



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIOVANNA VAZ CRIPPA

**EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO
FITOQUÍMICO PLUMBAGINA EM CÉLULAS HEPG2/C3A**

Londrina
2018



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agronômico do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

GIOVANNA VAZ CRIPPA

Efeitos citotóxicos e genotóxicos do fitoquímico plumbagina em
células HepG2/C3A

Londrina
2018

GIOVANNA VAZ CRIPPA

**EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO
FITOQUÍMICO PLUMBAGINA EM CÉLULAS HEPG2/C3A**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2018

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

Crippa, Giovanna Vaz.

Efeitos citotóxicos e genotóxicos do fitoquímico plumbagina em células HepG2/C3A / Giovanna Vaz Crippa. - Londrina, 2018.
57 f. il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2018.

Inclui bibliografia.

1. Ciclo celular - Tese. 2. Danos no DNA - Tese. 3. Morte celular - Tese. 4. Autofagia - Tese. I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

GIOVANNA VAZ CRIPPA

**EFEITOS CITOTÓXICOS E GENOTÓXICOS DO FITOQUÍMICO
PLUMBAGINA EM CÉLULAS HEPG2/C3A**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Andressa Megumi Niwa
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

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

Londrina, 23 de julho de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela dádiva da vida e por me permitir realizar tantos sonhos nesta existência.

Ao meu orientador, Mário Sérgio Mantovani, que mesmo sem me conhecer direito, abriu as portas e acreditou em mim. Também por toda paciência, empenho e sentido prático com que sempre me orientou neste trabalho. Muito obrigada por corrigir e me ajudar quando necessário sem nunca me desmotivar.

Agradecimentos à banca examinadora, Prof. Dr^a Andressa Megumi Niwa e Prof. Dr^a Sandra Regina Lepri, que se dispuseram a avaliar e julgar este trabalho, Também agradeço ao Departamento de Biologia Geral por disponibilizar o local.

À toda equipe do Laboratório de Genética Toxicológica, agradeço por compartilharem seus conhecimentos, e pela paciência que todos exibiram ao me ensinar as técnicas. Em especial à Thalita Zanetti e Bruna Biazzi que sempre estiveram dispostas a me ensinar e me ajudar nesses dois anos de mestrado.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPEs e FINEP, agradeço pelo incentivo financeiro e a oportunidade de realizar pesquisa.

Quero agradecer também à minha família, amigos e namorado pelo apoio incondicional que me deram, especialmente aos meus pais, Sandra e Antonio, meu padrastrô Marcelo e meu irmão Gabriel.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

CRIPPA, Giovanna Vaz. **Efeitos citotóxicos e genotóxicos do fitoquímico plumbagina em células HepG2/C3A**. 2018. 53 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

Compostos fitoquímicos e seus derivados têm sido propostos como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos. A plumbagina (PB), uma naftoquinona extraída principalmente do *Plumbago indica* Linn (Plumbaginaceae), possui propriedades de ação como antiparasitária, antifúngica, anti-inflamatória, bactericida e potencial antitumoral. Contudo, os mecanismos de ação da PB ainda precisam ser totalmente esclarecidos e sua toxicidade e efeitos prejudiciais precisam ser estabelecidos. Desta maneira, este estudo buscou correlacionar as atividades citotóxicas e genotóxicas da PB na linhagem de hepatocarcinoma humana (HepG2/C3A) com marcadores moleculares de expressão de mRNA. Na avaliação da citotoxicidade a PB reduziu a viabilidade celular a partir da concentração de 15 μM , efeito semelhante foi observado na análise de integridade de membrana por citometria de fluxo. Na avaliação da expressão de mRNA do sistema de metabolização de xenobióticos citocromo P450 observou-se indução significativa dos níveis de mRNA dos genes *CYP1A1* (21,55x), *CYP1A2* (105,42x) e *CYP3A4* (121,65x), sugerindo que a PB sofre metabolização extensiva em resposta a sua citotoxicidade. Além disso, observamos que a PB induziu apoptose na citometria de fluxo, aumento na expressão relativa de mRNA dos genes *PUMA* (9,23x; 18,46x), *CASP3* (2,06x; 2,91x) e *CASP8* (2,65x; 4,45x) nas concentrações 10 e 15 μM e redução na expressão do mRNA de *PARP1* (-2,43x) na maior concentração. O aumento na expressão do mRNA de *beclin1* (2,45x; 3,49x), demonstra que a PB poderia estar também associada à morte por autofagia. Na análise do ciclo celular a PB induziu parada em fase G2/M, sugerindo indução de danos no DNA, como foi observado no ensaio do cometa a partir de 5 μM . Esses danos estão correlacionados com a expressão aumentada dos mRNA dos genes *p21*, *GADD45A* e *H2AFX*, além de alterar também a expressão das proteínas H2AX, p21, p53, Chk1 e Chk2. Esses resultados permitem uma maior compreensão da ação celular da PB e de sua toxicidade, contribuindo para um possível desenvolvimento de fármacos baseados neste fitoquímico, podendo a análise molecular de marcadores de expressão de mRNA serem indicadores de monitoramento de toxicidade em células humanas.

Palavras-chave: Ciclo celular. Danos no DNA. Morte celular. Autofagia.

CRIPPA, Giovanna Vaz. **Cytotoxic and genotoxic effects of the phytochemical plumbagin on HepG2/C3A cells**. 2018. 53 p. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Phytochemical compounds and their derivatives have been proposed as a source for the development of new drugs. Plumbagin (PB), a naphthoquinone extracted mainly from *Plumbago indica* Linn (Plumbaginaceae), has properties of action as antiparasitic, antifungal, anti-inflammatory, bactericidal and antitumor potential. However, the mechanisms of action of PB still need to be fully clarified and its toxicity and detrimental effects need to be established. In this way, this study sought to correlate the cytotoxic and genotoxic activities of PB in the human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2/C3A) with molecular markers of mRNA expression. In the evaluation of cytotoxicity, PB reduced cell viability from the concentration of 15 μ M, a similar effect was observed in the membrane integrity analysis by flow cytometry. In the evaluation of mRNA expression of the cytochrome P450 xenobiotic metabolism system, significant mRNA levels of *CYP1A1* (21.55x), *CYP1A2* (105.42x) and *CYP3A4* (121.5x) genes were observed, suggesting that PB extensively metabolized in response to its cytotoxicity. In addition, in flow cytometry we observed that PB induced apoptosis and increased relative mRNA expression of the *PUMA* (9.23x; 18.46x), *CASP3* (2.06x; 2.91x) and *CASP8* (2.65x; 4.45x) at both concentrations and reduced expression of *PARP1* mRNA (-2,43x) at the highest concentration. The increase in *beclin1* mRNA expression (2.45x; 3.49x), demonstrates that BP could also be associated with autophagy death. In the cell cycle analysis, the PB induced a G2/M phase stop, suggesting induction of DNA damage, as observed in the comet assay from 5 μ M. These damages are correlated in the increased mRNA expression of the *p21*, *GADD45A* and *H2AFX* genes, as well as altering the expression of H2AX, p21, p53, Chk1 and Chk2 proteins. These results allow a better understanding of the cellular action of PB and its toxicity, contributing to a possible development of drugs based on this phytochemical and molecular analysis of mRNA expression markers can be indicators of toxicity monitoring in human cells.

Key words: Cell cycle. DNA damage. Cell death. Autophagy.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Vias intrínseca e extrínseca de indução de apoptose (Parolin; Reason, 2001).....15
- Figura 2** – A) Estrutura química da plumbagina (Sigma-Aldrich). B) *Plumbago indica*, representante da família Plumbaginaceae (Home Remedies).....18

ARTIGO

- Figura 1** - Viabilidade celular, obtida pelo ensaio de citotoxicidade da resazurina de células HepG2/C3A após 24 h de exposição aos tratamentos com plumbagina (5; 10; 15; 17,5 μ M). (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).33
- Figura 2** - Distribuição das células HepG2/C3A nas diferentes fases do ciclo celular, G1, S, G2/M (em porcentagem) por citometria de fluxo (marcação com iodeto de propídio), após 24 h de tratamento com 5; 10 e 15 μ M de PB. (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).34
- Figura 3** - Análise de morte celular por citometria de fluxo (marcação com Annexin-CF647/7-AAD) na linhagem celular HepG2/C3A, após 24 h de tratamento com PB nas concentrações de 5; 10 e 15 μ M. (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).35
- Figura 4** - Imagens obtidas através do microscópio EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) de células HepG2/C3A tratadas por 24 h com diferentes concentrações de PB (5; 10 e 15 μ M) e o controle negativo em aumento de 100x.35
- Figura 5** - Análise de integridade de membrana por citometria de fluxo (marcação com iodeto de propídio) na linhagem celular HepG2/C3A, tratada com PB nas concentrações de 5; 10, e 15 μ M. (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle $p < 0,05$36
- Figura 6** - Análise de danos de DNA através do ensaio cometa após 3 h de tratamento com a PB, nas concentrações 5; 10 e 15 μ M. (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle $p < 0,05$37
- Figura 7** - Imagens obtidas através do microscópio EVOS® FL *Auto Cell Imaging System* (Thermo Fisher) com aumento de 200X. (A) Controle negativo; (B) Nucleoides após 3 horas de tratamento na concentração de 10 μ M de PB.37

