

O gene supressor tumoral P53 está envolvido no controle de diversas atividades celulares importantes tais como parada de ciclo e apoptose devido a danos ao DNA. Cerca de 50% dos cânceres humanos possuem o gene supressor tumoral p53 alterado, implicando na possibilidade de aumento de progressão de tumores e do potencial metastático ou resistência a fármacos. Neste sentido, a Piperlongumina (PLN), alcaloide derivado de *Piper longum* linn, tem se apresentado como inibidor de proliferação celular com potencial atividade anticâncer. Neste trabalho, avaliamos a capacidade de PLN gerar danos no DNA em células tumorais de pulmão H1299 e A549 com p53 mutante e selvagem, respectivamente, e sua interferência no ciclo celular isolada ou em combinação com inibidor de PARP (Olaparib). PLN isolada ou associada, induziu danos a membranas somente da linhagem p53 negativa, somente o associado induziu danos a outra linhagem. PLN isolada induziu nenhuma ou pouca interferência no ciclo celular, apresentando retenção em G2/M, já os tratamentos associados, PLN induziu retenção de células em G2/M em ambas linhagens, sendo na linhagem A549, significativamente superior ao Olaparib isolado, nesta linhagem, também vemos a ativação de p53 com o tratamento com PLN já a partir de 12 h. Na linhagem A549, a PLN induziu pequena redução na quantidade de proteínas ciclina B1 e ciclina A em 48 h com suplementação de 0,5 e 10% de SBF respectivamente. Já na linhagem H1299, induziu a redução na regulação de ciclina D1 em células suplementadas com 0,5 ou 10%. PLN foi capaz de induzir quebras de fita dupla no DNA em ambas linhagens, com 0,5 e principalmente 10% de SBF, sendo mais potente na indução de danos na linhagem p53 negativa, além disso, aumentou a citotoxicidade do Olaparib provavelmente devido a capacidade de suprimir mecanismos da recombinação homóloga.

1-INTRODUÇÃO

O gene supressor tumoral P53 está envolvido em diversas atividades celulares tais como controle de ciclo celular para reparos de DNA em casos de danos, morte celular programada e senescência celular, entre outros (Levav-Cohen, Goldberg et al. 2014). Em condições de baixo estresse celular, a expressão deste gene é mantida em nível baixo, sendo degradado por MDM2, quando em estado de estresse, a proteína p53 recebe uma modificação pós tradução e torna-se estável, induzindo parada de ciclo e/ou morte celular (Pant and Lozano 2014). No entanto, cerca de 50% dos cânceres humanos possuem o gene supressor tumoral p53 mutante, o que pode levar ao aumento de progressão de tumores, aumento de potencial metastático ou mesmo levando as células a serem resistentes a fármacos (Morandell, Reinhardt et al. 2013, Rivlin, Koifman et al. 2015).

Diversos fármacos utilizados como agentes antitumorais são derivados de plantas, neste sentido, a Piperlongumina (PLN), alcaloide derivado de *Piper longum* linn, pimenta longa originaria da Índia, tem se apresentado como inibidor de proliferação celular com potencial atividade anticâncer (Niu, Xu et al. 2015). Em células de câncer de pulmão, a PLN induziu autofagia e apoptose através da inibição da via PI3K/AKT/mTOR (Wang, Mao et al. 2015), além de inibir a proliferação celular e tumoral pela inibição de via de sinalização NF- κ B (fator nuclear kappa B) (Zheng, Son et al. 2016) e induzir redução de expressão de STAT3 em NSCLC (Lewis, Bharadwaj et al. 2015). Muitas das ações de PLN são devido a capacidade desta em elevar o estresse oxidativo (Karki, Hedrick et al. 2017).

Em combinação com outras drogas, a PLN foi capaz de aumentar a citotoxicidade causada por cisplatina em células da câncer de cabeça e pescoço (HNC) (Roh, Kim et al. 2014). Quando combinada com Olaparib, um inibidor de PARP, enzima envolvida em reparos de quebras de DNA de fita simples, aumentou consideravelmente a citotoxicidade em células DT40 selvagens, demonstrando que a PLN poderia suprimir mecanismos da recombinação homóloga (Okamoto, Narita et al. 2014). Já foi relatado que a PLN tem capacidade de induzir morte celular tumoral independente do status de p53 (Raj, Ide et al. 2011). *In vivo*, PLN reteve o aumento de tamanho tumoral em mais de 40% em xenoenxerto de linhagem A549 (Xu, Fang et al. 2017) e em xenoenxerto com HT29 com p53 mutante, além disso, a PLN apresentou reativação de funções de p53 (Basak, Punganuru et al. 2016).

Neste sentido, a capacidade de PLN em gerar danos no DNA em células tumorais com p53 mutante não é completamente compreendida assim como sua interferência no ciclo celular

e os mecanismos celulares envolvidos, assim, nós avaliamos a PLN em linhagens tumorais de pulmão com p53 tipo selvagem e mutante, buscando compreender a capacidade de gerar danos ao DNA e os mecanismos celulares envolvidos.

2-MATERIAIS E MÉTODOS

2.1-Agentes Químicos

A Piperlongumina (PLN) ($C_{17}H_{19}NO_5$) foi obtida da Sigma-Aldrich ($\geq 97\%$ - CAS 20069-09-4) e utilizada nas concentrações de 0 ou 25 μM . Olaparib foi obtido da Sigma-Aldrich, ($\geq 98\%$ CAS 1174043-16-3) e utilizado na concentração de 10 μM . Para controle positivo, utilizamos Doxorubicina (DXR – Pharmacia - CAS 23214-92-8) na concentração de 3 μM durante 3 h.

2.2-Cultura Celular

Como modelos biológicos, foram utilizadas linhagens humanas tumorais de pulmão, A549 (p53 +/+) e NCI-H1299 (p53 -/-), livres de micoplasma. As células foram mantidas em frascos para cultura de 100 cm^2 . A549 foi cultivada com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - Gibco, REF 21969-035) e NCI-H1299 foi cultivada em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institutes* - Gibco, REF 21875-034), ambos suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco, CAT - 12657-029) 1% de L-Glutamina (200 mM - Gibco, CAT - 25030-024) e 0,5% de Penicilina e Estreptomicina (GIBCO-REF 15140-122). As células foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO_2 à 37° C. Em todos os testes as células foram semeadas e mantidas durante 24 h para estabilização antes de receber os tratamentos.

2.3-Integridade de Membranas e Ciclo Celular

A integridade de membranas e o perfil do ciclo celular foram avaliados por citometria de fluxo. 1×10^5 células/poço foram semeadas em placas de 6 poços Falcon. Após a estabilização, 0, 25 μM de PLN, 10 μM de Olaparib ou ambos foram adicionados durante 12, 24, 36 ou 48 h. Após os tratamentos, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspendidas em 500 μL de PBS. Para avaliação de integridade de membranas, 250 μL da suspensão celular foram tratadas com Iodeto de Propídio (2 $\mu g/mL$ - PI), aguardado 5 minutos e realizado a leitura onde 5000 eventos por tratamento foram analisados em citômetro de fluxo Accuri C6 Plus BD. Para avaliação do ciclo celular, as células foram centrifugadas e fixadas em etanol 70% frio durante um mínimo de 12 h. Posteriormente as células foram centrifugadas e suspendidas em PBS, foram tratadas com 5 μL de RNase (2 $\mu g/mL$, Invitrogen - CAT: 12091-021) e 5 $\mu L/mL$ de PI e mantidas no escuro em agitação branda durante uma hora. Posteriormente, 5000 eventos por tratamento foram avaliados em citômetro de fluxo Accuri C6 Plus BD para determinar as percentagens de células nas diferentes fases do ciclo (G1, S e G2/M). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4-Extratos de Células para Western Blot

Para obtenção de extratos de células, 1×10^6 células foram semeadas em placas de 100 mm (58,9 cm²), após estabilização, foi retirado o meio e adicionado meio contendo 0,5 ou 10% de SBF, após 24 h, foram tratadas com 0 ou 25 μ M de PLN durante 12, 24, ou 48 h. Ao final, as proteínas totais foram extraídas utilizando solução de lise (Tris pH=8 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA pH=8 3 mM, Triton 1%, Fluoreto de sódio 1mM) e inibidores de proteases e fosfatases (PMSF 1mM; Aprotinina 10 μ g/mL; Leupeptina 10 μ g/mL/ Ortovanadato Na 1mM e NaF 1mM). As proteínas totais foram quantificadas utilizando a metodologia Bradford. Para separação de proteínas foi utilizado gel de poliacrilamida à 10% e 25 μ g de proteínas total por poço, foi aplicado uma carga de 90 volts durante 2 h. Após a separação por peso, as proteínas totais foram transferidas para membranas PVDF (Millipore) em transferência úmida em câmara fria com carga de 90 volts durante 90 minutos. Posteriormente as membranas foram bloqueadas com leite (5%) durante mais de 30 minutos, foram lavadas em TBS-T 3 vezes durante 10 minutos e incubadas com os anticorpos primários durante a noite. Foram utilizados anticorpos referentes as proteínas P53 (cs-6243 1:1000); ciclina A (sc-596 1:1000); ciclina B1 (cs-752 1:1000) e ciclina D1 (sc-718 1:1000) e como controle de carga, foi utilizado β -actina (AC-74 1:2000). Após a incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes em TBS-T durante 10 minutos e incubadas em anticorpos secundários durante 1 h no escuro, foram lavadas em TBS-T e reveladas. Os respectivos pesos moleculares foram avaliados utilizando marcador conhecido (*Protein Plus Standards Dual Color* BIO RAD Cat. #161-0374).

2.5-Imunofluorescência

Em placas de 100 mm (58,9 cm²), foram adicionados lamina de vidro estéreis, e 1×10^6 células foram semeadas, após estabilização, as células foram divididas em dois grupos, no primeiro, as células foram tratadas com 25 μ M de PLN, com 10 μ M de Olaparib ou ambos durante 12, 36, 24 ou 48 h. No segundo, o meio foi retirado e adicionado meio contendo 0,5% de soro e aguardado 24 h, posteriormente receberam os mesmos tratamentos. As lâminas de vidro contendo as células foram transferidas para placas e lavadas 3 vezes com PBS durante 5 minutos, foi adicionado paraformaldeído (3%) durante 30 minutos, ao ser retirado, foi adicionado glicina (200 mM) durante 15 minutos, foi retirada e adicionado triton (0,2%) durante 30 minutos, foi retirado e as lâminas foram mantidas em PBS com 1% de BSA durante 30 minutos em agitação branda e armazenadas em 4° C. Para marcação, foram adicionados os anticorpos primários diluídos em BSA 1% e mantidos durante algumas horas em RT ou durante a noite em câmara fria. Posteriormente foram lavadas com PBS 3 vezes durante 5

minutos. Foram adicionados os anticorpos secundários diluídos em BSA 1% e mantidos durante 1 h em agitação (Mouse Cy 2 – *Cyanine* para colorir em roxo e Mouse Rabbit Cy 3 – *Indocarbocyanine* para colorir em verde). Foram lavadas 3 vezes com PBS e os núcleos foram corados com DAPI (1µg/mL) durante 15 minutos. Foram lavadas 3 vezes com PBS e as lâminas de vidro foram transferidas e coladas com Moviol em lâminas de microscopia. Foram avaliadas o número de focos das proteínas 53BP1 (1:400 (H-300) sc-22760) e Gamma-H2AX (1:200 - *Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139)*, clone JBW301).

2.6-Analise Estatística

Os valores mensurados para a integridade de membranas, ciclo celular e western blot foram comparadas por ANOVA seguida de Dunnett ($p < 0,05$). As imagens obtidas por imunofluorescência foram analisadas utilizando macro construído para o programa Fiji (ImageJ) para quantificação de focos. Os valores referentes a quantificação de focos em imunofluorescência foram calculados utilizando teste t ($p < 0,05$) através do programa GraphPad Prism 5.

3-RESULTADOS

3.1-Integridade de Membranas

A Integridade de membranas foi avaliada por citometria de fluxo. Na linhagem A549, apenas o tratamento associado em 48 h apresentou redução significativa de integridade de membranas. A linhagem H1299 apresentou redução significativa de integridade de membranas em 36 e 48 h de tratamento com PLN, o tratamento associado apresentou maior número de células com membranas danificadas a partir de 12 h, sendo estatisticamente diferente de PLN em 48 h (Figura 1).

