



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DANIEL PEDRIALI FRANCO

**MECANISMOS DE AÇÃO DOS COMPOSTOS
HARRINGTONINA E HOMOHARRINGTONINA EM
LINHAGENS CELULARES HEPG2/C3A E HUH-7.5**

Londrina
2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL



Programa de
Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular

DANIEL PEDRIALI FRANCO

**MECANISMOS DE AÇÃO DOS COMPOSTOS
HARRINGTONINA E HOMOHARRINGTONINA EM
LINHAGENS CELULARES HEPG2/C3A E HUH-7.5**

DANIEL PEDRIALI FRANCO

**MECANISMOS DE AÇÃO DOS COMPOSTOS
HARRINGTONINA E HOMO-HARRINGTONINA EM
LINHAGENS CELULARES HEPG2/C3A E HUH-7.5**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2019

DANIEL PEDRIALI FRANCO

**MECANISMOS DE AÇÃO DOS COMPOSTOS HARRINGTONINA E
HOMOHARRINGTONINA EM LINHAGENS CELULARES HEPG2/C3A
E HUH-7.5**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Ana Lúcia Dias
Universidade Estadual de Londrina – UEL

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

Londrina, 27 de fevereiro de 2019

1 FRANCO, Daniel Pedriali. **Mecanismos de ação dos compostos harringtonina e**
2 **homoharringtonina em linhagens celulares HepG2/C3A e HuH-7.5.** 2019. 77 f.
3 Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de
4 Londrina, Londrina, 2019.

5 6 7 **RESUMO**

8
9
10 A busca por compostos a partir de fontes naturais, como os fitoquímicos, tem crescido, já que
11 podem ser uma nova abordagem no tratamento e prevenção do câncer. Assim, avaliamos o
12 modo de ação dos alcaloides harringtonina (HT) e homoharringtonina (HHT) em linhagens
13 celulares de hepatócitos humano p53 selvagem (HepG2/C3A) e mutante (HuH-7.5),
14 realizando testes de viabilidade celular, citometria de fluxo para apoptose, ciclo celular e
15 integridade de membrana, genotoxicidade e expressão relativa de mRNA para genes de
16 apoptose, ciclo celular, metabolização de xenobióticos, estresse de retículo e de controle de
17 proliferação. HT e HHT mostraram aumento significativo na indução de apoptose inicial nas
18 duas linhagens, além alterarem o ciclo celular com aumento significativo de células em G2/M
19 nas duas linhagens quando tratadas com HHT e aumento significativo de células em S na
20 linhagem C3A quando tratadas com HT. A expressão relativa dos genes mostrou um aumento
21 de genes indutores de apoptose como *TNF*, *BBC3* e redução em *BCL2* e *BAK*, mostrando que
22 os compostos induzem a morte celular pela apoptose. Genes metabolizadores mostraram-se
23 alterados quando tratados com os compostos, onde houve aumento de *CYP2E1*, *CYP2C19* e
24 *CYP3A4*, sendo este último apenas na linhagem HuH-7.. Expressões relativas de genes de
25 estresse de retículo, *ERN1* e *EIF2AK3* mostraram aumento significativamente nos tratamentos
26 com HT e HHT, que podem estar ligadas com a ação principal desses compostos relacionada
27 a inibição da expressão proteica nas células. O estresse de retículo também pode causar
28 aumento de outros genes, como o *TRAF2*, que pôde ser visto aumentado neste estudo em
29 ambos os tratamentos, como também induzem fatores de necrose tumoral correlacionados
30 com o aumento observado para o gene *TNF*. Desse modo, sugerimos que os compostos
31 induzem o estresse de retículo pela alteração proteica causando morte celular pelas vias
32 intrínseca e extrínseca atribuído ao aumento de *BBC3* e *TNF* respectivamente.

33
34 **Palavras-Chave:** Harringtonina. Homoharringtonina. Morte celular. TNF.
35

1 FRANCO, Daniel Pedriali. **Mechanisms of action of harringtonina and**
2 **homoharringtonina compounds in HepG2/C3A and HuH-7.5 cell lines.** 2019. 77 p.
3 Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual
4 de Londrina, Londrina, 2019.

5
6
7 **ABSTRACT**
8
9

10 The search for compounds from natural sources, such as phytochemicals, has
11 grown, as they may be a new approach in the treatment and prevention of cancer.
12 Thus, we evaluated the mode of action of the harringtonine (HT) and
13 homoharringtonine (HHT) alkaloids in wild-type (HepG2 / C3A) and mutant (HuH-7.5)
14 human hepatocyte cell lines, performing cell viability tests, flow cytometry for
15 apoptosis , cell cycle and membrane integrity, genotoxicity and relative mRNA
16 expression for apoptosis, cell cycle, xenobiotic metabolism, reticulum stress and
17 proliferation control. HT and HHT showed a significant increase in the induction of
18 initial apoptosis in both strains, in addition to altering the cell cycle with significant
19 increase of G2 / M cells in the two strains when treated with HHT and significant
20 increase of S cells in the C3A line when treated with HT. The relative expression of
21 the genes showed an increase in apoptosis inducing genes such as *TNF*, *BBC3* and
22 reduction in *BCL2* and *BAK*, showing that the compounds induce cell death by
23 apoptosis. Metabolizing genes were altered when treated with the compounds, where
24 *CYP2E1*, *CYP2C19* and *CYP3A4* increased, the latter being only in the HuH-7
25 lineage. Relative expressions of reticulum, *ERN1* and *EIF2AK3* stress genes showed
26 a significant increase in treatments with HT and HHT, which may be linked to the
27 principal action of such compounds related to inhibition of protein expression in cells.
28 Reticulum stress may also cause increase in other genes, such as *TRAF2*, which
29 could be seen increased in this study in both treatments, as well as induce tumor
30 necrosis factors correlated with the observed increase for the *TNF* gene. Thus, we
31 suggest that the compounds induce the reticulum stress by the protein alteration
32 causing cell death by the intrinsic and extrinsic pathways attributed to the increase of
33 *BBC3* and *TNF* respectively.

34
35 **Key-Words:** Harringtonine. Homoharringtonine. Cell dead. TNF.

LISTA DE FIGURAS

1		
2	Figura 1 -	Classificação dos tipos de Fitoquímicos da Dieta. Adaptado de
3		Meybodi et al.2017 17
4	Figura 2 -	Ação de fitoquímicos na carcinogênese. Adaptado de: KOTECHA et
5		al., 2016..... 18
6	Figura 3 -	Estrutura Química da molécula dos compostos HT(A) e HHT(B)..... 20
7	Figura 4 -	Cascata de reação levando a apoptose pela via extrínseca de dois
8		receptores da família TNF, sendo eles Fas (CD95/apo-1) e TNFR1. A:
9		Ligante Faz se liga ao receptor na membrana citoplasmática, onde
10		induz um recrutamento proteico de FADD/MORT1 e caspase 8 ao seu
11		domínio de morte na parte intracelular, ocorrendo a ativação da
12		caspase 8 clivando outros elementos levando a célula para apoptose.
13		B: TNF se liga ao seu ligante TNFR1, onde induz a trimerização de
14		FADD/MORT1, TRADD, assim leva para dois eventos, um pela
15		ligação à caspase e ativação desta ocasionando os eventos seguintes
16		para apoptose; a ligação de TRAF2 e RIP levando a ativação de NF-
17		κ B, e apoptose pela RIP que sua sinalização ainda está desconhecida
18		(NAGATA, S; 1997)..... 24
19		
20	ARTIGO	
21	Figura 1 –	Viabilidade celular (%) na linhagem HuH-7, tratada com os
22		compostos HT (a) e HHT (b) nas concentrações de (0,001 μ M- 80
23		μ M), após 24h. Camptotecina como indutor de citotoxicidade (CPT),
24		(*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em
25		relação ao Controle (C).HT = harringtonina; HHT =
26		homoharringtonina..... 40
27	Figura 2 –	Viabilidade celular (%) na linhagem HepG2/C3A, tratada com os
28		compostos HT (a) e HHT (b) nas concentrações de (0,001 μ M- 80
29		μ M), após 24h. Camptotecina como indutor de citotoxicidade (CPT),
30		(*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em
31		relação ao Controle (C). HT = harringtonina; HHT =
32		homoharringtonina..... 42
33		

1	Figura 3 –	Integridade de Membrana na linhagem HuH-7.5, tratada com os	
2		compostos HT e HHT nas concentrações de (0,1-10 µM) após 24h,	
3		CPT = Camptotecina, (*) mostra resultados estatisticamente	
4		significativos (p<0,05) em relação ao Controle negativo (C). HT =	
5		harringtonina; HHT = homoharringtonina.....	44
6	Figura 4 –	Integridade de Membrana na linhagem HepG2/C3A, tratada com os	
7		compostos HT e HHT nas concentrações de (0,1-10 µM) após 24h,	
8		CPT = Camptocina, (*) mostra resultados estatisticamente	
9		significativos (p<0,05) em relação ao Controle negativo (C). HT =	
10		harringtonina; HHT = homoharringtonina.....	44
11	Figura 5 –	Concentração celular/mL na linhagem HuH-7.5, tratadas 24h com os	
12		compostos HT e HHT nas concentrações de (0,1-10 µM).	
13		Camptotecina; controle positivo (CPT), (*) mostra resultados	
14		estatisticamente significativos (p<0,05) em relação ao Controle	
15		negativo (C). HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.....	46
16	Figura 6 –	Concentração celular/mL com a linhagem HepG2/C3A, tratadas 24h	
17		com os compostos HT e HHT nas concentrações de (0,1-10 µM).	
18		Camptotecina; controle positivo (CPT), (*) mostra resultados	
19		estatisticamente significativos (p<0,05) em relação ao Controle	
20		negativo (C). HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.....	46
21	Figura 7 –	Imagens da linhagem HuH-7 e C3A pelo microscópio EVOS FL,	
22		200X, mostrando a densidade celular após tratamento de 24 horas	
23		com HT e HHT. HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina. C =	
24		controle	47
25	Figura 8 –	Porcentagem de células em diferentes fases do Ciclo Celular na	
26		linhagem HuH-7, tratadas 24h com os compostos HT (a) e HHT (b)	
27		nas concentrações de (0,1-10 µM). HT= Harringtonina; HHT=	
28		Homoharringtonina. CPT= Camptotecina como controle positivo, (*)	
29		mostra resultados estatisticamente significativos (p<0,01) em relação	
30		ao Controle (C)	49
31			

1	Figura 9 –	Porcentagem de células em diferentes fases do Ciclo Celular na	
2		linhagem HepG2/C3A, tratadas 24h com os compostos HT (a) e HHT	
3		(b) nas concentrações de(0,1-10 µM). HT= Harringtonina; HHT=	
4		Homoharringtonina. CPT= Camptotecina como controle positivo, (*)	
5		mostra resultados estatisticamente significativos (p<0,01) em relação	
6		ao Controle (C)	50
7	Figura 10 –	Porcentagem de células obtidas no ensaio de apoptose na linhagem	
8		HuH-7.5, tratadas 24h com os compostos HT (a) ou HHT (b) nas	
9		concentrações de (0,1-10 µM). CPT= Camptotecina; (*) mostra	
10		resultados estatisticamente significativos (p<0,05) em relação ao	
11		Controle (C-). HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina	52
12	Figura 11 –	Porcentagem de células obtidas no ensaio de apoptose na linhagem	
13		HepG2/C3A, tratadas 24h com os compostos HT (a) e HHT(b) nas	
14		concentrações de (0,1-10 µM). CPT= Camptotecina; (*) mostra	
15		resultados estatisticamente significativos(p<0,05) em relação ao	
16		Controle (C). HT = harringtonina; HHT =homoharringtonina.....	53
17	Figura 12 –	Tail Moment obtidos no ensaio do cometa na linhagem HuH-7.5 e	
18		HepG2/C3A, tratada por 3h com os compostos HT ou HHT na	
19		concentração de 10 µM. CPT=Camptotecina (CPT). (*) mostra	
20		resultados estatisticamente significativos (p<0,05) em relação ao	
21		Controle (C) HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.....	54
22	Figura 13 –	Expressão relativa de mRNA de genes relacionados apoptose (<i>BAK</i> ,	
23		<i>BBC3</i> , <i>BCL2</i> , <i>TNF</i>), estresse de retículo (<i>ERN1</i>), metabolismo	
24		(<i>CYP2C19</i> , <i>CYP2E1</i> , <i>CYP3A4</i>) e proliferação (<i>ID4</i> , <i>NFKB1</i> , <i>TRAF2</i>)	
25		na linhagem HuH-7.5 tratada com os compostos HT ou HHT na	
26		concentração de 5 µM por 12h. HT = harringtonina; HHT =	
27		homoharringtonina.....	56
28	Figura 14 –	Expressão relativa de mRNA de genes relacionados a apoptose	
29		(<i>BBC3</i> , <i>CASP3</i> , <i>TNF</i>), ciclo (<i>CDKN1A</i>), estresse de retículo	
30		(<i>EIF2AK3</i> , <i>ERN1</i>), metabolismo (<i>CYP2C19</i> , <i>CYP2E1</i>) e proliferação	
31		(<i>ID4</i> , <i>NFKB1</i> , <i>TRAF2</i>) na linhagem HepG2/C3A tratada com os	
32		compostos HT ou HHT na concentração de 5 µM por 12h. HT =	
33		harringtonina; HHT = homoharringtonina.....	57
34			

1	Figura 15 – Resumo Gráfico do mecanismo de ação dos compostos HT e HHT nas	
2	linhagens HuH-7.5 e HepG2/C3A. HT = harringtonina; HHT =	
3	homoharringtonina.....	64

LISTA DE TABELAS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Tabela 1 -	Estudos realizados <i>in vitro</i> com os compostos HT e HHT 21
Tabela 2 -	Valores de fluorescência obtidos no ensaio de viabilidade celular (resazurina), após 24 h de tratamento com HT ou HHT na Linhagem HuH-7.5. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de Dunnet 70
Tabela 3 -	Valores de fluorescência obtidos no ensaio de viabilidade celular (resazurina), após 24 h de tratamento com HT e HHT na Linhagem HepG2/C3A.(*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de Dunnet 70
Tabela 4 -	Médias das porcentagens da integridade de membrana por citometria de fluxo, obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na linhagem HuH-7.5. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de Dunnet 71
Tabela 5 -	Médias das porcentagens da integridade de membrana por citometria de fluxo, obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na linhagem HepgG2/C3A. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de Dunnet 71
Tabela 6 -	Médias das porcentagens da distribuição das células nas fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na linhagem HuH-7.5. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,01$), ANOVA seguida de Teste de Dunnet 71
Tabela 7 -	Médias das porcentagens da distribuição das células nas fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na linhagem HepgG2/C3A. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,01$), ANOVA seguida de Teste de Dunnet..... 72
Tabela 8 -	Médias das porcentagens de morte celular em apoptose inicial, tardia e necrose por citometria de fluxo obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na linhagem HuH-7.5. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de Dunnet..... 72

1	Tabela 9 -	Médias das porcentagens de morte celular em apoptose inicial, tardia e	
2		necrose por citometria de fluxo obtidas após 24 h de tratamento com	
3		HT ou HTT na linhagem HEpG2/C3A. (*) mostra resultados	
4		estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de	
5		Dunnet.....	73
6	Tabela 10 -	Médias dos valores obidos no ensaio cometa utilizando o Software	
7		CometScore®, após 3 h de tratamento com HT ou HTT, na linhagem	
8		HuH-7.5. CPT = Camptotecina .(*) mostra resultados estatisticamente	
9		significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de Dunnet	73
10	Tabela 11 -	Médias dos valores obidos no ensaio cometa, utilizando o Software	
11		CometScore®, após 3 h de tratamento com HT ou HTT, na linhagem	
12		HepG2/C3A. CPT = Camptotecina .(*) mostra resultados	
13		estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de	
14		Dunnet.....	74
15	Tabela 12 -	Expressão relativa dos genes testados por RT-qPCR tratados com HT	
16		ou HTT na concentração de $5\mu\text{M}$, por 12 h, na linhagem HuH-7.5.(*)	
17		mostra resultados estatisticamente significativos, quando acima de 2 e	
18		abaixo de -2(fold change)	74
19	Tabela 13 -	Expressão relativa dos genes testados por RT-qPCR, tratados com HT	
20		ou HTT, na concentração de $5\mu\text{M}$, por 12 h na linhagem	
21		HepG2/C3A.(*) mostra resultados estatisticamente significativos,	
22		quando acima de 2 e abaixo de -2(fold change)	76

LISTA DE ABREVIATURAS

1		
2		
3	BAK	<i>BCL2 Antagonist/Killer 1</i>
4	BBC3	<i>Bcl-2-binding component</i>
5	BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
6	Casp3	Caspase 3
7	Casp8	Caspase 8
8	CYP2C19	<i>Cytochrome P450 family 2 subfamily C member 19</i>
9	CYP2E1	<i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily E Member 1</i>
10	CYP3A4	<i>Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4</i>
11	DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
12	DMSO	Dimetilsufóxido
13	DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
14	EIF2AK3	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3</i>
15	EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
16	FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
17	FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
18	HT	Harringtonina
19	HHT	Homoharringtonina
20	IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
21	mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
22	MORT1	<i>Mediator of receptor-induced toxicity-1</i>
23	MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
24	NF-κB	<i>Nuclear kappa b</i>
25	PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
26	PUMA	<i>p53 upregulated modulator of apoptosis</i>
27	RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic acid</i>)
28	TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
29	TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>
30	TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>

SUMÁRIO

1			
2			
3	1.	INTRODUÇÃO	14
4			
5	2.	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
6	2.1.	Fitoquímicos e Câncer	16
7	2.2.	Harringtonina e Homoharringtonina	18
8	2.3	Apoptose	22
9		REFERÊNCIAS	25
10			
11	3.	OBJETIVOS	28
12	3.1	Objetivos gerais	28
13	3.2	Objetivos específicos	28
14			
15		ARTIGO	29
16	1.	INTRODUÇÃO	31
17	2.	MATERIAIS E MÉTODOS	33
18	2.1.	Agentes Químicos	33
19	2.2.	Cultivo Celular	33
20	2.3.	Ensaio de Citotoxicidade (Resazurina)	33
21	2.4.	Avaliação celular: ciclo celular, apoptose, integridade de membrana e	
22		contagem celular	34
23	2.4.1.	Ciclo Celular	35
24	2.4.2.	Teste de Apoptose	35
25	2.4.3.	Teste de Integridade de Membrana	35
26	2.4.4.	Contagem Celular	36
27	2.5.	Teste de Genotoxicidade	36
28	2.6.	Análise de Expressão de mRNA via RT-qPCR	37
29	2.7.	Análise Estatística	38

1	3.	RESULTADOS	39
2	3.1.	Ensaio de citotóxicidade	39
3	3.2.	Citometria de fluxo	43
4	3.2.1	integridade de membrana	43
5	3.2.2	Contagem celular	45
6	3.2.3	Ciclo celular	47
7	3.2.4	Apoptose	51
8	3.3.	Ensaio Cometa	54
9	3.4.	RT-qPCR	55
10			
11	4.	DISCUSSÃO	58
12			
13		REFERÊNCIAS	65
14			
15		APÊNDICE	70

1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais são utilizados para fins medicinais desde a antiguidade e com o avanço da tecnologia, hoje muitos dos medicamentos são a base de compostos vegetais ou sintetizados a partir deles (RATES, 2001). Esses compostos naturais, também conhecidos de fitoquímicos, servem como recurso na obtenção de novas terapias contra diversas doenças, principalmente o câncer, já que os tratamentos convencionais contra o câncer não conseguem apenas atingir células tumorais e o foco atual é o tratamento alvo-específico contra essas células, e produtos naturais tem demonstrado resultados promissores (EFFERTH, 2017).

Assim, o estudo com novos compostos a fim de analisarmos o comportamento em diferentes linhagens *in vitro*, compreendendo seus mecanismos de atuação é um passo importante neste trajeto, para assim, predizer os efeitos na saúde humana. Testes *in vitro* são ótimos para descobrir novas biomoléculas e caracterizam os efeitos desses novos compostos em um ambiente controlado (SOTOMAYOR; SCHULTEN, 2007). E neste cenário que a cada ano são descobertos mais fitoquímicos e muitos dos já conhecidos não são totalmente estudados, possuindo mecanismos de ações ainda não descobertos, muitos deles podendo modular atividades anti-tumorais como no caso dos alcaloides, induzindo a apoptose (MEYBODI, 2017). Por isso testes *in vitro* são uma estratégia de prospecção de compostos com potenciais terapêuticos.

Os compostos harringtonina e homoharringtonina são metabolitos secundários extraídas de espécies de coníferas da Ásia do gênero *Cephalotaxus*, pertencentes a família Cephalotaxaceae (HAM, 1994). Compostos extraídos da planta *Cephalotaxus hainanensis* Li, já demonstraram efeitos contra neoplasias relatados pela população local chinesa (HAM, 1994).

Estudos mostram que o efeito principal destes compostos é na alteração da expressão proteica (HUANG, 1974; KAUR et al., 2013; Ingolia et al., 2011), reduzindo a viabilidade celular *in vitro* observada em linhagem de Glia retinal (CAI et al., 2001), linhagens de mieloma U266, RPMI8226, MM.1S e MM.1R (Meng et al., 2008), MUTZ-1, K562, MOLT4 e U-20S (JIE et al., 2007). A homoharringtonina se destacou nos estudos levando atualmente a aprovação pela FDA de estudos com pacientes leucêmicos (BADGUJAR et al., 2016) já apresentando resultados promissores em testes em pacientes com leucemia mieloide aguda (JIN et al., 2003)(SHEN et al., 2018) (CORTES et al., 2013).

1 Assim é importante a investigação em outras linhagens, melhorando o
2 entendimento dos mecanismos de ação, buscar quais vias moleculares de expressão
3 gênica esses compostos interferem, contribuindo no entendimento e na segurança de uso
4 para a saúde humana. Assim, este trabalho buscou estudar os efeitos em duas linhagens
5 tumorais hepáticas, HuH-7.5 e HepG2/C3A sendo o p53 mutado e p53 selvagem
6 respectivamente, observando indução de apoptose, parada de ciclo celular, integridade
7 de membrana, dano ao material genético correlacionando com a análise de expressão
8 relativa de mRNA dessas vias.

9 Em vários tipos de câncer a proteína *p53* é encontrada mutada, o que leva esta
10 proteína ser um dos principais papéis no desenvolvimento do câncer (YUE, et al. 2017).
11 Em seu estado selvagem esta proteína de meia-vida curta é responsável na supressão-
12 tumoral por detecção de dano ao DNA, e responde a sinais de estresse intra e
13 extracelular, sendo os alvos da resposta por essa proteína vários processos celulares
14 como reparo de DNA, funções de parada de ciclo, apoptose e antioxidantes (YUE, et al.
15 2017). Quando mutada essa proteína tende a se acumular no citoplasma das células e
16 muitas vezes perdendo sua supressão-tumoral fazendo disso o gene *Tp53* um proto-
17 oncogene, muitas mutações foram observados que a proteína p53 ganhou novas
18 funções, podendo alterar a respostas de outras proteínas como levar a metástase,
19 prevenir a apoptose, e induzir a transcrição de outros genes (ASCHAUER; MULLER,
20 2016). Com isso, uma nova estratégia para contornar esses efeitos novos estudos
21 mostram que o acúmulo de p53 mutante e também com esses ganhos de funções pode
22 servir de terapias alvo contra esses tipos de câncer, podendo assim ser utilizada para
23 promover novos tratamentos (YUE, et al. 2017). Na linhagem HuH-7.5 deste estudo há
24 mutações pontuais em seu gene *Tp53* fazendo com que se acumule no citoplasma além
25 de ter sua proteína com uma meia-vida mais elevado em comparação ao seu estado
26 selvagem (BRESSAC, et al. 1990). Com este estudo os efeitos dos compostos
27 harringtonina e homoharringtonina podem ser mais bem compreendidos no sistema *in*
28 *vitro* avaliando os aspectos propostos.