- Figura 8** - Expressão relativa de mRNA de genes relacionados a progressão do ciclo celular (*MYC*, *p21*, *TP53*) obtidos pela técnica de RT-qPCR, após 12 h de tratamento com PB nas concentrações 10 e 15 μM . Os dados são apresentados como média da expressão relativa. A razão e a análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009. (a) Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$). (b) Diferença significativa entre as concentrações testadas ($p \leq 0,05$). 38
- Figura 9** - Expressão relativa de mRNA dos genes relacionados a danos no DNA (*GADD45A* e *H2AFX*) e estresse oxidativo (*GPX1*) obtidos pela técnica de RT-qPCR, após 12 h de tratamento com PB nas concentrações 10 e 15 μM . Os dados são apresentados como média da expressão relativa. A razão e a análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009. (*) Razão $\leq 0,5$ ou ≥ 2 . (a) Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$). (b) Diferença significativa entre as concentrações testadas ($p \leq 0,05$). 39
- Figura 10** - Expressão relativa de mRNA dos genes relacionados morte celular por apoptose (*CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1*, *PUMA* e *Surviv*) e autofagia (*beclin1*) obtidos pela técnica de RT-qPCR, após 12 h de tratamento com PB nas concentrações 10 e 15 μM . Os dados são apresentados como média da expressão relativa. A razão e a análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009; (*) Razão $\leq 0,5$ ou ≥ 2 . (a) Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$). (b) Diferença significativa entre as concentrações testadas ($p \leq 0,05$). 40
- Figura 11** - Expressão relativa de mRNA dos genes envolvidos no metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*, *CYP3A4* e *CYP1A2*) obtidos pela técnica de RT-qPCR após 12 h de tratamento com PB nas concentrações 10 e 15 μM . Os dados são apresentados como média da expressão relativa. A razão e a análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009; (*) Razão $\leq 0,5$ ou ≥ 2 . (a) Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$). (b) Diferença significativa entre as concentrações testadas ($p \leq 0,05$). 41
- Figura 12** - Média de intensidade de fluorescência de proteínas totais ATR, MDM2 e p21 e proteínas fosforiladas Chk1 (Ser345), Chk2 (Thr68), H2A.X (Ser139), p53 (Ser15) após 24 h de tratamento com PB nas concentrações 10 e 15 μM . (*) Estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle. MIF (Média de Intensidade de fluorescência). 42
- Figura 13** – Esquema representativo das atividades citotóxicas e genotóxicas desencadeadas na célula HepG2/C3A após os tratamentos com a PB. 46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Viabilidade celular (média ± desvio padrão) obtida do ensaio da resazurina após 24 h de tratamento com PB	51
Tabela 2 – Média da porcentagem de células (média ± desvio padrão) distribuída nas fases do ciclo celular (G1, S, G2/M) após os tratamentos por 24 h de PB.....	51
Tabela 3 – Média da porcentagem (média ± desvio padrão) de células viáveis, em apoptose inicial, tardia e necrose após os tratamentos por 24 h de plumbagina.....	51
Tabela 4 – Média da porcentagem de células (média ± desvio padrão) com membranas íntegras ou danificadas após os tratamentos por 24 h de PB.....	51
Tabela 5 – Média dos danos (média ± desvio padrão) observados no ensaio do cometa no parâmetro <i>Tail moment</i> após os tratamentos por 24 h de plumabagina.....	52
Tabela 6 – Iniciadores utilizados na PCR em tempo real.....	52
Tabela 7 – Expressão relativa dos genes relacionados à morte celular, estresse oxidativo, ciclo celular e danos no DNA.....	52
Tabela 8 – Expressão relativa dos genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos ⁵³	
Tabela 9 – Média de intensidade de fluorescência (média ± desvio padrão) na análise de proteína.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

ATG	<i>Autophagy-related protein</i>
ATR	<i>Serine/Threonine-protein kinase</i>
Bad	<i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-XL	<i>Bcl-2 extra large</i>
BH	<i>Bcl-2 homology</i>
BH3	<i>Bcl-2 homology region 3</i>
Bid	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
Bim	<i>Bcl-2-interacting mediator of cell death</i>
CASP3	Caspase 3
CASP8	Caspase 8
CASP9	Caspase 9
Chk1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
Chk2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CYP1A1	<i>Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 1</i>
CYP1A2	<i>Cytochrome P450 family 1 subfamily A member 2</i>
CYP3A4	<i>Cytochrome P450 family 3 subfamily A member 4</i>
CYP	Citocromo P450
dATP	<i>Deoxyadenosine triphosphate</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DR	Receptor de morte - <i>death receptor</i>
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GADD45A	<i>Growth arrest and DNA damage inducible 45 alpha</i>
GPX1	<i>Glutathione peroxidase 1</i>
H2AFX	<i>H2A histone family member X</i>
MDM2	<i>Murine double minute 2</i>
MIF	Média de intensidade de fluorescência
M-MLV	<i>Moloney Murine Leukemia Virus</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>

MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
NF-kB	<i>Nuclear kappa b</i>
<i>PARP1</i>	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase 1</i>
PB	Plumbagina
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
TNFR	<i>Tumor necrosis factor receptor</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Fitoquímicos	13
2.2. Principais tipos de morte celular	14
2.3. Metabolismo de xenobióticos	17
2.4. Plumbagina	18
2.5. Atividade antiproliferativa e genotóxica da plumbagina.....	19
REFERÊNCIAS	21
3. OBJETIVOS	25
3.2. Objetivos específicos	25
ARTIGO	26
1. Introdução	27
2. Materiais e Métodos	29
2.1. <i>Cultivo celular</i>	29
2.2. <i>Agente químico</i>	29
2.3. <i>Ensaio de citotoxicidade (Resazurina)</i>	29
2.4. <i>Ensaio por citometria de fluxo</i>	29
2.4.1. <i>Ciclo celular</i>	29
2.4.2. <i>Morte Celular por apoptose</i>	30
2.4.3. <i>Integridade de membrana</i>	30
2.5. <i>Ensaio do Cometa</i>	30
2.6. <i>Análise de expressão de mRNA via RT-qPCR</i>	31
2.7. <i>Expressão de proteína de danos no DNA</i>	32
2.8. <i>Análise Estatística</i>	32
3. Resultados.....	32
3.1. <i>Ensaio de citotoxicidade (Resazurina)</i>	32
3.2. <i>Análise das fases do ciclo celular</i>	33
3.3. <i>Análise da morte celular</i>	34
3.5. <i>Ensaio do Cometa</i>	36
3.6. <i>Expressão de mRNA</i>	37
3.7. <i>Análise de proteínas</i>	41
4. Discussão	43
5. Conclusão	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

APÊNDICE	50
----------------	----

1 1. INTRODUÇÃO

2 A atividade citotóxica e genotóxica da PB tem sido demonstrada em diferentes estudos
3 envolvendo várias linhagens celulares e também através de alguns estudos *in vivo*, utilizando
4 modelos de animais. A propriedade desejável de um agente antitumoral é induzir a morte de
5 células tumorais, com o mínimo de toxicidade para as células normais (SESHADRI;
6 RAJARAM; RAJARAM, 2011).

7 Fármacos contendo a estrutura quinona têm recebido atenção significativa devido aos
8 seus efeitos antitumorais. Essas drogas incluem a doxorubicina, mitoxantrona e mitomicina-
9 C. As quinonas são amplamente distribuídas em plantas (SESHADRI; RAJARAM;
10 RAJARAM, 2011).

11 O uso de plantas com fins medicinais vem ocorrendo desde os primórdios da civilização
12 e compreendem as espécies vegetais que produzem algum princípio ativo utilizado para o
13 tratamento de doenças, fornecendo material fitoterápico através de folhas, flores, frutos, raízes,
14 entre outros, dos quais são preparados chás e outras formas de medicamento. Devido à sua
15 grande diversidade, os fitoquímicos podem atingir uma ampla variedade de funções fisiológicas
16 e de vias metabólicas (ZHOU; LI; CHEN, 2010).

17 A compreensão dos mecanismos de ação de compostos derivados de produtos naturais
18 é essencial para identificar seus efeitos na saúde humana. Estes compostos atuam através de
19 diversos mecanismos celulares e moleculares, incluindo a inibição da proliferação celular, a
20 indução da apoptose, autofagia e inibição da migração/invasão e angiogênese. Estudos de
21 mecanismos de ação são realizados a fim de encontrar compostos mais efetivos e seletivos ou
22 que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço do câncer. A linhagem
23 HepG2/C3A é um derivado da linhagem HepG2, é um modelo bem estabelecido em ensaios *in*
24 *vitro* e apresenta alto índice de expressão de proteínas do metabolismo de xenobióticos.

25 A plumbagina (PB) é uma naftoquinona que pode ser extraída de raízes, cascas e folhas
26 de algumas famílias como *Plumbaginaceae*, *Ebenaceae*, *Dioncophyllaceae*, *Ancestrocladaceae*
27 e *Droseraceae*. Este componente natural possui várias atividades biológicas distintas, incluindo
28 atividade antiparasitária (AWASTHI et al., 2016), bactericida (AHMAD; MEHMOOD;
29 MOHAMMED, 1998), fungicida (MAHONEY et al., 2000), inseticida (BANERJEE et al.,
30 2001) e anti-inflamatória (OYEDAPO, 1996). Atualmente, um grande número de pesquisas
31 vem buscando elucidar os mecanismos pelo qual a PB atuaria na terapia anticâncer (LIU et al.,
32 2017). A plumbagina tem sido descrita pela sua atividade antiproliferativa e genotóxica nas
33 linhagens tumorais MCF-7 de câncer de mama (SAMENI; HANDI, 2016), MG63 de
34 osteosarcoma (XUE et al., 2016), Tca8113 de câncer de língua (QIU et al., 2016), PEO-1 e

1 PEO-4 de câncer de ovário (SINHA et al., 2013), HT29 de câncer de cólon (SUBRAMANIYA
2 et al., 2011) e DU145 de câncer de próstata (RESHMA et al., 2016).