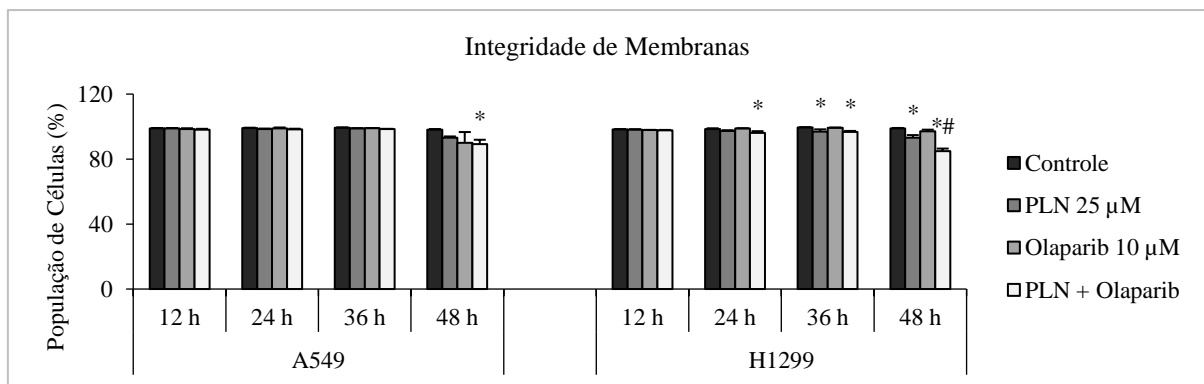
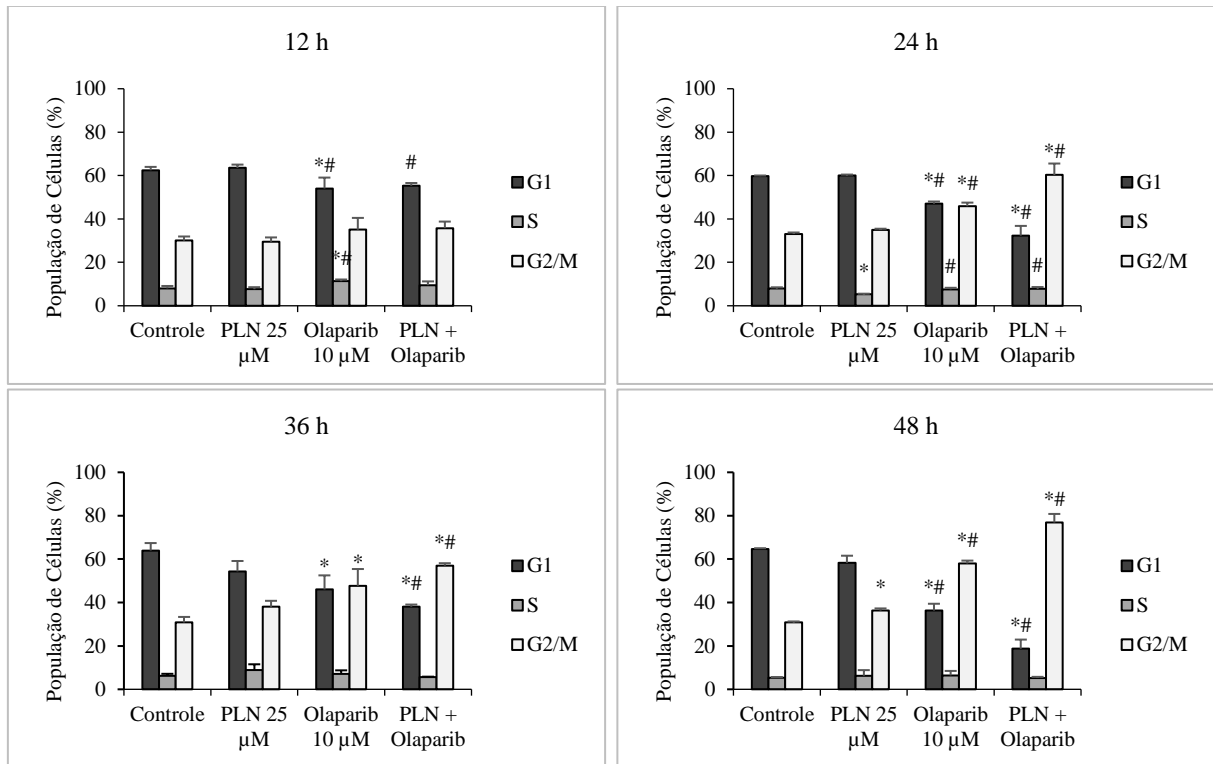


Figura 1. Integridade de Membrana. (*) - Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. (#) - Estatisticamente diferente em relação s PLN. ($p \leq 0,05$).

3.2-Ciclo Celular

O perfil de ciclo celular foi avaliado por citometria de fluxo. Na linhagem A549, apenas em 48 h de tratamento a PLN induziu aumento de fase G2/M, o Olaparib apresentou aumento significativo de G2/M a partir de 24 h, o tratamento associado (PLN + Olaparib) apresentou aumento significativo de G2/M a partir de 24 h, sendo diferente estatisticamente de PLN já a partir de 24 h (Figura 2a). Na linhagem H1299, em 12 h de tratamento, a PLN apresenta maior número de células em G2/M além de aumento de S em 12 e 24 h, o Olaparib apresentou retenção em G2/M a partir de 12 h, não sendo significativo apenas em 24 h, o tratamento associado apresentou aumento em G2/M a partir de 12 h, sendo diferente estatisticamente de PLN somente em 36 h (Figura 2b).

a) A549 suplementada com 10% de SBF.



b) H1299 suplementada com 10% de SBF.

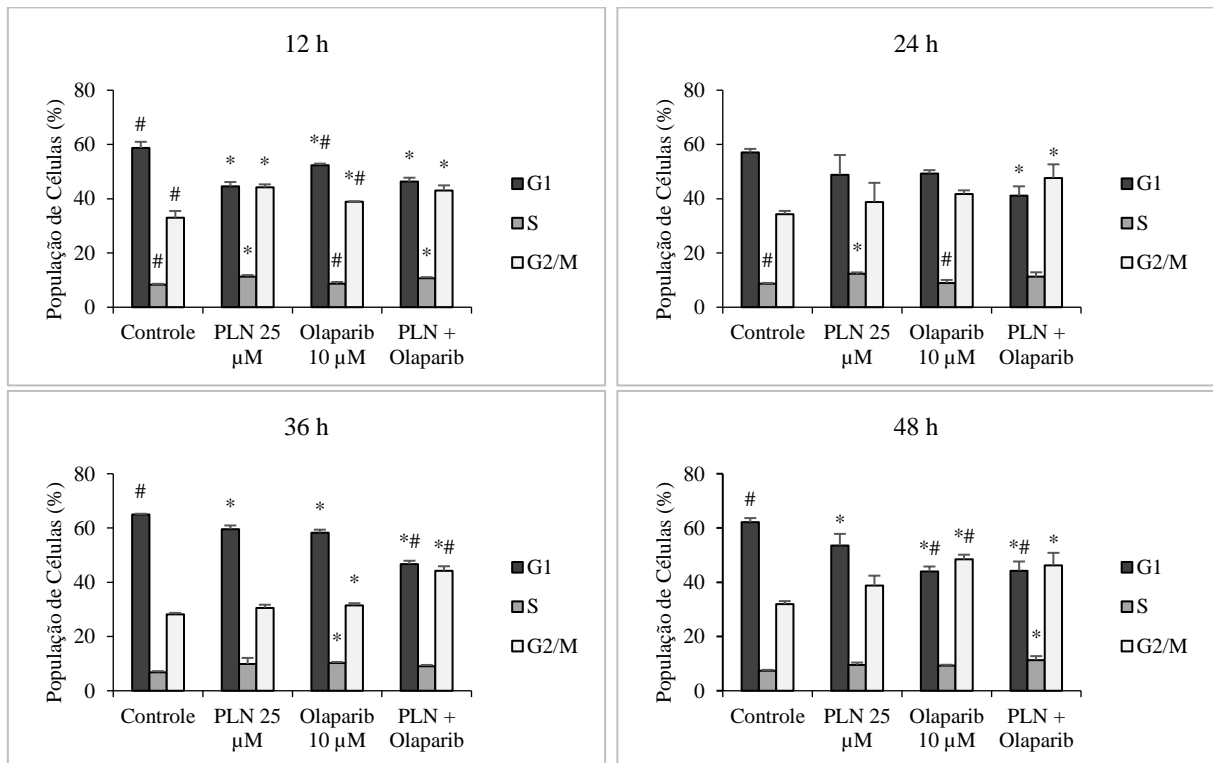


Figura 2. Ciclo celular foi obtido por citometria de fluxo após 12, 24, 36 e 48 h de tratamento para as linhagens a549 (a) e H1299 (b). (*) indica estatisticamente significativo $p \leq 0,05$.

3.3-Western Blot

Na avaliação de proteínas por western blot, observamos na linhagem A549, que o tratamento com PLN aumenta a concentração de P53 já a partir de 12 h, principalmente nas células suplementadas com 10% de SBF, sendo que não houve marcação na linhagem H1299 (p53 -/-) conforme esperado. Na linhagem A549, encontramos aumento na regulação da proteína ciclina A (1,4x) em 12 h no tratamento com 0,5% de SBF e redução em 48 h (-1,85x) no tratamento com 10% de SBF. A ciclina B1 foi regulada negativamente (-1,9x) em 48 h nas células com 0,5% de SBF (Figura 3a). Na linhagem H1299, observamos redução significativa de ciclina D1 em 12 e 24 h (2 e 1,4x respectivamente) nas células com 0,5% de SBF, no tratamento com 10% de SBF, ciclina B1 apresentou leve redução (-1,3x) e a ciclina D1 apresentou redução a partir de 12 h, (-3,6, -6,1, e -1,9x respectivamente) (Figura 3b).

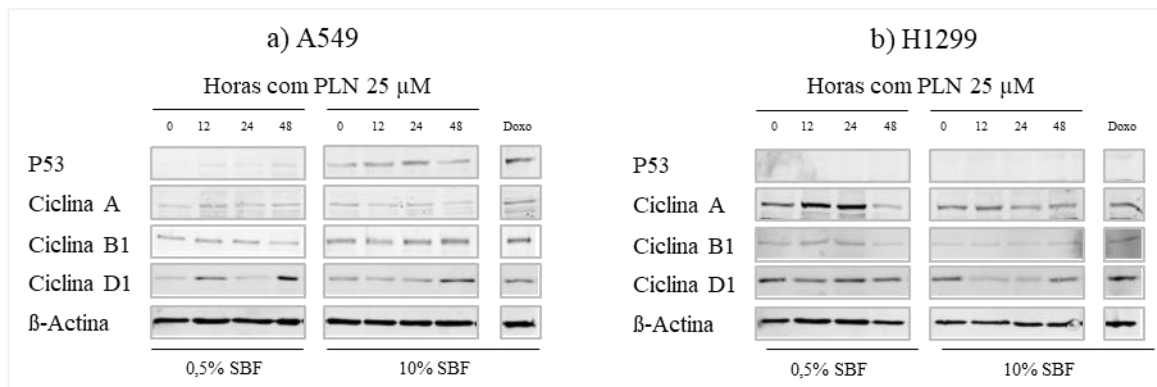


Figura 3. Quantificação de proteínas por Western Blot nas linhagens A549 e H1299 após 12, 24 e 48 h suplementadas com 0,5% ou 10% de SBF.

3.4-Imunofluorescência

Foram avaliadas por imunofluorescências focos das proteínas 53BP1 e Gamma-H2Ax. Linhagem A549 suplementada com 0,5% de SBF: não foi observado aumento de número de focos de 53BP1 no tratamento com PLN em todos os tempos testados, já no tratamento associado, observamos diferença estatística a partir de 24 h em relação a PLN, quanto a focos de Gamma-H2Ax, observamos um pequeno, porem significativo aumento de número de focos no tratamento associado a partir de 24 h (Figura 4). Linhagem A549 suplementada com 10% de SBF: observamos aumento de número de focos de 53BP1 no tratamento com PLN apenas em 48 h de tratamento, o tratamento com Olaparib induziu aumento significativo de número de focos partir de 24 h tendo o tratamento associado apresentado aumento de focos já em 12 h, sendo estatisticamente diferente de PLN em 24 h, quanto a focos de Gamma-H2Ax, observamos um pequeno, porem significativo aumento de número de focos no tratamento com Olaparib a partir de 36 h e do associado a partir de 24 h (Figura 5). Linhagem H1299 suplementada com 0,5% de SBF: observamos aumento de número de focos de 53BP1 no tratamento com PLN, Olaparib e associado a partir de 24 h de tratamento, quanto a focos de Gamma-H2Ax, observamos significativo aumento de número de focos no tratamento com Olaparib e o associado em 24 e 36 h (Figura 6). Linhagem H1299 suplementada com 10% de SBF: observamos aumento de número de focos de 53BP1 no tratamento com PLN, Olaparib e associado já a partir de 12 h sendo o tratamento associado diferente estatisticamente de PLN em 24 e 36 h, quanto a focos de Gamma-H2Ax, observamos significativo aumento de número de focos nos tratamentos com PLN, Olaparib e associado em 24 e 36 h, tendo o tratamento associado número de focos estatisticamente maior que a PLN (Figura 7).

A549 suplementada com 0,5% de SBF.