29

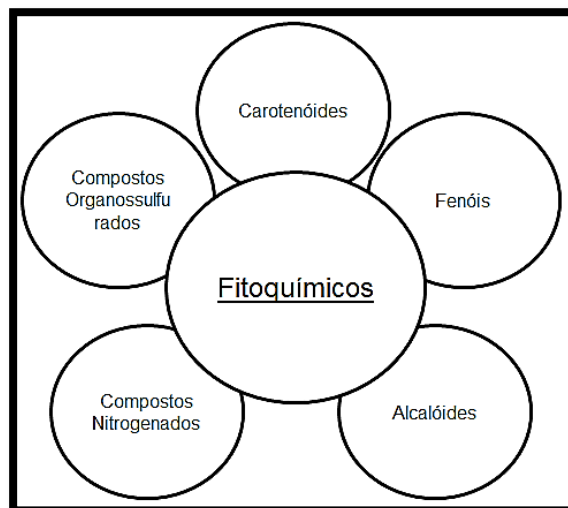
1 **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

2 **2.1. Fitoquímicos e Câncer**

3 Desde o início da civilização produtos naturais são utilizados com fins
4 terapêuticos. A evolução da ciência e desenvolvimento de novas técnicas bioquímicas
5 possibilitou obter compostos puros extraídos de fontes naturais, como por exemplo os
6 fitoquímicos e estudos de modificações estruturais dessas moléculas (RATES, 2001).
7 Desse modo há um grande interesse das indústrias farmacêuticas na triagem e obtenção
8 de moléculas de origem vegetal para o desenvolvimento de medicamentos
9 (MONTANHER, 2003).

10 Fitoquímicos são definidos como princípios ativos provenientes de vegetais
11 (LIU, 2004), carotenoides, fenóis, compostos organossulfurados e alcaloides são alguns
12 grupos que podem ser classificados de acordo com sua estrutura química, onde possuem
13 propriedades biológicas diferentes entre esses grupos (Figura 1) (MEYBODI et al.,
14 2017). O consumo pela dieta de alimentos contendo esses compostos podem auxiliar no
15 combate ou tratamento de doenças cardiovasculares (como ataques cardíacos), câncer,
16 Alzheimer e outras (LIU, 2003). Dentre elas o câncer tem destaque para se pesquisar
17 metabolitos a fim de modular pontos específicos do desenvolvimento desta patologia
18 alterando o processo de carcinogênese, como induzindo a morte celular (KUMAR et al.,
19 2015). Alguns fitoquímicos alcaloides como Piperina (YAFFE et al., 2014) e
20 Isorhynchophylline (LEE et al., 2017) induzem células *in vitro* ao processo de apoptose
21 e paradas de ciclo. Resultados como estes levam os pesquisadores ao estudo de
22 diferentes estratégias e criação de novos fármacos contra o câncer.

23



1

2 **Figura 1** - Classificação dos tipos de Fitoquímicos.

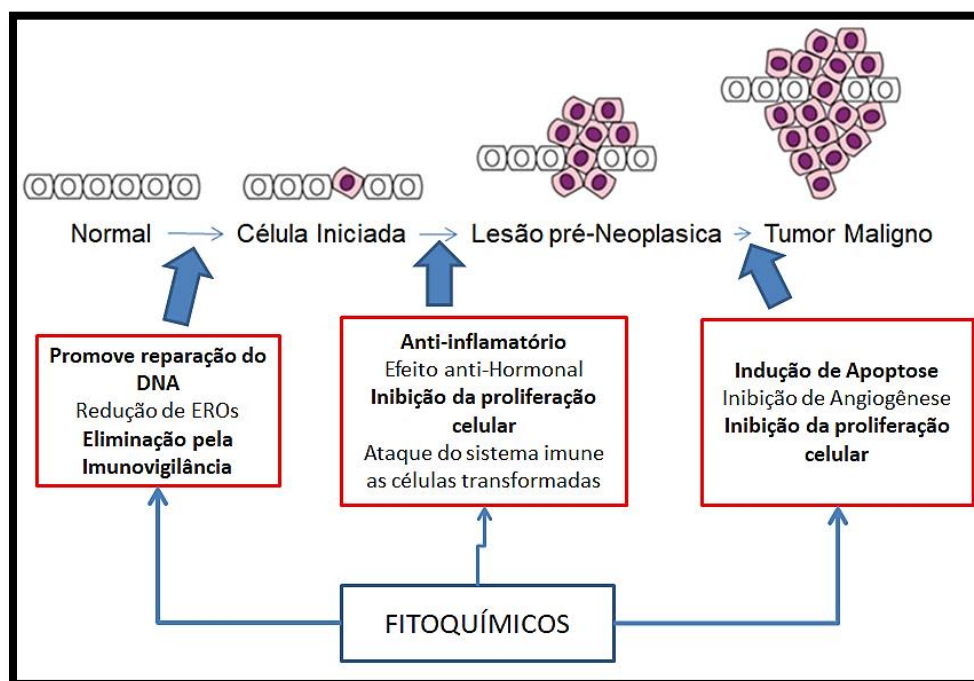
3 Fonte: MEYBODi et al., 2017 com modificações.

4 Dependendo do estilo de vida que a nós estamos expostos, há um grande
 5 impacto na chance do desenvolvimento de um câncer (KHANet al., 2010)., Hábitos
 6 como a pratica do fumo de tabaco, uso de bebidas alcoólicas, ingestão de alimentos com
 7 alto teor de sal, infecções dentre elas a HPV e outros são fatores de riscos para a geração
 8 de um processo cancerígeno no individuo (GUERRA et al.,2005). A taxa de incidência
 9 de câncer vem crescendo juntamente com a mortalidade, em todos os países, sendo que
 10 foram registrados aproximadamente 18 milhões de novos casos e 9 milhões de mortes
 11 relacionadas ao câncer no ano de 2018 (GLOBOCAN, 2018). Há também uma
 12 estimativa de acordo com o INCA (2017) que para os anos de 2018 e 2019 do
 13 surgimento de 600 mil novos casos de câncer no Brasil em cada ano.

14 Esta neoplasia surge de mutações no material genético de células normais.
 15 Estudos mostram que o câncer é um processo derivado de vários acontecimentos, nos
 16 quais não apenas uma, mas várias mutações no DNA ocorrem, transformando células
 17 normais em tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Desse modo estas células
 18 mutantes, possuem uma taxa de divisão celular e invasão incontroláveis, diferentemente
 19 das células normais onde o seu ciclo celular é cuidadosamente regulado
 20 (MCLAUGHLIN et al., 2003).

21 Diante disso vários estudos mostram que o uso de fitoquímicos podem modular
 22 varias vias envolvidas com a proliferação celular, morte programada e outros
 23 mecanismos de células tumorais (Figura 2), assim o estudo destes compostos naturais
 24 desvendando os modos de ação podem levar a terapias futuras mais econômicas e

- 1 eficientes contra células tumorais e provavelmente menos tóxicas contra células normais
 2 (KOTECHA et al., 2016).



3 **Figura 2**—Ação de fitoquímicos na carcinogênese.

4 Fonte: KOTECHA et al., 2016 com modificações

5 **2.2. Harringtonina e Homoharringtonina**

6 Os compostos estudados neste trabalho foram inicialmente encontrados e
 7 isolados de espécies de coníferas do gênero *Cephalotaxus* da Ásia oriental, sendo
 8 algumas das espécies *Cephalotaxus hainanensis* (HAM, 1994) e *Cephalotaxus*
 9 *harringtonia* (POWELL, 1970). Essas plantas mostraram potenciais após a população
 10 chinesa pertencente a esses locais nativos da planta terem obtido bons resultados com o
 11 tratamento contra neoplasias, utilizando-se desses compostos dessas espécies (HAM,
 12 1994). Esses compostos são alcaloides, possuindo, o composto harringtonina uma massa
 13 molar de 531,246 g/mol sendo sua fórmula molecular: $C_{28}H_{37}NO_9$, e a
 14 homoharringtonina, possuindo sua massa molar de 545,255 g/mol e sua fórmula
 15 molecular sendo $C_{29}H_{39}NO_9$ (POWELL, 1970). (Figura 3)

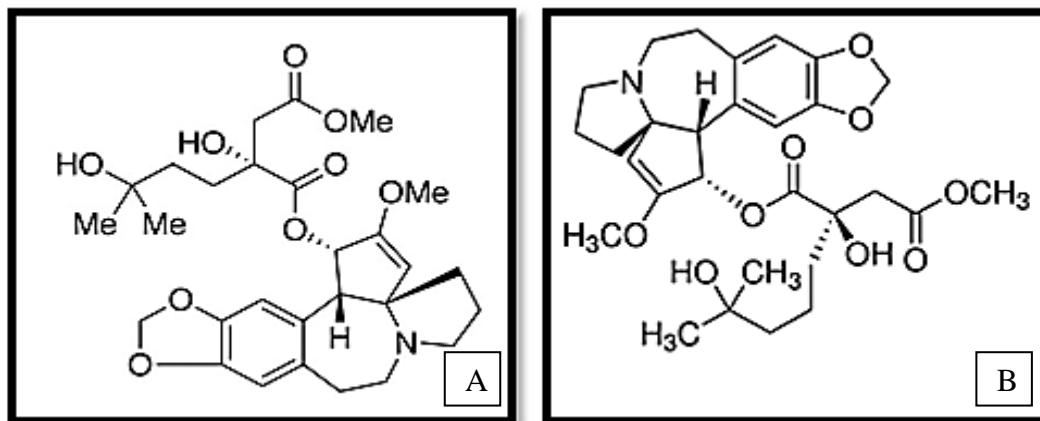
16 Estudos (Tabela 1) já mostraram atividades com esses compostos, como na
 17 China, a HT foi anteriormente utilizada para o tratamento da leucemia promielocítica
 18 aguda apresentando nos pacientes resultados promissores (SAKAMOTO et al. 2017).

1 HHT também se mostrou uma substância inibidora da biossíntese de proteínas, (200
2 nM) e foi capaz de inibir parcialmente a síntese de DNA na linhagem celular HeLa no
3 estudo de Mou-Tuan Huang (1974). Também se mostrou eficiente na inibição da
4 replicação do vírus da *chikungunya* e também afetando a expressão proteica desse vírus
5 (KAURET et al., 2013).

6 Ingolia et al., (2011) analisando o perfil ribossômico de células embrionárias de
7 camundongo tratadas com HT, observaram a indução de um acúmulo ribossômico em
8 estágio de iniciação de códons de proteínas. Isso é promovido pelo fato de que tanto a
9 HT como a HHT inibem a síntese da polifenilalanina e metionil-puromicina observado
10 em ribossomos de leveduras, sugerindo que provavelmente esses efeitos é o que
11 promovem a inibição do alongamento das cadeias proteicas das células (FRESNO et al.,
12 1977)

13 Jiang et al. (1983) testaram os compostos HT e HHT em tumores sólidos
14 extraídos de pacientes e observaram *in vitro* uma atividade antitumoral significativa em
15 carcinomas de ovário e endometrial, sendo que a HHT resultou em um efeito superior
16 ao encontrado para a HT.

17 Isolado da mesma espécie vegetal, a HHT também mostra atividades
18 antitumorais, sendo a estrutura química das duas substâncias bem semelhantes (Figura
19 3) (JIANG et al., 1983). A homoharringtonina já foi observada agindo em várias
20 linhagens celulares de origem tumoral (Mz-ChA-1, A818-4, Pt45P1 e HT-29) induzindo
21 a morte celular, mostrando-se uma substância promissora em terapias anticâncer
22 (PHILIPP et al., 2015). Ela se mostrou eficaz alterando o crescimento normal do
23 protozoário *Trypanosoma brucei* causando a parada de ciclo celular, levando à queda de
24 potencial da mitocôndria e também na inibição da biossíntese de proteínas do *T. brucei*
25 (KRSTIN et al., 2016).



1

2 **Figura 3:** Estrutura Química da molécula dos compostos HT (A) e HHT (B).

3 Fonte: Santa Cruz Biotechnology, 2018; Sigmaaldrich, 2019, com modificações.

4 No estudo de Cai et al. (2001) utilizando o teste de viabilidade celular de MTT
 5 (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) observou-se a redução de
 6 viabilidade celular em uma linhagem de células da glia da retina, na qual as
 7 concentrações dos tratamentos com HT foram de 0,23 μ M a 3,76 μ M por 96 horas, e a
 8 redução da viabilidade foi de 22% e 98%, respectivamente.

9 Em outro trabalho feito por Ni et al. (2003), os pesquisadores testaram o
 10 composto HHT em várias concentrações por 72 horas a fim de obter IC₅₀ deste
 11 composto na linhagem celular de leucemia, HL-60, e o valor foi de 20ng/mL, (0,02 μ M)
 12 nessa linhagem.

13 Algumas linhagens de mieloma como U266, RPMI8226, MM.1S e MM.1R
 14 foram usadas no teste de MTT no trabalho de Meng et al. (2008). Eles utilizaram HHT
 15 em várias concentrações por 48h determinando os IC₅₀, sendo que para as linhagens
 16 MM.1S e MM.1R o valor foi de 8,7ng/mL e 11,6ng/mL, respectivamente. Isso
 17 corresponde a uma concentração do composto de 0,021 μ M. Já nas linhagens U266 e
 18 RPMI8226 foi obtido um valor mais alto, significando que são mais resistentes a HHT,
 19 sendo o IC₅₀ de 39,7ng/mL e 40,7ng/mL, respectivamente. Isso corresponde a um valor
 20 próximo de 0,075 μ M.

21 No estudo de Jie et al. (2007), os pesquisadores realizaram o teste de viabilidade
 22 celular com as linhagens MUTZ-1, K562, U-20S e MOLT4, e observaram uma redução
 23 de viabilidade celular no tratamento com HHT na concentração de 200ng/mL
 24 (corresponde a 0,367 μ M), com 24h de tratamento. Entre essas linhagens a de
 25 osteosarcoma U-20S foi a que apresentou uma forte resistência ao tratamento com

1 HHT, aonde sua viabilidade se manteve acima dos 90%, em comparação a linhagem
 2 celular MUTZ-1 que na mesma pesquisa apresentou uma redução de aproximadamente
 3 40% da viabilidade.

4 **Tabela 1** – Estudos realizados *in vitro* com os compostos HT e HHT.

Composto	Efeito	Linhagem	Referencia
HT(200 nM)	Inibidor de biossíntese proteica.	HeLa	(HUANG 1974)
HT(0,24 µM)	Inibidor replicação e expressão proteica da <i>chikungunya</i> .	Vírus <i>chikungunya</i> (CHIKV-0708)	(KAUR et al. 2013)
HT (2µg/mL)	Ribossomos em estagio inicial de tradução proteica.	Células embrionárias de camundongo	(Ingolia et al. 2011)
HT	Inibição do alongamento das cadeias proteicas	Leveduras	(FRESNO, et al.1977)
HT e HHT (0,001-0,01-0,1 µg/mL)	Atividade antiproliferativa (in vitro).	Tumores sólidos extraídos de pacientes.	(Jiang et al. 1983)
HHT	Morte celular (Receptores TRAIL)	Mz-ChA-1, A818-4, Pt45P1 e HT-29	(PHILIPP et al. 2015)
HT (0,23 – 3,76 µM)	Redução Viabilidade (MTT)	Linhagem de Glia retinal	(CAI et al. 2001)
HHT	Redução Viabilidade (MTT)	U266, RPMI8226, MM.1S e MM.1R	(Meng et al. 2008)
HHT(0,367µM)	Redução Viabilidade (MTT)	MUTZ-1, K562, MOLT4 e U-20S	(Jie et al. 2007)

5

6 Esses compostos se mostraram com grande potencial terapêutico, sobretudo o
 7 composto HHT, que desde o seu descobrimento há aproximadamente 40 anos vem
 8 demonstrando bons resultados *in vitro*, o que levou a aprovação pela FDA para testes
 9 com pacientes leucêmicos, propiciando novas descobertas sobre o composto
 10 (BADGUJAR et al., 2016). Como pode ser demonstrado na pesquisa de JIN, et al (2013)
 11 de 206 pacientes com leucemia mieloide aguda foram tratados por 7 dias com HHT na
 12 concentração de 2mg/m² por dia além de outros compostos usados como citarabina (100

1 mg/m² por dia) e aclarubicina (20 mg/dia), esse estudo demonstrou resultados positivos
2 onde 73% dos 206 deste grupo de pacientes houve uma regressão da doença, mostrando
3 um tratamento alternativo para a leucemia mieloide aguda.

4 **2.3 Apoptose**

5 Apoptose é um mecanismo fisiológico normal de morte celular programada,
6 garantindo a homeostase e descarte celular com danos irreparáveis. Neste processo a
7 proteína p53 é de extrema importância, pois atua na identificação de danos ao material
8 genético e sinaliza para a via de morte celular programada por apoptose (ASHKENAZI,
9 2008). Porém mutações no gene supressor *Tp53* pode acarretar a proteína p53 a
10 realização de novas funções celulares, como desregulação da apoptose, garantindo a
11 sobrevivência dessas células mutadas assim podendo se proliferar o que acontece em muitos
12 tipos de neoplasias (ASHKENAZI, 2008). Por outro lado novos estudos mostram que o
13 acúmulo de p53 mutante no interior dessas células mutadas e também com esses ganhos
14 de funções da proteína p53 pode servir de terapias alvo contra esses tipos de câncer,
15 tornando uma nova estratégia para promover novos tratamentos (YUE, et al. 2017).

16 O processo de apoptose pode ser desencadeado por estímulos internos ou
17 externos, culminando nas alterações morfológicas da célula, como desestruturação do
18 citoesqueleto, degradando o material genético levando o núcleo ao colapso e a formação
19 de bolhas envoltas pela membrana celular do conteúdo celular, sendo assim fagocitadas
20 por macrófagos (PAROLIN; REASON, 2001).

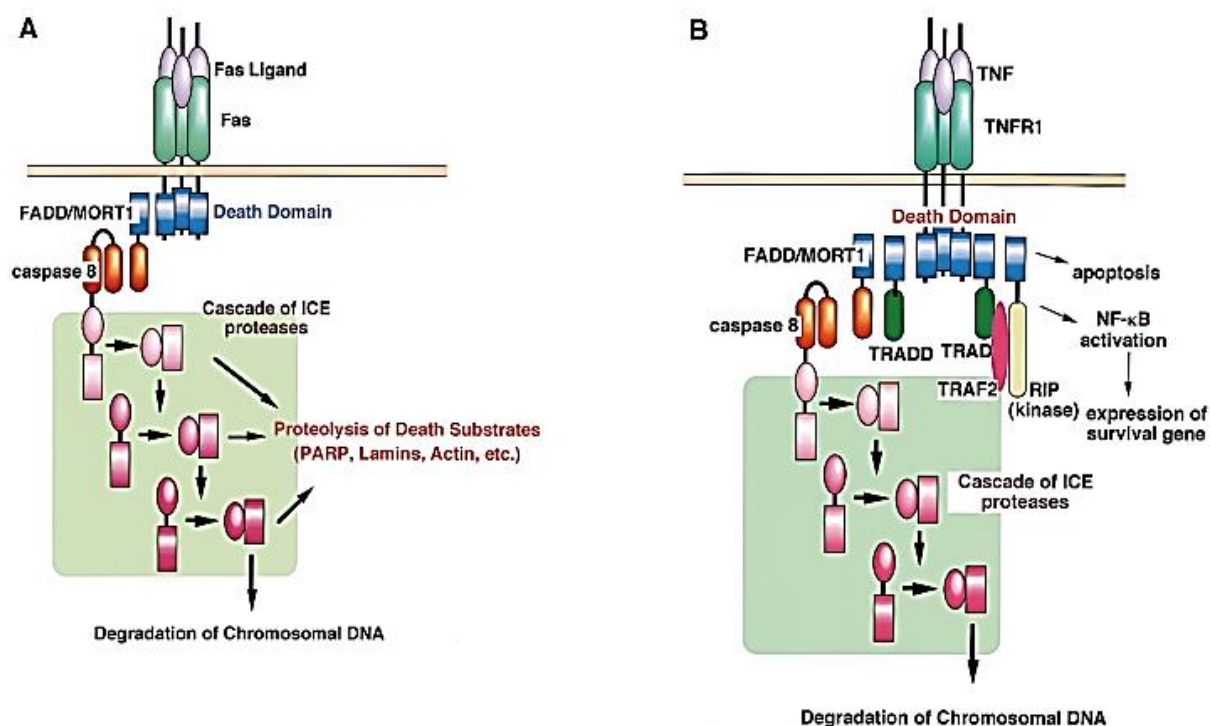
21 Na sinalização pela via extrínseca (Figura 4) a membrana celular contém
22 proteínas receptoras de fatores de necrose tumoral, esses receptores (família-TNF) que
23 incluem várias proteínas, identificam os ligantes, e com essa sinalização vinda do
24 exterior celular se inicia os eventos que levam à apoptose pela via extrínseca
25 (GHOBRIAL et al. 2005). Esses receptores da família-TNF possuem domínios
26 extracelular de morte especializado na cascata de reações que levam as informações
27 para a parte intracelular da célula, esses domínios são ricos em cisteína compartilhando
28 essa característica nesta família de receptores (FULDA; DEBATIN; 2006). Alguns
29 receptores desta família são: CD95(apo-1/Fas), TRAIL e TNFR (WALCZAK, H.;
30 KRAMMER, P.H. 2000).

1 Tudo se inicia com o ligante pró-inflamatório TNF- α (fator de necrose tumoral),
2 comumente produzido em tecidos danificados, ou até por infecções, no receptor de
3 TNFR1 na membrana celular, o que recruta a proteína FADD (WANG, et al. 2009), ou
4 a proteína denominada de FADD/MORT1 (proteína FAS associada com o domínio de
5 morte) (NAGATA, 1997). Isso leva outra proteína, o TRADD, a se ligar à proteína
6 TNFR1 e esse complexo protéico interage com caspase 8 que é portadora de dois
7 domínios DED/MORT1 que se ligam ao domínio já encontrado em FADD/MORT1.
8 Desse modo a caspase 8 cliva a cascata de reação de caspase 3 levando a degradação do
9 DNA e consequentemente a apoptose (NAGATA, S; 1997). Outro evento que ocorre na
10 ligação do TNF com TNFR1, e o recrutamento em cascata de FADD e TRADD é a
11 indução da ligação de RIP juntamente com TRAF2 o que estimula a proteína de
12 sobrevivência NF- κ B (KISCHKEL, F.C; et al. 2000). Essa proteína dependendo do caso
13 pode produzir uma resistência contra apoptose em condições fisiológicas normais ou
14 por outro lado produzir uma resposta pró-apoptótica, como no caso de infecções virais
15 na célula, onde NF- κ B é estimulado por vários motivos e está associado a regulação de
16 muitos genes, como nos casos de inflamação e regulação da apoptose (GHOBRIAL,
17 I.M.; et al. 2005).

18 Além do receptor TNFR, em outro receptor da família TNF, o Fas(CD95/apo-1),
19 a sinalização produzida é muito semelhante entre eles envolvendo quase as mesmas
20 proteínas. A Fas não é capaz de induzir sozinha a apoptose, sendo necessário um
21 recrutamento de FADD/MORT1 que se ligam a parte intracelular da Fas que desse
22 modo se ligam a caspase 8, sofrendo uma mudança na estrutura da molécula, ativando a
23 caspase 8, a qual segue ativando outras moléculas de morte, entre elas a caspase 3
24 (WALCZAK, H.; KRAMMER, P.H. 2000).

25 Por último temos o ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL) ou
26 Apo2L. Esse sistema de sinalização possui também similaridade com outros membros
27 da família-TNF, por terem alguns receptores o sistema TNF (TRAIL) apenas os
28 receptores DR4 e DR5 induzem a sinalização de morte por apresentarem o domínio de
29 morte na parte intracelular (KISCHKEL, et al. 2000). Desse modo quando o receptor
30 TRAIL recebe a sinalização os dominós de morte da parte intracelular recrutam FADD,
31 que ativa a caspase 8, seguindo como nos modelos anteriores (FULDA, S.; DEBATIN,
32 K.M. 2006).

1 Na via intrínseca a família de proteínas Bcl-2 é de grande importância, onde
 2 contem proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas (GHOBRIAL, et al. 2005), dentre
 3 elas algumas podem ser citadas como Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w e Mcl-1 que fazem parte do
 4 grupo de proteínas anti-apoptóticas, e as Bax, Bad, Bid e (PAROLIN; REASON, 2001)
 5 PUMA que são pró-apoptóticas (BRUNELLE; LETAI; 2009). Com o sinal de morte,
 6 que pode ser produzido por vários tipos de estresse ou danos, as proteínas pró-
 7 apoptóticas desta família (bcl-2), induzem a permeabilidade da membrana mitocondrial
 8 liberando fatores apoptóticos como citocromo c, Smac/DIABLO, AIF e outros,
 9 promovendo assim a ação das caspases efetoras da morte celular, levando a degradação
 10 da célula (FULDA; DEBATIN; 2006).