3 Considerando que a PB já demonstrou atividade em diversos tipos de linhagens tumorais
4 através da indução de apoptose, parada de ciclo celular, aumento de espécies reativas de
5 oxigênio, e além disso, foi proposta como um potente regulador de metástase (GAASCHT et
6 al., 2014; AWASTHI et al., 2016), a elucidação e correlação dos mecanismos de ação da PB
7 tornam-se uma importante ferramenta no entendimento da sua toxicidade e efeitos prejudiciais
8 para seres humanos no seu uso terapêutico. Desta maneira, este estudo buscou correlacionar as
9 atividades citotóxicas e genotóxicas da PB na linhagem de hepatocarcinoma humana
10 (HepG2/C3A) com os marcadores moleculares de expressão de mRNA.

11 12 **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

13 **2.1. Fitoquímicos**

14 Os compostos naturais derivados de plantas, têm sido historicamente considerados como
15 fonte inestimável de potenciais agentes terapêuticos (ZHANG et al., 2012). Segundo a *World*
16 *Health Organization*, 80% da população mundial depende de plantas medicinais para o
17 tratamento de várias doenças. Os fitoquímicos são bem conhecidos por desempenharem papéis
18 essenciais em uma grande variedade de doenças, incluindo o câncer. O estudo de fitoquímicos
19 como potenciais agentes anticâncer vem aumentando não somente pelo baixo custo, mas
20 também, por apresentarem menores efeitos colaterais (KUMAR et al., 2016; ZHANG et al.,
21 2012).

22 Estima-se que mais de 10.000 fitoquímicos foram identificados e utilizados no
23 tratamento do câncer devido às suas propriedades antitumorais, podendo aumentar
24 sinergicamente a eficiência de drogas anticâncer e reduzir seus efeitos tóxicos (TUORKEY,
25 2015). Por exemplo, alguns compostos dietéticos incluindo a curcumina, sulforafano,
26 isoflavona, e resveratrol, podem afetar as vias de auto-renovação das células tumorais. Algumas
27 evidências sugerem que alguns metabólitos derivados de plantas possuem propriedades pró-
28 apoptóticas, podendo induzir a morte celular por ativação das vias intrínseca e extrínseca da
29 apoptose (OUYANG et al., 2014).

30 Sendo assim, é de grande importância a análise de novas drogas para tais propriedades,
31 buscando elucidar seus mecanismos de ação. Fazem-se necessários mais estudos para elaborar
32 formulações utilizando produtos naturais, com base em seus alvos moleculares para seu uso
33 eficaz como agentes quimioterápicos e/ou quimiopreventivos (KUMAR et al., 2016;
34 SARAVANAN et al., 2014).

2.2. Principais tipos de morte celular

O desenvolvimento e a manutenção dos organismos multicelulares dependem da interação entre as células constituintes. O número de células é regulado pelo controle de taxa de divisão e morte celular. Existem diversos processos de morte celular já identificados, sendo os principais, apoptose, autofagia e necrose. O tipo de estímulo recebido pela célula, determina a forma de morte (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; ELMORE, 2007).

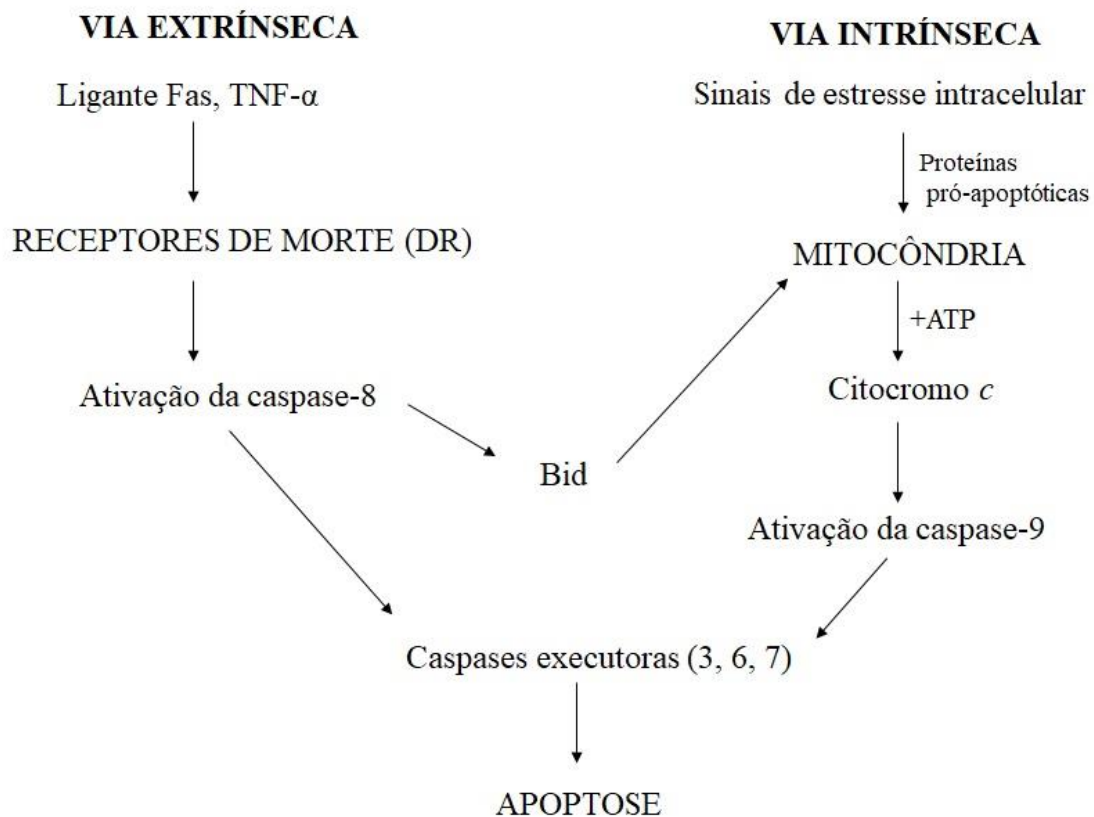
A apoptose é uma morte celular programada regulada por fatores intrínsecos e extrínsecos de grande eficiência (PAROLIN; REASON, 2001). De modo geral a apoptose é caracterizada por específicas mudanças morfológicas como: encolhimento da célula, formação de bolhas na membrana, perda de adesão celular (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

A apoptose pode ser deflagrada por estímulos extrínsecos, através de receptores específicos de morte celular que respondem à ligantes de morte, ou por estímulos intrínsecos de estresse intracelular, tais como lesão de DNA, perturbação no ciclo celular ou nas vias metabólicas (Figura 1). Ambas culminam na ativação de proteases conhecidas como caspases (PAROLIN; REASON, 2001; JAYAKIRAN, 2015).

As caspases pertencem à família das cisteínas proteases, são sintetizadas pelas células e permanecem inativas no citosol, sob a forma de procaspases, tornando-se ativas após a clivagem proteolítica dos resíduos de ácido aspártico. As caspases desempenham um papel central na apoptose em ambas vias, intrínseca e extrínseca, e podem ser classificadas como iniciadoras (-2, -8, -9, -10, -11) e efetoras (-3, -6, -7). As caspases iniciadoras iniciam a via apoptótica enquanto as efetoras resultam na morte celular (JAYAKIRAN, 2015).

A via extrínseca ocorre através da interação dos receptores de morte (DR) com seus respectivos ligantes. Os receptores mais conhecidos são TNFR (*tumor necrosis fator receptor*) e Fas (CD95) e seus ligantes TNF e FasL. A apoptose se inicia pela interação de um ligante da família TNF ao seu receptor, seguida pela ativação de proteínas de sinalização (JAYAKIRAN, 2015). Entre esses receptores, um dos mais estudados e melhor caracterizado é o receptor Fas, quando o receptor Fas se acopla ao ligante Fas (FasL) é formado um agregado de morte. Este se liga a uma proteína adaptadora presente no citosol, chamada cadeia de morte associada ao Fas (FAAD), a ligação deste complexo à procaspase 8 resulta na ativação dessa enzima por clivagem proteolítica. A caspase 8 então, diretamente ou pela via mitocondrial, ativa a caspase 3 que leva à apoptose (PAROLIN; REASON, 2001).

1 Além dos receptores de morte, a apoptose ocorre também por sinais de estresse
 2 intracelular, neste caso a via mitocondrial é ativada com envolvimento de alterações na
 3 permeabilidade da membrana e translocação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 do
 4 citosol para a mitocôndria. Essa translocação resulta na liberação do citocromo *c* para o citosol,
 5 este, se liga a dATP, Apaf-1 e pró-caspase 9, formando um complexo chamado apoptossomo.
 6 Quando ativa, a caspase 9 pode então clivar as caspases efetoras subsequentes, 3 e 7. A via
 7 mitocondrial é frequentemente ativada em resposta a danos no DNA, aumento nos níveis de
 8 espécies reativas de oxigênio (EROs), aumento do cálcio mitocondrial, e algumas drogas
 9 (PAROLIN; REASON, 2001; JAYAKIRAN, 2015).