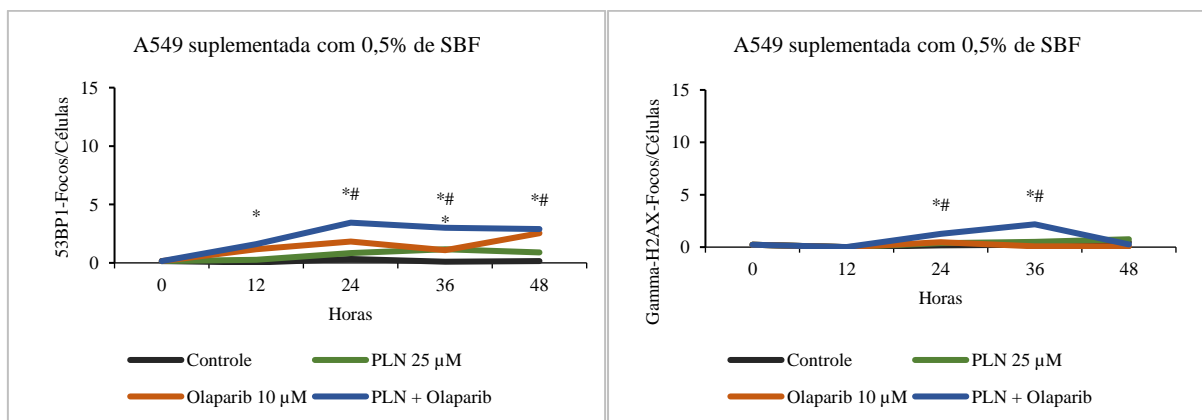
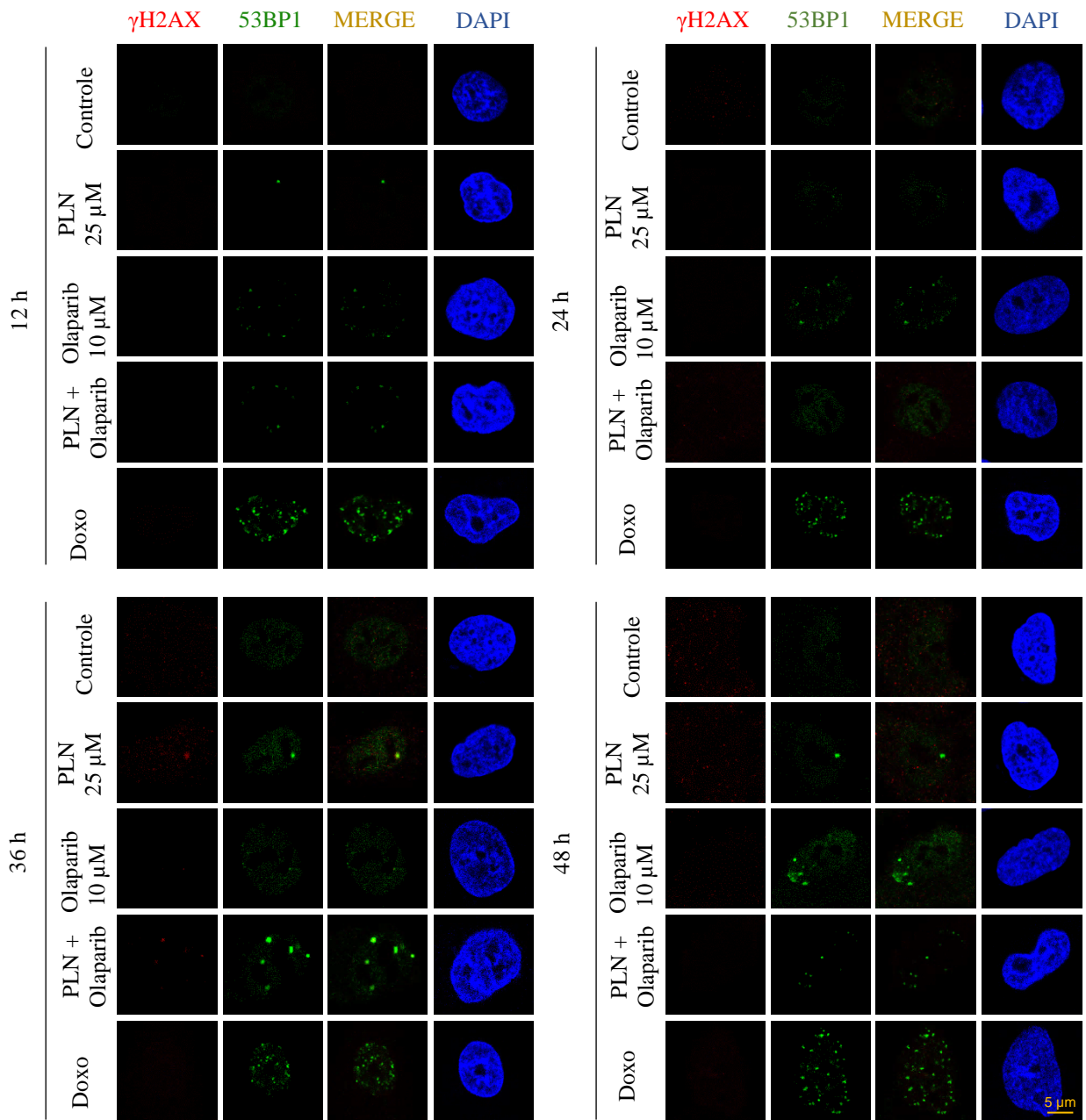


Figura 4. Determinação de formação de focos de 53BP1 e Gamma-H2Ax em células a549 suplementadas com 0,5% de SBF durante 12, 24, 36 e 48 h. (*) indica estatisticamente significativo em relação ao controle negativo $p \leq 0,05$. (#) indica estatisticamente significativo em relação a PLN $p \leq 0,05$.

A549 suplementada com 10% de SBF.

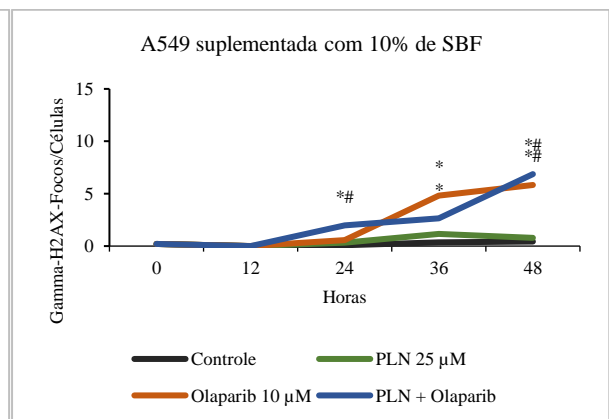
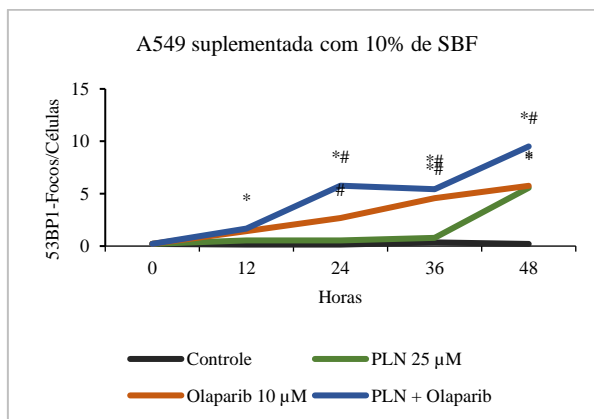
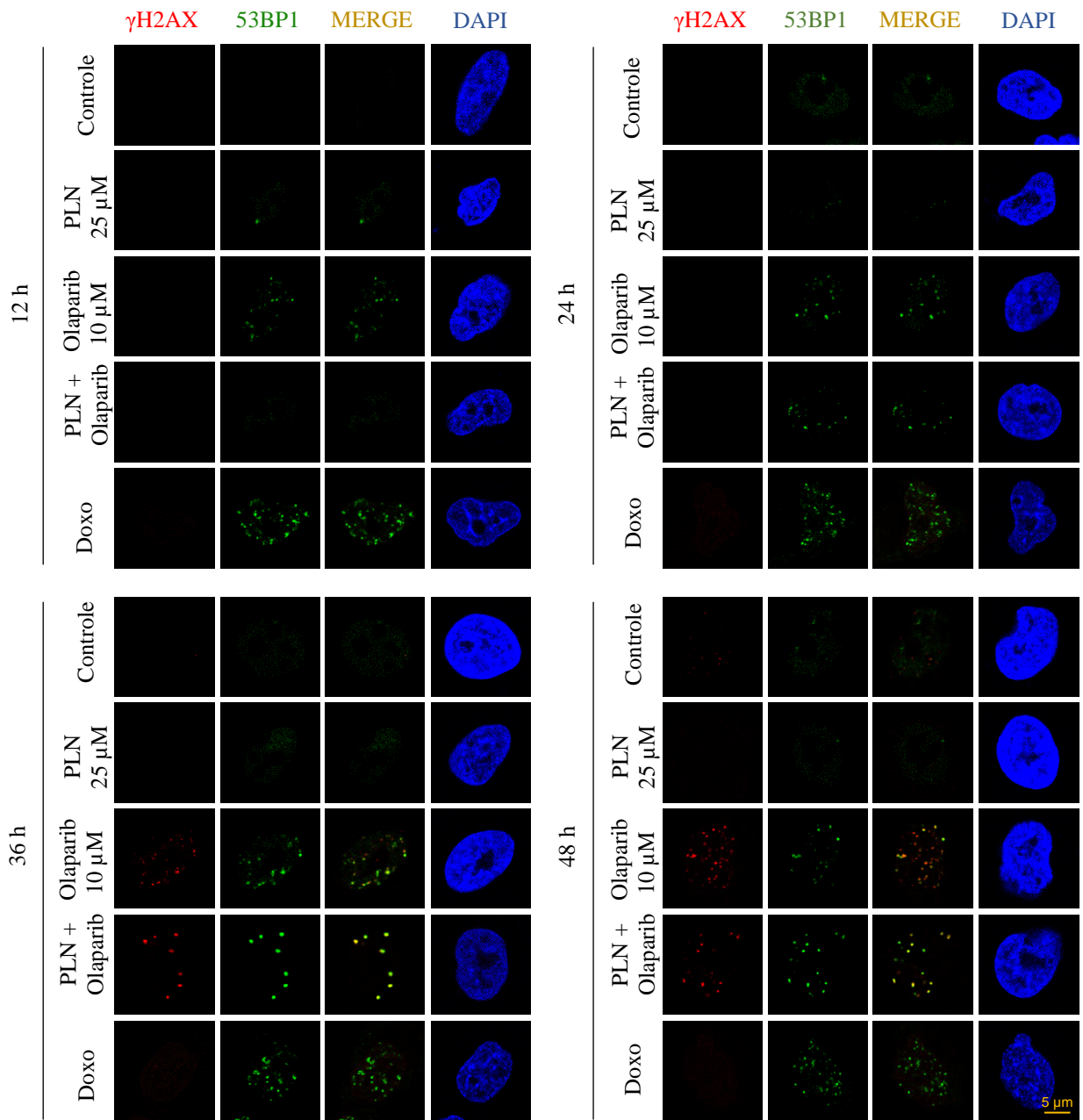


Figura 5. Determinação de formação de focos de 53BP1 e Gamma-H2Ax em células a549 suplementadas com 10% de SBF durante 12, 24, 36 e 48 h. (*) indica estatisticamente significativo em relação ao controle negativo $p \leq 0,05$. (#) indica estatisticamente significativo em relação a PLN $p \leq 0,05$.

H1299 suplementada com 0,5% de SBF.

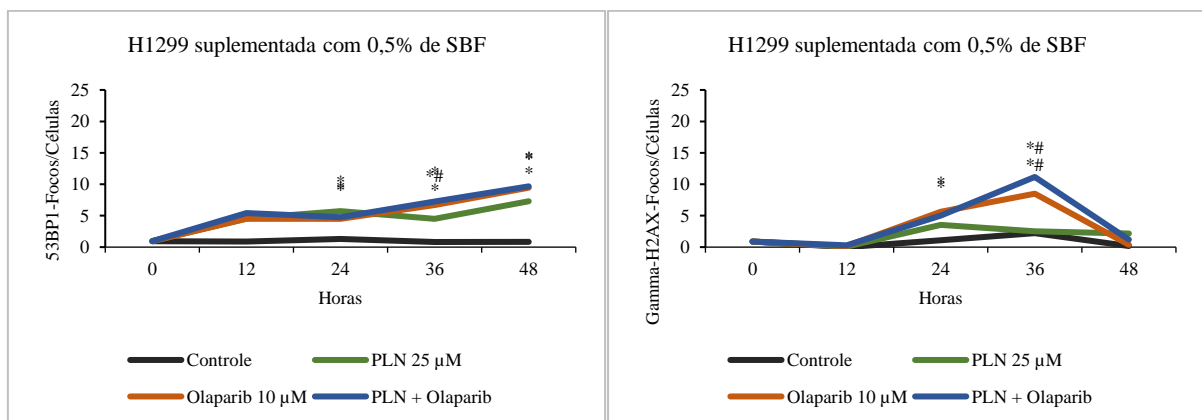
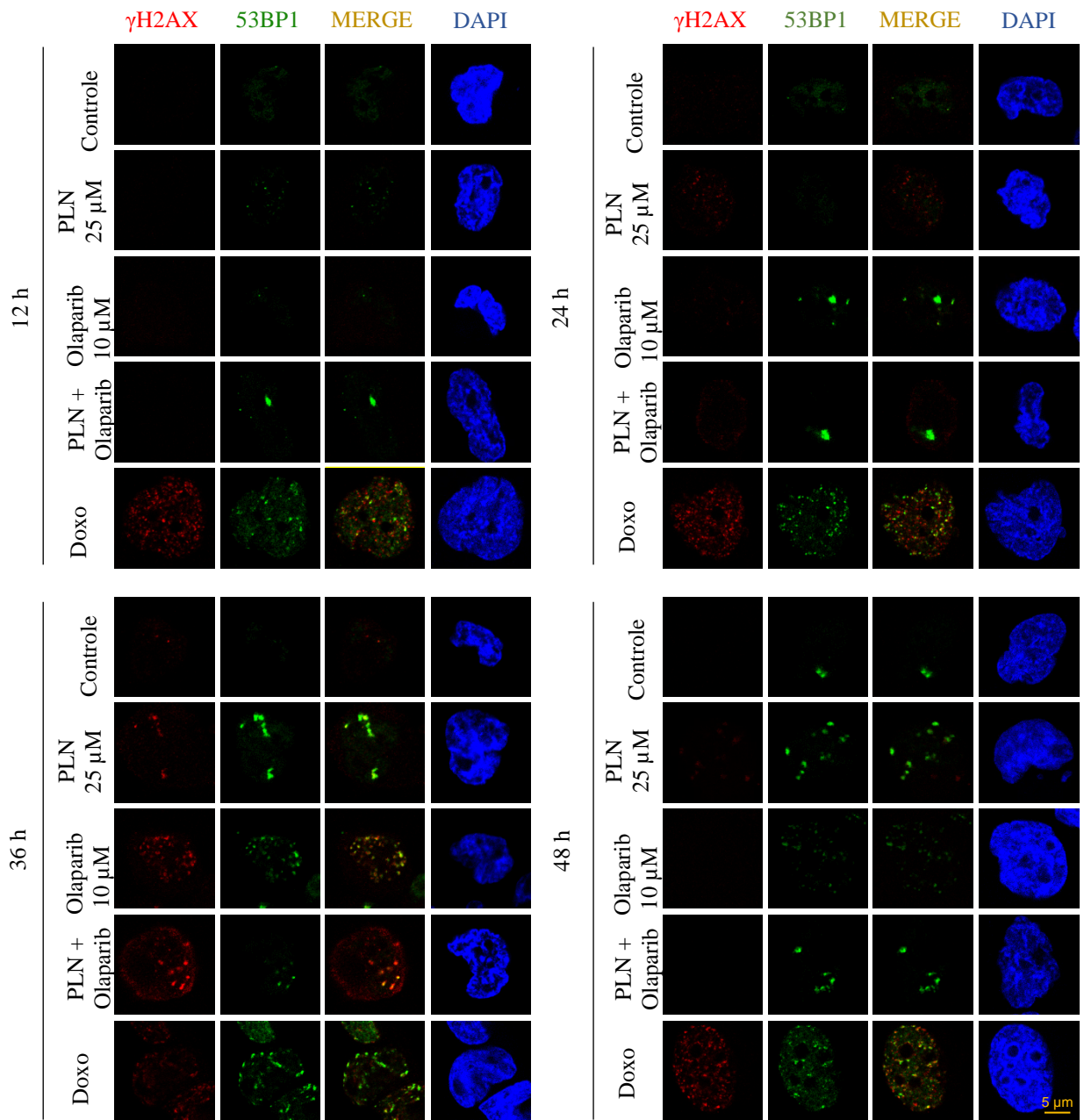