11 **Figura 4:** Cascata de reação levando a apoptose pela via extrínseca de dois receptores
 12 da família TNF, sendo eles Fas (CD95/apo-1) e TNFR1. A: Ligante Fas se liga ao
 13 receptor na membrana citoplasmática, onde induz um recrutamento proteico de
 14 FADD/MORT1 e caspase 8 ao seu domínio de morte na parte intracelular, ocorrendo a
 15 ativação da caspase 8 clivando outros elementos levando a célula para apoptose. B: TNF
 16 se liga ao seu ligante TNFR1, onde induz a trimerização de FADD/MORT1, TRADD,
 17 assim leva para dois eventos, um pela ligação à caspase e ativação desta ocasionando os
 18 eventos seguintes para apoptose; a ligação de TRAF2 e RIP levando a ativação de NF-
 19 κB, e apoptose pela RIP que sua sinalização ainda está desconhecida (NAGATA, S;
 20 1997).

21

1 REFERÊNCIAS

- 2 ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathways in cancer. **Cytokine**
3 **Growth Factor Reviews**, v. 19, p. 325-331, 2008.
- 4 BADGUJAR, V.B. et al. Homoharringtonine: A nascent Phytochemical for Cancer
5 Treatment (Review). **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 5,
6 n. 1, p. 421-432, 2016.
- 7
8 BRUNELLE, J. K. LETAI, A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2
9 family. **Cell Science at a Glance**, v. 122, n. 4, p. 437- 441, 2009.
- 10
11 CAI, J.P. et al. Cytotoxic effects of antiproliferative agents on human retinal glial cells
12 in vitro. **International Ophthalmology**, v. 24, p. 225-231, 2001.
- 13 EFFERTH, T. et al. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer
14 precision medicine. **Oncotarget**. V. 8, n. 30, p. 50284-50304, 2017.
- 15
16 Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José
17 Alencar Gomes da Silva – Rio de Janeiro: INCA, 2017.
- 18
19 FRESNO, M. et al. Inhibition of Translation in Eukaryotic Systems by
20 Harringtonine. **European Journal of Biochemistry**, v. 72, p. 232-330, 1977.
- 21
22 FULDA, S. DEBATIN, K.M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in
23 anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798-4711, 2006)
- 24
25 GHOBRIAL, I.M. et al. Targeting Apoptosis Pathways in Cancer Therapy. **A Cancer**
26 **Journal for Clinicians**, v. 55, p. 178-194, 2005.
- 27
28 GUERRA, M. R. et al. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos
29 mais recentes. **Rev Bras Cancero**, v. 51, p. 227-234, 2005.
- 30
31 HAM, R.; Highlight on the Studies of Anticancer Drugs Derived from Plants in China.
32 **Stem Cells**, v. 12, p. 53-63, 1994.
- 33
34 HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70,
35 2000.
- 36
37 HUANG, MOU-TUAN.; Harringtonine, an inhibitor of initiation of Protein
38 Biosynthesis. **Molecular Pharmacology**, n. 11 p. 511-519. 1974.
- 39
40 INGOLIA, N.T.; et al. Ribosome Profiling of Mouse Embryonic Stem Cells Reveals the
41 Complexity and Dynamics of Mammalian Proteomes. **Cell**, v. 147, p. 789-802, 2011
- 42
43 Ferlay J. et al. (2018). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France:
44 International Agency for Research on Cancer. Disponível em:
45 <<https://gco.iarc.fr/today>>, acesso [15 jan. 2019].
- 46
47 JIANG, T.L.; et al. Comparative in vitro antitumor activity of homoharringtonine and
harringtonine against clonogenic human tumor cells. **Investigational New Drugs**, v. 1
p. 021-025, 1983.

- 1 JIE, H.; Homoharringtonine-induced apoptosis of MDS cell line MUTZ-1 cells is
2 mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. **Leukemia & Lymphoma**, v.
3 48, p. 964-977, 2007.
4
- 5 JIN, J.; et al. Homoharringtonine-based induction regimens for patients with de-novo
6 acute myeloid leukaemia: a multicentre, open-label, randomised, controlled phase 3
7 trial. **The lancet** , v.14, p. 599-608, 2013.
8
- 9 KAUR, P.; et al. Inhibition of Chikungunya Virus Replication by Harringtonine, a
10 Novel Antiviral That Suppresses Viral Protein Expression. **Antimicrobial Agents and**
11 **Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 155-167, 2013.
12
- 13 KISCHKEL, F. C.; et al. Apo2L/TRAIL-Dependent Recruitment of Endogenous
14 FADD and Caspase-8 to Death Receptors 4 and 5. **Immunity**, v. 12, p. 611-620, 2000.
15
- 16 KOTECHA, R.; et al. Dietary phytochemicals and cancer chemoprevention: a review of
17 the clinical evidence. **Oncotarget**, v. 7, n. 32, p. 52517-52529, 2016.
18
- 19 KHAN, N.; et al. Lifestyle as risk factor for cancer: Evidences from human studies.
20 **Cancer Letters**, v. 293, p. 133-143, 2010.
21
- 22 KRSTIN, S.; et al. How do the alkaloids emetine and homoharringtonine kill
23 trypanosomes? An insight into their molecular modes of action. **Phytomedicine**, v. 23,
24 p. 1771-1777, 2016.
25
- 26 KUMAR, M.; et al. Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat
27 cancer. **Cytotechnology**, v. 68, p. 531-563, 2016.
28
- 29 LEE, H.; et al. Isorhynchophylline, a Potent Plant Alkaloid, Induces Apoptotic and
30 Anti-Metastatic Effects in Human Hepatocellular Carcinoma Cells through the
31 Modulation of Diverse Cell Signaling Cascades. **Int. J. Mol. Sci**, v. 18, p. 1-17, 2017.
32
- 33 LIU, R.H: Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic
34 combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 78,
35 n. 3, p. 517-520, 2003
36
- 37 LIU, R. H. Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of
38 Action. **The Journal of Nutrition**, v. 134, n. 12, p. 3479-3485, 2004
39
- 40 MCLAUGHLIN, F.; et al. The Cell Cycle, Chromatin and Cancer: Mechanism-Based
41 Therapeutics Come of Age. **Drug Discovery Today**, v. 8, n. 17, p. 793-802, 2003.
42
- 43 MENG, H.; et al. Homoharringtonine inhibits the AKT pathway and induces *in vitro*
44 and *in vivo* cytotoxicity in human multiple myeloma cells. **Leukemia & Lymphoma**, v.
45 49, n. 10, p. 1954-1962, 2008.
46
- 47 MEYBODI, N. M; et al. Phytochemicals in Cancer Prevention: A Review of the
48 Evidence. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 10, p. 1-10, 2017.
49

- 1 MONTANHER, A. B. P.; et al. Monitoring of the crude extracts of *Polygala* Species
2 (Polygalaceae) using *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p.
3 66-68, 2003.
4
- 5 NI, D.; et al. Metabolism of homoharringtonine, a cytotoxic component of the evergreen
6 plant *Cephalotaxus harringtonia*. **Journal of Experimental Therapeutics and**
7 **Oncology**, v. 3, p. 47-52, 2003.
8
- 9 PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças
10 1 hepatobiliares. *Arquivos de Gastroenterologia*, v. 38, n. 2, p. 138-144, 2001.
11
- 12 PHILIPP, S.; et al. Homoharringtonine, a clinically approved anti-leukemia drug,
13 sensitizes tumor cells for TRAIL-induced necroptosis. **Cell Communication and**
14 **Signaling**, v. 13 n. 25 p. 1-16, 2015.
15
- 16 POWELL, R. G.; et al. Structures of Harringtonine, Isoharringtonine, and
17 Homoharringtonine. **Tetrahedron Letters**, n. 11, p. 815-818, 1970.
18
- 19 RATES, S. M. K.; Promoção do uso Racional de Fitoterápicos: uma Abordagem no
20 Ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 11, n. 2, p. 57-69,
21 2001.
22
- 23 SAKAMOTO, S.; et al. Development of an indirect competitive
24 immunochromatographic strip test for rapid detection and determination of anticancer
25 drug, harringtonine. **Journal of Chromatography B**, v. 1048, p. 150-154, 2017.
26
- 27 WALCZAK, H.; KRAMMER, P. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L)
28 Apoptosis Systems, **Experimental Cell Research**, v. 256, p. 58-66, 2000.
29
- 30 WANG, Y.; et al. Activation of the extrinsic apoptotic pathway by TNF- α in
31 Human Salivary Gland (HSG) cells *in vitro*, suggests a role for the TNF receptor (TNF-
32 R) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Sjögren's Syndrome-associated
33 autoimmune sialadenitis. **Archiver of Oral Biology**, v. 54, p. 986-996, 2009
34
- 35 YAFFE, P. B.; et al. Piperine, an Alkaloid From Black Pepper, Inhibits Growth of Human
36 Colon Cancer Cells Via G1 Arrest and Apoptosis Triggered by Endoplasmic Reticulum
37 Stress. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, p. 1070-1085, 2015.
- 38 YUE, et al. Mutant p53 in Cancer: Accumulation Gain-of-function, and therapy.
39 **Journal of Molecular Biology**, v. 429, p. 1598-1606, 2017.
40

1 OBJETIVOS

2 Objetivos gerais

3

4 O presente trabalho teve como objetivo analisar os efeitos dos alcalóides
5 Harringtonina (HT) e Homoharringtonina (HHT) nas linhagens celulares hepáticas
6 tumorais humana, HepG2/C3A e HuH-7.5, que possuem p53 selvagem e p53 mutado,
7 respectivamente, a fim de compreender os mecanismos envolvidos com a atividade
8 antiproliferativa de HT e HHT nestas condições biológicas.

9

10 Objetivos específicos

11

- 12 • Avaliar os efeitos citotóxicos de HT e HHT em células HepG2/C3A e HuH-7.5
13 através do teste de viabilidade celular Resazurina e determinou-se as
14 concentrações que foram utilizados nos demais ensaio;
- 15
- 16 • Avaliar o perfil de ocorrência de apoptose nas linhagem HepG2/C3A e HuH-7.5
17 após o tratamento com HT e HHT através da citometria de fluxo
- 18
- 19 • Estudar as alterações do ciclo celular nas linhagens celulares tratadas com HT e
20 HHT, através da citometria de fluxo;
- 21
- 22 • Avaliar danos ao material genético pelo ensaio cometa das linhagens com p53
23 selvagem (HepG2/C3A) e p53 mutado (HuH-7) após o tratamento com HT e
24 HHT;
- 25
- 26 • Estudar a expressão de mRNA de genes de apoptose, metabolismo, controle de
27 proliferação, ciclo celular, dano no DNA e estresse de retículo nas duas
28 linhagens tratadas com os compostos;
- 29
- 30 • Observar se há diferença de comportamento das linhagens com p53 selvagem
31 (HepG2/C3A) e p53 mutado (HuH-7) frente ao tratamento com HT e HHT.

1 **ARTIGO**2 Artigo a ser submetido à revista **Biomedicine & Pharmacotherapy**.

3

4 **Título: Correlação da expressão de mRNA de genes de apoptose e danos no DNA**
5 **em células p53 selvagem e mutante tratadas com homoharringtonina e**
6 **harringtonina.**

7

8 **mRNA correlation to apoptosis and DNA damage in p53 wild and mutant cells**
9 **treated with homoharringtonin and harringtonin.**

10

11 Franco, D.P.; Biazi B. I.; Zanetti, T. A.; Marques, L. A.; Mantovani, M. S.

12

13

14 Centro de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual
15 de Londrina, Londrina/PR16 **E-mail: daniel.pedriali@gmail.com**17 **Departamento de Biologia Geral – CCB**18 **Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário32**19 **P.O. Box 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.33**20 **Tel: +55 43 3371-4977**

RESUMO

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

O presente estudo teve por objetivo avaliar o modo de ação dos alcaloides Harringtonina (HT) e Homoharringtonina (HHT) em linhagens celulares de hepatócitos humanos no p53 selvagem e mutante, HepG2/C3A e HuH-7, respectivamente. Realizando testes de viabilidade celular, citometria de fluxo para apoptose, ciclo celular, integridade de membrana, teste de cometa e expressão relativa de mRNA em, sendo observados genes de apoptose, ciclo celular, metabolizadores, estresse de retículo e de controle de proliferação. Os compostos estudados neste trabalho mostraram aumento significativo em apoptose inicial nas duas linhagens além de uma alteração no ciclo celular sendo aumentada significativamente a fase G2/M nas duas linhagens quando tratadas com Homoharringtonina (HHT) e aumento significativo de S na linhagem C3A quando tratadas com Harringtonina (HT). A expressão relativa dos genes mostrou um aumento de genes indutores de apoptose como *TNF*, *BBC3* e redução em *BCL2* e *BAK*, mostrando que os compostos induzem a morte celular por apoptose. Genes metabolizadores *CYP2E1*, *CYP2C19* e *CYP3A4* sendo este ultimo apenas na linhagem HuH-7 mostraram-se alterados, esses resultados induzem uma resposta das linhagens na metabolização desses compostos testados. Expressões relativas de genes de estresse de retículo, ERN1 e EIF2AK3 mostraram-se aumentados nos tratamentos, que pode estar ligado com a ação principal dos compostos já descrita como alteração e inibição expressão proteica das células, o estresse causa aumento de outros genes como *TRAF2* visto aumentando neste estudo como também induzem *TNF* descrito acima. Desse modo os compostos induzem o estresse de retículo causando morte celular por apoptose.

Palavras-Chave: Harringtonina; Homoharringtonina; morte celular; TNF

1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais são utilizados para fins medicinais desde a antiguidade e com o avanço da tecnologia, hoje muitos dos medicamentos são a base de compostos vegetais ou sintetizados a partir deles (RATES, 2001). Esses compostos naturais, também conhecidos de fitoquímicos, servem como recurso na obtenção de novas terapias contra diversas doenças, incluindo o câncer, já que os tratamentos convencionais contra o câncer não conseguem apenas atingir células tumorais e o foco atual é o tratamento alvo-específico contra essas células, e produtos naturais tem demonstrado resultados promissores (EFFERTH, 2017).

Assim, o estudo com novos compostos a fim de analisarmos o comportamento citotóxico em diferentes linhagens *in vitro*, compreendendo seus mecanismos de atuação é um passo importante neste trajeto, para assim, predizer os efeitos na saúde humana. Testes *in vitro* são ótimos para descobrir novas biomoléculas e caracterizam os efeitos desses novos compostos em um ambiente controlado (SOTOMAYOR; SCHULTEN, 2007). E neste cenário que a cada ano são descobertos mais fitoquímicos e muitos dos já conhecidos não são totalmente estudados, possuindo mecanismos de ações ainda não descobertos, muitos deles podendo modular atividades anti-tumorais como no caso dos alcaloides, induzindo a apoptose (MEYBODI, 2017). Por isso testes *in vitro* são uma estratégia de prospecção de compostos com potenciais terapêuticos.

Os compostos harringtonina e homoharringtonina são metabolitos secundários extraídas de espécies de coníferas da Ásia do gênero *Cephalotaxus*, pertencentes a família Cephalotaxaceae um exemplo é o da planta *Cephalotaxus hainanensis* Li, onde esses compostos já demonstraram efeitos contra neoplasias relatados pela população local chinesa (HAM, 1994).

Estudos mostram que o efeito principal destes compostos é na alteração da expressão proteica (HUANG, 1974; KAUR et al., 2013; Ingolia et al., 2011), reduzindo a viabilidade celular *in vitro* em linhagem de Glia retinal (CAI et al., 2001), linhagens de mieloma U266, RPMI8226, MM.1S e MM.1R (Meng et al., 2008), MUTZ-1, K562, MOLT4 e U-20S (JIE et al., 2007). Entre esses compostos a homoharringtonina se destacou nos estudos levando atualmente a aprovação pela FDA de estudos com pacientes leucêmicos (BADGUJAR et al., 2016) já apresentando resultados promissores em testes em pacientes com leucemia mieloide aguda (JIN et al., 2003)(SHEN et al., 2018) (CORTES et al., 2013) .

1 É importante a investigação em outras linhagens, melhorando o entendimento
2 dos mecanismos de ação, buscar quais vias moleculares de expressão gênica esses
3 compostos interferem, contribuindo no entendimento e na segurança de uso para a saúde
4 humana.

5 Em vários tipos de câncer o a proteína *p53* é encontrada mutada, o que leva esta
6 proteína ser um dos principais papéis no desenvolvimento do câncer, em seu estado
7 selvagem é responsável na supressão-tumoral por detecção de dano ao DNA, e responde
8 a sinais de estresse intra e extracelular (YUE, et al. 2017). Os alvos da resposta por essa
9 proteína vários processos celulares como reparo de DNA, funções de parada de ciclo,
10 apoptose e antioxidantes (YUE, et al. 2017). Quando mutada essa proteína tende a se
11 acumular no citoplasma das células e muitas vezes perdendo sua supressão-tumoral
12 fazendo disso o gene *Tp53* um proto-oncogene (ASCHAUER; MULLER, 2016).
13 Mutações podem levar a proteína p53 ganhar novas funções, podendo alterar a respostas
14 de outras proteínas como também levar a metástase, prevenir a apoptose, e induzir a
15 transcrição de outros genes (ASCHAUER; MULLER, 2016). Com isso novos estudos
16 mostram que o acúmulo de p53 mutante e novos ganhos de funções pode servir de
17 terapias alvo contra tipos de câncer, tornando uma nova estratégia para promover novos
18 tratamentos (YUE, et al. 2017). Na linhagem HuH-7.5 deste estudo há mutações
19 pontuais em seu gene *Tp53* fazendo com que se acumule no citoplasma além de ter sua
20 proteína com uma meia-vida mais elevado em comparação ao seu estado selvagem
21 (BRESSAC, et al. 1990).

22 Com este estudo os efeitos dos compostos harringtonina e homoharringtonina
23 podem ser mais bem compreendidos no sistema *in vitro* avaliando os aspectos propostos
24 neste trabalho. Este trabalho buscou estudar os efeitos em duas linhagens tumorais
25 hepáticas, HuH-7.5 e HepG2/C3A sendo o p53 mutado e p53 selvagem
26 respectivamente, observando indução de apoptose, parada de ciclo celular, integridade
27 de membrana, dano ao material genético correlacionando com a análise de expressão
28 relativa de mRNA dessas vias

1 **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

2 **2.1. Agentes Químicos**

3 O composto Harringtonina foi adquirido pela ChemCruz® (CAS 26833-85-2),
4 PM = 531,59g/mol, C₂₈H₃₇NO₉, e a Homoharringtonina foi adquirida na Sigma
5 Aldrich®, PM = 545,62 g/mol, C₂₉H₃₉NO₉. Ambos foram dissolvidos em
6 dimetilsulfóxido (DMSO), na concentração de 100 mM, e diluídos em meio de cultura
7 antes dos tratamentos. As concentrações usadas para os testes neste trabalho foram de
8 0,1, 1 e 10µM para os testes de citometria e genotoxicidade, e 5 µM análise de
9 expressão de mRNA diluídas em meio de cultura celular. Como controles positivos
10 foram utilizados camptotecina (2 µM ; SIGMA® , cod: 1000891597).

11 **2.2. Cultivo celular**

12 As duas linhagens celulares tumorais utilizadas foram de origem hepática
13 tumorais humanas, sendo elas HepG2/C3A e HuH-7.5.
14 A linhagem HuH-7.5 foi doada pelo Prof. Wander Pavanelli do Departamento de
15 Patologia da Universidade Estadual de Londrina e a linhagem HepG2/C3A foi obtida do
16 Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ). Sendo essas linhagens livre de
17 micoplasma. As células foram mantidas em frascos de cultura com 25 cm² em meio de
18 cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO) baixa glucose, com o
19 volume do frasco em 5mL, suplementado com 10% soro bovino fetal (GIBCO) e
20 contendo 1% de antibiótico e antimicótico (GIBCO). As culturas foram mantidas em
21 estufa de cultura a 37 ° C e 5% de CO₂. A linhagem HepG2/C3A é derivada de um
22 carcinoma hepatocelular, com morfologia de tecido epitelial. Esta linhagem apresenta
23 níveis de expressão do gene *Tp53* selvagem. HuH-7.5 é uma linhagem celular do tipo
24 epitelial e possui mutação no gene *Tp53*.

25 **2.3. Ensaio de Citotoxicidade (Resazurina)**

26 Para este teste foi utilizado o protocolo de McMillian, (2002) o composto de
27 Resazurina; Molecular Probes® diluída na concentração final de 60 µM. Para a
28 validação da citotoxicidade do experimento foi utilizado Camptotecina (SIGMA®) a 2
29 µM por poço. As células foram preparadas em placas de 96 poços, com a concentração
30 de 2,5x10⁴ células por poço para a linhagem HepG2/C3A e na linhagem HuH-7.5 uma

1 concentração de 10^4 células e estabilizadas por 24 horas. Após o período de
2 estabilização as células foram tratadas com os compostos nas concentrações de 0,001
3 μM , 0,12 μM , 0,25 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM , 40 μM e 80 μM .
4 Os poços contendo com compostos HT e HHT, possuíam uma concentração de DMSO
5 de 0,08% na maior concentração dos compostos estudados. Após o tratamento de 24
6 horas as células foram submetidas à retirada dos tratamentos de cada poço e adicionado
7 100 μM de resazurina em cada poço e condicionadas em estufa de cultura a 37° C e 5%
8 de CO₂. Após o tempo de 3 horas as placas foram reveladas em um leitor de placas
9 Glomax[®](Promega) a 540-560 nm de excitação e 580-600 nm de emissão. Foram feitas
10 3 repetições biológicas de cada linhagem por composto.

11

12 **2.4. Avaliação celular: ciclo celular, apoptose, integridade de membrana e** 13 **contagem celular**

14 As células foram analisadas em citômetro de fluxo *Guava easyCyteTM* (Merck
15 *Millipore*). Para esses testes as células foram preparadas em placas de 6 poços em uma
16 concentração de 2×10^5 células por poço da linhagem HuH-7.5, e a linhagem
17 HepG2/C3A na concentração de $6,1 \times 10^5$ células por poço. Foram utilizados tratamentos
18 com Harringtonina e Homoharringtonina, no tempo de 24 horas em três repetições
19 biológicas.

20 Foi utilizado como controle de indução de apoptose a Camptocina na
21 concentração de 2 μM , nos mesmos padrões em todos os testes avaliados pela
22 citometria de fluxo. As células foram levadas para a colheita, aonde foi retirado e
23 encaminhado o meio de cultura dos poços a tubos cônicos descartáveis de 15 mL para
24 posteriormente serem centrifugados. As células aderidas foram lavadas duas vezes com
25 3 mL de PBS (Tampão fosfato-salino) e o líquido sendo dispensado juntamente com o
26 meio de cultura reservado anteriormente em seus respectivos tratamentos. Após a
27 lavagem as células foram tripnizadas sendo inativada a tripsina com o meio antes
28 armazenado nos tubos. Foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos sendo descartado
29 os sobrenadantes e ressuspensas em PBS, e aliqotado 100 μL da re-suspensão em
30 microtubos de 1,5mL para serem processados de acordo com os testes abaixo:

1 **2.4.1. Ciclo Celular**

2 Para a análise do ciclo celular foi adicionado 5 μ L de RNase na concentração de 2
3 mg/mL e incubadas em estufa a 37° C e 5% CO₂ por 30 minutos. Em seguida foi
4 realizada a lise celular e a marcação do DNA com 100 μ L de citrato de sódio Triton X-
5 100 a 0,1% e 5 μ L de Iodeto de propídeo sendo mantidas em gelo e protegida da luz por
6 30 minutos. Posteriormente as células foram submetidas a análise em citômetro de fluxo
7 e estimada a porcentagem das células em cada estágio do ciclo celular (G1, S e G2/M)
8 utilizando o *Software InCyte* e lidos 5000 eventos.

9

10 **2.4.2. Teste de Apoptose**

11 Após a colheita anteriormente descrita, neste teste de apoptose foi utilizado o Kit
12 de apoptose *Alexa FluorTM, annexin V (Invitrogen-cod:A23204)* e os dados obtidos pelo
13 citômetro. Adicionando 100 μ L do tampão de apoptose e mais 5 μ L de Anexina e
14 esperado 10 minutos em temperatura ambiente em seguida adicionado 5 μ L de 7AAD e
15 após 5 minutos, realizado a leitura no citômetro. Foram lidos 5000 eventos, os eventos
16 não marcados são considerados células vivas, as células marcadas apenas com anexina
17 são consideradas em apoptose inicial, as que são marcadas com 7-AAD estão em
18 necrose e quando ambos estão marcados indicam apoptose tardia.

19 **2.4.3. Teste de Integridade de Membrana**

20 No ensaio de integridade de membrana foi adicionando 20 μ L de Iodeto de
21 propídeo a 2 μ g/mL e incubados por 10 minutos antes das análises pelo citômetro.
22 Foram lidos 5000 eventos e considerados com membrana rompida os eventos que foram
23 marcados com o Iodeto de propídeo, e considerado com membrana íntegra a população
24 que não foi marcada com o composto.