10 **Figura 1** - Vias intrínseca e extrínseca de indução de apoptose. Adaptado de: Parolin; Reason,
 11 2001.

12 Há mais de 20 membros da família do Bcl-2, que podem ser divididos em três grupos
 13 com base em sua função pró-apoptótica, antiapoptótica e em domínios de homologia com *BCL-*
 14 *2* (BH, Bcl-2 *homology*). Algumas proteínas da família Bcl-2, tais como a própria Bcl-2 e Bcl-
 15 XL, que são os principais membros desse grupo e possuem quatro domínios (BH1 - BH4),
 16 impedem a liberação do citocromo *c*, inibindo a apoptose parcialmente. Outras proteínas desta
 17 família são as promotoras de apoptose, Bax e Bak, que possuem três domínios (BH1, BH2 e
 18 BH3) (LEVINE; SINHA; KROEMER, 2008). BAD, BID, BIM, Puma e NOXA são membros

1 do grupo sensores e, estes possuem apenas o terceiro dos quatro domínios BH, por isso, são
2 chamados de *BH3-only*. As proteínas *BH3-only* agem como sensores de estresse celular e
3 danos, e regulam o equilíbrio entre os dois outros grupos (ABBAS; KUMAR; FAUSTO, 2016)

4 O DNA danificado desencadeia a apoptose com a participação do fator de transcrição
5 p53, o qual ativa a transcrição dos genes, que promovem a liberação do citocromo *c* da
6 mitocôndria. As proteínas pertencentes à família de proteínas Bcl-2, ajudam a regular a ativação
7 das procaspases, tendo influência na inibição ou ativação de apoptose. A proteína p53 é
8 supressora tumoral e tem uma grande importância na modulação do ciclo celular e indução de
9 apoptose quando o DNA está danificado, ou como resposta ao estresse em células humanas
10 (FETT-CONTE; SALLES, 2002;).

11 A alternativa à morte celular por apoptose é a necrose. A necrose é considerada um
12 processo tóxico em que a célula é uma vítima passiva e segue um modo de morte independente
13 de energia. Dois fatores que irão converter um processo apoptótico em andamento em um
14 processo necrótico incluem uma diminuição da disponibilidade de ATP e caspases. A lesão
15 necrótica é mediada por dois mecanismos principais: interferência com o suplemento de energia
16 da célula e danos diretos à membrana. Algumas principais alterações morfológicas que ocorrem
17 na necrose incluem inchaço celular, formação de vacúolos citoplasmáticos, retículo
18 endoplasmático distendido, bolhas citoplasmáticas, mitocôndria condensada, inchada ou
19 rompida e ruptura de membrana celular (ELMORE, 2007).

20 A autofagia é um processo adaptativo que ocorre em resposta a diferentes formas de
21 estresse, incluindo privação de nutrientes, depleção do fator de crescimento, infecção e hipóxia.
22 A morte por autofagia é caracterizada pelo sequestro do citoplasma e organelas em vesículas
23 duplas ou multimembranas e subsequente degradação por enzimas lisossomais (ELMORE,
24 2007).

25 Durante a autofagia, porções do citoplasma são encapsuladas por membrana, originando
26 estruturas denominadas autofagossomos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). A
27 maquinaria molecular básica autofágica envolve a atividade de proteínas relacionadas à
28 autofagia (Atg), as quais são codificadas pelos genes *ATG*. Em termos simplificados, a
29 autofagia pode ser dividida em várias etapas interligadas. Primeiro há a ativação de um
30 complexo envolvendo serina/treonina quinase ULK1, este complexo é alvo direto da via
31 mTOR, bem como outros reguladores da autofagia. A expansão da membrana autofagossômica
32 é promovida por um segundo complexo multiproteico controlado por uma proteína beclin-1. A
33 expansão da membrana depende de várias proteínas que orquestram a formação do

1 autofagossomo que posteriormente se funde com o lisossomo levando à degradação
2 (THORBURN; THAMM; GUSTAFSON, 2014).

3 4 **2.3. Metabolismo de xenobióticos**

5 O sistema enzimático do citocromo P450 (CYP), consiste em uma superfamília de
6 hemoproteínas que catalisam o metabolismo oxidativo de uma ampla variedade de substâncias
7 químicas exógenas, incluindo fármacos, carcinógenos, toxinas e compostos endógenos, como
8 esteroides, ácidos graxos e prostaglandinas. A família de enzimas CYP desempenha um papel
9 importante no metabolismo de fase I de muitos fármacos. A ampla gama de fármacos que
10 sofrem biotransformação oxidativa mediada por CYP é responsável pelo grande número de
11 interações medicamentosas clinicamente significativas durante a terapia com múltiplos
12 fármacos (BADYAL; DADHICH, 2001).

13 No fígado humano, existem pelo menos 12 enzimas CYP distintas. Cerca de 6
14 isoenzimas das famílias CYP estão envolvidos no metabolismo hepático da maioria dos
15 fármacos, incluindo CYP1A2, 3A4, 2C9, 2D6 e 2E13 (BADYAL; DADHICH, 2001).

16 Nos diversos tecidos, estas enzimas apresentam diferentes níveis de expressão, sendo
17 que a forma seletiva como ocorrem nos tecidos é um dos fatores que determinam a
18 especificidade da ação farmacológica e toxicológica de fármacos e outros xenobióticos em
19 diferentes órgãos. Apesar de haver expressão das enzimas do sistema citocromo *P450*, em
20 tecidos extra-hepáticos, a capacidade de biotransformação de fármacos ou ativação de pró-
21 carcinógenos ou pró-fármacos, nesses tecidos é bem menor quando comparado à
22 biotransformação hepática (PELKONEN; RAUNIO, 1997).

23 Algumas formas de *P450* são expressas seletivamente em tumores, e isto poderia
24 proporcionar uma resistência a fármacos, mas também podem ser previstas terapias futuras
25 utilizando estas enzimas como alvo de fármacos. Muitos fármacos citotóxicos são inativados
26 pela ação de *CYP*, enquanto outros pró-fármacos são ativados pela ação de *CYP*, tornando-os
27 citotóxicos e eficazes na quimioterapia do câncer (ANTONA; SUNDBERG, 2006).

28 Portanto, devido ao papel importante dos *CYPs* na bioativação e inativação de fármacos
29 anticancerígenos, os *CYPs* desempenham um papel importante como determinantes na terapia
30 do câncer. Estes processos são principalmente hepáticos, mas a atividade extra-hepática
31 também pode ser crítica. Além de uma variabilidade interindividual na farmacocinética de
32 fármacos anticancerígenos causados por *CYP* hepáticos, uma atividade alterada nas células
33 tumorais poderia resultar numa eficácia alterada do fármaco. As células cancerígenas por

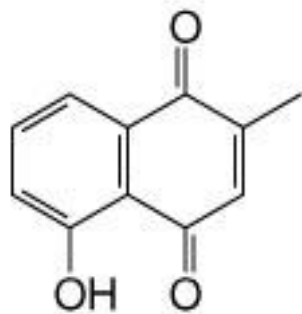
1 mecanismos genéticos ou epigenéticos, devido a maior instabilidade do DNA podem alterar a
2 transcrição de *P450* (ANTONA; SUNDBERG, 2006).

3 As interações entre fitoquímicos e *CYP* são bem reconhecidas por suas implicações
4 clínicas e toxicológicas potenciais. Os fitoquímicos podem atuar como substratos, inibidores
5 ou indutores das isoformas do *CYP*, o que pode levar a interações farmacocinéticas com os
6 fármacos metabolizados (SUMSAKUL et al., 2015). A capacidade dos tumores de metabolizar
7 fármacos é um meio potencial para alcançar uma ótima terapia por ativação de pró-fármacos
8 nas células neoplásicas (ANTONA; SUNDBERG, 2006).

10 2.4. Plumbagina

11 A plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona, $C_{11}H_8O_3$ - PM= 188,18) (Figura
12 2A) é uma naftoquinona, análoga da vitamina K3, que pode ser isolada de folhas, cascas e raízes
13 de algumas espécies dos gêneros *Juglans* (MAHONEY et al., 2000), *Pera* (GUIMARÃES;
14 FARIA, 2006), *Drosera* (ALVARADO et al., 2010), *Diospyros* (DZOYEM et al., 2007), e de
15 representantes do gênero *Plumbago* (Figura 2B). É um composto quinoide amarelo, muito
16 utilizado como ingrediente na medicina *Ayurvédica* (originária da Índia) contra diarreia,
17 indigestão, doenças de pele, e também, muito conhecido por seu efeito abortivo (SUKKASEM
18 et al., 2016; ONO et al., 2015).

20 A)



20 B)



26 **Figura 2** - A) Estrutura química da plumbagina (Sigma-Aldrich). B) *Plumbago indica*,
27 representante da família Plumbaginaceae (Home Remedies).