Figura 6. Determinação de formação de focos de 53BP1 e Gamma-H2Ax em células H1299 suplementadas com 0,5% de SBF durante 12, 24, 36 e 48 h. (*) indica estatisticamente significativo em relação ao controle negativo $p \leq 0,05$. (#) indica estatisticamente significativo em relação a PLN $p \leq 0,05$.

H1299 suplementada com 10% de SBF.

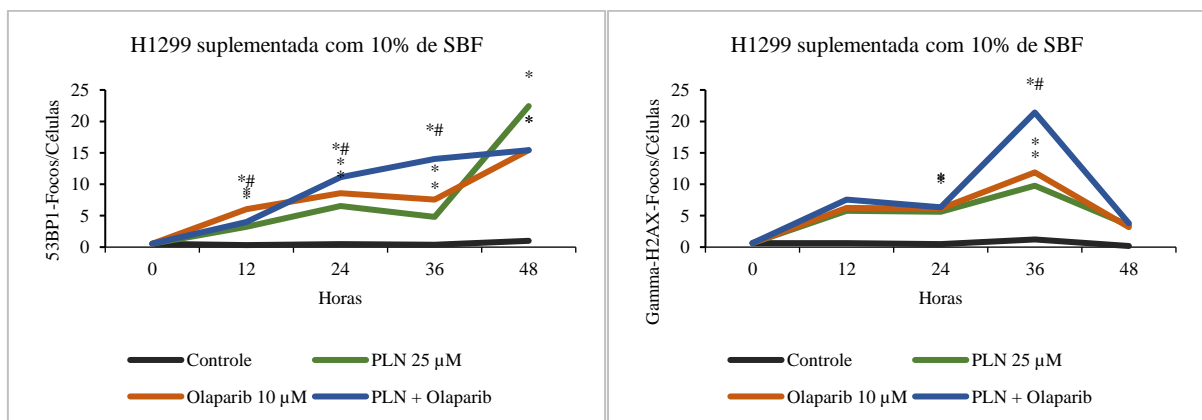
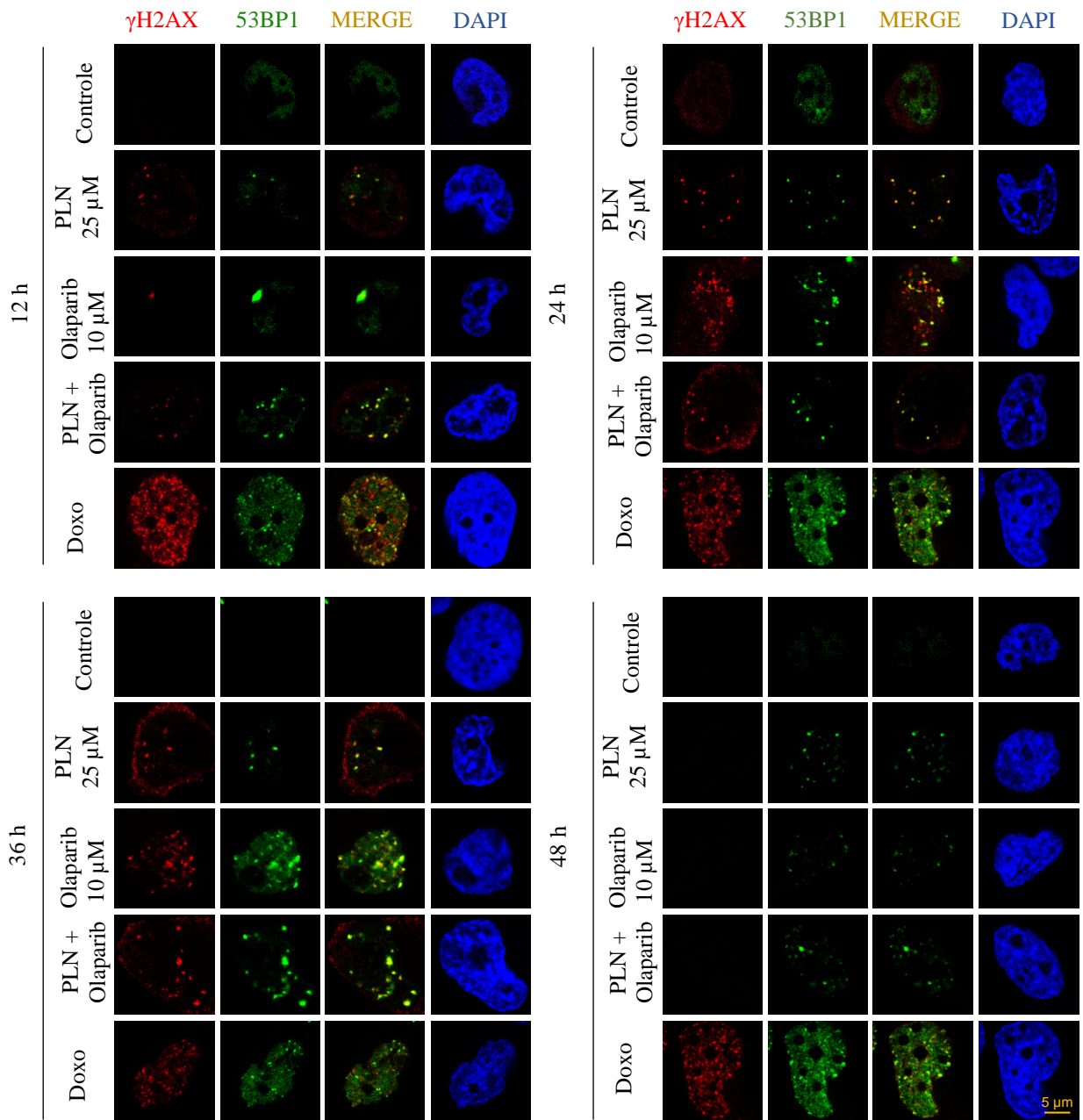


Figura 7. Determinação de formação de focos de 53BP1 e Gamma-H2Ax em células H1299 suplementadas com 10% de SBF durante 12, 24, 36 e 48 h. (*) indica estatisticamente significativo em relação ao controle negativo $p \leq 0,05$. (#) indica estatisticamente significativo em relação a PLN $p \leq 0,05$.

4-DISCUSSÃO

A proteína p53 pode desempenhar papéis importantes na progressão de câncer e em sua terapia, já foi reportado que mutações em seu gene aumenta a sensibilidade de tumores contra rádio e/ou quimioterapias (Morandell, Reinhardt et al. 2013). Neste trabalho, avaliamos a capacidade de PLN em gerar danos em células tumorais de pulmão p53 $+/+$ e p53 $-/-$ em células paradas (0,5% de SBF) e em proliferação (10% de SBF), além de sua interferência no ciclo celular. Também avaliamos sua ação quando associado a um inibidor de PARP-1, enzima envolvida em reparos de quebras de DNA (Chalmers 2009). Como um parâmetro de citotoxicidade, avaliamos a capacidade da PLN em induzir danos a membranas isolada ou associada ao Olaparib. Nós observamos que a PLN isolada é capaz de induzir danos a membranas somente na linhagem p53 $-/-$, porém quando associada ao inibidor, observamos maior potência de ação além de já observarmos danos na linhagem p53 $+/+$, indicando que houve ativação de mecanismos de reparos, entre eles, ativação de p53 na linhagem A549 como observado por Western Blot, de maneira interessante, já foi constatado a capacidade da PLN em gerar danos independente do status de p53 em outras linhagens (Roh, Kim et al. 2014). A capacidade de gerar danos a membrana se deve possivelmente pela capacidade da PLN em elevar o estresse oxidativo (Raj, Ide et al. 2011), levando a danos celular importantes, entre elas a peroxidação lipídica, o que gera danos a membrana (Bi, Qu et al. 2015). A PLN em associação com Olaparib também levou a sensibilização de células DT40, os autores demonstraram que a PLN tem a capacidade de suprimir a recombinação homologa (Okamoto, Narita et al. 2014).

Já foi demonstrado a capacidade de PLN quanto sua interferência no ciclo celular (Chen, Liu et al. 2016). Na linhagem a549, por western blot, observamos que a PLN induziu pequena redução de ciclina B1 (0,5% SBF) e ciclina A (10% SBF) em 48 h, observamos nesta linhagem retenção em G2/M neste tempo, resultados semelhantes aos encontrados por Duan e colaboradores, (Duan, Zhang et al. 2016), os autores observaram que em células tumorais gástrico humanos (AGAS e HGC27), o tratamento com PLN induziu a prisão de ciclo celular em G2 além da regulação negativa de ciclina B1 e aumento de GADD45a, proteína relacionada a prisão de ciclo em caso de danos ao DNA. Já na linhagem H1299, observamos redução na regulação de ciclina D1 em células suplementadas com 0,5 ou 10%. Ciclina D1 é necessária na transição G1/S. Han e colaboradores (Han, et al., 2014) demonstraram que a PLN induzia a redução de expressão de produtos de vários genes regulados por NF-KB, incluindo ciclina D1, c-Myc e COX-2 levando a parada de proliferação, assim, ao menos na linhagem H1299, a PLN poderia estar inibindo NF-KB. Neste trabalho, a PLN causou nenhuma ou pouca alteração no

perfil de ciclo com retenção em G2/M quando utilizada isolada em ambas linhagens, no entanto, no tratamento associado, na linhagem p53 +/+, observamos retenção de células em G2/M, sendo esta significativamente superior ao Olaparib, além disso, observamos um efeito pouco acentuado de prisão em G2/M por parte do Olaparib e do associado na linhagem p53 -/-, indicando que o efeito de prisão nesta fase é relacionado ao p53, nos encontramos ativação de p53 em A549, estes resultados estão de acordo com os encontrados por Jelinic & Levine (Jelinic and Levine 2014) onde os autores observaram em células U2S a prisão acentuada em fase G2 com regulação positiva de p53 além de p21 e acumulação de ciclina A, não tendo este efeito em H1299. Neste trabalho, o tratamento associado induziu retenção de ciclo na fase G2/M na linhagem H1299, no entanto com muito menos potência em relação a P53 positiva.