1 2.4.4. Contagem Celular

2 A contagem celular foi realizada juntamente com o teste de integridade de
3 membrana, onde foi observada a quantidade de células por μL captadas no citômetro de
4 fluxo, e assim estimado a quantidade total por tratamento.

5 2.5. Teste de Genotoxicidade

6 O ensaio do cometa foi realizado segundo Singh et al. (1988) com modificações.
7 As células foram semeadas em placas de cultivo celular de 6 poços na concentração
8 de $2,5 \times 10^5$ células para a linhagem HuH-7.5 e $6,17 \times 10^5$ para a HepG2/C3A
9 contendo 1mL de DMEM suplementado com SBF (10%). Após estabilização por 24
10 horas procederam-se os tratamentos com 3 horas na concentração de 10 μM dos
11 compostos. Como controle negativo foi utilizado meio suplementado e como controle
12 positivo camptotecina na concentração de 2 μM . Após o tempo de tratamento as células
13 foram coletadas por dissociação enzimática (tripsina 0,025% à 37°C), centrifugadas a
14 1250rpm por 5 minutos e o sobrenadante descartado.

15 As lâminas foram preparadas com 20 μL de suspensão celular e 120 μL de
16 agarose de baixo ponto de fusão a 37°C, depositadas em lâmina pré-gelatinizada com
17 agarose padrão. Posteriormente, foram imersas em solução de lise gelada (NaCl 2.5M,
18 EDTA 100mM, Tris 10mM, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH = 10) por 1 hora. As
19 lâminas foram colocadas em cuba de eletroforese com tampão alcalino gelado (NaOH
20 300 mM e EDTA 1mM, pH > 13) por 20 minutos para a desnaturação do DNA, seguido
21 pela eletroforese a 25V e 300mA por 20 minutos. As lâminas foram neutralizadas com
22 tampão Tris-HCl (pH 7.5) e fixadas em etanol absoluto. Para a análise, as lâminas foram
23 coradas com brometo de etídio (0,002mg/mL) e fotografadas com o microscópio de
24 fluorescência *EVOS[®] FL auto Cell Imaging System (Thermo Fisher)* com aumento de
25 200x.

26 A análise dos danos genotóxicos foram analisadas no software *CometScore[®]*
27 levando a em consideração para as análises o aspecto Tail Moment, totalizando 300
28 células por tratamento.

1 2.6. Análise de Expressão de mRNA via RT-qPCR

2 A técnica de expressão gênica em tempo real (RT-qPCR) foi utilizada para
3 observações das alterações relativas a expressão dos genes relacionados com apoptose
4 (*BAK*, *BCL2*, *BBC3*, *TNF*, *CASP3*, *CASP8*), metabolismo (*CYP2E1*, *CYP3A4*,
5 *CYP2C19*, *CYP2D6*), estresse de retículo (*ERN1*, *EIF2AK3*), ciclo celular e danos ao
6 DNA (*CDKN1A*, *TP53*) e de proliferação (*MYC*, *MTOR*, *NF-KB*, *BCN1*, *TRAF2* e *ID*).

7 Um total de 2×10^5 de HuH-7 e $6,17 \times 10^5$ de HepG2/C3A foram semeadas em
8 frascos de cultura separados, um para cada tipo de linhagem, e tratadas com 5 μ M de
9 Harringtonina e Homoharringtonina, separadamente. Após o tempo de 12h de
10 tratamento o meio das células foi retirado e passou-se a extrair o RNA total com
11 RNeasy® Mini Kit (Qiagen, cod: 74106) de acordo com o protocolo do fabricante.
12 Posteriormente após o procedimento de extração do RNA total ele foi eluído e
13 armazenado em microtubos em freezer, e uma parte do material foi lido em
14 espectrofotometro (BioDrop μ Lite, *BioDrop*) para observar a pureza de RNA total sendo
15 a razão ($A_{260/280nm}$) obtido entre 1,8 e 2. Foi feito o gel de agarose 1% para se verificar a
16 integridade do material.

17 O cDNA foi sintetizado em um termociclador T100™ *Thermal Cycler* BIO-
18 RAD, onde 1000 ng de RNA total foi diluído em H₂O DEPC (12,4 μ L), 1 μ L de oligo
19 dT (10 pmd/mL) e 2 μ L de cada dNTPs (2,5 mM), mantidos por 15 minutos a 60°C.
20 Após esse tempo o material foi colocado em gelo e adicionando 4 μ L de 5X First Strand
21 Buffer (250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl e 15 mM MgCl₂). Após 2 minutos em
22 temperatura ambiente foi adicionando 0,1 μ L de RNase out e 0,5 μ L de enzima de
23 transcriptase reversa (M-MLV – Invitrogen, *Life Technologies*) por amostra, as quais
24 foram incubadas a 37°C por 50 minutos e posteriormente a 70°C por 15 minutos e por
25 final a 10°C.

26 Para a realização da PCR em tempo real, um composto fluorescente (5 μ L)
27 *Platinum SYBER Green* qPCR Supermix-UDG (Bio-Rad, cod: 11733038), 0,5 μ L de
28 cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol) e 5 μ L de cDNA de cada amostra (250ng)
29 foram adicionados em microtubos para RT-PCR.

30 As reações foram ocorridas no termociclador nas condições: 95°C por 5 minutos
31 seguidos de 45 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 20
32 segundos no equipamento *Lightcycler® Nano* (Roche). A curva de Melting foi analisada

1 no final de cada reação com temperatura de 50°C a 90°C em cada 0,5 graus por 20
2 segundos. Os genes testados no tratamento com os alcaloides foram comparados com a
3 expressão do gene normalizador, *RPL13A*.

4 **2.7. Análise Estatística**

5 Os resultados obtidos nos testes acima foram comparados por teste ANOVA
6 seguidos por Dunnet ($p < 0,05$). Essas análises foram realizadas no programa *GraphPad*
7 *Prism 5*. A análise da expressão gênica foi realizada pelo programa *Rest 2009*, sendo
8 acima de 2 vezes com análise estatisticamente significativa o fator da expressão para
9 cima ou para baixo (*Fold change*).

10

1 3. RESULTADOS

2

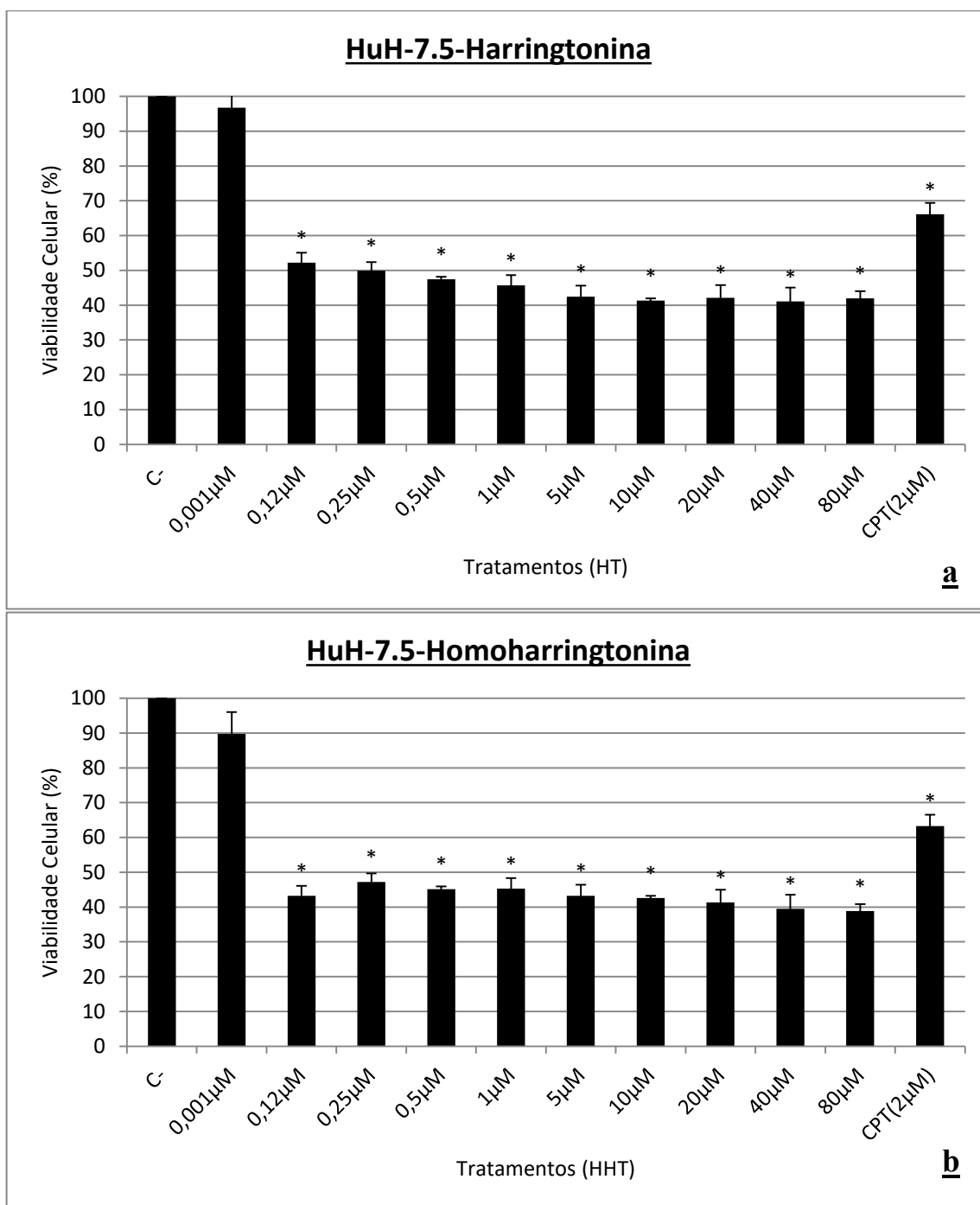
3 3.1. Ensaio de citotoxicidade

4 No ensaio de citotoxicidade os dois compostos estudados (HT e HHT)
5 apresentaram efeito citotóxico dentro de uma faixa de concentrações de tratamentos de
6 0,12-80 μM nas duas linhagens estudadas. A linhagem HuH-7.5 se mostrou mais
7 sensível aos compostos.

8 Na linhagem HuH-7.5, os compostos HT e HHT reduziram significativamente a
9 viabilidade das células em aproximadamente 55% em relação ao grupo não tratamento
10 a partir de 0,12 μM . Não houve diferença estatística quando as linhagens foram tratadas
11 com 0,001 μM de HT ou HHT em relação ao controle (Figura 1).

12 Os valores estatísticos nas extremidades, em porcentagem de células viáveis no
13 tratamento com HT variaram de 52% (0,12 μM) até 41% (40 μM) nas concentrações
14 citotóxicas em comparação ao controle. Nos tratados com HT entre as concentrações de
15 80 μM a 5 μM não há nenhuma diferença estatística ($p < 0,05$) entre esses tratamentos,
16 sendo observado apenas a partir da concentração de 1 μM um início de aumento de
17 viabilidade celular da HuH-7.5 (Figura 1-a).

18 Efeitos similares foram encontrados nos tratamentos com HHT. Os valores nas
19 extremidades estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em porcentagem para as células
20 HuH-7.5 viáveis variaram de 47,2% (0,25 μM) até 38,8% (80 μM) e não apresentou
21 diferenças significativas ($p < 0,05$) entre esses tratamentos (Figura 1-b).



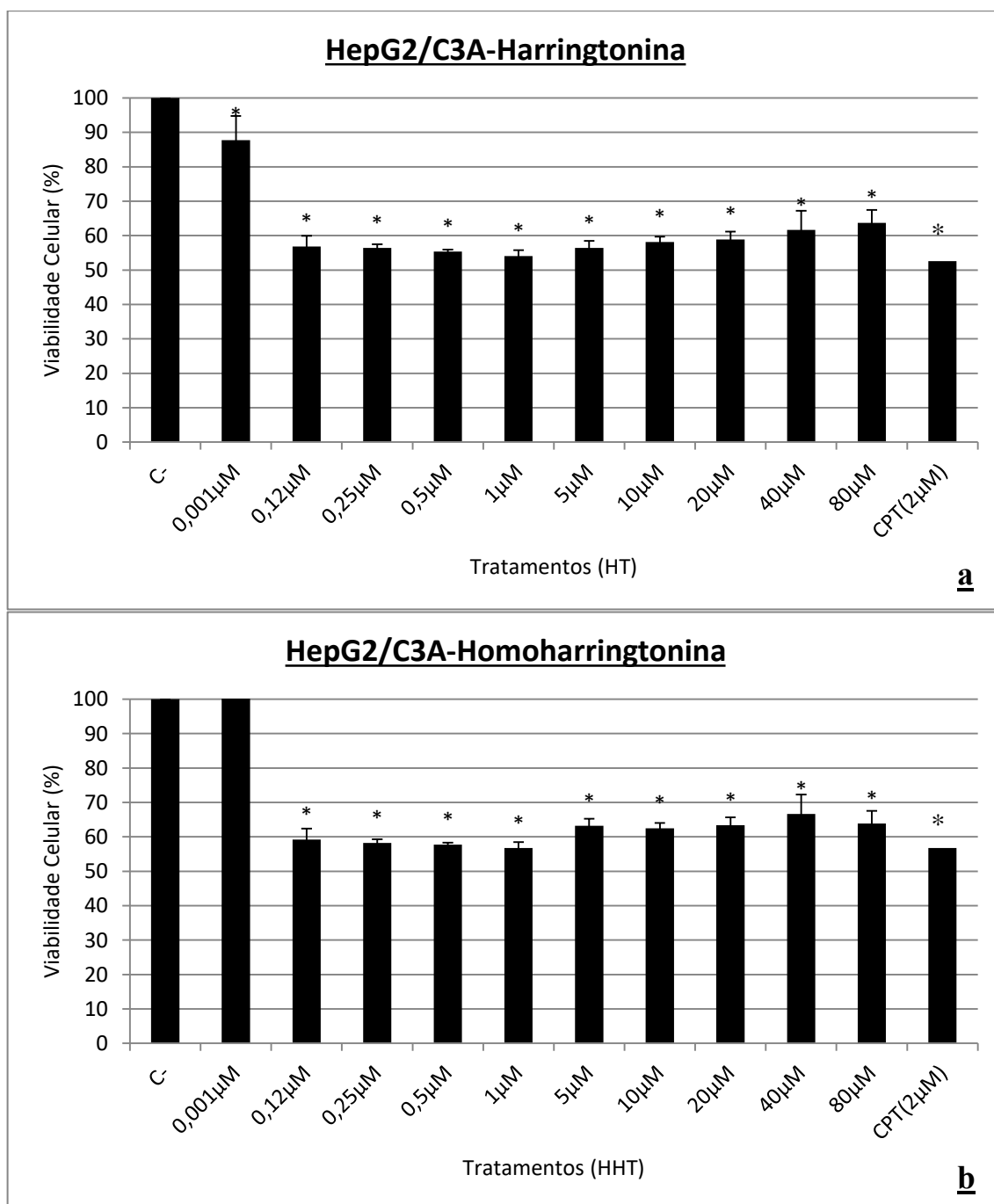
1 **Figura 1:** Viabilidade celular (%) na linhagem HuH-7.5, tratada com os compostos HT
 2 (a) e HHT (b) nas concentrações de (0,001 μ M- 80 μ M), após 24h. Camptotecina como
 3 indutor de citotoxicidade (CPT), (*) mostra resultados estatisticamente significativos
 4 ($p < 0,05$) em relação ao Controle (C). HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.

1 Nos experimentos com HepG2/C3A os compostos HT (Figura 2-a) e HHT
2 (Figura 2-b) responderam de forma semelhante, reduzindo significativamente a
3 viabilidade das células nas concentrações estudadas de 0,12-80 μM , e nenhum efeito na
4 de 0,001 μM .

5 A porcentagem do valor mais baixo e mais alto de células viáveis observadas
6 nos tratamento citotóxicos com HT ficaram no intervalo de 63,7% (80 μM) a 54% (1
7 μM) (Figura 2-a).

8 Os maiores e menores valores da viabilidade obtida em porcentagem para o
9 composto HHT na linhagem HepG2/C3A nas concentrações citotóxicas foram 66,6%
10 (40 μM) a 53% (5 μM) (Figura 2-b).

11 Neste ensaio a linhagem HuH-7.5 se mostrou mais sensível aos dois compostos
12 de forma uniforme ($p < 0,05$), demonstrando uma redução aproximada de 55% de
13 viabilidade pelo calculo de média entre a maioria dos tratados, em relação a linhagem
14 HepG2/C3A na qual houve uma redução de viabilidade aproximada de 40%.



1 **Figura 2:** Viabilidade celular (%) na linhagem HepG2/C3A, tratada com os compostos
 2 HT (a) e HHT (b) nas concentrações de (0,001 μ M- 80 μ M), após 24h. Camptotecina
 3 como indutor de citotoxicidade (CPT), (*) mostra resultados estatisticamente
 4 significativos ($p < 0,05$) em relação ao Controle (C). HT = harringtonina; HHT =
 5 homoharringtonina.

1 3.2. Citometria de fluxo

2 3.2.1 Integridade de membrana

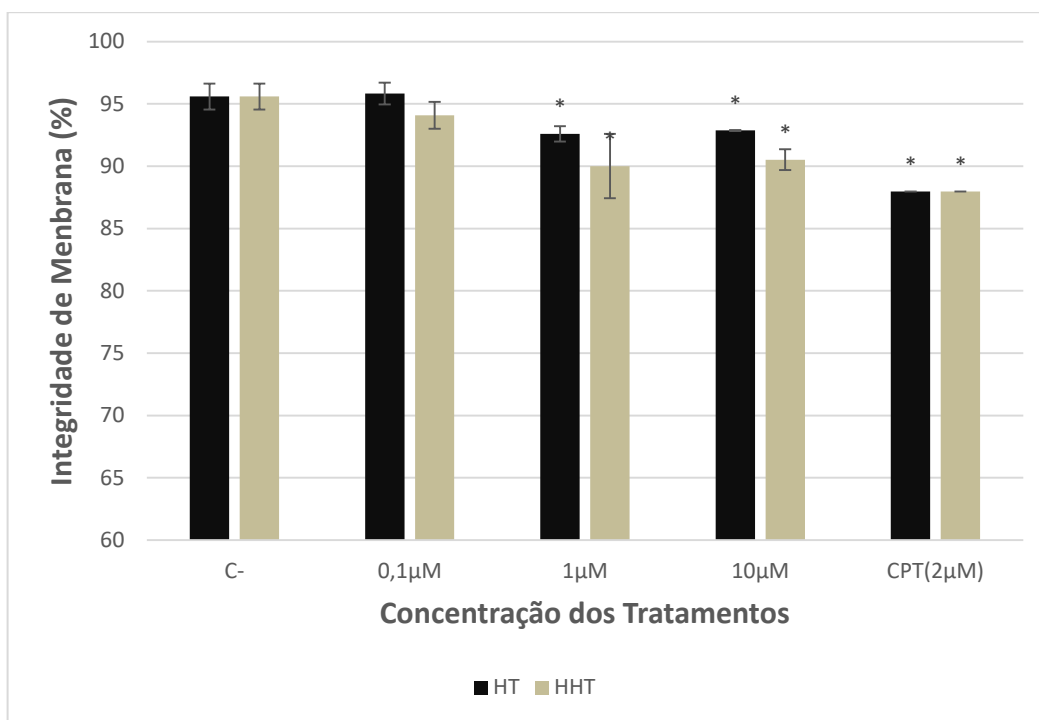
3 No ensaio de integridade de membrana por citometria de fluxo, a linhagem
4 HuH-7.5 apresentou uma redução da integridade de membrana estatisticamente
5 significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle, quando tratada com ambos os compostos
6 somente na concentração de 1 μM e 10 μM (Figura 3).

7 O valor em porcentagem das células HuH-7.5 com membrana íntegra obtido
8 neste ensaio quando tratadas com HT foram para as concentrações de variou de 92,5 a
9 95,8%. Já nas tratadas com HHT os valores variaram de 90 a 94%. O controle positivo
10 mostrou 87,9% de integridade de membrana nas células (Figura 3).

11 Já na linhagem HepG2/C3A não houve redução significativa ($p < 0,05$) em
12 comparação ao controle, em nenhum dos tratamentos com os dois compostos estudados.

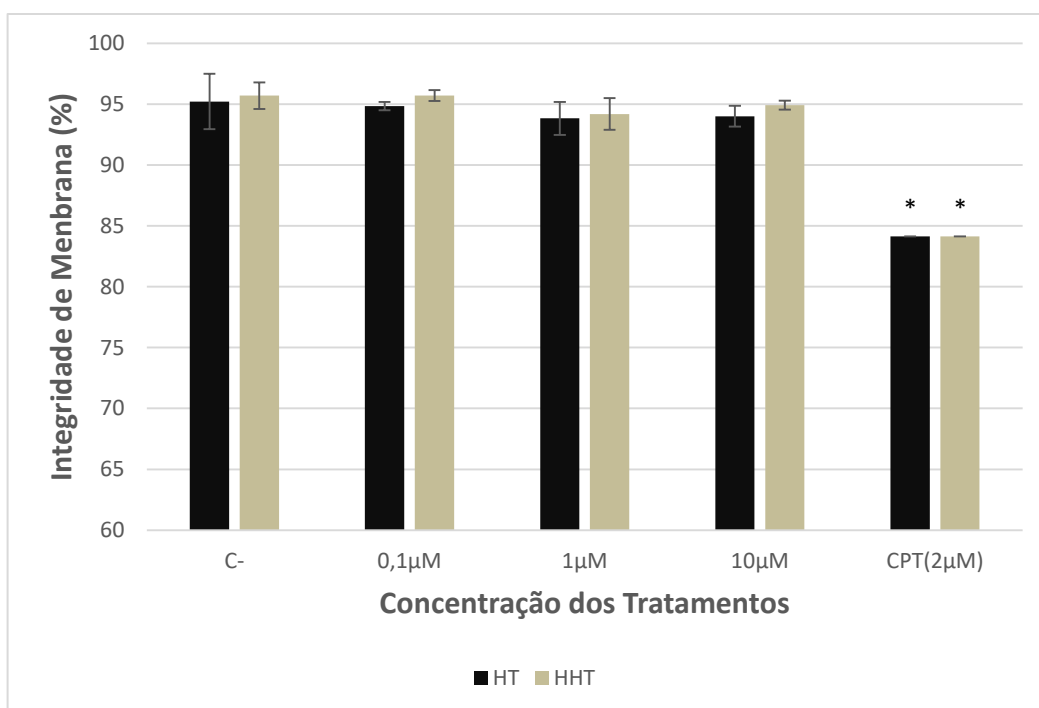
13 As porcentagens obtidas para HepG2/C3A no ensaio com o composto HT
14 variaram de 93,8 a 94,8%. E para os testes com o composto HHT variaram de 94,1 a
15 95,7%. Sendo de 84,01% de integridade nas células no controle positivo (Figura 4).

16



1

2 **Figura 3:** Integridade de Membrana na linhagem HuH-7.5, tratada com os compostos
 3 HT e HHT nas concentrações de (0,1-10 μM) após 24h, CPT = Camptotecina, (*)
 4 mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao Controle
 5 negativo (C). HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.