28 Estudos mostram que espécies como *Plumbago zeylanica*, *Plumbago capensis*,
29 *Plumbago indica*, *Plumbago auriculata*, *Plumbago scandens*, e *Plumbago europaea*,
30 apresentaram atividade antiparasitária (AWASTHI et al., 2016), bactericida (AHMAD;
31 MEHMOOD; MOHAMMED, 1998), fungicida (MAHONEY et al., 2000), inseticida

(BANERJEE et al., 2001) e anti-inflamatória (OYEDAPO, 1996). As propriedades supressoras tumorais foram demonstradas em diversas linhagens de células tumorais tais como MCF-7, de câncer de mama (SAMENI; HANDE, 2016), MG63 de osteosarcoma (XUE et al., 2016), Tca8113 de carcinoma escamoso de língua, (QIU, et al., 2013), linhagens PEO-1 e PEO-4 de câncer de ovário (SINHA et al., 2013), HT29 de câncer de cólon (SUBRAMANIYA et al., 2011), DU145 de câncer de próstata (RESHMA et al., 2016), A375.S2 de melanoma (WANG et al., 2008), entre outros.

Awasthi e colaboradores (2016) observaram que a PB (0,875-14 μ M), apresentou atividade antiparasitária contra a Leishmaniose. A plumbagina induziu morte celular em ambas formas, amastigota e promastigota de *Leishmania donovani*, através da indução do estresse oxidativo, que resultou na despolarização da membrana mitocondrial, depleção nos níveis de ATP, elevação do cálcio citosólico, e aumento da atividade das ciclinas 3/7.

A capacidade anti-inflamatória da PB também foi observada e se deve à sua capacidade de suprimir a ativação do fator *nuclear kappa B* (NF-kB), afetando as funções biológicas de leucócitos que participam de vias da resposta inflamatória, na doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH), uma complicação comum do transplante de medula óssea (CHECKER et al., 2009). Outro trabalho demonstrou atividade antifúngica, nas concentrações de 0,78-3,12 μ g/mL, inibindo significativamente o crescimento de 12 estirpes diferentes de agentes patogênicos de fungos filamentosos e leveduras: *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Alternaria sp.*, *C. albicans*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Cryptococcus neoformans*, *Candida tropicalis*, *Cladosporium sp.*, *Geotrichum candidum*, *Fusarium sp.* e *Penicillium sp.* (PADHYE et al., 2010).

Suas propriedades antitumorais tem chamado maior atenção por sua eficácia contra diferentes linhagens tumorais, sendo sua atividade antiproliferativa e genotóxica atribuída a diferentes mecanismos, como o bloqueio do ciclo celular, o aumento da concentração de EROs (espécies reativas de oxigênio), a despolarização da membrana, o extravasamento de cálcio intracelular, e apoptose, mostrando que mais estudos podem auxiliar para compreender melhor o potencial deste composto na saúde humana (AWASTHI et al., 2016; GAASCHT et al., 2014).

2.5. Atividade antiproliferativa e genotóxica da plumbagina

Diversos estudos demonstraram o potencial da plumbagina contra as células tumorais. A PB apresentou atividade antiproliferativa em células de mieloma múltiplo (OPM1), diminuindo a viabilidade celular, através do ensaio do MTT e induzindo a apoptose na concentração de 50 μ M através da análise de morte celular por citometria de fluxo (WU et al.,

1 2016). Nas linhagens de câncer de próstata, PC-3 e DU145, as concentrações 4 e 8 μM de PB
2 levaram à despolarização da membrana mitocondrial, ativação de caspases 8, 9 e 3, induzindo
3 apoptose por via intrínseca e extrínseca (RESHMA et al., 2016).

4 A PB induziu parada de ciclo celular na fase G2/M em células de carcinoma escamoso
5 da língua (Tca8113) nas concentrações de 5 e 10 μM , resultado obtido pela análise de ciclo
6 celular por citometria de fluxo. Através da análise em microscopia desta mesma linhagem,
7 foram observadas alterações morfológicas características de apoptose, no qual, posteriormente,
8 foi detectada alteração na relação de proteínas pró/anti-apoptóticas Bax/Bcl-3 (QIU et al.,
9 2013).

10 Também foi descrito o seu efeito inibitório em células de câncer de mama (MCF-7) nas
11 concentrações de 5, 10 e 20 μM em diferentes vias de sinalização, que desempenham um papel
12 crucial na proliferação, sobrevivência, invasão e metástase de células cancerígenas através da
13 supressão das principais moléculas de sinalização tais como o NF-KB, p53, que já foi observada
14 em diversos tipos de câncer por desempenhar um papel importante em seu desenvolvimento e
15 progressão. A PB levou as células a parada de ciclo em G0/G1 e fase S, aumento de expressão
16 do gene pró-apoptótico *BAD*, despolarização da membrana mitocondrial e aumento
17 significativo de EROs (SAGAR et al., 2014).

18 A genotoxicidade da PB se dá através do aumento dos níveis de EROs, podendo levar a
19 uma disfunção mitocondrial levando a liberação do citocromo *c* (fator de indução de apoptose)
20 para o núcleo, podendo causar fragmentação do DNA. A partir disso, as EROs liberadas para a
21 mitocôndria poderiam também causar efeitos diretos no núcleo. Estes caminhos poderiam
22 funcionar independentemente ou interdependente causando condensação da cromatina,
23 fragmentação do DNA, levando a mudanças morfológicas e bioquímicas de apoptose,
24 consequentemente matando as células tumorais (SRINIVAS et al., 2004; KHAW et al., 2015).
25 O aumento dos níveis de EROs poderia levar também à ativação da *P53*, que não
26 necessariamente induzirá a apoptose, mas pode parar o ciclo celular, ou estimular o aumento de
27 *BAX* (ONO et al., 2015).

28

1 **REFERÊNCIAS**

- 2 ABBAS, Abul K.; KUMAR, Vinay; FAUSTO, N. **Patologia**: Bases patológicas das doenças.
3 9 ed. Brasil: Editora Elsevier, 1440 p. 2016.
- 4 AHMAD, I.; MEDHMOOD, Z.; MOHAMMAD, F. Screening of some Indian medicinal plants
5 for their antimicrobial properties. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 62, p. 183-193, 1998.
- 6 ALVARADO, Jimmy, et al. Actividad inhibitoria de plantas in vitro de *Drosera capillaris* sobre
7 *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista Peruana de Biología**. v. 17, n. 3, p. 353 – 358, 2010.
8
- 9 ANTONA, C. R.; SUNDBERG, M. I. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer.
10 **Oncogene**, v. 25, p. 1679-1691, 2006.
11
- 12 ANUF, R. A., et al. Antiproliferative effects of *Plumbago rosea* and its purified constituent
13 plumbagin on SK-MEL 28 melanoma cell lines. **Pharmacognosy Research**, v. 6, n. 4, p. 312-
14 319, 2014.
15
- 16 AWASTHI, B. P. et al. Plumbagin, a plant-derived naphthoquinone metabolite induces
17 mitochondria mediated apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani*: an ultrastructural and
18 physiological study. **Apoptosis**, v. 21, p. 941-953, 2016.
19
- 20 BADYAL, D. K.; DADHICH, A. P. Cytochrome P450 and drug interactions. **Indian Journal**
21 **of Pharmacology**, v. 33, p. 248-258. 2001.
22
- 23 BANERJEE, S. et al. Insect growth regulatory activity of naturally occurring quinones and their
24 derivatives in *Dysdercus koenigii* Fabr. (Hern, Pyrrhocoridae). **Applied Entomology**, v. 125,
25 n. 1-2, p.25-30, 2001.
26
- 27 BERTZ, R. J.; GRANNEMAN, G. R. Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood
28 of metabolic pharmacokinetic interactions. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 32, p. 210-258,
29 1998.
30
- 31 CHECKER, Rahul, et al. Anti-inflammatory effects of plumbagin are mediated by inhibition
32 of NF-kappaB activation in lymphocytes. **International Immunopharmacology**, v. 9, p. 949-
33 958, 2009.
34
- 35 CHEN, A., et al. Evaluation of the inhibition potential of plumbagin against cytochrome P450
36 using LC-MS/MS and cocktail approach. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-12, 2016.
37
- 38 DZOYEM, J. P., et al. *In vitro* antifungal activity of extract and Plumbagin from the stem bark
39 of *Diospyros crassiflora* Hiern (Ebenaceae). **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 671-674, 2007.
40
- 41 ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n.
42 4, p. 495-515. 2007.
43
- 44 FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese
45 humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, p. 85-89, 2002.
46
- 47 GAASCHT, F. et al. Plumbagin modulates leukemia cell redox status. **Molecules**, v. 19, p.
48 10011-10032, 2014.