Na presença de danos ao DNA, ocorre a fosforilação da histona H2AX por ATM e ATR via PI3K, Gamma-H2Ax recruta as demais proteínas para a localização e reparo do DNA (focos) (Kuo and Yang 2008). Gamma-H2Ax é fosforilado por ATR em respostas a danos de cadeia simples de DNA (Ward, Minn et al. 2004). Danos em cadeia dupla de DNA deve ser sinalizado rapidamente para manter a integridade celular, a proteína 1 de ligação de p53 (53BP1) regula a resposta celular na existência de danos em cadeia dupla, promovendo a união das extremidades do DNA por recombinação (Panier and Boulton 2014). Já foi descrito que a PLN tem a capacidade de gerar danos ao DNA (Dhillon, Chikara et al. 2014, Cottini, Hideshima et al. 2015), neste sentido, nós avaliamos a capacidade de PLN isolada ou a associação com o Olaparib em ativar a formação de focos de Gamma-H2Ax e 53BP1. Nossos resultados demonstraram que a PLN isolada não causou elevação de número de focos em células A549 paradas (0,5% de SBF) indicando não haver induzido quebras de DNA, no entanto, vemos aumento significativo de focos de 53BP1 em 48 h em células A549 em proliferação (10% de SBF), isso indica que a PLN pode interferir e causar danos durante a duplicação do DNA. Quanto ao tratamento associado, observamos que a formação de focos de ambas proteínas em células A549 paradas ou em proliferação, com o associado apresentando a formação de focos em menos tempo, indicando uma potencialização de efeito no tratamento com reparo sensibilizado, nesta linhagem, a formação de focos de Gamma-H2Ax foi pequena, porem significativa no tratamento associado nas células paradas, apresentando efeitos semelhantes nos tratamentos associados e Olaparib com aumento significativo em menos tempo no tratamento associado. Já na linhagem H1299, observamos que a PLN isolada já é capaz de gerar aumento no número de focos de 53BP1 em células paradas e principalmente em proliferação, isso se deve provavelmente pela capacidade da PLN em aumentar as EROs (Jin, Lee et al. 2014, Xiong,

Liu et al. 2015). A formação de focos de 53BP1 no tratamento com Olaparib isolada ou associado a PLN ocorreu de forma semelhante nas células paradas, e assim como na linhagem A549, a formação de focos ocorreu em menos tempo nas células em proliferação, quanto a formação de focos de gamma-H2Ax, no tratamento em células paradas observamos elevação de número de focos até 36 h nos tratamentos com Olaparib isolada e associado a PLN, caindo em 48 h indicando que neste tempo de tratamento, muitas células já morreram devido a excesso de danos, resultados semelhantes no tratamento de células em proliferação, com maior número de focos no associado.

Em conclusão, a PLN isolada tem a capacidade de gerar danos de fita dupla ao DNA, principalmente na linhagem p53 $-/-$, provavelmente pelo aumento de EROs, a menor ativação de 53BP1 e Gamma-H2Ax na linhagem A549 se deu por menor capacidade de geração de danos devido a ativação de p53. Além disso, a mais rápida e maior atividade em combinação com Olaparib reforça a conclusão da PLN ter a capacidade de suprimir mecanismos da recombinação homóloga.

5.AGRADECIMENTOS.

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior – Processo número 88881.135664/2016-01 do aluno Adrivanio Baranoski. Também agradecem ao Professor Pedro A. Lazo-Zbikowski Taracena por ceder seu laboratório para o desenvolvimento da pesquisa.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

Basak, D., et al. (2016). "Piperlongumine exerts cytotoxic effects against cancer cells with mutant p53 proteins at least in part by restoring the biological functions of the tumor suppressor." Int J Oncol **48**(4): 1426-1436.

Bi, Y., et al. (2015). "Neuroprotective effects of alkaloids from *Piper longum* in a MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease." Pharmaceutical biology **53**(10): 1516-1524.

Chalmers, A. J. (2009). "The potential role and application of PARP inhibitors in cancer treatment." British medical bulletin **89**(1): 23-40.

Chen, S.-Y., et al. (2016). "Piperlongumine suppresses proliferation of human oral squamous cell carcinoma through cell cycle arrest, apoptosis and senescence." International journal of molecular sciences **17**(4): 616.

Cottini, F., et al. (2015). "Synthetic lethal approaches exploiting DNA damage in aggressive myeloma." Cancer discovery **5**(9): 972-987.

Dhillon, H., et al. (2014). "Piperlongumine induces pancreatic cancer cell death by enhancing reactive oxygen species and DNA damage." Toxicology reports **1**: 309-318.

Duan, C., et al. (2016). "Piperlongumine induces gastric cancer cell apoptosis and G2/M cell cycle arrest both in vitro and in vivo." Tumor Biology **37**(8): 10793-10804.

Jelincic, P. and D. A. Levine (2014). "New insights into PARP inhibitors' effect on cell cycle and homology-directed DNA damage repair." Molecular cancer therapeutics **13**(6): 1645-1654.

Jin, H.-O., et al. (2014). "Piperlongumine induces cell death through ROS-mediated CHOP activation and potentiates TRAIL-induced cell death in breast cancer cells." Journal of cancer research and clinical oncology **140**(12): 2039-2046.

Karki, K., et al. (2017). "Piperlongumine Induces Reactive Oxygen Species (ROS)-Dependent Downregulation of Specificity Protein Transcription Factors." Cancer Prevention Research **10**(8): 467-477.

Kuo, L. J. and L.-X. Yang (2008). " γ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks." In vivo **22**(3): 305-309.

Levav-Cohen, Y., et al. (2014). The p53-Mdm2 loop: a critical juncture of stress response. Mutant p53 and MDM2 in Cancer, Springer: 161-186.

Lewis, K. M., et al. (2015). "Small-molecule targeting of signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 to treat non-small cell lung cancer." Lung Cancer **90**(2): 182-190.

Morandell, S., et al. (2013). "A reversible gene-targeting strategy identifies synthetic lethal interactions between MK2 and p53 in the DNA damage response in vivo." Cell reports **5**(4): 868-877.

Niu, M., et al. (2015). "Piperlongumine is a novel nuclear export inhibitor with potent anticancer activity." Chemico-biological interactions **237**: 66-72.

Okamoto, S., et al. (2014). "Impact of DNA repair pathways on the cytotoxicity of piperlongumine in chicken DT40 cell-lines." Genes & cancer **5**(7-8): 285.

Panier, S. and S. J. Boulton (2014). "Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus." Nature reviews Molecular cell biology **15**(1): 7.

Pant, V. and G. Lozano (2014). "Limiting the power of p53 through the ubiquitin proteasome pathway." Genes & development **28**(16): 1739-1751.

Raj, L., et al. (2011). "Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS." Nature **475**(7355): 231-234.

Rivlin, N., et al. (2015). p53 orchestrates between normal differentiation and cancer. Seminars in cancer biology, Elsevier.

Roh, J.-L., et al. (2014). "Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer." Oncotarget **5**(19): 9227.

Wang, F., et al. (2015). "Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway." International journal of immunopathology and pharmacology **28**(3): 362-373.

Ward, I. M., et al. (2004). "UV-induced ataxia-telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) activation requires replication stress." Journal of Biological Chemistry **279**(11): 9677-9680.

Xiong, X.-x., et al. (2015). "Piperlongumine induces apoptotic and autophagic death of the primary myeloid leukemia cells from patients via activation of ROS-p38/JNK pathways." Acta Pharmacologica Sinica **36**(3): 362.

Xu, X., et al. (2017). "Identification of novel ROS inducer by merging the fragments of piperlongumine and dicoumarol." Bioorganic & medicinal chemistry letters **27**(5): 1325-1328.

Zheng, J., et al. (2016). "Piperlongumine inhibits lung tumor growth via inhibition of nuclear factor kappa B signaling pathway." Scientific reports **6**: 26357.

7-MATERIAL SUPLEMENTAR

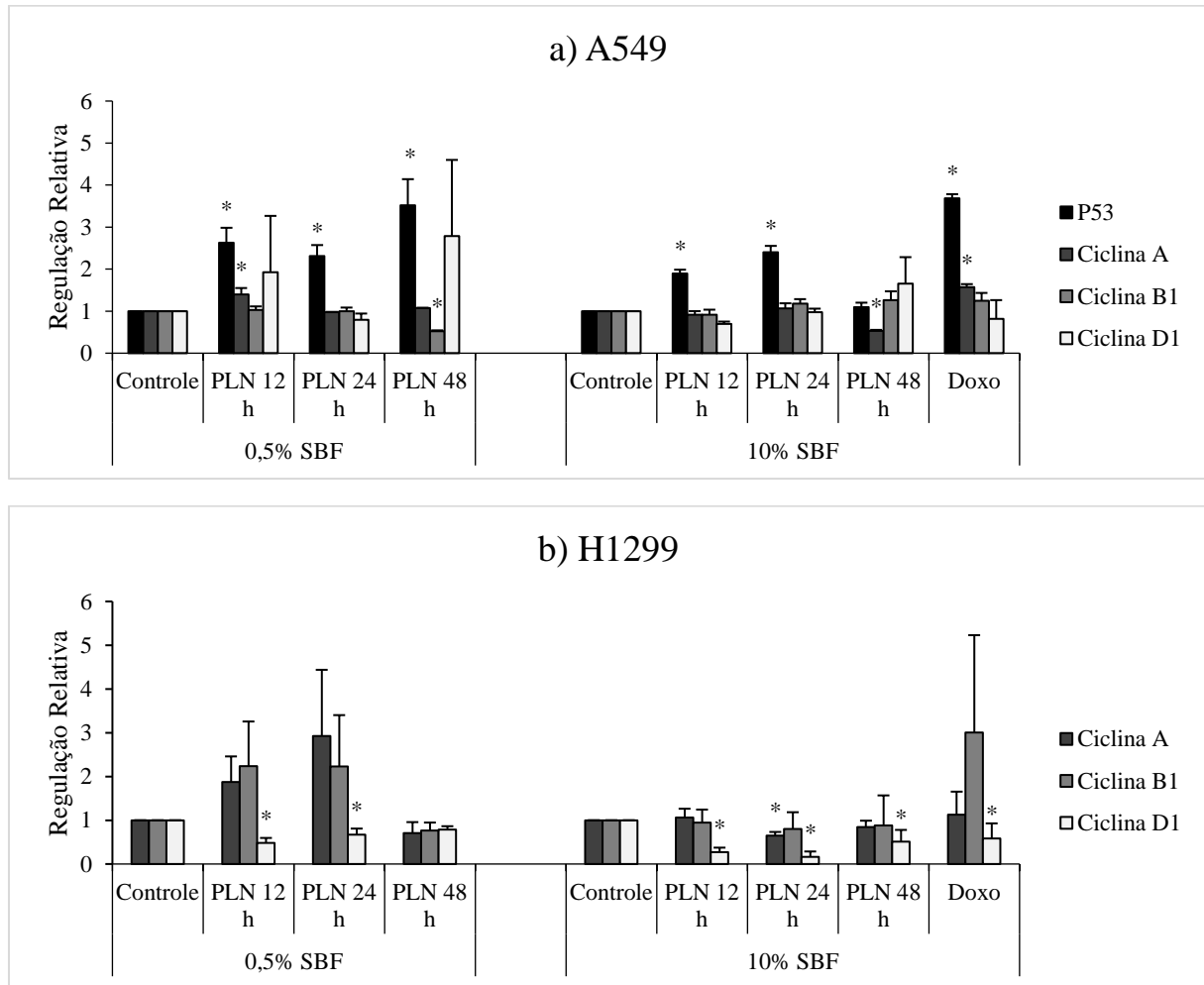
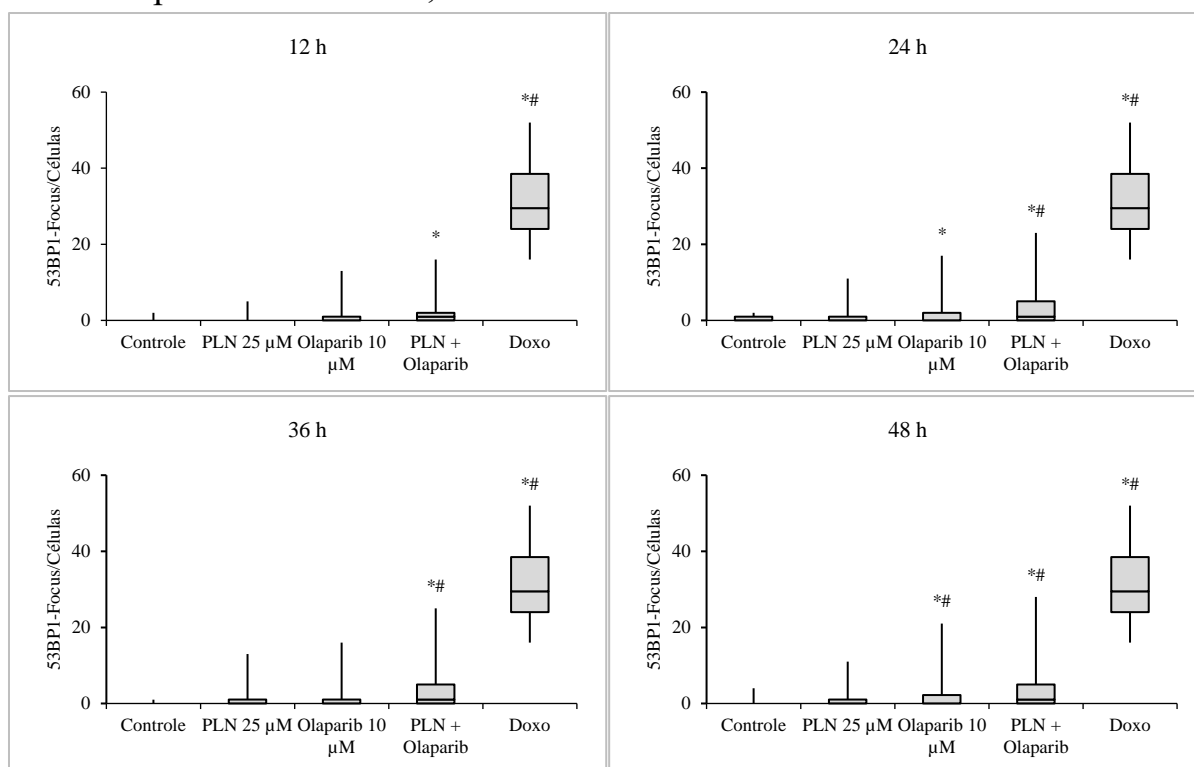


Figura S1. Quantificação de proteínas por Western Blot nas linhagens a549, p53+/+ e H1299, p53-/- após 12, 24 e 48 h em células suplementadas com 0,5% ou 10% de SBF. (*) indica estatisticamente significativo em relação ao controle negativo $p \leq 0,05$.