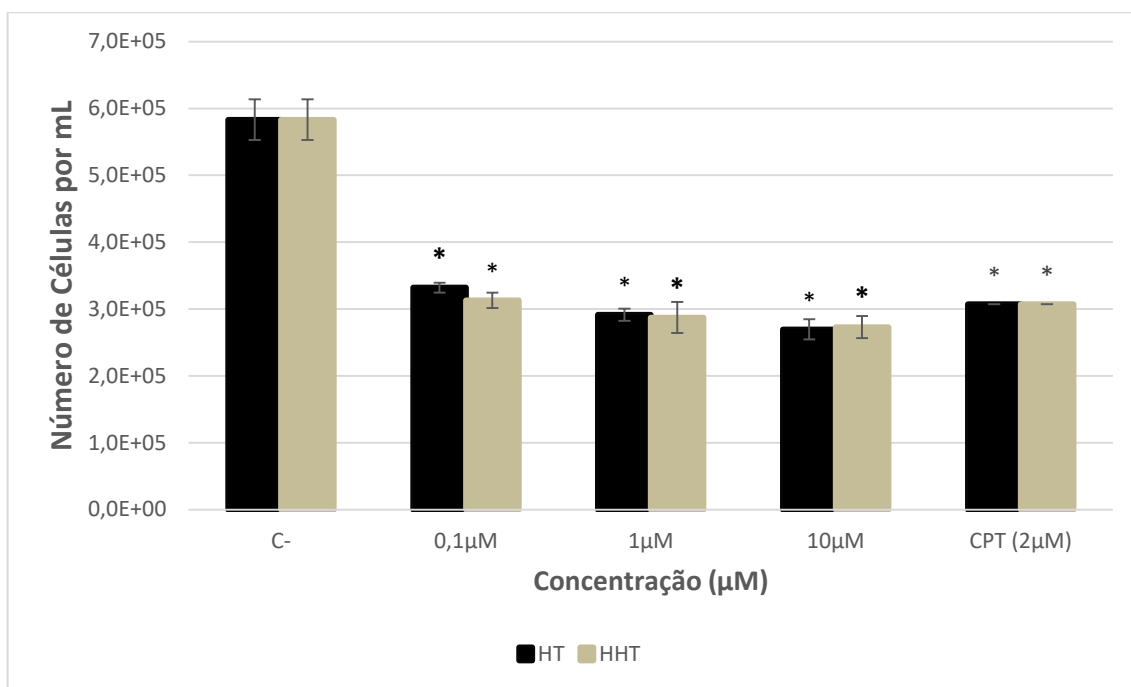
6 **Figura 4:** Integridade de Membrana na linhagem HepG2/C3A, tratada com os
 7 compostos HT e HHT nas concentrações de (0,1-10 μM) após 24h, CPT =
 8 Camptotecina, (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação
 9 ao Controle negativo (C). HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.

1 3.2.2 Contagem celular

2 A contagem de células realizada em citometria mostrou uma grande redução no
3 número de células, aproximadamente a metade, nas duas linhagens celulares com os
4 dois compostos estudados, apresentando um perfil similar entre essas. Nas
5 fotomicrografias (Figura 9) das culturas pode ser observada pouca diferença visual entre
6 os tratamentos na linhagem HuH-7.5 e há uma diferença no número de células na
7 linhagem HepG2/C3A, como pode ser observado na Figura 5.

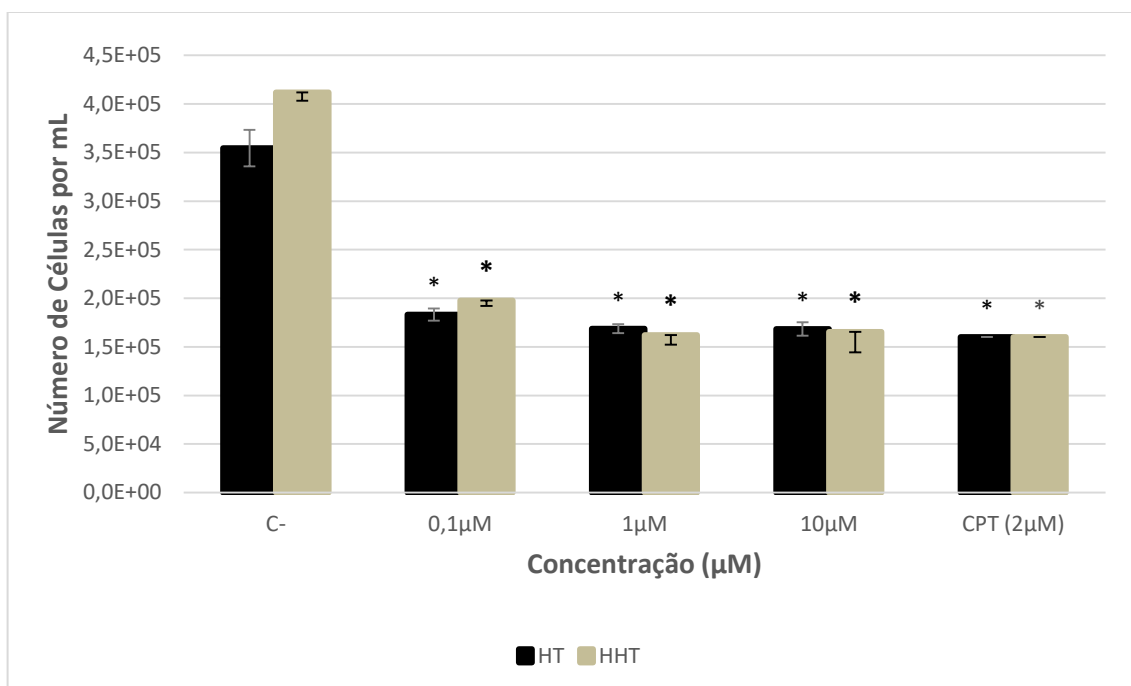
8 A média do número de células obtido na linhagem HuH-7.5 quando tratada com
9 HT por 24h variaram de 2,6 a $3,3 \times 10^5$ /mL;(controle = $5,8 \times 10^5$ /mL). Já no tratamento
10 com o composto HHT as médias variaram de 2,7 a $3,1 \times 10^5$ /mL (controle = $5,8 \times 10^5$ /mL)
11 (Figura 5).

12 Na linhagem HepG2/C3A os valores das concentrações de células para os
13 tratados com HT por 24h variaram de 1,6 a $1,8 \times 10^5$ /mL (controle = $3,5 \times 10^5$ /mL). E com
14 o composto HHT variaram de 1,6 a $1,9 \times 10^5$ /mL (controle = $4,1 \times 10^5$ /mL) (Figura 6).



1

2 **Figura 5:** Concentração celular/mL na linhagem HuH-7.5, tratadas 24h com os
 3 compostos HT e HHT nas concentrações de (0,1-10 μM). Camptotecina; controle
 4 positivo (CPT), (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em
 5 relação ao Controle negativo (C). HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.



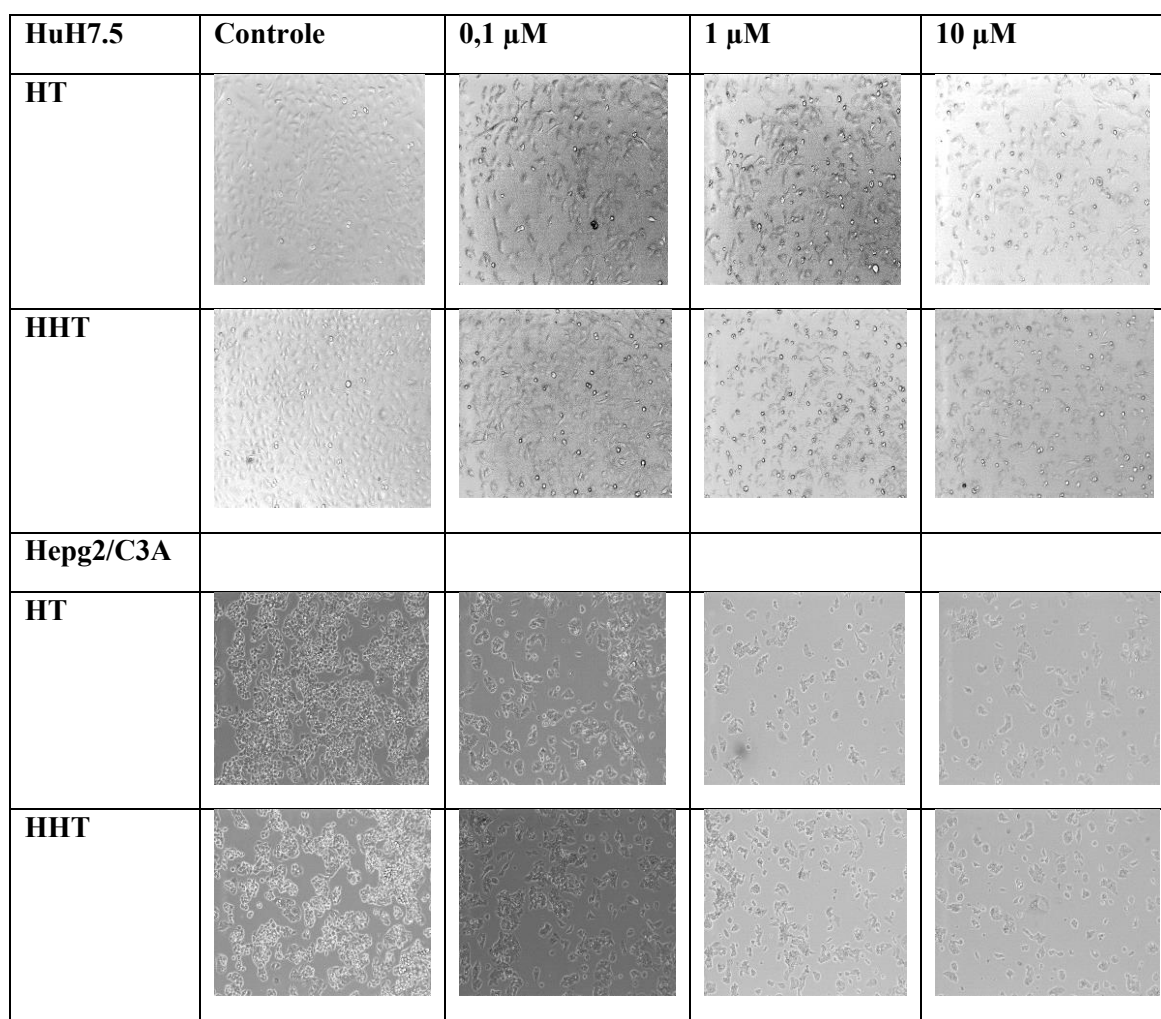
6

7 **Figura 6:** Concentração celular/mL com a linhagem HepG2/C3A, tratadas 24h com os
 8 compostos HT e HHT nas concentrações de 0.1-10 μM. Camptotecina; controle positivo
 9 (CPT), (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao
 10 Controle negativo (C). HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.

11

12

1



2 **Figura 7:** Imagens da linhagem HuH-7.5 e C3A pelo microscópio EVOS FL, 200X, mostrando
3 a densidade celular após tratamento de 24 horas com HT e HHT. HT = harringtonina; HHT =
4 homoharringtonina. C = controle.

5

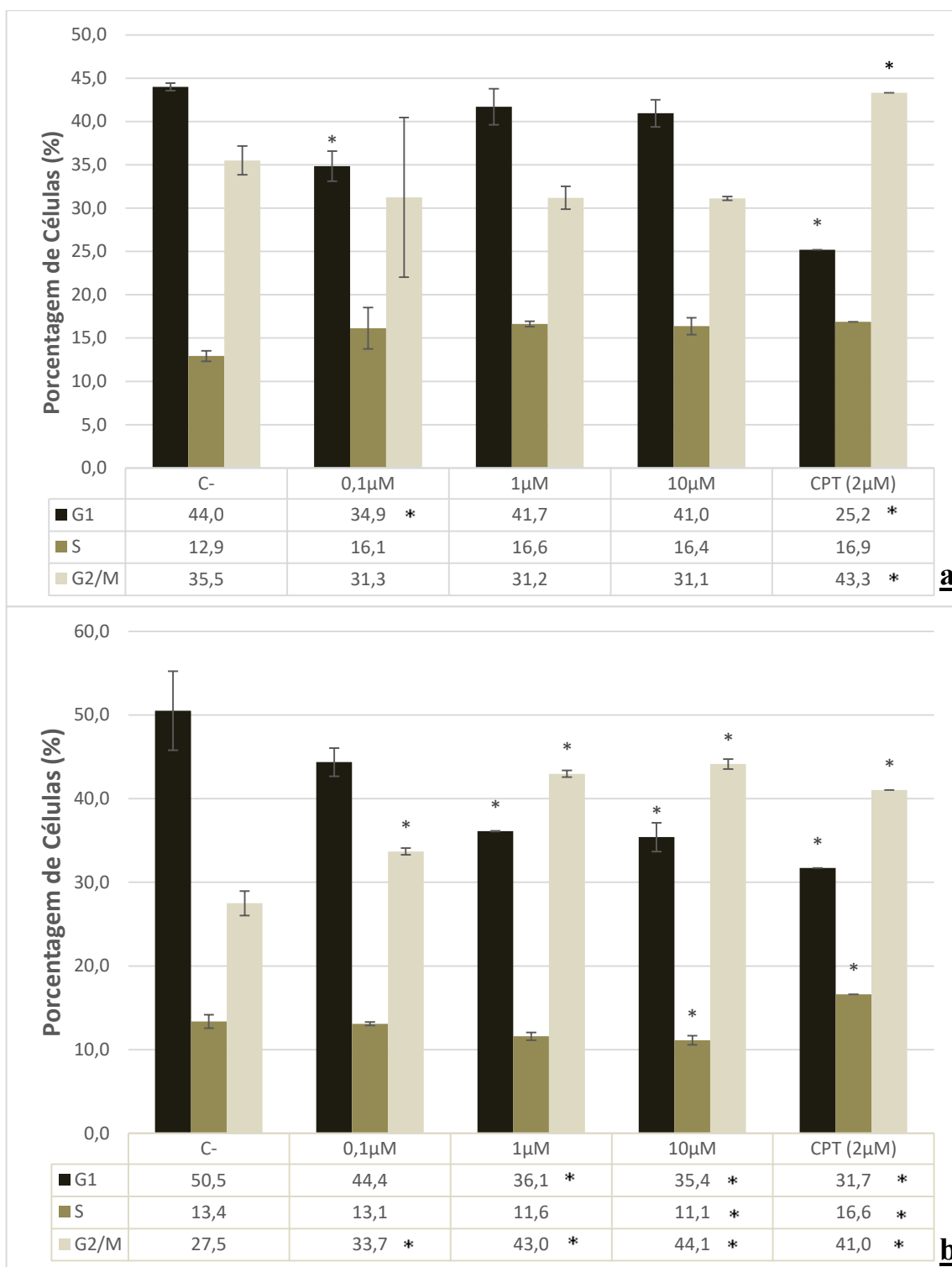
6 3.2.3 Ciclo celular

7 Nos resultados obtidos no ensaio de ciclo celular observou-se que o tratamento
8 com os compostos HT e HHT alteraram as fases do ciclo celular nas duas linhagens
9 celulares estudadas.

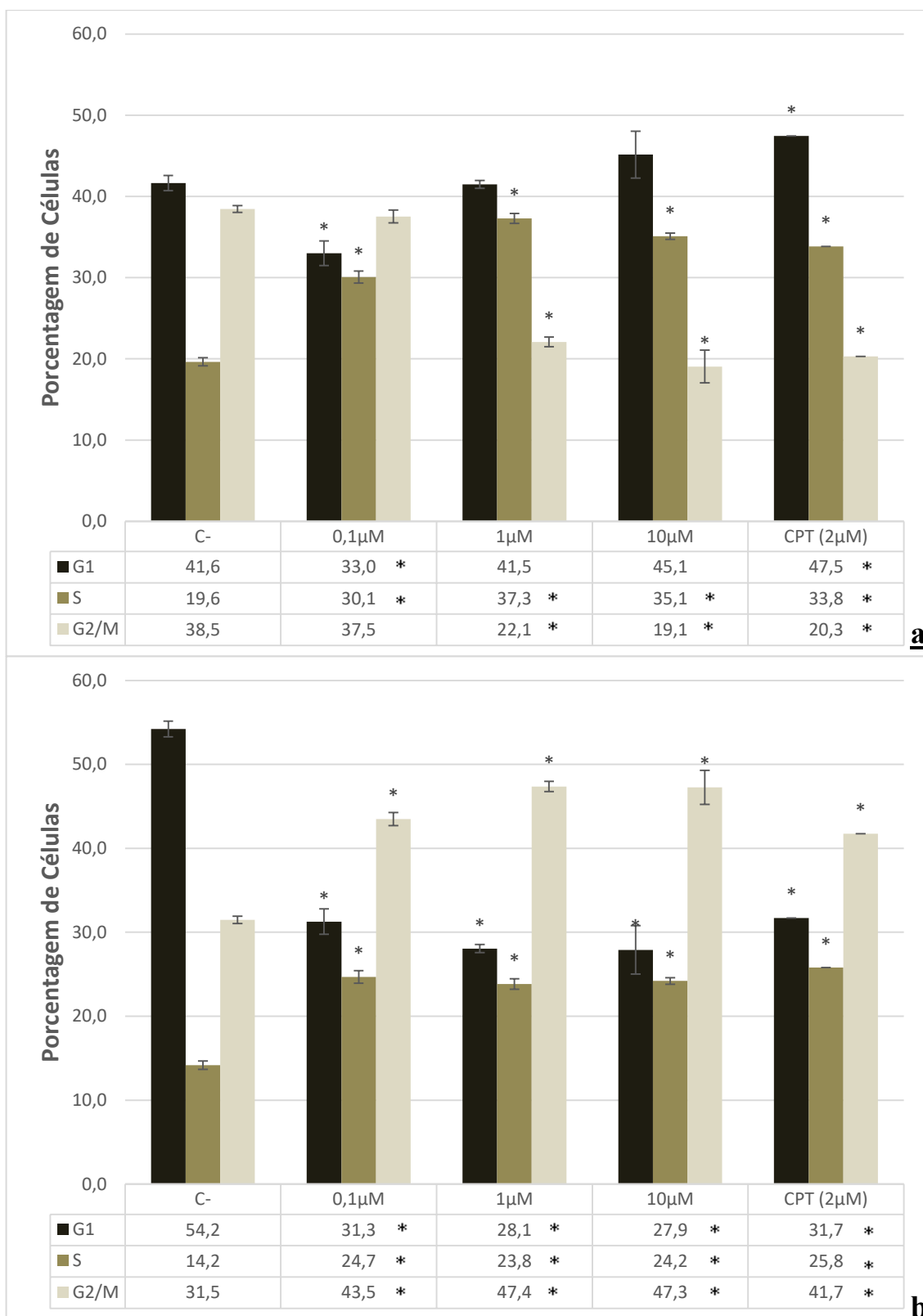
10 Na linhagem HuH-7 quando tratada com o composto HT houve uma diminuição
11 ($p < 0,01$) do estágio G1 na concentração de 0,1 μM (34,9%), em comparação ao controle
12 (44%). Já com o composto HHT nesta mesma linhagem houve um aumento ($p < 0,01$) de
13 células no estágio em G2/M em todas as concentrações, 0,1 μM (33%), 1 μM (43%) e
14 em 10 μM (44,1%) em comparação ao controle (27,5%). (Figura 8).

1 Já na linhagem HepG2/C3A foi observado diferença de respostas entre os
2 tratamentos com compostos HT e HHT. Quando as células foram tratadas com HT
3 houve aumento significativo ($p < 0,01$) de S em todas as concentrações 0,1 μM (30,1%),
4 1 μM (37,3%) e em 10 μM (35,1%) em comparação ao controle (19,3%). (Figura 9-a)

5 Com o composto HHT esta linhagem respondeu diferentemente, havendo
6 aumento de G2/M S em todas as concentrações 0,1 μM (43,5%), 1 μM (47,4%) e em 10
7 μM (47,3%) em comparação ao controle (31,5%). (Figura 9-b)



1 **Figura 8:** Análise de Ciclo Celular na linhagem HuH-7.5, tratadas 24h com os
 2 compostos HT (a) e HHT (b) nas concentrações de (0,1-10 μ M). HT= Harringtonina;
 3 HHT= Homoharringtonina. CPT= Camptotecina como controle positivo, (*) mostra
 4 resultados estatisticamente significativos ($p < 0,01$) em relação ao Controle (C).



1 **Figura 9:** Análise de Ciclo Celular na linhagem HepG2/C3A, tratadas 24h com os
 2 compostos HT (a) e HHT (b) nas concentrações de (0,1-10 μM). HT= Harringtonina;
 3 HHT= Homoharringtonina. CPT= Camptotecina como controle positivo, (*) mostra
 4 resultados estatisticamente significativos ($p < 0,01$) em relação ao Controle (C).

1 3.2.4 Apoptose

2

3 Na linhagem HuH-7.5 tratada com HT houve um aumento de 3 e 4x no número
4 de células em apoptose inicial nas concentrações de 1 e 10 μM respectivamente. Na
5 menor concentração testada (0,1 μM) não houve diferença em relação ao controle.
6 Também houve um aumento significativo ($p < 0,05$) em apoptose tardia na concentração
7 de 1 μM , apresentando a taxa de 1,73% (controle = 0,44%) (Figura 10-a).

8 Quando a linhagem HuH-7.5 foi tratada com HHT, houve uma resposta
9 estatisticamente ($p < 0,05$) mais elevadas nas concentrações 0,1 μM e 10 μM em relação
10 ao tratamento com HT, sendo as taxas de apoptose inicial de 13,4% para 0,1 μM ;
11 23,2% para 1 μM e 30,8% para 10 μM (controle = 7,4%). Houve também um aumento
12 significativo ($p < 0,05$) em apoptose tardia e necrose para 1 μM e 10 μM , sendo os
13 valores para cada concentração de 2,8% e 0,6%, 3,25% e 0,58%, respectivamente
14 (controle = 1,4% e 0,27%) (Figura 10-b).

15 Na linhagem HepG2/C3A tratada com HT foi observado um aumento
16 significativo ($p < 0,05$) na apoptose inicial tanto na concentração de 1 μM (18,1%),
17 quanto na de 10 μM (13,6%), em relação ao controle (7,3%). As porcentagens de
18 apoptose tardia e necrose não tiveram seus valores alterados com este composto (Figura
19 11-a).

20 Quando a linhagem HepG2/C3A foi tratada com HHT, este composto mostrou-
21 se estatisticamente ($p < 0,05$) aumento de apoptose do que HT, como foi observado no
22 outro modelo celular estudado (HuH-7.5), sendo os valores de apoptose inicial de
23 15,2% para a concentração de 0,1 μM , 23% para 1 μM e 20,1% para 10 μM (controle =
24 8,9%). As porcentagens de apoptose tardia e necrose não foram alteradas por
25 tratamentos com HHT (Figura 11-b).