- 1 GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira**
2 **de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.
3
- 4 GUIMARÃES, Dênia A. S.; FARIA, Angélica R.; Substâncias da natureza com atividade anti-
5 Trypanosoma cruzi. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 3, p. 455-465, 2007.
6
- 7 JAISWAL, P. K.; GOEL, A.; MITTAL, R. D. Survivin: A molecular biomarker cancer. **Indian**
8 **Journal of Medical Research**, v. 141, p. 389-397, 2015.
9
- 10 JAYAKIRAN, M. Apoptosis-Biochemistry: A mini review. **Journal Clinical & Experimental**
11 **Pathology**, v. 5, n. 1, p.1-4. 2015.
12
- 13 KHAW, A. K. et al. Plumbagin alters telomere dynamics, induces DNA damage and cell death
14 in human brain tumor cells. **Mutation Research**, v. 793, p. 86-95, 2015.
15
- 16 KLAASSEN, Curtis D.; WATKINS, John B. **Fundamentos em toxicologia de Casarett e**
17 **Doull** (Lange). Porto Alegre, 2 ed. XII 460p, 2012.
18
- 19 KUMAR, Manish, et al. Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat
20 cancer. **Cytotechnology**, v. 68, p. 531-563, 2016.
21
- 22 LEVINE, S.; SINHA, S.; KROEMER, G. Bcl-2 family members. **Autophagy**, v. 4, n. 5, p. 600-
23 606. 2008.
24
- 25 LI, et al. Plumbagin inhibits cell growth and potentiates apoptosis in human gastric cancer cells
26 in vitro through the NF-KB signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 33, p. 242-
27 249, 2012.
28
- 29 LIU, Y. et al. Anticancer properties and pharmaceutical applications of plumbagin: A review.
30 **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 45, n. 3, p. 1-19. 2017.
31
- 32 MAHONEY, N. et al. Regulation of aflatoxin production by naphthoquinones of walnut
33 (*Juglans regia*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n.9, p. 4418-4421, 2002.
34
- 35 NEWMANN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to
36 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.
37
- 38 ONO, T. et al. Plumbagin suppresses tumor cell growth in oral squamous cell carcinoma cell
39 lines. **Oral Diseases**, v. 21, p. 501-511, 2015.
40
- 41 OUYANG, L. et al. Plant natural products: from tradicional compounds to new emerging drugs
42 in cancer therapy. **Cell Proliferation**, v. 47, p. 506-515. 2014.
43
- 44 OYEDAPO, O. O. Studies on bioactivity of the root extract of *Plumbago zeylanica*.
45 **International Journal of Pharmacognosy**, v. 34, n.5, p.365-369, 1996.
46
- 47 PADHYE, S. et al. Perspectives on medicinal properties of plumbagin and its analogs.
48 **Medicinal Research Reviews**, v. 32, n. 6, p. 1131-1158, 2012.
49

- 1 PAROLIN, M. B.; REASON, I. J. M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças
2 hepatobiliares. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, 2001.
3
- 4 PELKONEN, O.; RAUNIO, H. Metabolic activation of toxins: tissue-specific expression. And
5 metabolism in target organs. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, n. 4, p. 767-774.
6 1997.
7
- 8 QIU, J. et al. Plumbagin induces the apoptosis of human tongue carcinoma cells through the
9 mitochondria-mediated pathway. **Medical Science Monitor Basic Research**, v. 19, p. 228-
10 236, 2013.
11
- 12 RESHMA, R. S. et al. Plumbagin, a naphthoquinone derivate induces apoptosis in BRCA ½
13 defective castrate resistant prostate cancer cells as well as prostate cancer stem-like cell.
14 **Pharmacological Research**, v. 105, p. 134-145, 2016.
15
- 16 SAGAR, S. et al. Cytotoxicity and apoptosis induced by a plumbagin derivate in estrogen
17 positive MCF-7 breast cancer cells. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 14, p.
18 170-180, 2014.
19
- 20 SARAVANAN, R. et al. A review on the role of phytoconstituents in breast cancer cells.
21 **International Journal of PharmTech Research**, v.6, no.2, p. 799-808, 2014.
22
- 23 SAMENI, S.; HANDE, M. P. Plumbagin triggers DNA damage response, telomere dysfunction
24 and genome instability of human breast cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 82, p.
25 256-268, 2016.
26
- 27 SINHA, S. et al. Plumbagin inhibits tumorigenesis and angiogenesis of ovarian cancer cells in
28 vivo. **International Journal of Cancer**, v. 132, p. 1201-1212, 2013.
29
- 30 SRINIVAS, P. et al. Plumbagin induces reactive oxygen species, which mediate apoptosis in
31 human cervical cancer cells. **Molecular Carcinogenesis**, v. 40, p. 201-211, 2004.
32
- 33 SUBRAMANIYA, B. R. et al. Apoptosis inducing effect of plumbagin on colonic cancer cells
34 depends on expression of COX-2. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, p. 1-11, 2011.
35
- 36 SUKKASEM, N. et al. Imbalance of the antioxidative system by plumbagin and Plumbago
37 indica L. extract induces hepatotoxicity in mice. **Journal of Intercultural
38 Ethnopharmacology**, v. 5, n. 2, 2016.
- 39 SUMSAKUL, W. et al. In vitro inhibitory effects of plumbagin, the promising antimalarial
40 candidate, on human cytochrome P450 enzymes. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**,
41 v. 8, n. 11, p. 914-918, 2015.
42
- 43 THORBURN, A. THAMM, D. H. GUSTAFSON, D. L. Autophagy and Cancer Therapy.
44 **Molecular Pharmacology**, v. 85, p. 830-838, 2014.
45
- 46 XUE, Y. et al. Plumbagin exhibits an anti-proliferative effect in human osteosarcoma cells by
47 downregulating FHL2 and interfering with Wnt/β-catenin signaling. **Oncology Letters**, v. 12,
48 p.1095-1100, 2016.
49

- 1 WANG, Clay C. C., et al. Plumbagin induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive
2 oxygen species/c-Jun N-terminal kinase pathways in human melanoma A375.S2 cells. **Cancer**
3 **Letters**, v. 259, p. 82-98, 2008.
4
- 5 WU, Hongwei, et al. Plumbagin inhibits cell proliferation and promotes apoptosis in multiple
6 myeloma cells through inhibition of the PI3K/Akt-mTOR pathway. **Oncology Letters**, v. 12,
7 p. 3612-3618, 2016.
8
- 9 ZHANG, X. et al. Plant natural compounds: targeting pathways of autophagy as anti-cancer
10 therapeutic agents. **Cell Proliferation**, v. 45, p. 466-476, 2012.

1 **3. OBJETIVOS**

2 **3.1. Objetivo geral**

3 Compreender e correlacionar os mecanismos moleculares pelos quais a PB atua como
4 agente citotóxico e genotóxico utilizando a linhagem de hepatocarcinoma humano
5 (HepG2/C3A).

6 **3.2. Objetivos específicos**

- 7 - Avaliar a citotoxicidade da plumbagina utilizando o ensaio da resazurina na linhagem
8 HepG2/C3A e determinar concentrações que serão utilizadas nas demais avaliações;
- 9 - Avaliar a integridade da membrana em células HepG2/C3A tratadas com plumbagina;
- 10 - Avaliar o perfil das fases do ciclo celular na linhagem tumoral HepG2/C3A após o
11 tratamento com plumbagina;
- 12 - Avaliar a ação da plumbagina na indução de apoptose nas células HepG2/C3A;
- 13 - Avaliar a frequência de danos no DNA com o ensaio do cometa em células HepG2/C3A
14 após o tratamento com a plumbagina;
- 15 - Analisar a expressão de genes envolvidos no processo de regulação do ciclo celular,
16 morte celular, danos de DNA, metabolismo de drogas e estresse oxidativo em células
17 HepG2/C3A quando tratadas com a plumbagina;
- 18 - Avaliar a expressão de proteínas envolvidas no processo de danos de DNA, estresse
19 oxidativo, ciclo celular e apoptose em células HepG2/C3A.

20

1 **ARTIGO**

2

3 Artigo a ser submetido à revista **Toxicology in vitro**.

4

5 **Título: mRNA como marcadores de expressão relacionados ao metabolismo de**
6 **xenobióticos, danos no DNA, indução de apoptose e autofagia na citotoxicidade e**
7 **genotoxicidade da plumbagina em células HepG2/C3A.**

8

9 Crippa, G. V.*¹; Zanetti, T. A.¹; Biazi B. I.¹; Baranovisk, A.¹; Marques, L. A.¹; Coatti, G. C.²;
10 Lepri, S. R.¹; Mantovani, M. S.¹.

11

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

14 2. Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco. Instituto de Biociências.
15 Universidade de São Paulo. São Paulo/SP.

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30 *Autor correspondente: Giovanna Vaz Crippa

31 E-mail: giovannavazc@hotmail.com

32 Departamento de Biologia Geral – CCB

33 Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário

34 P.O. Box 6001, CEP: 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.

35 Tel: +55 43 3371-4977

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

RESUMO

Compostos fitoquímicos e seus derivados têm sido propostos como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos. A plumbagina (PB), uma naftoquinona extraída principalmente do *Plumbago indica* Linn (Plumbaginaceae), possui propriedades de ação como antiparasitária, antifúngica, anti-inflamatória, bactericida e potencial antitumoral. Contudo, os mecanismos de ação da PB ainda precisam ser totalmente esclarecidos e sua toxicidade e efeitos prejudiciais precisam ser estabelecidos. Desta maneira, este estudo buscou correlacionar as atividades citotóxicas e genotóxicas da PB na linhagem de hepatocarcinoma humana (HepG2/C3A) com marcadores moleculares de expressão de mRNA. Na avaliação da citotoxicidade a PB reduziu a viabilidade celular a partir da concentração de 15 µM, efeito semelhante foi observado na análise de integridade de membrana por citometria de fluxo. Na avaliação da expressão de mRNA do sistema de metabolização de xenobióticos citocromo P450 observou-se indução significativa dos níveis de mRNA dos genes *CYP1A1* (21,55x), *CYP1A2* (105,42x) e *CYP3A4* (121,65x), sugerindo que a PB sofre metabolização extensiva em resposta a sua citotoxicidade. Além disso, observamos que a PB induziu apoptose na citometria de fluxo, aumento na expressão relativa de mRNA dos genes *PUMA* (9,23x; 18,46x), *CASP3* (2,06x; 2,91x) e *CASP8* (2,65x; 4,45x) em ambas concentrações e redução na expressão do mRNA de *PARP1* (-2,43x) na maior concentração. O aumento na expressão do mRNA de *beclin1* (2,45x; 3,49x), demonstra que a PB poderia estar também associada à morte por autofagia. Na análise do ciclo celular a PB induziu parada em fase G2/M, sugerindo indução de danos no DNA, como foi observado no ensaio do cometa a partir de 5 µM. Esses danos são correlacionados na expressão aumentada dos mRNA dos genes *p21*, *GADD45A* e *H2AFX*, além de alterar também a expressão das proteínas H2AX, p21, p53, Chk1 e Chk2. Esses resultados permitem uma maior compreensão da ação celular da PB e de sua toxicidade, contribuindo para um possível desenvolvimento de fármacos baseados neste fitoquímico, podendo a análise molecular de marcadores de expressão de mRNA serem indicadores de monitoramento de toxicidade em células humanas.