A549 suplementada com 0,5% de SBF



A549 suplementada com 10% de SBF

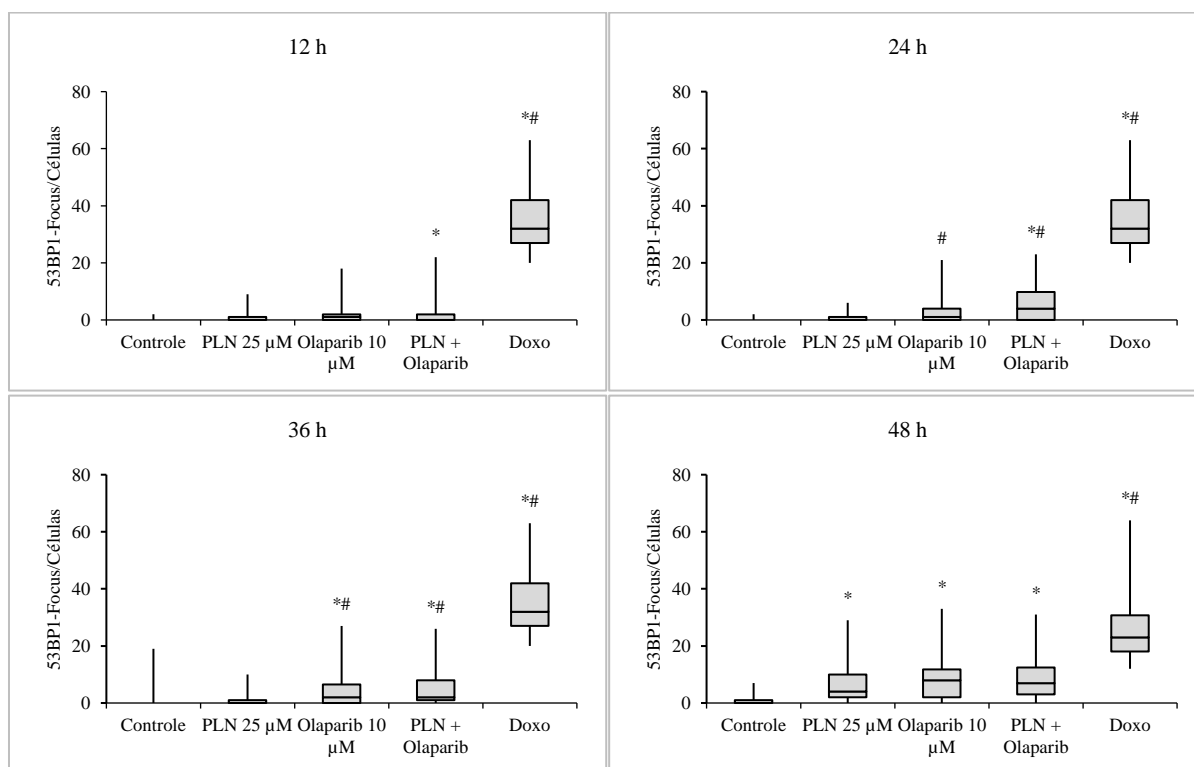
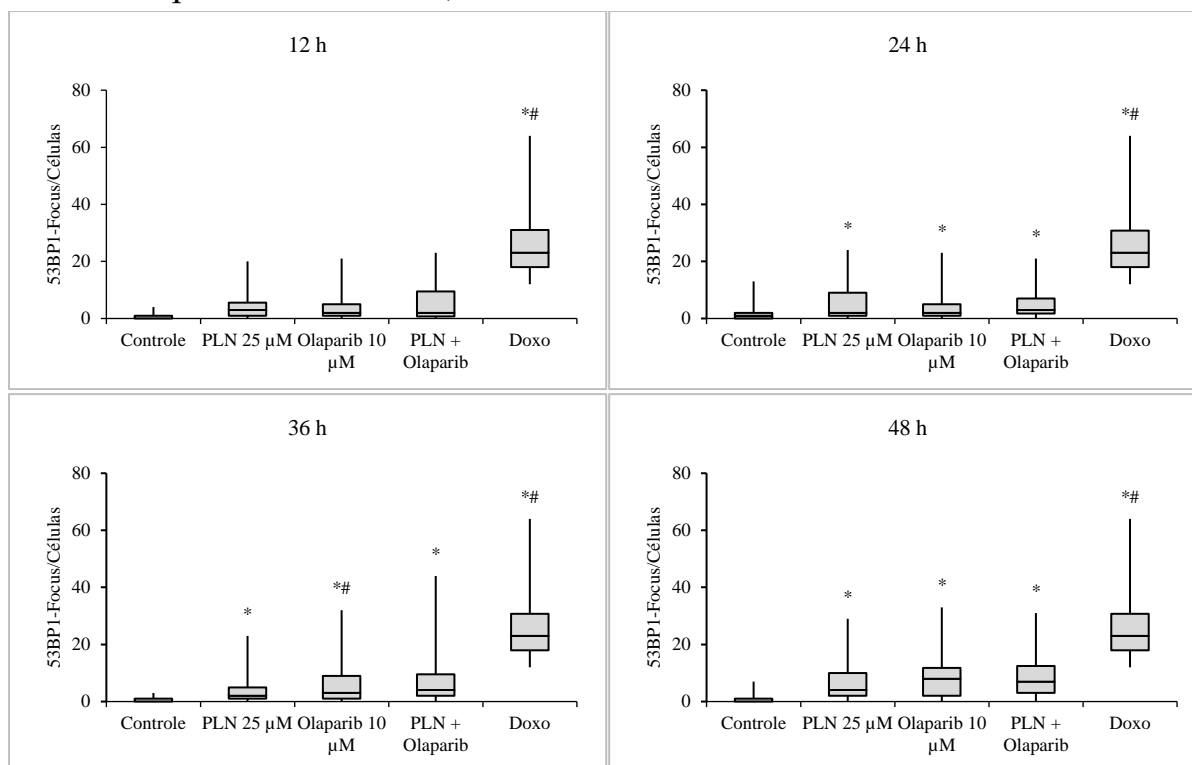


Figura S2. Número de focos de 53BP1 em células A549 suplementada com 0,5 ou 10% de soro bovino fetal. Doxo: doxorubicina 3 μ M durante 3 h. (*) – Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. (#). Estatisticamente diferente em relação a PLN. ($p \leq 0,05$).

H1299 suplementada com 0,5% de SBF



H1299 suplementada com 10% de SBF

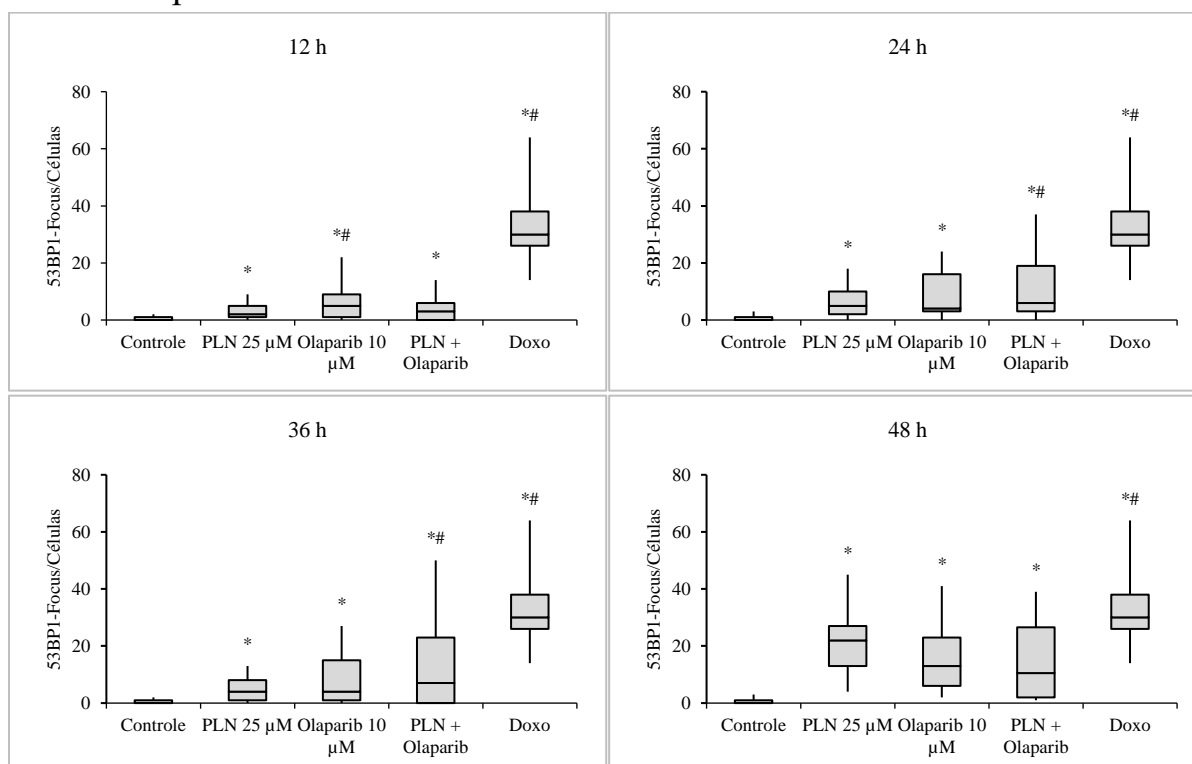
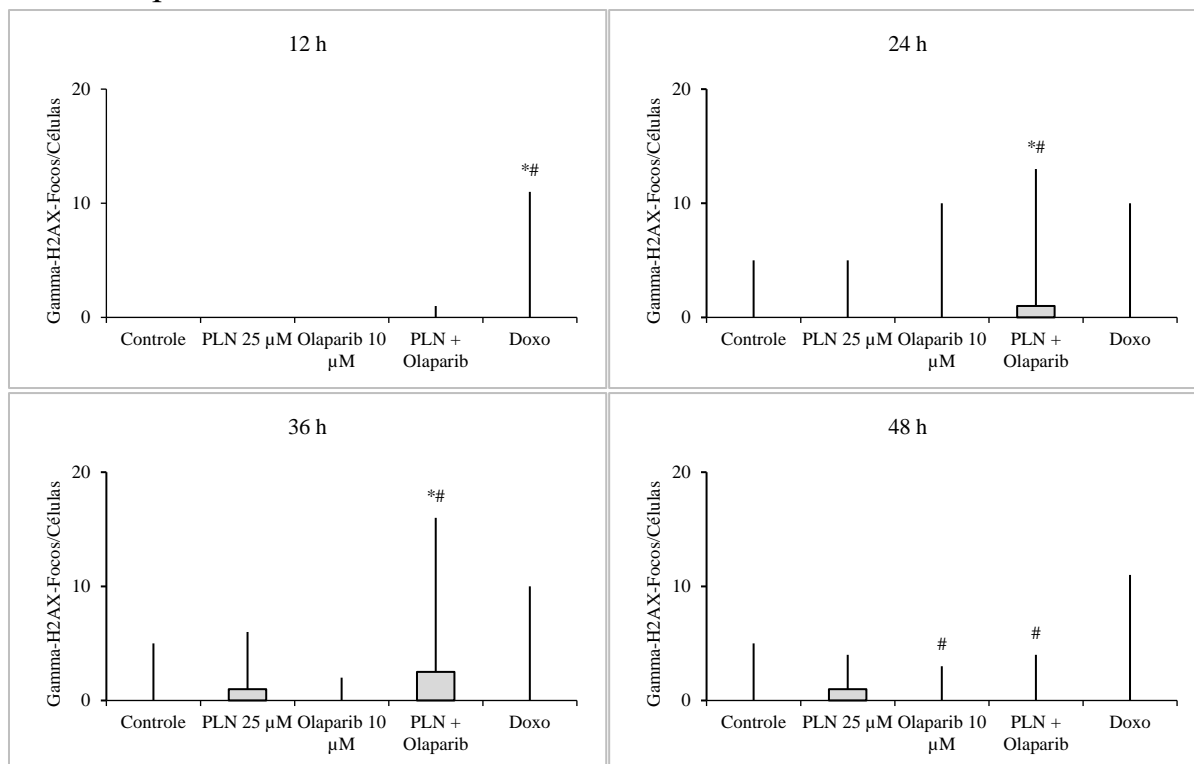


Figura S3. Número de focos de 53BP1 em células H1299 suplementada com 0,5 ou 10% de soro bovino fetal. Doxo: doxorubicina 3 μ M durante 3 h. (*) – Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. (#). Estatisticamente diferente em relação a PLN. ($p \leq 0,05$).