26

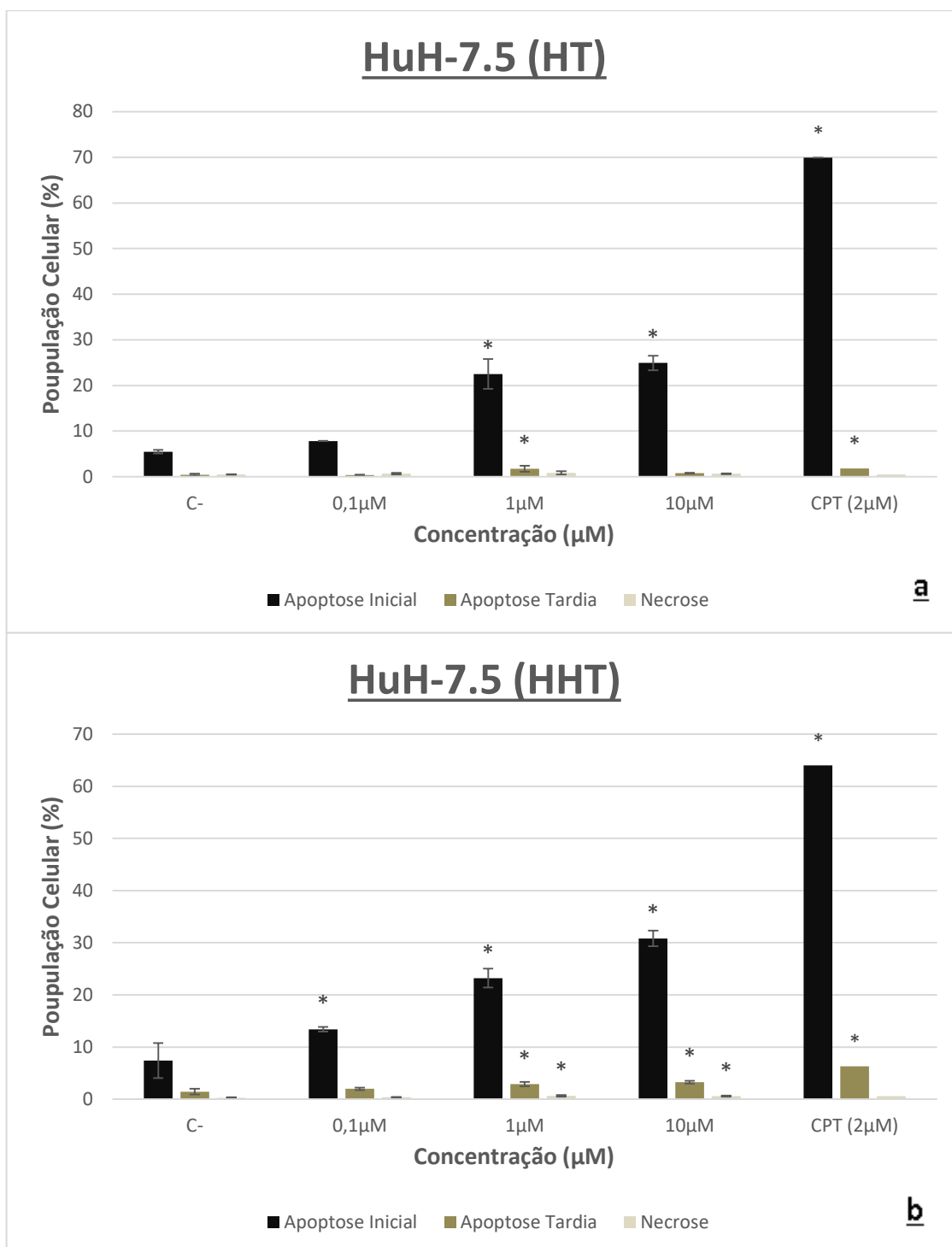
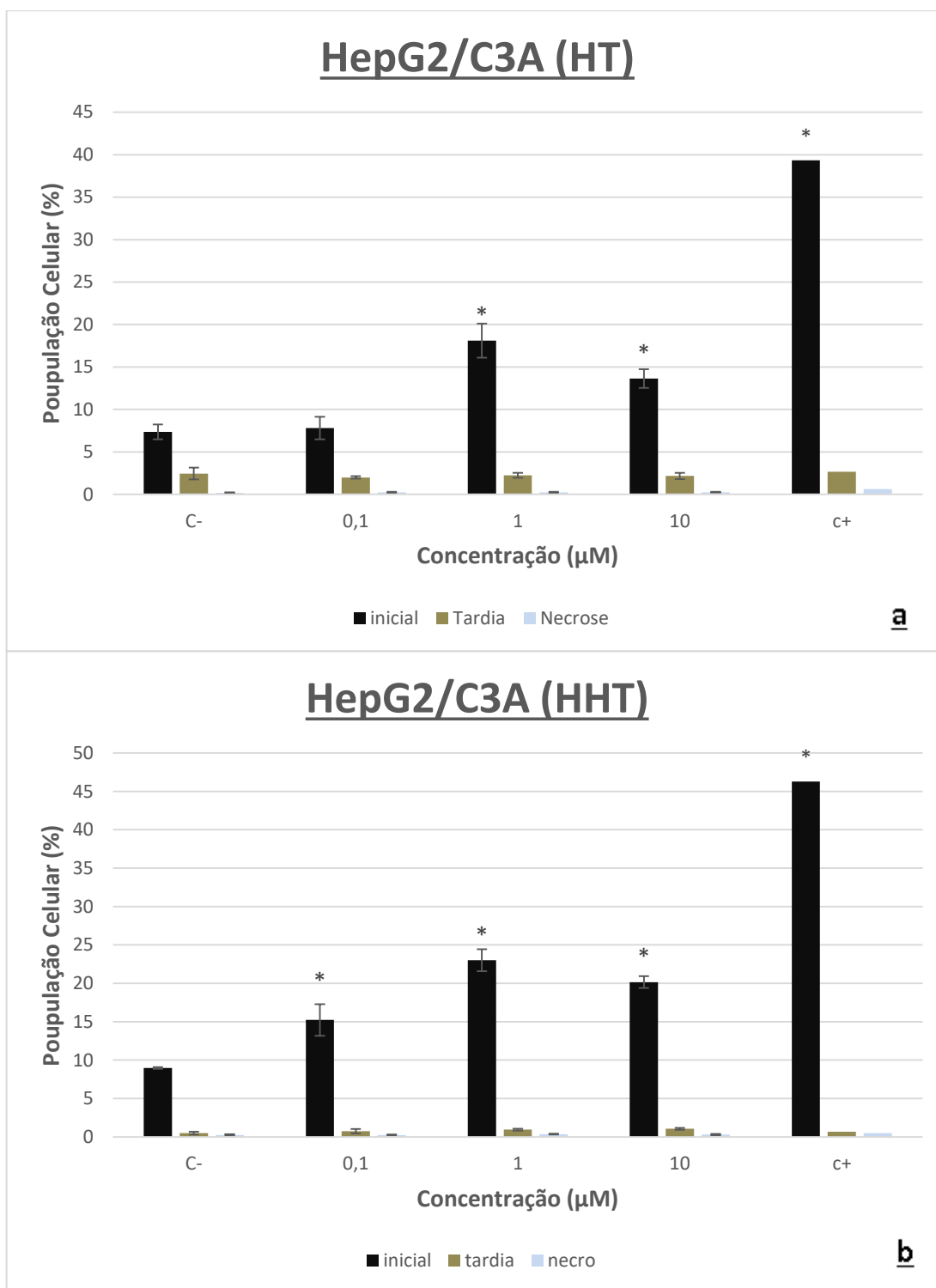


Figura 10: Porcentagem de células obtidas no ensaio de apoptose na linhagem HuH-7.5, tratadas 24h com os compostos HT (a) ou HHT (b) nas concentrações de (0,1-10 µM). CPT= Camptotecina; (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao Controle (C-). HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.



1

2

3 **Figura 11:** Porcentagem de células obtidas no ensaio de apoptose na linhagem
 4 HepG2/C3A, tratadas 24h com os compostos HT (a) ou HHT(b) nas concentrações de
 5 (0,1-10 μM). CPT= Camptotecina; (*) mostra resultados estatisticamente significativos
 6 (p<0,05) em relação ao Controle (C-). HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.

1 3.3. Cometa

- 2 No teste de genotoxicidade (Figura 12) não foi observado danos causados ao
3 material genético, tanto na linhagem HuH-7.5 como em HepG2/C3A. .

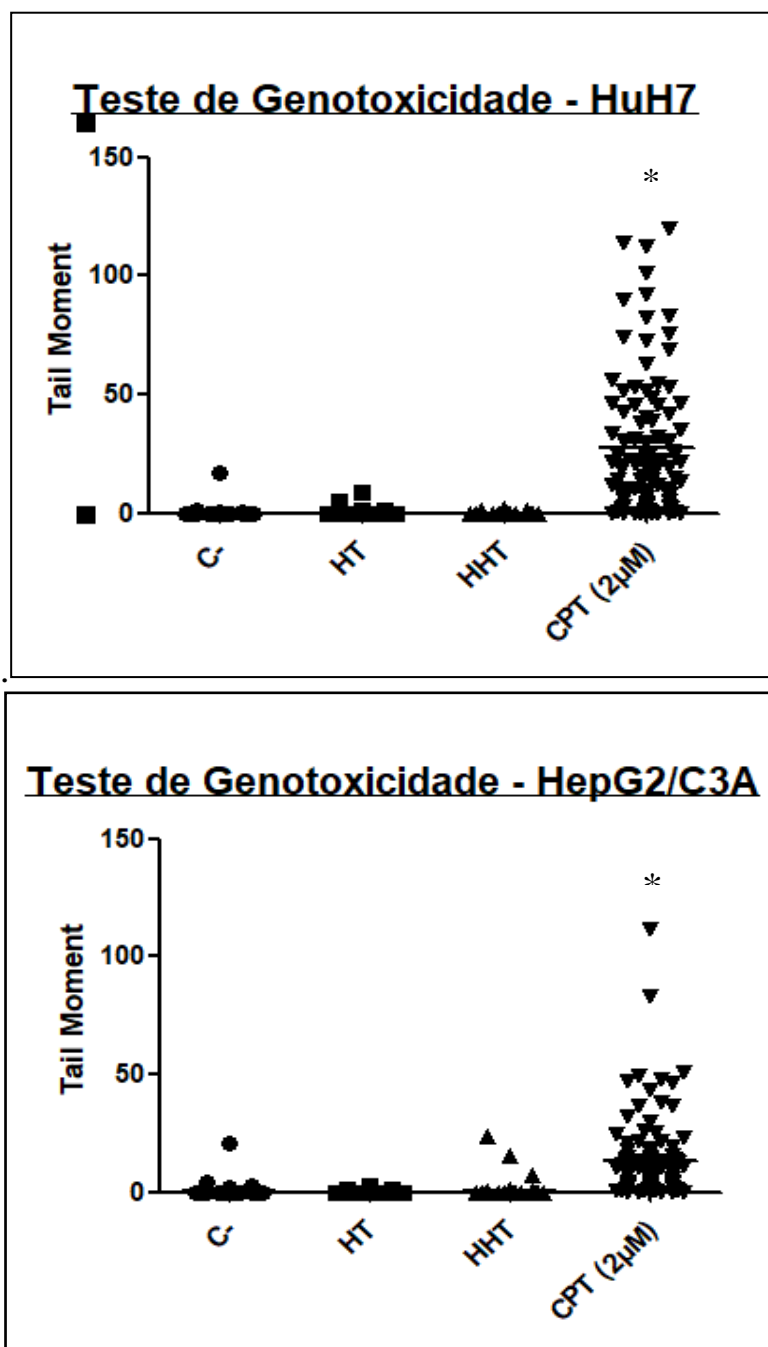


Figura 12: Tail Moment obtidos no ensaio do cometa na linhagem HuH-7.5 e HepG2/C3A, tratada por 3h com os compostos HT ou HHT na concentração de 10 µM. CPT=Camptotecina (CPT). (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em relação ao Controle (C) HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.

1 3.4. RT-qPCR

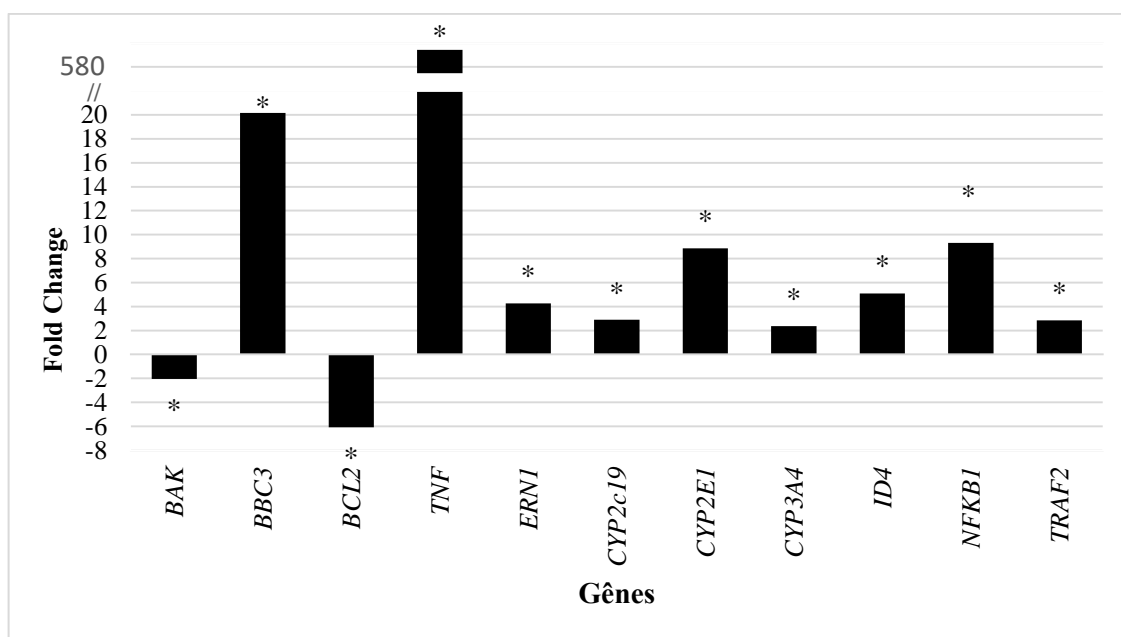
2 Na linhagem HuH-7.5, os tratamentos com HT e HHT inibiram a expressão de
3 mRNA dos genes *BAK* e *BCL2* que tiveram sua expressão suprimida significativamente,
4 sendo de 2 e 6 vezes menores quando tratadas com HT, e 2 e 5 vezes com HHT,
5 respectivamente (Figura 13). Já os mRNA para os genes *BBC3*, *TNF* e *TRAF2*
6 mostraram superexpressos significativamente quando esta linhagem foi tratada, tanto
7 com HT quanto HHT (Figura 13). Os valores foram de 20, 613 e 3 vezes maiores do
8 que o controle para o tratamento com HT, e para o composto HHT foram de 17, 920 e 4
9 vezes mais expressos do que o controle, respectivamente. Alguns mRNAs de genes de
10 metabolismos se mostraram superexpressos significativamente em HuH-7.5 tratadas
11 com HT, sendo para *CYP2E1* 9 vezes, para *CYP3A4* 2 vezes e para *CYP2C19* 2 vezes
12 mais expressos que o grupo controle. Para o tratamento com o composto HHT
13 observou-se um aumento significativo para os mesmos mRNAs, sendo de 12 vezes para
14 o gene *CYP2E1*, 3 vezes para o gene *CYP3A4* e 8 vezes para o *CYP2C19* em relação ao
15 controle (Figura 13).

16 Outros mRNAs foram superexpressos significativamente nesta linhagem sendo
17 eles o do gene *NFKB1* que teve um aumento de 9 vezes em ambos tratamentos (HT e
18 HHT), *ID4* que aumentou 5 vezes também em ambos tratamentos (HT e HHT), e *ERNI*
19 que aumentou 4 vezes no tratado com HT e 5 vezes para o tratamento com HHT
20 (Figura 13).

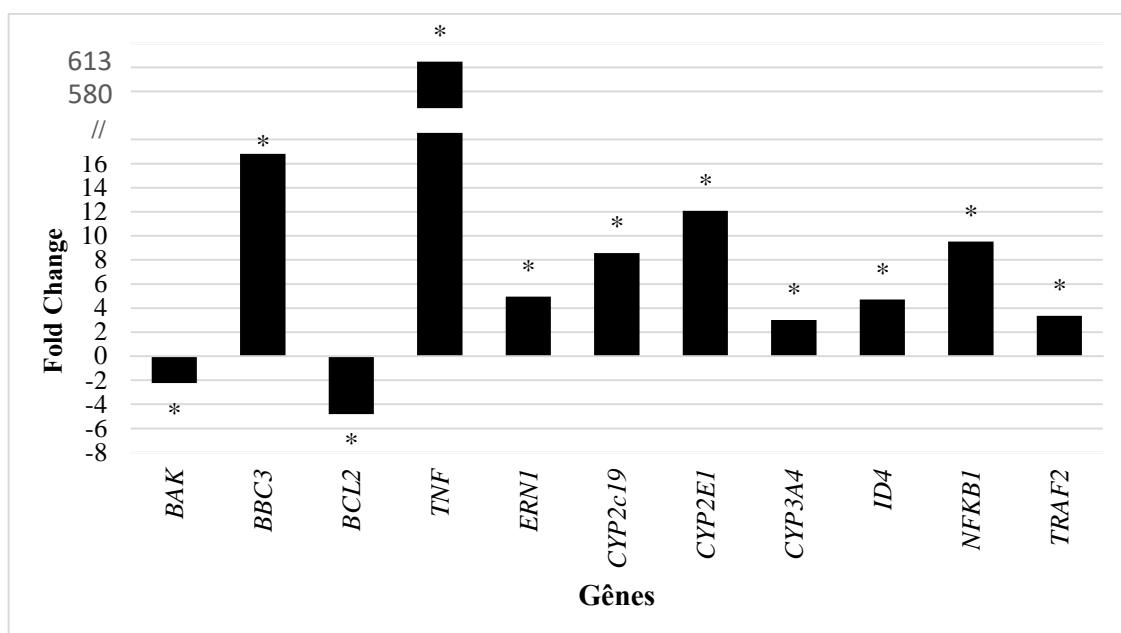
21 Os outros genes testados (*CASP3*, *CASP8*, *CYP2D6*, *EIF2AK3*, *MYC*, *mTOR*,
22 *BCN1*, *CDKN1A* e *TP53*) não houve alterações em relação ao controle.

23 Em HepG2/C3A houve um aumento significativo de 2 vezes no mRNA do gene
24 *CDKN1A* em ambos tratamentos (HT e HHT) em relação ao controle. Em relação aos
25 mRNAs dos genes de metabolismo houve um aumento significativo de 10 vezes para
26 *CYP2E1* para o composto HT e 9 vezes para o HHT (Figura 14). Para os mRNA do
27 gene *CYP2C19* houve um aumento significativo de 6 vezes em ambos tratamentos (HT
28 e HHT). O mRNA do gene *BBC3* foi superexpresso significativamente em 16 vezes no
29 tratamento com HT e 12 vezes no tratamento com HHT (Figura 14). Para o mRNA do
30 gene *TNF* houve uma superexpressão significativa de 2996 vezes em ambos tratamentos
31 (HT e HHT). Para o mRNA do gene *TRAF2* houve um aumento significativo de 12
32 vezes no tratamento com HT e de 10 vezes com HHT. Apenas no tratado com HT foi
33 observado um aumento significativo de expressão de 2 vezes no mRNA do gene da

1 *Caspase 3*. Tanto no tratado com HT quanto com HHT houve um aumento significativo
 2 da expressão em 3 vezes para o mRNA do gene *ID4* e de 2 vezes para o mRNA do gene
 3 *EIF2AK3*. Para o mRNA do gene *ERNI* houve uma superexpressão significativa de 14
 4 vezes para o tratamento com HT e de 15 vezes com HHT. Houve um aumento
 5 significativo do mRNA do gene *NFKB1* de 10 vezes com o tratamento com HT e 9
 6 vezes com HHT.



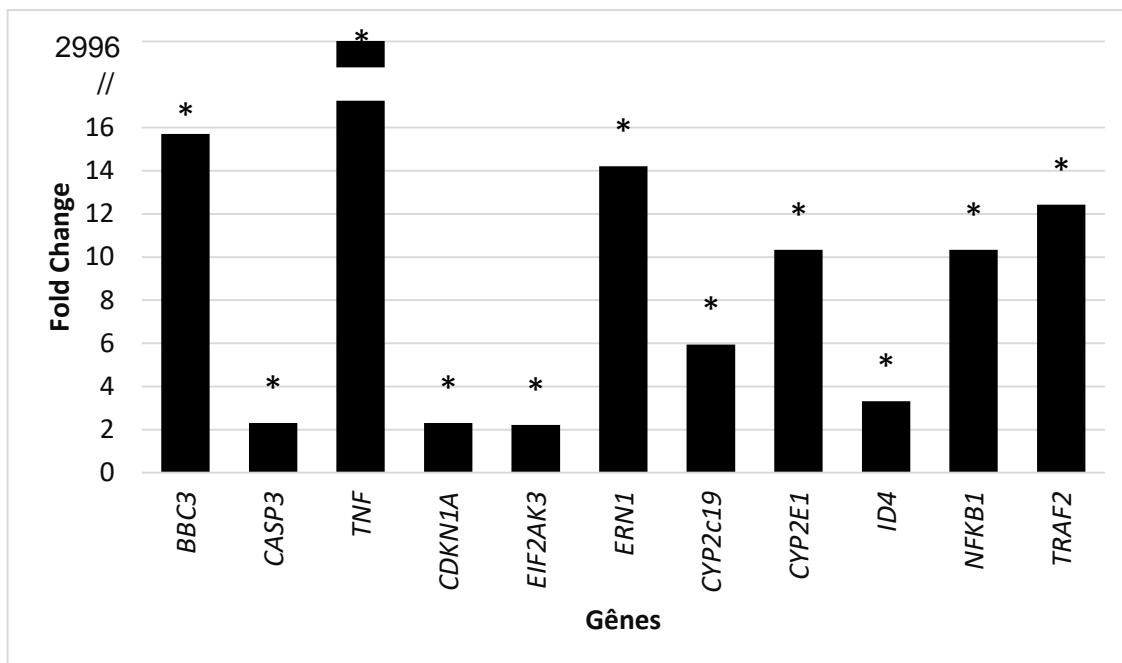
7



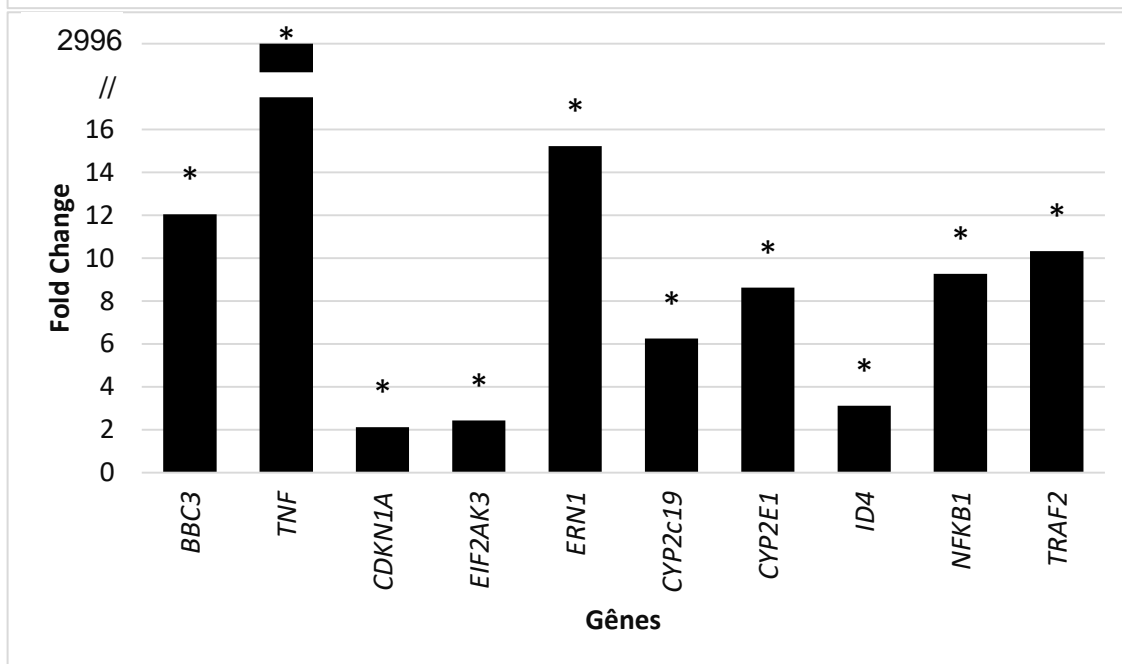
8

9 **Figura 13:** Expressão relativa de mRNA de genes relacionados a apoptose (*BAK*,
 10 *BBC3*, *BCL2*, *TNF*), estresse de retículo (*ERNI*), metabolismo (*CYP2C19*, *CYP2E1*,
 11 *CYP3A4*) e proliferação (*ID4*, *NFKB1*, *TRAF2*) na linhagem HuH-7.5 tratada com os
 12 compostos HT ou HHT na concentração de 5 μ M por 12h. HT = harringtonina; HHT =
 13 homoharringtonina.

1



2



3

4 **Figura 14:** Expressão relativa de mRNA de genes relacionados a apoptose (*BBC3*,
5 *CASP3*, *TNF*), ciclo (*CDKN1A*), estresse de retículo (*EIF2AK3*, *ERN1*), metabolismo
6 (*CYP2C19*, *CYP2E1*) e proliferação (*ID4*, *NFKB1*, *TRAF2*) na linhagem HepG2/C3A
7 tratada com os compostos HT ou HHT na concentração de 5 μ M por 12h. HT =
8 harringtonina; HHT = homoharringtonina.

1 4. DISCUSSÃO

2
3 Os fitoquímicos têm sido utilizados há milhares de anos e são geralmente
4 reconhecidos pelo seu valor medicinal. Extensas pesquisas dentro das duas últimas
5 décadas, de nosso laboratório e outros indicam que existem fitoquímicos que podem
6 prevenir várias doenças crônicas, incluindo câncer, diabetes, cardiovascular, pulmonar,
7 neurológica e doenças auto-imunes. Por exemplo, estabeleceu-se o potencial
8 antiproliferativo da piperlongumine, goniotalamina e plumbagina em modelos *in vitro*.
9 Além disso, o mecanismo molecular antiproliferativo pelo qual estes agentes atuam
10 também é cada vez mais evidente. O atual trabalho descreve os principais efeitos de
11 dois compostos, o HT e o HHT, e correlaciona os seus mecanismos de ação e seu
12 potencial antiproliferativo no câncer.

13 Em nosso trabalho foi observado um efeito de morte celular induzida pelos
14 compostos estudados em ambas linhagens celulares, na investigação da causa de morte
15 celular ela não se deu por conta de danos ao DNA, que apresentou alteração diferente no
16 ciclo celular das linhagens e com perfis diferentes para os compostos (HT e HHT). E em
17 nossa expressão de mRNA as linhagens se comportaram de maneira igual quando
18 tratadas com os compostos, porém entre elas a resposta foi diferente, contudo as duas
19 linhagens apresentaram uma marcada super expressão de *TNF*. A citotoxicidade do
20 efeito dos compostos sobre essas linhagens se mostraram não-dependente da relação
21 dose-resposta .