30 Palavras-chave: Ciclo celular; danos no DNA; morte celular; autofagia.

31
32

1. Introdução

33 A atividade citotóxica e genotóxica da PB tem sido demonstrada em diferentes estudos
34 envolvendo várias linhagens celulares e também através de alguns estudos *in vivo*, utilizando
35 modelos de animais. A propriedade desejável de um agente antitumoral é induzir a morte de
36 células tumorais, com o mínimo de toxicidade para as células normais (Seshadri; Rajaram;
37 Rajaram, 2011).

38 Fármacos contendo a estrutura quinona têm recebido atenção significativa devido aos
39 seus efeitos antitumorais. Essas drogas incluem a doxorubicina, mitoxantrona e mitomicina-
40 C. As quinonas são amplamente distribuídas em plantas (Seshadri; Rajaram; Rajaram, 2011).

1 O uso de plantas com fins medicinais vem ocorrendo desde os primórdios da civilização
2 e compreendem as espécies vegetais que produzem algum princípio ativo utilizado para o
3 tratamento de doenças, fornecendo material fitoterápico através de folhas, flores, frutos, raízes,
4 entre outros, dos quais são preparados chás e outras formas de medicamento. Devido à sua
5 grande diversidade, os fitoquímicos podem atingir uma ampla variedade de funções fisiológicas
6 e de vias metabólicas (Zhou; Li; Chen, 2010).

7 A compreensão dos mecanismos de ação de compostos derivados de produtos naturais
8 é essencial para identificar seus efeitos na saúde humana. Estes compostos atuam através de
9 diversos mecanismos celulares e moleculares, incluindo a inibição da proliferação celular, a
10 indução da apoptose, autofagia e inibição da migração/invasão e angiogênese. Estudos de
11 mecanismos de ação são realizados a fim de encontrar compostos mais efetivos e seletivos ou
12 que visem à descoberta de novas estratégias que impeçam o avanço do câncer. A linhagem
13 HepG2/C3A é um derivado da linhagem HepG2, é um modelo bem estabelecido em ensaios *in*
14 *vitro* e apresenta alto índice de expressão de proteínas do metabolismo de xenobióticos.

15 A plumbagina (PB) é uma naftoquinona que pode ser extraída de raízes, cascas e folhas
16 de algumas famílias como *Plumbaginaceae*, *Ebenaceae*, *Dioncophyllaceae*, *Anastrocladaceae*
17 e *Droseraceae*. Este componente natural possui várias atividades biológicas distintas, incluindo
18 atividade antiparasitária (AWASTHI et al., 2016), bactericida (AHMAD; MEHMOOD;
19 MOHAMMED, 1998), fungicida (MAHONEY et al., 2000), inseticida (BANERJEE et al.,
20 2001) e anti-inflamatória (OYEDAPO, 1996). Atualmente, um grande número de pesquisas
21 vem buscando elucidar os mecanismos pelo qual a PB atua na terapia anticâncer (LIU et al.,
22 2017). A plumbagina tem sido descrita pela sua atividade antiproliferativa e genotóxica nas
23 linhagens tumorais MCF-7 de câncer de mama (SAMENI; HANDI, 2016), MG63 de
24 osteosarcoma (XUE et al., 2016), Tca8113 de câncer de língua (QIU et al., 2016), PEO-1 e
25 PEO-4 de câncer de ovário (SINHA et al., 2013), HT29 de câncer de cólon (SUBRAMANIYA
26 et al., 2011) e DU145 de câncer de próstata (RESHMA et al., 2016).

27 Considerando que a PB já demonstrou atividade em diversos tipos de linhagens tumorais
28 através da indução de apoptose, parada de ciclo celular, aumento de espécies reativas de
29 oxigênio, e além disso, foi proposta como um potente regulador de metástase (Gaascht et al.,
30 2014; Awasthi et al., 2016), a elucidação e correlação dos mecanismos de ação da PB tornam-
31 se uma importante ferramenta no entendimento da sua toxicidade e efeitos prejudiciais para
32 seres humanos no seu uso terapêutico. Desta maneira, este estudo buscou correlacionar as
33 atividades citotóxicas e genotóxicas da PB na linhagem de hepatocarcinoma humana
34 (HepG2/C3A) com os marcadores moleculares de expressão de mRNA.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultivo celular

A linhagem celular de hepatocarcinoma humano, HepG2/C3A, foi obtida do Banco de células do Rio de Janeiro, livre de micoplasma. As células foram mantidas em frascos para cultura de 25 cm² com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10% de soro bovino fetal e contendo 0,1% de penicilina/estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas em estufa úmida com 5% de CO₂ a 37 °C.

2.2. Agente químico

O composto plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) utilizado, é um derivado de naftoquinona isolado da raiz do *Plumbago indica* Linn (CAS 481-42-5, C₁₁H₈O₃, PM=188,18, *Sigma-Aldrich* Brasil). A plumbagina foi dissolvida em DMSO (0,1%) (100mM) e diluída em meio de cultura. As concentrações utilizadas foram selecionadas com base nos ensaios da literatura e no ensaio de citotoxicidade do presente estudo.

2.3. Ensaio de citotoxicidade (Resazurina)

A citotoxicidade foi avaliada através do ensaio da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) de acordo com o protocolo de McMillian et al. (2002). Em placa de 24 poços foram semeadas 5×10⁴ células/poço. Após 24 h de estabilização, as células foram tratadas com plumbagina nas concentrações 5, 10, 15 e 17,5 µM. Após 24 h de tratamento, o meio foi descartado e adicionado 500 µL de resazurina 60 µM/poço. As células foram incubadas a 37 °C por 3 h. Os dados de viabilidade celular foram obtidos através do leitor de fluorescência Glomax® (Promega) (540-560 nm de excitação e 580-600 nm de emissão). Os experimentos foram realizados em três repetições.

2.4. Ensaio por citometria de fluxo

2.4.1. Ciclo celular

Através da coloração das células com iodeto de propídio, foi avaliada a cinética do ciclo celular. As células foram distribuídas em porcentagem nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S, G2/M), de acordo com a intensidade de fluorescência. Em placa de 6 poços um total de 7,2×10⁵ células foram semeadas por poço. Após 24 h de estabilização, as células foram tratadas com PB, nas concentrações 5, 10 e 15 µM por 24 h. Após o tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm por 5 min, ressuspensas em PBS (tampão fosfato-salino) e incubadas com 5 µL de RNase (2 µg/mL) por 30 min a 37 °C. Posteriormente, 50 µL dessa suspensão foi incubada por 30 min com 200 µL *Guava Cell Cycle Reagent* (Merck Millipore –

1 Cat.4500-0220) protegidos da luz. Após esses procedimentos, as amostras foram avaliadas pelo
2 citômetro de fluxo (*Guava easyCyte™*, *Merck Millipore*) utilizando o *Software InCyte* com
3 5000 eventos por tratamento. Os experimentos foram realizados em três repetições.

4 2.4.2. Morte Celular por apoptose

5 Foi avaliada a indução de apoptose pela plumbagina, pela marcação com Anexina V-
6 PE (CF647) e 7-AAD (intercalante de DNA) com o kit *PE Annexin V Apoptosis Detection*
7 (*Biosciences* – Cat.559763). Foram avaliados 3 parâmetros: Células não marcadas,
8 consideradas viáveis; células marcadas apenas com Anexina V-PE, ou duplo marcadas
9 (Anexina V-PE + 7-AAD), consideradas como apoptóticas; células marcadas apenas com 7-
10 AAD consideradas como células mortas. Foram semeadas $7,2 \times 10^5$ células por poço, em placa
11 de 6 poços e tratadas com PB (5, 10 e $15 \mu\text{M}$) por 24 h após o período de estabilização. Após
12 24 h de tratamento, as células foram colhidas e processadas seguindo o protocolo do kit. Após
13 esses procedimentos, as amostras foram avaliadas pelo citômetro de fluxo (*Guava easyCyte™*,
14 *Merck Millipore*) utilizando o *Software InCyte* com 5000 eventos por tratamento. Os
15 experimentos foram realizados em três repetições.