A549 suplementada com 0,5% de SBF



A549 suplementada com 10% de SBF

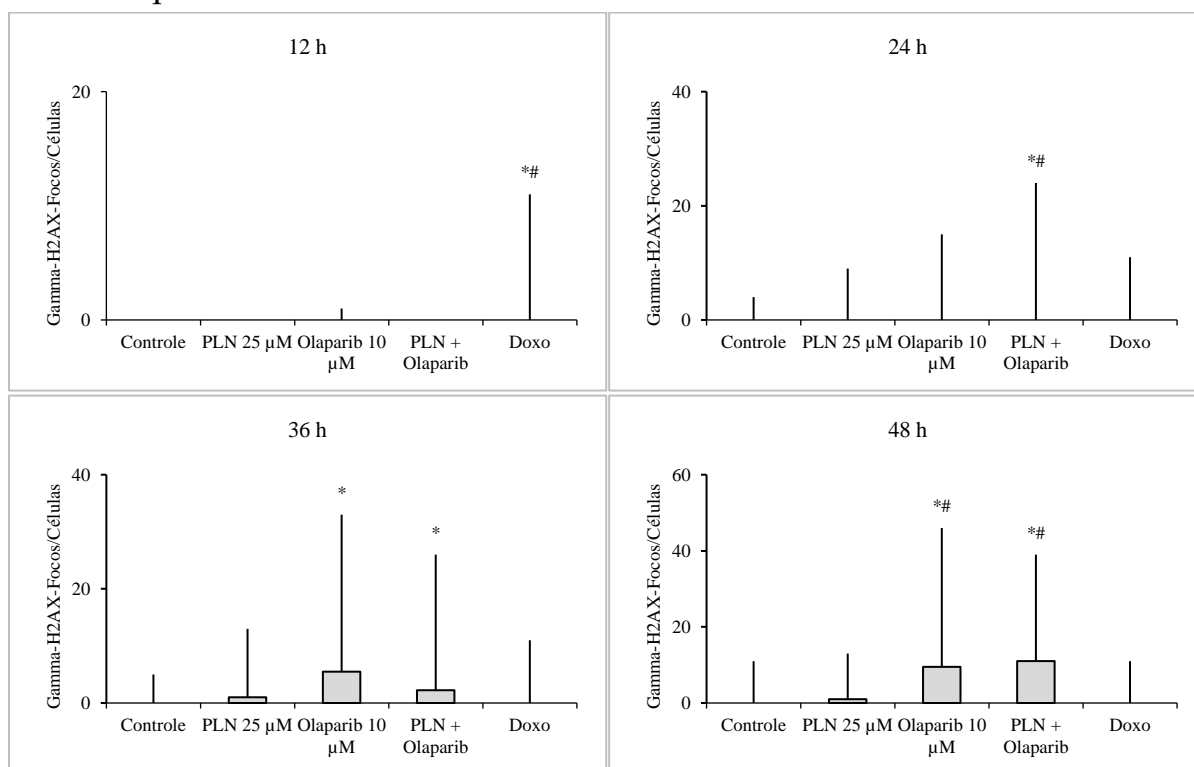
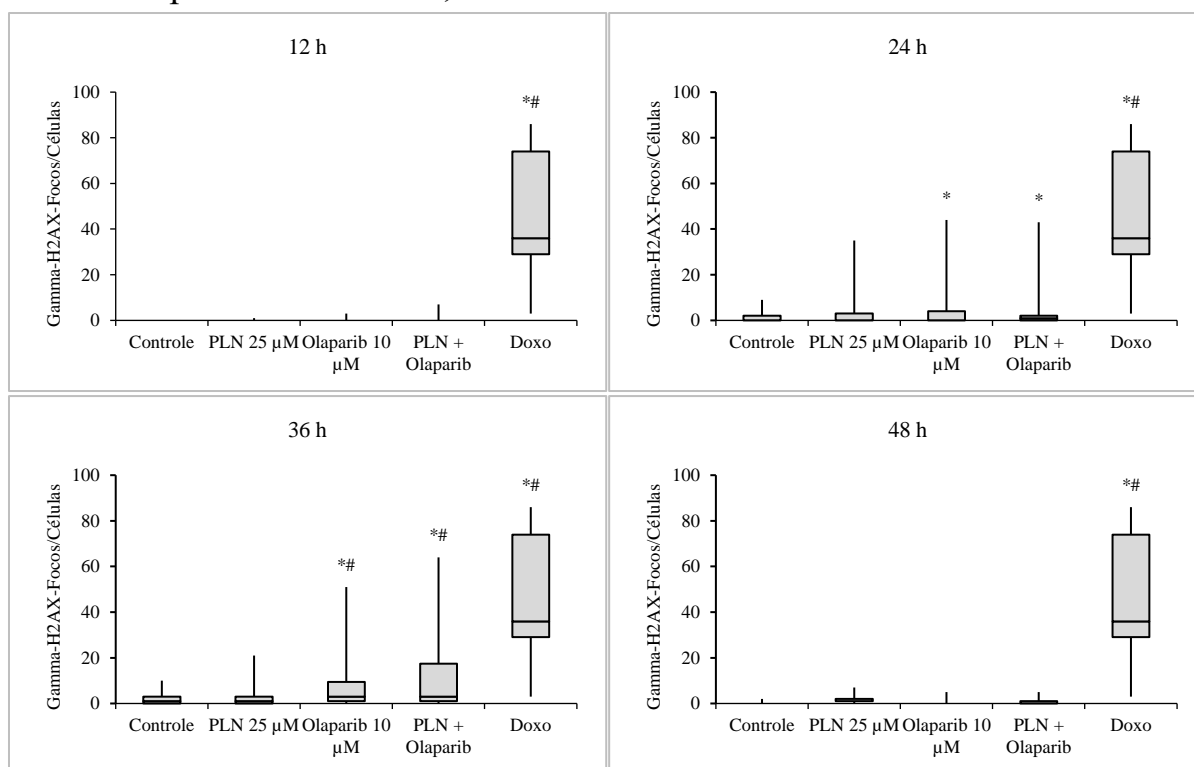


Figura S4. Número de focos de Gamma-H2AX em células A549 suplementada com 0,5 ou 10% de soro bovino fetal. Doxo: doxorubicina 3 μM durante 3 h. (*) – Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. (#). Estatisticamente diferente em relação a PLN. (p ≤ 0,05).

H1299 suplementada com 0,5% de SBF



H1299 suplementada com 10% de SBF

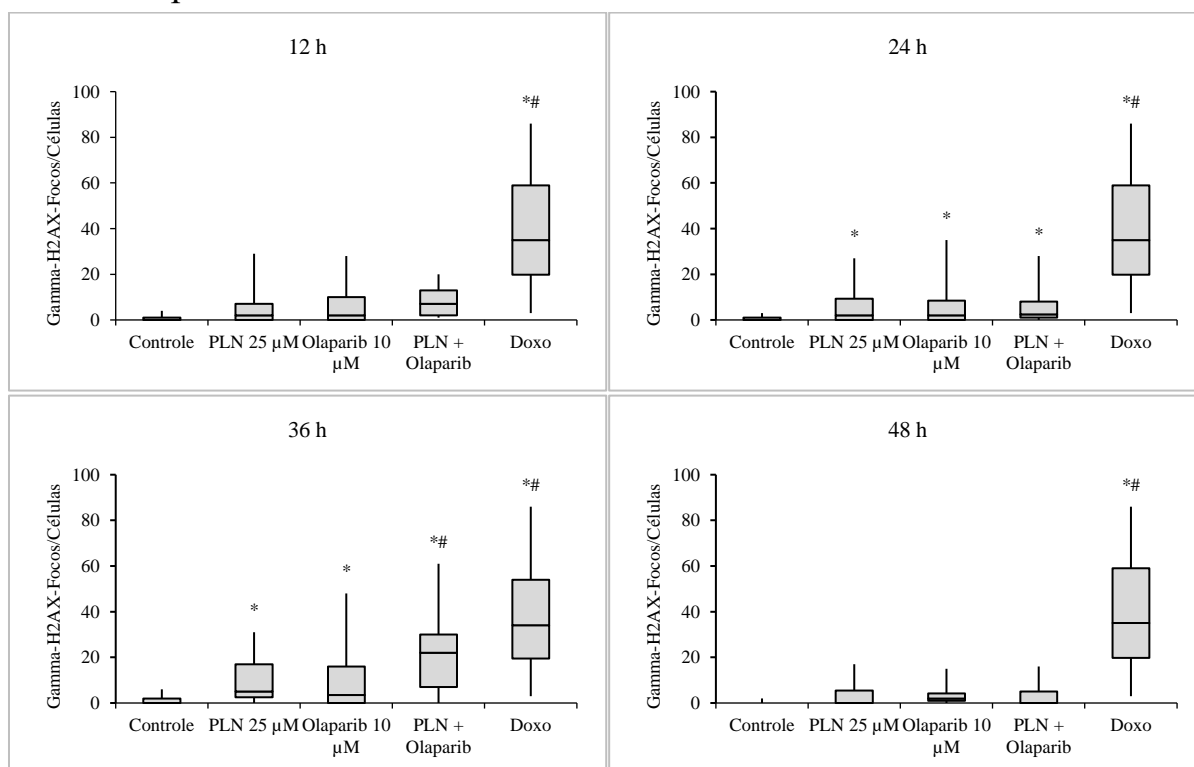


Figura S5. Número de focos de Gamma-H2AX em células H1299 suplementada com 0,5 ou 10% de soro bovino fetal. Doxo: doxorubicina 3 μM durante 3 h. (*). Estatisticamente diferente em relação ao controle negativo. (#) - Estatisticamente diferente em relação a PLN. ($p \leq 0,05$).

Linhagem celular A549 suplementada com 0,5% de SBF.

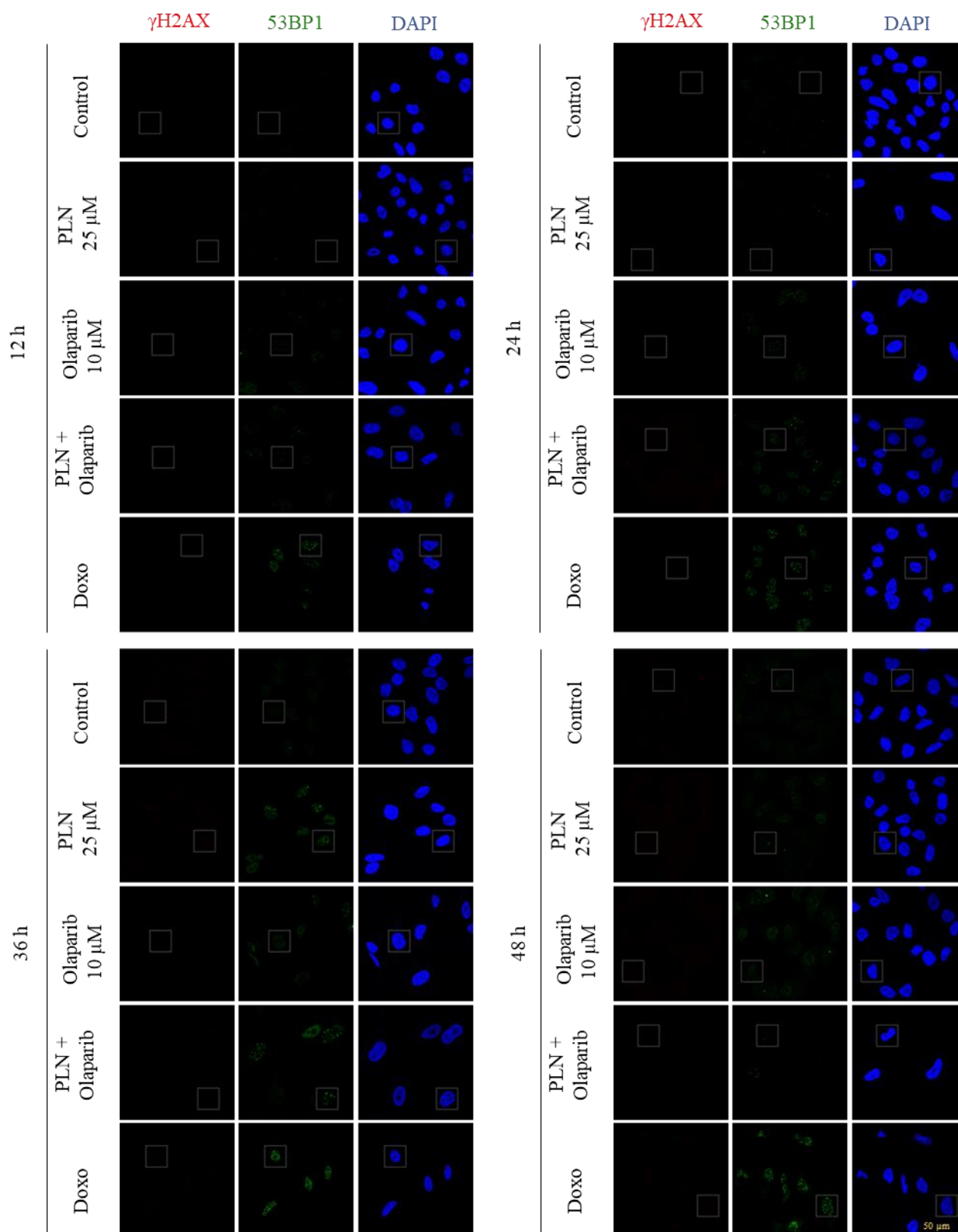


Figura S6. Imagem representativa de campo dos diferentes tempos de tratamentos na linhagem a549 suplementada com 0,5% de SBF. Doxo: Doxorubicina 3 μ M durante 3 h.

Linagem celular A549 suplementada com 10% de SBF.