22 No teste de MTT, que é semelhante ao ensaio com resazurina, onde envolve
23 metabolismo mitocondrial reduzindo esses compostos em células viáveis, desse modo
24 podendo mensurar a citotoxicidade de compostos (GONZALES; TARLOFF, 2001),
25 outras linhagens também mostraram pelo teste um efeito antiproliferativo resultante do
26 tratamento com HT, no caso de células da glia da retina expostas a concentrações entre
27 0,23 μ M a 3,76 μ M (CAI, et al. 2001), ou HHT como nas linhagem HL-60 de células de
28 leucemia promielocíticas expostas a concentração de 0,02 μ M (NI, et al 2003), também
29 em múltiplas linhagens de mieloma: U266, RPMI8226, MM.1S, MM.1R que mostraram
30 seus valores aproximados de IC₅₀ em seus testes foram de 0,075 μ M para as duas
31 primeiras linhagens e 0,021 μ M nas ultimas (MENG, et al 2008), redução de viabilidade
32 também foi visto na linhagem MUTZ-1 de linfoma de burkitt, MOLT4 e K562 (JIE, et
33 al 2007). Segundo Jie et al. (2007) a redução de viabilidade para algumas linhagens é

1 mais efetiva do que em outras, como por exemplo, na linhagem de osteosarcoma U-20S
2 que quanto tratada com 0,367 μ M de HHT o efeito foi muito pequeno em comparação a
3 outras linhagens.

4 Corroborando com o ensaio de viabilidade celular deste trabalho a contagem de
5 células realizada mostrou uma redução nos poços tratados com HT ou HHT na
6 concentração de 0,1 μ M a 10 μ M, essa redução foi de aproximadamente de 50% em
7 comparação ao grupo controle em ambas as linhagens celulares e compostos. Portanto,
8 observa-se que HT e HHT estavam reduzindo o número de células e não alterando o
9 metabolismo mitocondrial. Sabe-se que os alcaloides estudados têm como principal
10 forma de ação a inibição da tradução de proteínas, ligando-se aos ribossomos,
11 prejudicando assim o alongamento das moléculas proteicas. A HT também altera a
12 síntese de mRNA de genes de proteínas centroméricas (NOVOTNY, L. et al. 2016),
13 sendo possivelmente esses os eventos que causam a morte dessas células estudadas.

14 Nossa investigação continuou com a análise do dano de membrana plasmática
15 das linhagens estudadas como um efeito de citotoxicidade dos compostos HT e HHT.
16 Contudo, para os dois compostos na linhagem HuH-7.5 houve uma redução da
17 integridade em nosso trabalho. No estudo de Philipp et al. (2015) foi testado HHT nas
18 linhagens Mz-ChA-1, HT-29, A818-4 e Pt45P1 tratadas nas concentrações semelhantes
19 as nossas (variaram de 0,01 μ M a 1 μ M), e foi observado um aumento de perda de
20 integridade apenas em A818-4. Desse modo, o efeito dos compostos HT e HHT na
21 redução de viabilidade e número de células não está ligado à integridade de membrana..
22 Esta redução da integridade da membrana na linhagem HuH-7.5 pode estar ligada as
23 taxas observadas de necrose nos mesmos tratamentos de (1 μ M e 10 μ M), pois na
24 necrose celular ocorre a perda da integridade de membrana, assim produzindo uma
25 resposta inflamatória (MELAMED, et al. 2015), ou também que membros da família
26 TNF (Fator de Necrose Tumoral) podem estimular tanto a apoptose quanto necrose
27 (MORIOKA, et al 2014).

28 Em nosso RT-qPCR o que mais chama atenção foi a superexpressão relativa de
29 *TNF* em ambas as linhagens celulares tratadas com os compostos HT e HHT. Este gene
30 dá origem a uma citocina que está ligada a processos inflamatórios celulares (HAN,et
31 al. 2000) e apoptose (WANG, et al 2009). Assim é possível que este seja um dos pontos
32 em resposta da ação dos compostos em ambas as linhagens celulares. Pelo fato de que a
33 citocina sintetizada pelo gene *TNF* induzir a expressão do gene *BBC3*, que da origem a

1 proteína PUMA, um pró-apoptótico da família BCL-2, que pela via p53-independente
2 pode levar a célula a apoptose também mediado pelo *NF-κB*, uma vez que a ativação do
3 PUMA é realizada pela subunidade p65 da proteína NF-κB (WANG, et al. 2009). Isso
4 correlaciona uma via de sinalização celular que está presente na citotoxicidade induzida
5 pelo tratamento com HT e HHT. Além disso, foi visto na linhagem HuH-7.5 em ambos
6 compostos uma menor expressão de *BCL2*, provavelmente por resposta a inibição
7 causada pela proteína PUMA que é responsável por regular proteínas anti-apoptóticas
8 (KANG; REYNOLDS, 2009). Assim os genes induzidos *TNF* e *BBC3* e redução de
9 *BCL2* pela atuação dos compostos testados podem estar relacionadas com apoptose via
10 citometria de fluxo, onde foi observado a indução de apoptose em ambas as linhagens
11 em nosso trabalho.

12 A indução de apoptose por HT e HHT em outras linhagens celulares tem sido
13 descrita na literatura. Fang et al. (1998) observaram que HT a indução de apoptose
14 ocorre por um aumento da concentração de Ca^{2+} em regiões nucleares em células HL-60
15 (células de leucemia mieloide humana), demonstrando Ca^{2+} ser um sinalizador e
16 regulador do processo de morte celular. O aumento de Ca^{2+} na região intracelular é
17 promovido pelo TNF α resultando em apoptose (BELLOMO, et al. 1992), esses íons são
18 liberados pelo retículo endoplasmático (ER) após estresse celular, incluindo a resposta
19 da sinalização pelo TNF- α , (XU, et al. 2017). Cai et al. (2001) observaram que houve
20 indução de apoptose no tratamento com HHT nas linhagens leucêmicas MOLT-3,
21 MOLT—16, Jurkat e P12, a liberação de citocromo c pela mitocôndria e a ativação de
22 caspase, além da mudança de localização das proteínas BAX intracelularmente.

23 Resultados semelhantes foram encontrados por Yinjun et al. (2004) também
24 utilizando HHT onde o mecanismo de indução de apoptose nas linhagens celulares de
25 leucemia mieloide U937, HL-60, HEL, THP e K562 foi pela ativação da cascata de
26 caspases e a indução da proteínas BAX.

27 Já nas linhagens tumorais colorretais humanas, RKO e HT-29, o composto HHT
28 induziu a apoptose via ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL), um
29 receptor da família TNF, além da supressão de alguns genes anti-apoptóticos (*MCL-1* e
30 *cFLIP*)(BERANOVA, et al. 2013). Os nossos resultados também mostram indução de
31 apoptose com à super expressão de *TNF*. Neste trabalho evidências apontam para a
32 indução de apoptose tanto pela via intrínseca, onde há um aumento de *BBC3* e
33 diminuição de *BCL2*, quanto pela via extrínseca, sendo pelo aumento de *TNF*.

1 Não houve alteração na expressão do gene *TP53*, nem indução de danos ao DNA
2 em nosso trabalho em nenhuma linhagem. A literatura traz que a proteína p53 está
3 envolvida com a reparação de dano causado no material genético das células, havendo
4 um aumento desta proteína quando há um dano ao material genético, além de fazer com
5 que as células tenham uma parada e aumento na fase G1 do ciclo celular (KASTAN, et
6 al. 1991), (SPEIDEL, 2015). Porém no estudo de Giaccia e Kastan (1998) foi relatado
7 que a alteração de mRNA do gene *TP53* não acontece em todas as linhagens, e sim
8 apenas na modulação da sua proteína, além disso varias maneiras podem ocorrer na
9 ativação da proteína p53, sendo elas genotóxicas ou não-genotóxicas, como por
10 exemplo espécies reativas de oxigênio (EROs), onde dependendo do nível a proteína
11 pode modular tanto cascatas de reações para a apoptose celular ou também reações
12 induzindo a promoção de antioxidantes e assim promovendo a sobrevivência da célula
13 (BENSAAD; VOUSDEN, 2007). Além do envolvimento de p53 relacionado ao dano de
14 DNA, parada de ciclo e apoptose essa proteína em abordagens mais recentes também
15 esta envolvida em outras vias como no metabolismo de glicose (BENSAAD;
16 VOUSDEN, 2007). Em HuH 7.5 p53 possui mutações pontuais e deleções, com meia
17 vida de aproximadamente 240 minutos (HSU, 1993), fazendo com que se acumule no
18 citoplasma afetando seu funcionamento (BRESSAC, et al. 1990). Desse modo
19 provavelmente a resistência da linhagem HepG2/C3A (p53 selvagem) em comparação a
20 HuH7.5 nos tratamentos com HT e HHT pode estar relacionada ao modo de ação da
21 proteína p53. Desse modo podemos sugerir que qualquer ativação dessa proteínas em
22 HuH7.5 não apresenta resposta celular adequada devido as mutações ou que essas
23 mutações leve a um efeito apoptótico maior pela quantidade acumulada intracelular,
24 diferentemente da linhagem com seu p53 selvagem.

25 Em nosso estudo não houve aumento na fase G1 do ciclo celular em nenhuma
26 linhagem também sugerindo que não ocorreram danos ao DNA (LINKE, 1996). Já no
27 estagio G2/M nas duas linhagens celulares tratadas com HHT houve aumento
28 pronunciado indicando parada de ciclo, e apenas na linhagem HepG2/C3A foi alterado
29 o estagio S, este aumentado para dois tratamentos, indicando também parada em S. O
30 processo que leva a estas paradas precisa melhor elucidado, porém provavelmente possa
31 estar relacionado a principal ação de HT e HHT na alteração de síntese de proteínas em
32 eucariotos (Fresno, et al. 1977)(TSCHERNE; PESTKA, 1975), podendo ser responsável
33 pelas paradas de ciclo, em resposta o estresse de retículo causado pelos compostos, já

1 que o acúmulo de proteínas mal formadas causa alteração na homeostase do retículo
2 ativando proteínas como PERK e IRE1, que estão envolvidas e atuam no estresse de
3 retículo (OYADOMARI; MORI, 2004)(DAI; CHEN; LI, 2009).

4 Em nossa avaliação os dados de expressão aumentada de mRNA de genes de
5 estresse de retículo corroboram com esse ponto de vista. Na linhagem C3A onde foi
6 observado o aumento de *EIF2AK3* sua proteína PERK está associada a detecção de
7 proteínas malformadas, onde esta proteína ativa eIF2 que atua diminuindo a síntese de
8 proteínas e o acúmulo das mesmas, evitando assim o aumento ainda mais do estresse de
9 retículo (WEK; CAVENER, 2007). O gene *ERN1* codifica a enzima IRE1 que é
10 responsável pela detecção de estresse no retículo juntamente com PERK, e IRE1
11 também cumpre a função de se ligar em proteínas mal formadas e sinalização de cascata
12 de reações para a transcrição de genes relacionados ao estresse de retículo, propiciando
13 a sobrevivência da célula (MENDEZ, et al. 2015).

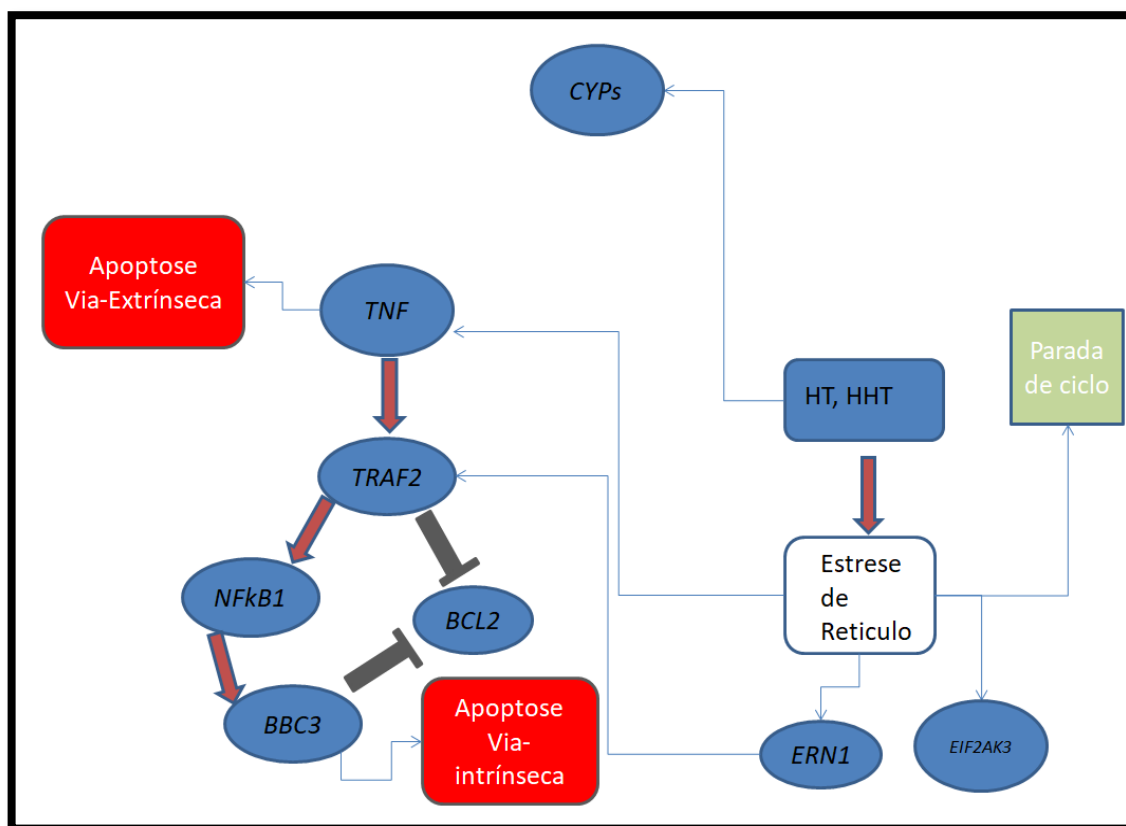
14 IRN1 pode influenciar genes pró-inflamatório dentre eles *NFKBI* quando há um
15 estresse de retículo ativando as vias do NF- κ B (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Além
16 disso, uma das isoformas de IRE1, a IRE1 α está associada ao recrutamento de TRAF2
17 que induz a supressão de BCL2 suprimindo genes anti-apoptóticos, além do próprio
18 efeito do estresse de retículo induzir receptores de morte celular, TRAIL (LURLARO,
19 R; PINEDO, C. M. 2015). Como foi visto em nosso trabalho um elevado aumento de
20 TNF que está relacionando a indução de apoptose induz também o recrutamento
21 indireto de TRAF2 e NF- κ B, em resposta a cascata de reações de apoptose. (TADA, et
22 al. 2001).

23 Observamos também uma alteração em genes de metabolismo de xenobióticos,
24 *CYP2E1*, *CYP3A4*, *CYP2C19* em HuH-7.5 e *CYP2E1*, *CYP2C19* em HepG2/C3A, as
25 quais mostram aumento desses genes, assim podendo aferir que essas linhagens estão
26 metabolizando esses xenobióticos. Esses genes podem sofrer aumento de sua expressão
27 por xenobióticos e são responsáveis por metabolizar compostos para a eliminação
28 podendo causar alguma patogenicidade, esse processo também pode causar aumento de
29 espécies de radicais livres causando danos à célula (MURRAY, M. 2006).

30 Os compostos estudados nesse trabalho mostram efeito antiproliferativo
31 significativo e em 2012, o composto homoharringtonine foi aprovado pela FDA para
32 estudos em pacientes com leucemia mieloide crônica ou avançada, mostrando um passo

1 a frente na avaliação clínica desses compostos (BADGUJAR, V. B. et al. 2016).
2 Contudo, o questionamento do uso seguro desses compostos ainda permanece. Em
3 resposta a isso testamos e observamos um aumento de mRNA do gene de proliferação
4 *ID4* em ambas as linhagens celulares testadas com os compostos e isso pode levantar
5 uma questão de segurança de uso, já que este gene é observado superexpressado em
6 vários tipos de câncer (ORSO, S. D. et al. 2010). *ID4* promove a progressão do ciclo
7 celular e funciona como um *Timer* determinando quando células normais serão
8 diferenciadas, diminuindo sua expressão quando as células forem diferenciadas
9 (KONDO; RAFF, 2000). Porém existe um pouco de controvérsia já que em algumas
10 linhagens possuem o gene *ID4* hipermetilado, contudo essas proteínas *ID4* podem
11 aumentar a tradução de mRNA de citocinas pro-angiogênicas como *IL8* e *GRO-alpha*
12 (ORSO, S. D. et al. 2010). Assim, os tratamentos com HT ou HHT poderiam ser
13 indutores de diferenciação e angiogênese tumoral, contribuindo para a evolução
14 indesejada da patologia em vez de combatê-la.

15 Desse modo podemos supor que os compostos HT e HHT, induzem as linhagens
16 HuH-7.5 e HepG2/C3A a apoptose pela via-extrínseca pelos receptores de *TNF*
17 (mRNA), e intrínseca pelo aumento de mRNA de *BBC3* e diminuição de *BCL2*, além
18 destes compostos promoverem estresse de retículo sugerido pela sua principal ação de
19 inibição da tradução e alongamento de proteínas, observado por nós no aumento do
20 mRNA dos genes *ERN1* e *EIF2AK3*, pois suas proteínas estão ligadas ao recrutamento
21 de proteínas pró-inflamatórias como *NF-κB* e *TRAF2*, sendo esta última atuando
22 indiretamente por suprimir *BCL2*. Observamos também a sinalização de morte por *TNF*
23 e que este também induz o aumento de mRNA do gene *BBC3* indiretamente pela
24 proteína *NF-κB*. Os compostos também estimularam a expressão de mRNA de genes de
25 metabolismo de xenobióticos nas linhagens estudadas, e também alterações no ciclo
26 celular, que provavelmente foram alterados pelo estresse de retículo (Figura 15). A
27 mutação em *p53* na linhagem HuH7.5 parece estar correlacionada com a maior
28 efetividade antiproliferativa dos compostos nessas células.



1 **Figura 15:** Resumo Gráfico do mecanismo proposto de ação dos compostos HT e HHT nas linhagens
 2 HuH-7.5 e HepG2/C3A. HT = harringtonina; HHT = homoharringtonina.

Apenas há alteração na modulação proteica do gene TP53, proteica.

REFERÊNCIAS

- 1
2
3 BADGUJAR, V.B. et al. Homoharringtonine: A nascent Phytochemical for Cancer
4 Treatment (Review). **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, v. 5,
5 n. 1, p. 421-432, 2016.
6
7 BARTEK, J.; LUKAS, J. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer.
8 **Cancer Cell**, v. 3, p. 421-429, 2003.
9
10 BENSAAD, K.; VOUSDEN, K. H.; p53: new roles in metabolism. **Cell Biology**, v. 17,
11 n. 6, p. 286-291, 2007.
12
13 BERANOVA, L. et al. The plant alkaloid and anti-leukemia drug homoharringtonine
14 sensitizes resistant human colorectal carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via
15 multiple mechanisms. **Apoptosis**, v. 18, p. 739-750, 2013.
16
17 BELLOMO, G. et al. Tumor Necrosis Factor α Induces Apoptosis in Mammary
18 Adenocarcinoma Cells by an Increase in Intranuclear Free Ca^{2+} Concentration and
19 DNA Fragmentation. **Cancer Research**, v. 52, p. 1342-1346, 1992.
20
21 BRESSAC, B. et al. Abnormal structure and expression of p53 gene in human
22 hepatocellular carcinoma. **Medical Sciences**, v.87, p. 1973-1977, 1990.
23
24 BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative Stress. **Best Practice & Research Clinical**
25 **Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, p. 287-299, 2011.
26
27 CAI, J.P. et al. Cytotoxic effects of antiproliferative agents on human retinal glial cells
28 in vitro. **International Ophthalmology**, v. 24, p. 225-231, 2001.
29
30 CAI, Z. et al. Apoptotic response to homoharringtonine in human wt p53 leukemic cells
31 is independent of reactive oxygen species generation and implicates Bax translocation,
32 mitochondrial cytochrome c release and caspase activation. **Leukemia**, v. 15, p. 567-
33 574, 2001.
34
35 COOKE, M.S. et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. **The**
36 **FASEB Journal**, v. 17, p.1195-1214, 2003.
37
38 CORTES, J. et al Phase 2 study of subcutaneous omacetaxine mepesuccinate
39 for chronic-phase chronic myeloid leukemia patients resistant to orintolerant of tyrosine
40 kinase inhibitors. **American Journal of Hematology**, v. 88, n. 5, p. 350-354, 2013.
41
42 DAI, R.; CHEN, R.; LI, H.; Cross-talk between PI3K/Akt and MEK/ERK pathways
43 mediates endoplasmic reticulum stress-induced cell cycle progression and cell death in
44 human hepatocellular carcinoma cells. **International Journal Of Oncology**, v. 34, p.
45 1749-1757, 2009.

46 EFFERTH, T. et al. Integration of phytochemicals and phytotherapy into cancer
47 precision medicine. **Oncotarget**. V. 8, n. 30, p. 50284-50304, 2017.
48

- 1 FANG, M. et al. Intracellular calcium distribution in apoptosis of HL-60 cells induced
2 by harringtonine: intranuclear accumulation and regionalization. **Cancer Letters**, v.
3 127, p. 113-121, 1998.
- 4
- 5 FRESNO, M.; et al. Inhibition of Translation in Eukaryotic Systems by
6 Harringtonine. **European Journal of Biochemistry**, v. 72, p. 232-330, 1977.
- 7
- 8 GIACCIA, A. J.; KASTAN, M.B.; The complexity of p53 emerging patterns from
9 divergent signals. **Genes & Development**, v. 12, p. 2973-2983, 1998.
- 10
- 11 GONZALES, R.J.; TARLOFF, J.B. Evaluation Of Hepatic Subcellular Fractions For
12 Alamar Blue And MTT Reductase Activity. **Toxicology in Vitro**, v. 15, p. 257-259,
13 2001.
- 14
- 15 HAM, R.; Highlight on the Studies of Anticancer Drugs Derived from Plants in China.
16 **Stem Cells**, v. 12, p. 53-63, 1994.
- 17
- 18 HAN, YP. et al. TNF- α stimulates activation of pro-MMP2 in human skin through NF-
19 κ B mediated induction of MT1-MMP. **Journal of Cell Science**, v. 114, p. 131-139,
20 2000.
- 21
- 22 HSU, I. C. et al. p53 gene mutation and integrated hepatitis B viral DNA sequences in
23 human liver cancer cell lines. **Carcinogenesis**, v. 14, n. 5, p. 987-992, 1993.
- 24
- 25 HUANG, MOU-TUAN.; Harringtonine, an inhibitor of initiation of Protein
26 Biosynthesis. **Molecular Pharmacology**, n. 11 p. 511-519. 1974.
- 27
- 28 INGOLIA, N.T. et al. Ribosome Profiling of Mouse Embryonic Stem Cells Reveals the
29 Complexity and Dynamics of Mammalian Proteomes. **Cell**, v. 147, p. 789-802, 2011.
- 30
- 31 JACKSON, S. P.; BARTEK, J. The DNA-damage response in human biology and
32 disease. **Nature**, v. 461, p. 1071-1078, 2009.
- 33
- 34 JIANG, T.L. et al. Comparative in vitro antitumor activity of homoharringtonine and
35 harringtonine against clonogenic human tumor cells. **Investigational New Drugs**, v. 1 p.
36 021-025, 1983.
- 37
- 38 JIE, H.; Homoharringtonine-induced apoptosis of MDS cell line MUTZ-1 cells is
39 mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. **Leukemia & Lymphoma**, v.
40 48, p. 964-977, 2007.
- 41
- 42 JIN, J. et al. Homoharringtonine-based induction regimens for patients with de-novo
43 acute myeloid leukaemia: a multicentre, open-label, randomised, controlled phase 3
44 trial. **The lancet**, v.14, p. 599-608, 2013.
- 45
- 46 KANG, M.H.; REYNOLDS, C.P. Bcl-2 Inhibitors: Targeting Mitochondrial Apoptotic
47 Pathways in Cancer Therapy. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 1126-1132, 2009.
- 48
- 49 KASTAN, M. B. et al. Participation of p53 Protein in the Cellular Response to DNA
50 Damage. **Cancer Research**, v. 51, p. 6304-6311, 1991.