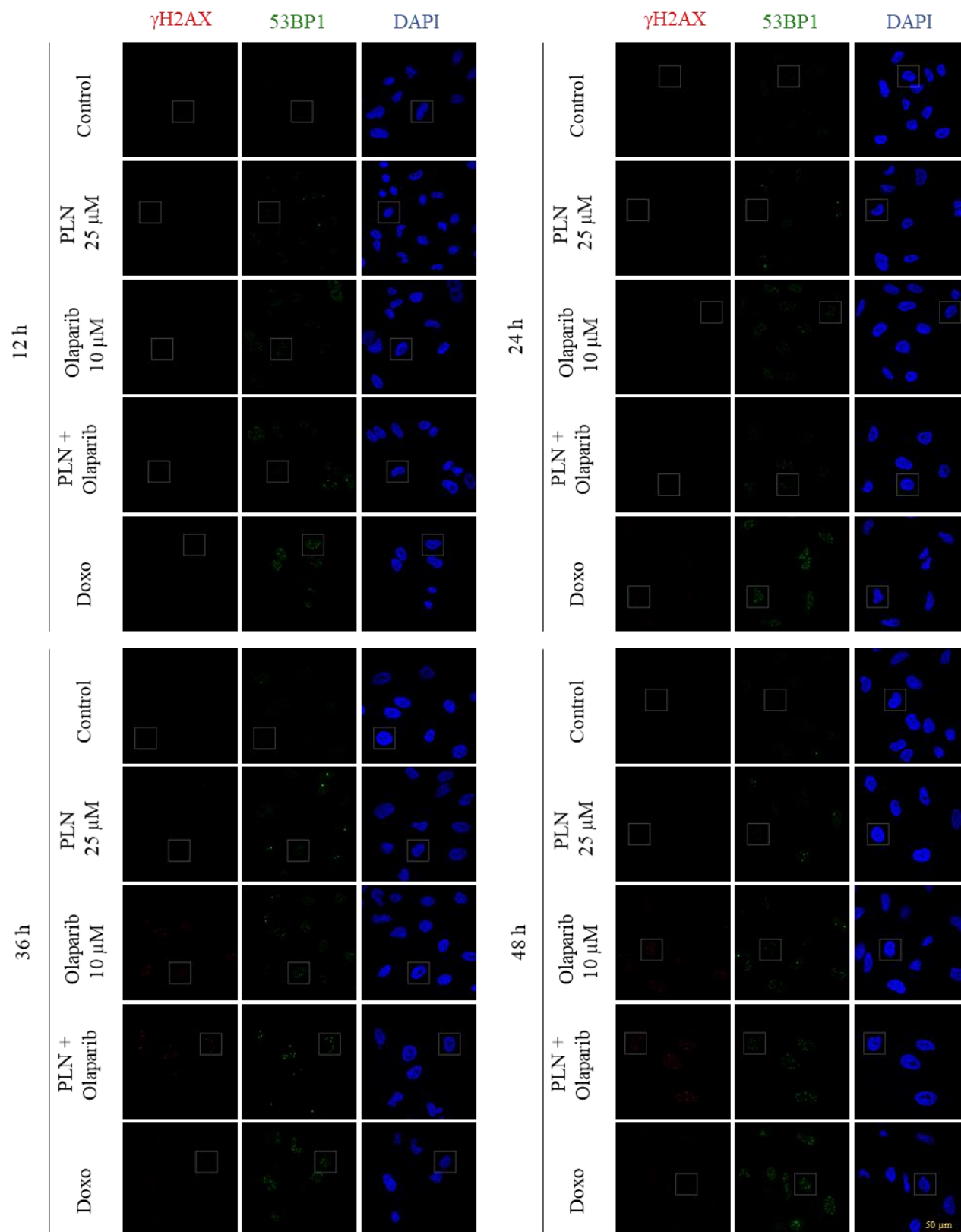


Figura S7. Imagem representativa de campo dos diferentes tempos de tratamentos na linhagem a549 suplementada com 10% de SBF. Doxo: Doxorubicina 3 μM durante 3 h.

Linhagem celular H1299 suplementada com 0,5% de SBF.

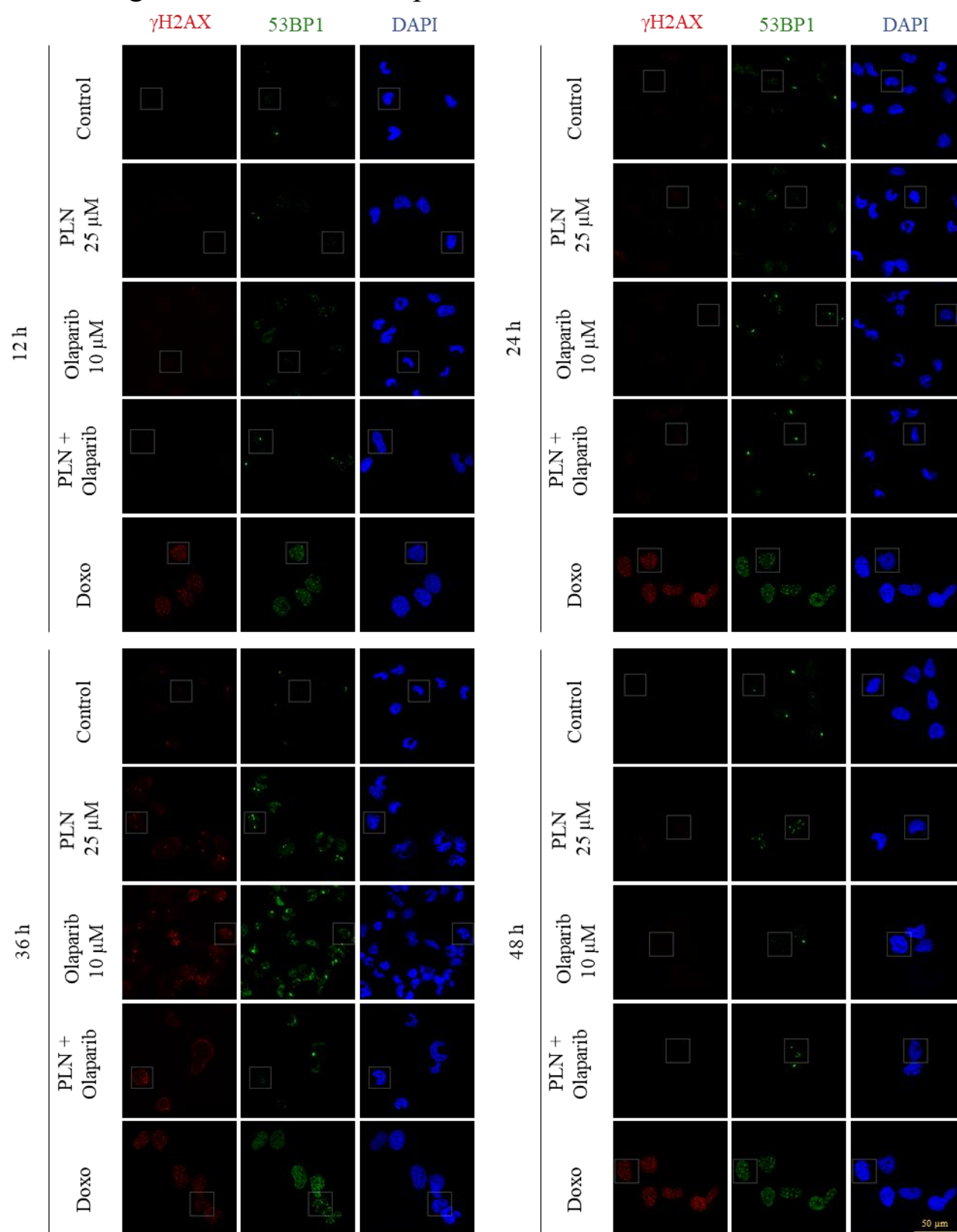


Figura S8. Imagem representativa de campo dos diferentes tempos de tratamentos na linhagem H1299 suplementada com 0,5% de SBF. Doxo: Doxorubicina 3 μM durante 3 h.

Linhagem celular H1299 suplementada com 10% de SBF.

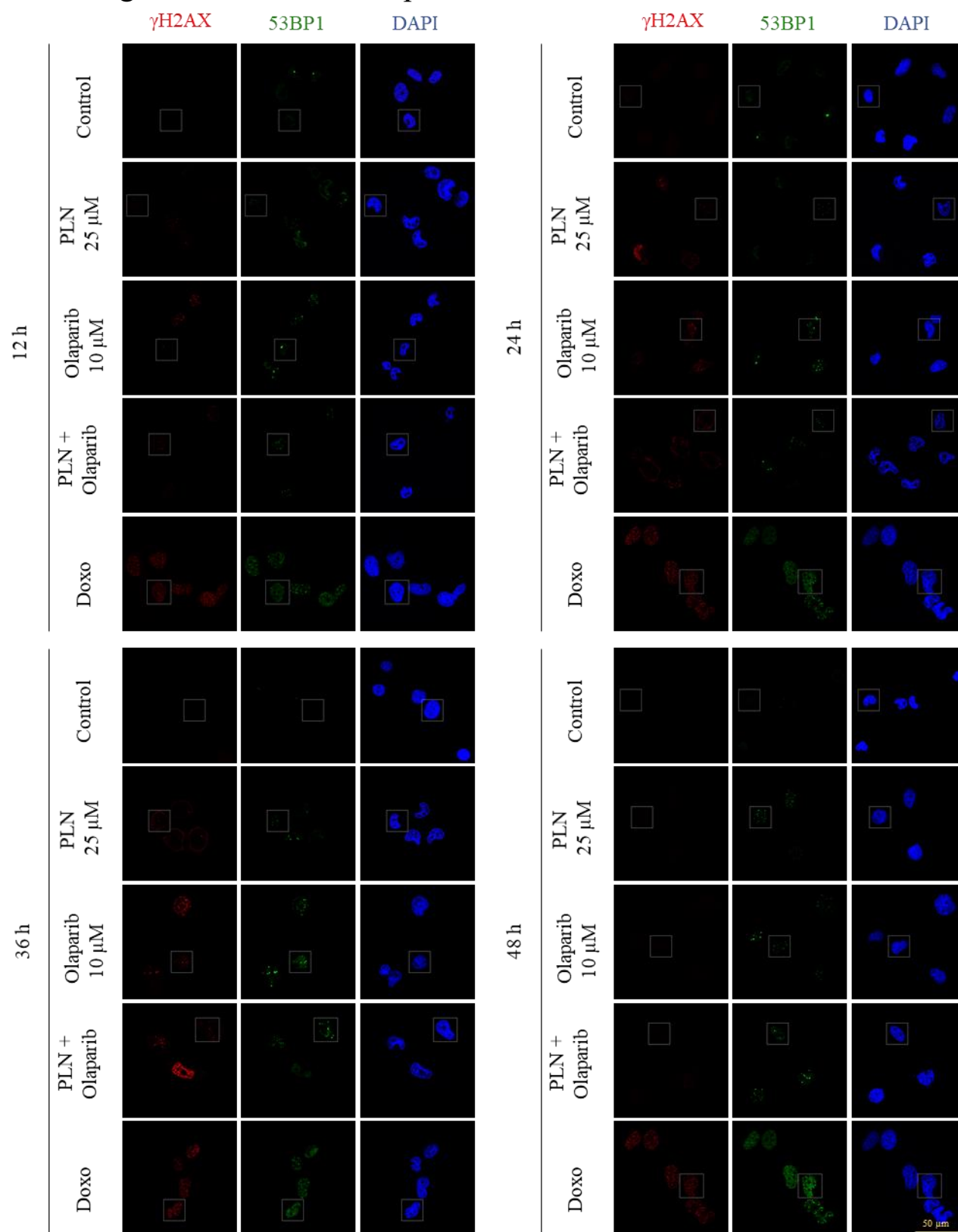


Figura S9. Imagem representativa de campo dos diferentes tempos de tratamentos na linhagem H1200 suplementada com 10% de SBF. Doxo: Doxorubicina 3 μM durante 3 h.

VI-CONSIDERAÇÕES FINAIS

A PLN tem apresentado diversas propriedades importantes em relação ao câncer. *In vitro*, demonstrou efeitos antiproliferativos, induzindo retenção de ciclo celular, apoptose e danos ao DNA por elevação de EROs. *In vivo*, demonstrou efeitos antitumorais em diferentes xenoenxertos.

Neste trabalho, avaliamos a viabilidade celular, ciclo, concentração e perfil de índice celular em tempo real, apoptose, danos a membrana e DNA, geração de EROs e perfis de expressão de genes e proteínas relacionadas as vias citadas em células tumorais e não tumorais de mama e pulmão, além de avaliar a capacidade de gerar quebras de fitas de DNA. Nossos resultados demonstraram que a PLN não apresentou seletividade para linhagens tumorais de mama ou pulmão estudadas. Além de induzir quebra de fita de DNA e aumentar a citotoxicidade do inibidor de PARP. A PLN causa redução de proliferação em todas as linhagens estudadas, nas de mama, por indução de estresse oxidativo principalmente, que leva a danos ao DNA, levando a retenção de ciclo. Na linhagem IMR-90, a PLN induz a regulação negativa de genes envolvidos em ciclo celular. Também observamos que a PLN ativa o supressor tumoral P53, evitando maiores danos em comparação a linhagem P53 negativa, além do mais, a maior atividade em combinação com Olaparib indica capacidade de suprimir mecanismos da recombinação homóloga.

Estes resultados nos chamam a atenção para os efeitos colaterais que a PLN pode causar nas células não tumorais por aumento de estresse oxidativo, principalmente *in vivo*, visto que é descrita em muitos artigos como seletiva para células tumorais, diferentemente do encontrado no presente estudo. A maior inibição de linhagens não tumorais pode ser devido a maior resistência de células tumorais.