- 1 KAUR, P. et al. Inhibition of Chikungunya Virus Replication by Harringtonine, a
2 Novel Antiviral That Suppresses Viral Protein Expression. **Antimicrobial Agents and**
3 **Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 155-167, 2013.
- 4 KONDO, T.; RAFF, M.; The id4 HLH protein and the timing of oligodendrocyte
5 differentiation. **EMBO journal**, v. 19, n. 9, p. 1998-2007, 2000.
- 6
- 7 KLEIN, D. K. et al. Cyclin F suppresses B-Myb activity to promote cell cycle
8 checkpoint control. **Nature Communication**, v. 6, p. 5800-5811, 2015.
- 9
- 10 KUAR, P. et al. Inhibition of Chikungunya Virus Replication by Harringtonine, a Novel
11 Antiviral That Suppresses Viral Protein Expression. **Antimicrobial Agents and**
12 **Chemotherapy**, v. 57 n. 1 p. 155-167, 2013.
- 13
- 14 LEE, M.C. et al. Aloidin-Induced cell growth arrest, cell apoptosis, and autophagy in
15 humans non-small cell lung cancer cells. **Biomarkers and Genomic Medicine**, v. 6, p.
16 144-149, 2014.
- 17
- 18 LINKE, S. P. et al. A reversible, p53-dependent G₀/G₁ cell cycle arrest induced by
19 ribonucleotide depletion in the absence of detectable DNA damage. **Genes &**
20 **Development**, v. 10, p. 934-947, 1996.
- 21
- 22 LIU, J. et al. Modeling of lung cancer by an orthotopically growing H460SM variant
23 cell line reveals novel candidate genes for systemic metastasis. **Oncogene**, v. 23, p.
24 6316-6324, 2004.
- 25
- 26 LURLARO, R.; PINEDO, C.M. Cell death induced by endoplasmic reticulum
27 stress. **FEBS Journal**, v. 283, p. 2640-2652, 2015.
- 28
- 29 MCMILLIAN, M.K.; et al. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic
30 cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 18, p. 157-173, 2002.
- 31
- 32 MELAMED, J.R.; et al. Elucidating the Fundamental Mechanisms of Cell Death
33 Triggered by Photothermal Therapy. **ACS Nano**, v. 9, n. 1, p. 6-11, 2015.
- 34
- 35 MENDEZ, A. S.; et al. Endoplasmic reticulum stress-independent activation of unfolded
36 protein response kinases by a small molecule ATP-mimic. **eLife**, v. 4, p. 1-27, 2015.
- 37
- 38 MENG, H. et al. Homoharringtonine inhibits the AKT pathway and induces *in vitro* and
39 *in vivo* cytotoxicity in human multiple myeloma cells. **Leukemia & Lymphoma**, v. 49,
40 n. 10, p. 1954-1962, 2008.
- 41
- 42 MEYBODI, N. M. et al. Phytochemicals in Cancer Prevention: A Review of the
43 Evidence. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, v. 10, p. 1-10, 2017.
- 44
- 45 MORIOKA, S. et al. TAK1 kinase switches cell fate from apoptosis to necrosis
46 following TNF stimulation. **Journal of Cell Biology**, v. 204, n. 4, p. 607-623, 2014.
- 47
- 48 MURRAY, M.; Altered CYP Expression and Function in Response to Dietary Factors:
49 Potential Roles in Disease Pathogenesis. **Current Drug Metabolism**, v. 7, p. 67-81,
50 2006.

- 1 NAGATA, S.; Apoptosis by Death Factor. **Cell**, v. 88, p. 355-365, 1997.
- 2
- 3 NI, D. et al. Metabolism of homoharringtonine, a cytotoxic component of the evergreen
4 plant *Cephalotaxus harringtonia*. **Journal of Experimental Therapeutics and**
5 **Oncology**, v. 3, p. 47-52, 2003.
- 6
- 7 NICIFOROVIC, A. et al. Antitumor effects of a natural anthracycline analog (Aloin)
8 involve altered activity of antioxidant enzymes in HeLaS3 cells. **Cancer Biologic &**
9 **Therapy**, v. 6, n. 8, p. 1211-1216, 2007.
- 10
- 11 NORBURY, C. J.; ZHIVOTOVSKY, B. DNA damage-induced apoptosis. **Oncogene**, v.
12 23, p. 2797-2808, 2004.
- 13
- 14 NOVOTNY, L. et al. Protein synthesis inhibitors of natural origin for CML therapy:
15 semisynthetic homoharringtonine (Omacetaxine mepesuccinate). **Neoplasma**, v. 63, n.
16 4, p. 495-503, 2016.
- 17
- 18 ORSO, S.D. et al. ID4: a new player in the cancer arena. **OncoTarget**, Maio, v.1, p. 48-
19 58, 2010.
- 20
- 21 OYADOMARI, S.; MORI, M.; Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum
22 stress. **Cell death and Differentiation**, v. 11, p. 381-389, 2004.
- 23
- 24 PHILIPP, S. et al. Homoharringtonine, a clinically approved anti-leukemia drug,
25 sensitizes tumor cells for TRAIL-induced necroptosis. **Cell Communication and**
26 **Signaling**, v. 13 n. 25 p. 1-16, 2015.
- 27
- 28 RATES, S. M. K.; Promoção do uso Racional de Fitoterápicos: uma Abordagem no
29 Ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 11, n. 2, p. 57-69,
30 2001.
- 31
- 32 ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **TRENDS in**
33 **Molecular Medicine**, v. 12, n. 9, p. 440-450, 2006.
- 34
- 35 SAKARKAR, D. M.; et al. Ethnopharmacological Review of Traditional Medicinal
36 Plants for Anticancer Activity. **International Journal of PharmTech Research**, v. 3,
37 n. 1, p. 298-308, 2011.
- 38
- 39 SINGH, N.P; et al. A Simple Technique for Quantitation of Low Levels of DNA
40 Damage in Individual Cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.
- 41
- 42 SHEN, Y. et al. Granulocyte colony stimulating factor priming chemotherapy is more
43 effective than standard chemotherapy as salvage therapy in relapsed
44 acute myeloid leukemia. **Medicina Clinica**, v. 151, n. 9, p. 339-344, 2018.
- 45
- 46 SOTOMAYOR, M; SCHULTEN, K.; Single-Molecule Experiments
47 in Vitro and in Silico. **Science**, v. 316, p. 1144-1148, 2007.
- 48
- 49 SPEIDEL, D.; The role of DNA damage responses in p53 biology. **Arch Toxicol**, v. 89,
50 p. 501-517, 2015.

- 1 TADA, K. et al. Critical roles of TRAF2 and TRAF5 in TNF-induced NF- κ B
2 activation and protection from cell death. **J. Biol. Chem**, v. jun/30 p. 1-26, 2001.
- 3
4 TSCHERNE, J. S.; PESTKA, S. Inhibition of Protein Synthesis in Intact HeLa Cells.
5 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Out, v. 1, p. 479-487, 1975.
- 6
7 VALLINAS, M. G.; et al. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy:
8 acomplementary approach with promising perspectives. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 9,
9 p. 585-599, 2013.
- 10
11 VERBON, E. H. et al. The Influence of reactive oxygen species on cell cycle
12 progression in mammalian cells. **Gene**, v. 511, p. 1-6, 2012.
- 13
14 VERMEULEN, K. et al. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and
15 therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, p. 131-149, 2003.
- 16
17 XU, Z. et al. The Protective effect of propofol against TNF- α -induced apoptosis was
18 mediated via inhibiting iNOS/NO production and maintaining intracellular Ca⁺
19 homeostasis in mouse hippocampal HT22 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.
20 91, p. 664-672, 2017.
- 21
22 YINJUN, L. et al. Homoharringtonine Mediates Myeloid Cell Apoptosis via
23 Upregulation of Pro-apoptotic bax and Inducing Caspase-3-Mediated Cleavage of
24 Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP). **American Journal of Hematology**, n. 76, p.
25 199-204, 2004.
- 26
27 WANG, P.; et al. PUMA is directly activated by NF- κ B and contributes to TNF- α -
28 induced apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 1192- 1202, 2009.
- 29
30 WANG, Y.; et al. Activation of the extrinsic apoptotic pathway by TNF- α in
31 Human Salivary Gland (HSG) cells *in vitro*, suggests a role for the TNF receptor (TNF-
32 R) and Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) in Sjögren's Syndrome-associated
33 autoimmune sialadenitis. **Archiver of Oral Biology**, v. 54, p. 986-996, 2009
- 34
35 WEK, R. C.; CAVENER, D.R. Translational Control and the Unfolded Protein
36 Response. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, n. 12, p. 2357-2371, 2007
- 37 YUE, et al. Mutant p53 in Cancer: Accumulation Gain-of-function, and therapy.
38 **Journal of Molecular Biology**, v.429, p. 1598-1606, 2017.

APÊNDICE

Tabela 2: Valores de fluorescência obtidos no ensaio de viabilidade celular (resazurina), após 24 h de tratamento com HT ou HHT na Linhagem HuH-7.5. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de Dunnet.

Tratamentos	Viabilidade (Média \pm desvio padrão)	
	HT	HHT
Linhagem HuH-7.5		
Controle	106437,2 \pm 4183,4	111157,1 \pm 4030,8
0,001 μM	102753,2 \pm 1471,9	99652,7 \pm 4393,8
0,12 μM	55449,3 \pm 309,5*	47951,3 \pm 3545,0*
0,25 μM	53068,0 \pm 875,6*	52409,9 \pm 1038,8*
0,5 μM	50459,8 \pm 1496,5*	50192,7 \pm 2200,5*
1 μM	48553,8 \pm 2057,1*	50333,5 \pm 2614,7*
5 μM	45143,2 \pm 2530,3*	47970,0 \pm 1050,1*
10 μM	43990,5 \pm 2052,0*	47216,2 \pm 1959,3*
20 μM	44759,4 \pm 2397,2*	45933,5 \pm 1338,5*
40 μM	43576,0 \pm 1881,2*	43889,9 \pm 1903,0*
80 μM	44644,5 \pm 984,8*	43082,1 \pm 1899,2*

Tabela 3: Valores de fluorescência obtidos no ensaio de viabilidade celular (resazurina), após 24 h de tratamento com HT e HHT na Linhagem HepG2/C3A. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de Dunnet.

Tratamentos	Viabilidade (Média \pm desvio padrão)	
	HT	HHT
Linhagem HepG2/C3A		
Controle	102290,3 \pm 4226,8	94724,3 \pm 2344,8
0,001 μM	89590,8 \pm 4415,3	94294,8 \pm 1657,9
0,12 μM	58064,6 \pm 2777,3*	56148,5 \pm 3927,5*
0,25 μM	57713,3 \pm 2962,8*	55193,5 \pm 2730,4*
0,5 μM	56646,6 \pm 2352,0*	54733,2 \pm 4298,4*
1 μM	55237,3 \pm 2085,9*	53812,9 \pm 5326,1*
5 μM	57743,7 \pm 4211,4*	59875,6 \pm 4167,8*
10 μM	59525,6 \pm 3669,7*	59209,2 \pm 2886,6*
20 μM	60234,1 \pm 2799,5*	60080,9 \pm 3228,7*
40 μM	62986,1 \pm 5176,8*	63221,7 \pm 5327,5*
80 μM	65096,2 \pm 2964,9*	60536,1 \pm 5233,3*

1 **Tabela 4:** Médias das porcentagens da integridade de membrana por citometria de
 2 fluxo, obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na linhagem HuH-7.5. (*)
 3 mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de
 4 Dunnet.

Tratamentos	Integridade (Média \pm desvio padrão)	
	HT	HHT
HuH-7.5		
Controle	95,5866 \pm 1,0300	95,5866 \pm 1,0300
0,1 μM	95,8266 \pm 0,8746	94,08 \pm 1,0762
1 μM	92,5933 \pm 0,6149*	90,0066 \pm 2,5812*
10 μM	92,8666 \pm 0,0305*	90,52 \pm 0,8323*

5
 6 **Tabela 5:** Médias das porcentagens da integridade de membrana por citometria de
 7 fluxo, obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na linhagem HepG2/C3A. (*)
 8 mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA seguida de Teste de
 9 Dunnet.

Tratamentos	Integridade (Média \pm desvio padrão)	
	HT	HHT
HepG2/C3A		
Controle	95,2133 \pm 2,2693	95,6933 \pm 1,0925
0,1 μM	94,8333 \pm 0,3372	95,7066 \pm 0,4407
1 μM	93,8333 \pm 1,3537	94,1862 \pm 1,2962
10 μM	94,0066 \pm 0,8600	94,9266 \pm 0,3693

10
 11 **Tabela 6 :** Médias das porcentagens da distribuição das células nas fases do ciclo
 12 celular (G1, S e G2/M) obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na linhagem
 13 HuH-7.5. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,01$), ANOVA
 14 seguida de Teste de Dunnet.

HuH-7.5	Ciclo Celular (Média \pm desvio padrão)					
	HT			HHT		
	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M
Controle	43,9 \pm 0,442	12,92 \pm 0,610	35,5 \pm 1,662	50,511 \pm 4,732	13,377 \pm 0,807	27,490 \pm 1,463
0,1 μM	34,853 \pm 1,740	16,126 \pm 2,395 *	31,253 \pm 9,220	44,366 \pm 1,689	13,089 \pm 0,215	33,687 \pm 0,412 *
1 μM	41,706 \pm 2,0729	16,64 \pm 0,312	31,193 \pm 1,320	36,121 \pm 0,026 *	11,587 \pm 0,469	42,971 \pm 0,400 *
10 μM	40,953 \pm 1,567	16,366 \pm 0,979	31,12 \pm 0,222	35,394 \pm 1,731 *	11,120 \pm 0,554 *	44,133 \pm 0,608 *

15
 16

1 **Tabela 7:** Médias das porcentagens da distribuição das células nas fases do ciclo celular
 2 (G1, S e G2/M) obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na linhagem
 3 HepG2/C3A. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,01$), ANOVA
 4 seguida de Teste de Dunnet.

Ciclo Celular (Média \pm desvio padrão)						
HepG2/C3A	HT			HHT		
	G1	S	G2/M	G1	S	G2/M
Controle	41,644 \pm 0,940	19,640 \pm 0,488	38,453 \pm 0,430	54,226 \pm 0,470	14,168 \pm 1,350	31,473 \pm 0,744
0,1	33,004 \pm 1,517 *	30,069 \pm 0,737 *	37,530 \pm 0,785	31,269 \pm 2,588 *	24,678 \pm 1,584 *	43,489 \pm 3,676 *
1	41,481 \pm 0,491	37,293 \pm 0,618 *	22,082 \pm 0,601 *	28,058 \pm 2,217 *	23,829 \pm 1,190	47,365 \pm 1,919 *
10	45,147 \pm 2,884	35,103 \pm 0,395 *	19,055 \pm 2,019 *	27,900 \pm 0,930 *	24,204 \pm 0,408 *	47,269 \pm 0,903 *

5
6
7
8
9
10

Tabela 8: Médias das porcentagens de morte celular em apoptose inicial, tardia e
 necrose por citometria de fluxo obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na
 linhagem HuH-7.5. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$),
 ANOVA seguida de Teste de Dunnet.

Morte Celular (Média \pm desvio padrão)						
HuH-7.5	HT			HHT		
	Apoptose inicial	Apoptose Tardia	Necrose	Apoptose inicial	Apoptose Tardia	Necrose
Control e	5,4866 \pm 0,3879	0,4466 \pm 0,2193	0,48 \pm 0,04	7,4 \pm 3,3471	1,4466 \pm 0,5345	0,2733 \pm 0,0808
0,1 μM	7,8266 \pm 0,0461	0,3933 \pm 0,0305	0,6733 \pm 0,2003	13,4133 \pm * 0,4562	1,98 \pm 0,24	0,3733 \pm 0,0642
1 μM	22,5 \pm 3,270 *	1,7333 \pm 0,6543 *	0,8533 \pm 0,3494	23,2133 \pm * 1,8102	2,8866 \pm 0,4387 *	0,6466 \pm 0,1501 *
10 μM	24,9266 \pm 1,5672 *	0,8133 \pm 0,05773	0,6466 \pm 0,0808	30,82 \pm 1,4895 *	3,2533 \pm 0,2532 *	0,5866 \pm 0,0988 *

11
12

1 **Tabela 9:** Médias das porcentagens de morte celular em apoptose inicial, tardia e
 2 necrose por citometria de fluxo obtidas após 24 h de tratamento com HT ou HHT na
 3 linhagem HEPG2/C3A. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$),
 4 ANOVA seguida de Teste de Dunnet.
 5

HepG2/C3A	Morte Celular (Média \pm desvio padrão)					
	HT			HHT		
	Apoptose inicial	Apoptose Tardia	Necrose	Apoptose inicial	Apoptose Tardia	Necrose
Controle	7,37 \pm 0,8753	2,4563 \pm 0,7031	0,183 \pm 0,0677	8,9781 \pm 0,0977	0,4766 \pm 0,1761	0,2446 \pm 0,0868
0,1 μM	7,8049 \pm 1,3291	2,0026 \pm 0,1510	0,231 \pm 0,0629	15,2285 \pm 2,0662 *	0,75 \pm 0,2930	0,2548 \pm 0,0431
1 μM	18,1102 \pm 2,0120 *	2,2383 \pm 0,2927	0,236 \pm 0,0524	23,0042 \pm 1,4302 *	0,94 \pm 0,1374	0,3611 \pm 0,0668
10 μM	13,6532 \pm 1,0989 *	2,1656 \pm 0,3601	0,255 \pm 0,0461	20,1615 \pm 0,7792 *	1,0566 \pm 0,1289	0,2920 \pm 0,0738

6
 7
 8
 9
 10
 11
 12

Tabela 10: Médias dos valores obidos no ensaio cometa utilizando o Software
CometScore[®], após 3 h de tratamento com HT ou HHT, na linhagem HuH-7.5. CPT =
 Camptotecina. (*) mostra resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ANOVA
 seguida de Teste de Dunnet.

Tratamentos	Tail Moment (Média \pm desvio padrão)	
Linhagem HuH-7	HT	HHT
Controle	0,0693 \pm 0,0962	0,0693 \pm 0,0962
10 μM	0,0783 \pm 0,0745	0,0708 \pm 0,0142
CPT	27,2708 \pm 29,1129 *	27,2708 \pm 29,1129 *

1 **Tabela 11:** Médias dos valores obidos no ensaio cometa, utilizando o Software
 2 *CometScore*[®], após 3 h de tratamento com HT ou HHT, na linhagem HepG2/C3A. CPT
 3 = Camptotecina .(*) mostra resultados estatisticamente significativos (p<0,05), ANOVA
 4 seguida de Teste de Dunnet.
 5

Tratamentos	Tail Moment (Média ± desvio padrão)	
	HT	HHT
Linhagem HepG2/C3A		
Controle	0,1681 ± 0,1297	0,1681 ± 0,1297
10 µM	0,0762 ± 0,0163	0,2094 ± 0,2653
CPT	13,5637 ± 17,4259 *	13,5637 ± 17,4259 *

6
 7
 8
 9
 10
 11

Tabela 12: Expressão relativa dos genes testados por RT-qPCR tratados com HT ou HHT na concentração de 5µM, por 12 h, na linhagem HuH-7.5.(*) mostra resultados estatisticamente significativos, quando acima de 2 e abaixo de -2(fold change).

Gene	HuH-7.5	Expressão	Std. ERROR	Fold-Change
MYC	HT	1,222	0,956 – 1,614	1,222
	HHT	0,874	0,666 – 1,208	-1,1441
BAK	HT	0,486	0,329 – 0,653	-2,0576 *
	HHT	0,446	0,325 – 0,565	-2,2421 *
BCL2	HT	0,164	0,097 – 0,241	-6,0975 *
	HHT	0,208	0,088 – 0,347	-4,8076 *
MTOR	HT	0,65	0,505 – 0,801	-1,5384
	HHT	0,652	0,540 – 0,840	-1,5337
CDKN1I	HT	1,6	1,205 – 2,184	1,6
	HHT	1,489	1,060 – 2,038	1,489
CYP2E1	HT	8,85	6,911 – 12,271	8,85 *
	HHT	12,081	10,227 – 15,658	12,081 *
CYP3A4	HT	2,374	1,536 – 3,883	2,374 *
	HHT	2,996	1,599 – 5,314	2,996 *
CYP2C19	HT	2,895	2,108 – 4,432	2,895 *
	HHT	8,578	6,388 – 11,689	8,578 *
CYP2D6	HT	0,895	0,711 – 1,034	-1,1173

	HHT	1,071	0,886 – 1,244	1,071
BBC3	HT	20,163	18,618 – 22,882	20,163 *
	HHT	16,819	13,108 – 23,873	16,819 *
TP53	HT	1,413	1,153 – 1,733	1,413
	HHT	1,422	1,176 – 1,779	1,422
TNFα	HT	636,052	374,965 – 1.186,401	636,052 *
	HHT	930,159	501,925 – 1.636,027	930,159 *
BECLIN1	HT	0,864	0,653 – 1,146	-1,1574
	HHT	1,065	0,909 – 1,278	1,065
TRAF2	HT	2,853	2,247 – 3,423	2,853 *
	HHT	3,355	2,491 – 4,908	3,355 *
ERN1	HT	4,269	3,037 – 6,076	4,269 *
	HHT	4,96	2,906 – 8,932	4,96 *
CASP3	HT	0,645	0,542 – 0,774	-1,5503
	HHT	0,624	0,467 – 0,850	-1,6025
CASP8	HT	0,631	0,423 – 0,855	-1,5847
	HHT	0,683	0,482 – 0,930	-1,4641
EIF2AK3	HT	1,34	0,793 – 2,301	1,34
	HHT	1,354	0,831 – 2,168	1,354
ID4	HT	5,098	3,129 – 7,288	5,098 *
	HHT	4,72	3,320 – 7,806	4,72 *
NF-κb	HT	9,307	6,272 – 12,100	9,307 *
	HHT	9,529	7,051 – 12,571	9,529 *

1 **Tabela 13:** Expressão relativa dos genes testados por RT-qPCR, tratados com HT ou
 2 HTT, na concentração de 5 μ M, por 12 h na linhagem HepG2/C3A.(*) mostra resultados
 3 estatisticamente significativos, quando acima de 2 e abaixo de -2(fold change).
 4
 5

Gene	HepG2/C3A	Expressão	Std.ERROR	Fold-Change
MYC	HT	1,346	1,031 – 1,551	1,346
	HHT	1,207	0,787 - 2,311	1,207
BAK	HT	1,299	0,922 - 1,685	1,299
	HHT	1,419	0,845 - 2,081	1,419
BCL2	HT	1,204	0,924 - 1,458	1,204
	HHT	1,097	0,491 - 1,838	1,097
MTOR	HT	1,123	0,714 - 1,497	1,123
	HHT	1,014	0,767 – 1,578	1,014
CDKN1I	HT	2,304	1,861 – 2,954	2,304*
	HHT	2,129	1,594 – 2,744	2,129*
CYP2E1	HT	10,329	8,599 – 11,817	10,329*
	HHT	8,626	6,220 – 11,189	8,626*
CYP3A4	HT	1,046	0,538 - 1.744	1,046
	HHT	1,567	0,867 – 3,571	1,567
CYP2C19	HT	5,946	4,523 – 9,352	5,946*
	HHT	6,251	4,337 – 9,636	6,251*
CYP2D6	HT	1,574	1,371 – 1,755	1,574
	HHT	1,454	1,158 – 1,789	1,454
BBC3	HT	15,711	13,055 – 18,639	15,711*
	HHT	12,039	9,599 – 15,666	12,039*
TP53	HT	1,299	0,849 – 1,961	1,299
	HHT	1,304	0,927 – 2,211	1,304
TNFα	HT	2.996,37	2.220,868 – 4.396,099	2.996,37*
	HHT	2.999,14	1.768,209 – 4.594,966	2.999,14
BECLIN1	HT	1,686	0,910 – 2,767	1,686
	HHT	1,244	0,846 – 2,605	1,244
TRAF2	HT	12,432	7,388 – 22,020	12,432*

	HHT	10,324	6,755 – 20,657	10,324*
<i>ERN1</i>	HT	14,205	10,357 – 20,882	14,205*
	HHT	15,225	7,234 – 28,571	15,225*
<i>CASP3</i>	HT	2,313	0,945 – 4,560	2,313*
	HHT	1,992	1,084 – 5,177	1,992
<i>CASP8</i>	HT	1,245	0,681 – 2,538	1,245
	HHT	1,208	0,555 – 2,914	1,208
<i>EIF2AK3</i>	HT	2,219	0,795 – 4,793	2,219*
	HHT	2,431	1,182 – 8,220	2,431*
<i>ID4</i>	HT	3,321	2,335 – 4,607	3,321*
	HHT	3,129	1,317 – 6,711	3,129*
<i>NF-κb</i>	HT	10,329	5,856 – 18,116	10,329*
	HHT	9,268	5,069 – 21,536	9,268*