16 2.4.3. Integridade de membrana

17 A verificação de integridade de membrana foi realizada pelo citômetro de fluxo *Guava*
18 *EasyCyte™* (*Merck Millipore*). Foram semeadas $7,2 \times 10^5$ células por poço, em placa de 6 poços.
19 Após 24 h de estabilização, foram adicionados os tratamentos com PB (5, 10 e $15 \mu\text{M}$). Após
20 24 h de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 min e
21 ressuspendidas em 200 μL de PBS. Para avaliação da integridade de membrana, foi adicionado
22 25 μL de PI (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em 100 μL da suspensão, aguardado 5 min, foram analisadas 5000
23 células por tratamento por citometria de fluxo, foram consideradas íntegras as células não
24 coradas.

25 2.5. Ensaio do Cometa

26 Para a avaliação de genotoxicidade foi utilizado o Ensaio do Cometa (Collins et al.,
27 2008). Um total de $7,2 \times 10^5$ células foram semeadas por poço, em placa de 6 poços. Em seguida,
28 as células foram tratadas com PB (5, 10 e $15 \mu\text{M}$). Após 3 h de tratamento, as células foram
29 colhidas, centrifugadas (1000 rpm por 5 min) e ressuspendidas. Em seguida, foram suspensas
30 em agarose de baixo ponto de fusão (*Low Melting Point* - 0,5%) e distribuídas em lâminas pré-
31 gelatinizadas com agarose comum (1,5%). As células foram lisadas (NaCl 2,225 M,
32 EDTAtitriplex 89 mM e Tris 8,9 mM) por 60 min à 4 °C e submetidas a condições alcalinas
33 (EDTAtitriplex 1 mM e NaOH 0,3 N) por 20 min. A eletroforese foi realizada em $\text{pH} > 13$, 25

1 V, 300 mA durante 20 min. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 N e pH
2 7,5 corrigido com HCl), fixadas em álcool absoluto, secadas e mantidas a 4 °C para posterior
3 coloração. Para análise, as lâminas foram coradas com brometo de etídio (2 µg/mL) e
4 analisadas 100 células por lâmina, sendo 2 lâminas por tratamentos. O experimento foi
5 realizado em três repetições. As imagens foram obtidas através do Microscópio EVOS® *FL*
6 *Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher)* com aumento de 200X. As imagens dos cometas
7 foram analisadas no programa *CometScore*®, para avaliar o parâmetro *Tail moment*.

8 2.6. Análise de expressão de mRNA via RT-qPCR

9 A RT-qPCR foi utilizada para avaliar alterações na expressão relativa de genes
10 relacionados à morte celular por apoptose (*PUMA*, *Survivin*, *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1*),
11 estresse oxidativo (*GPX1*), danos no DNA (*GADD45A*, *H2AFX*), regulação do ciclo celular
12 (*p21*, *MYC* e *TP53*), metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*, *CYP1A2* e *CYP3A4*), e autofagia
13 (*beclin1*). Um total de 10⁶ células foram semeadas em placas de 6 poços e tratadas com
14 plumbagina (10 e 15 µM) por 12 h. Após os tratamentos foi extraído o RNA total utilizando-se
15 *RNeasy*® Mini Kit (*Qiagen*, Cat.74106), segundo as especificações do fabricante.
16 Posteriormente, parte da amostra foi encaminhada para leitura em espectrofotômetro (*BioDrop*
17 *µLite*, *BioDrop*) para quantificação e avaliação da pureza do RNA sendo a razão ($A_{260/280nm}$)
18 obtida entre 1,8 e 2, e sua integridade foi verificada em gel de agarose 0,8 %. Três repetições
19 experimentais foram realizadas. A síntese de cDNA foi realizada em termociclador T100™
20 *Thermal Cycler BIO-RAD*, onde 1000 ng de RNA total foram diluídos em H₂O DEPC (volume
21 total de 12,4 µL), 1 µL de oligo dT (10 pmd/mL) e 2 µL de dNTPs (2,5 mM) e mantidas por 15
22 minutos a 60 °C. Em seguida, foram mantidas em gelo e adicionado 4 µL de 5X *First Strand*
23 *Buffer* (250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ e 100 mM) e aguardado 2
24 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foi adicionado 0,1 µL de RNAase out e 0,5
25 µL de enzima transcriptase reversa (*M-MLV-Invitrogen*, *Life Technologies*) por amostra, as
26 quais foram mantidas por 37 °C/50', 70 °C/15' e a etapa final à 10 °C.

27 Para PCR em tempo real foi utilizado o composto fluorescente (5 µL) *Plantinum SYBER*
28 *Green qPCR Supermix-UDG* (Bio-Rad, Cat.11733038), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo
29 iniciador (10pmol) e 5 µL de cDNA de cada amostra (250 ng). As reações de qPCR foram
30 realizadas nas seguintes condições: 95° C por 5 minutos e 45 ciclos de 95° C/20 segundo, 60°
31 C/30 segundos, 72° C/20 segundos no aparelho CFX96 *Touch Deep Well*™ *Real-Time PCR*
32 *Detection System* (Bio-Rad). A análise da curva de *Melting* foi realizada no final de cada reação
33 com temperatura de 50°C a 90°C a cada 0,5 graus por 20 segundos. Os genes utilizados foram

1 comparados com a expressão do gene normalizador *GAPDH*. Todos os primers foram
2 adquiridos na *Sigma-Aldrich* Brasil. A eficiência dos oligonucleotídeos foi calculada pelo
3 programa *LinRegPCR*, versão 2013.1. O experimento foi realizado em três repetições.

4 5 2.7. Expressão de proteína de danos no DNA

6 Utilizando o equipamento *MAGPIX® System* foram avaliadas as alterações nas
7 concentrações de proteínas através da tecnologia *LUMINEX XMAP®*, utilizando o marcador
8 fluorescente (Estreptavidina-Ficoeritrina (PE)). Foram semeadas $1,4 \times 10^5$ células em placa de
9 24 poços, após 12 h de tratamento com plumbagina (10 e 15 μM) foram processadas seguindo
10 o protocolo do *MILLIPLEX®MAP Kit Human DNA Damage/Genotoxicity – 7 Plex* (Cat. 48-
11 621MAG), utilizando o programa *xPONENT 4.2*. O experimento foi realizado em três
12 repetições.

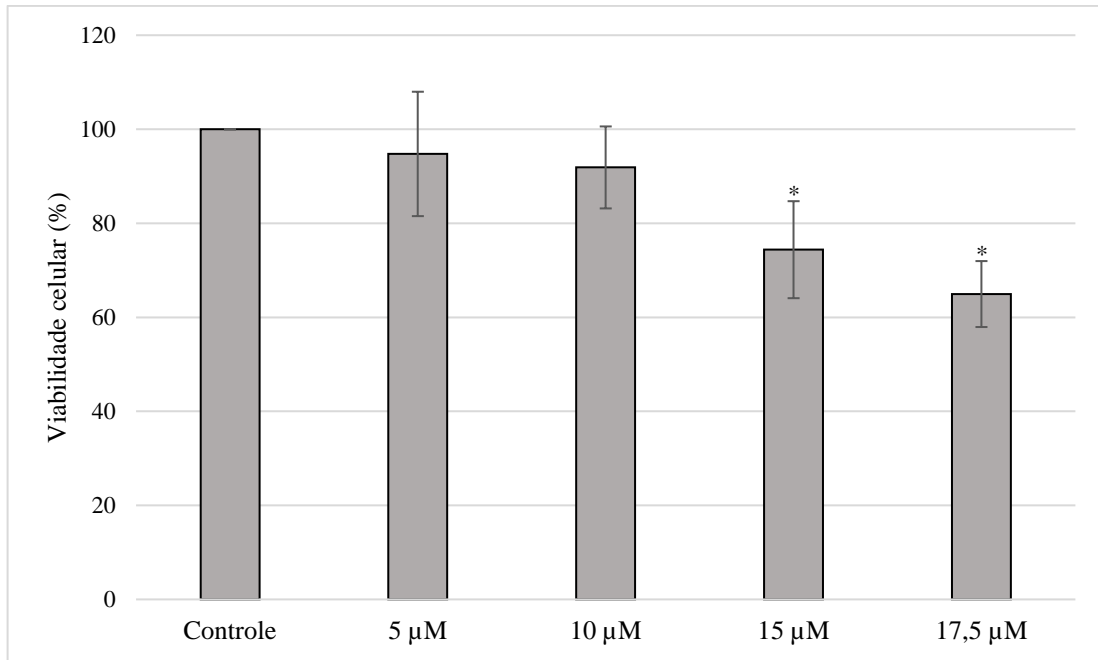
13 14 2.8. Análise Estatística

15 Os resultados obtidos nos ensaios de resazurina, ciclo celular, morte celular, cometa,
16 integridade de membrana, expressão de mRNA e proteína foram comparados por ANOVA
17 seguida de *Dunnet* ($p < 0,05$). Essas análises estatísticas foram realizadas através do programa
18 *GraphPad Prism 5*. A análise dos dados de expressão gênica foi realizada também com o
19 método *Pairwise Fixed Reallocation Randomization Test* inserido no programa *Rest 2009*
20 (Pfaffl et al., 2002). Sendo considerado significativo pelo *Rest* e fator de expressão (*Fold*
21 *change-razão*) acima/abaixo de 2 vezes.

22 23 **3. Resultados**

24 3.1. Ensaio de citotoxicidade (Resazurina)

25 A partir da concentração de 15 μM observou-se que a PB apresentou significativa
26 citotoxicidade (viabilidade = $74,38 \pm 10,32$) quando comparado com o controle negativo
27 (100 ± 0) (Figura 1).



1

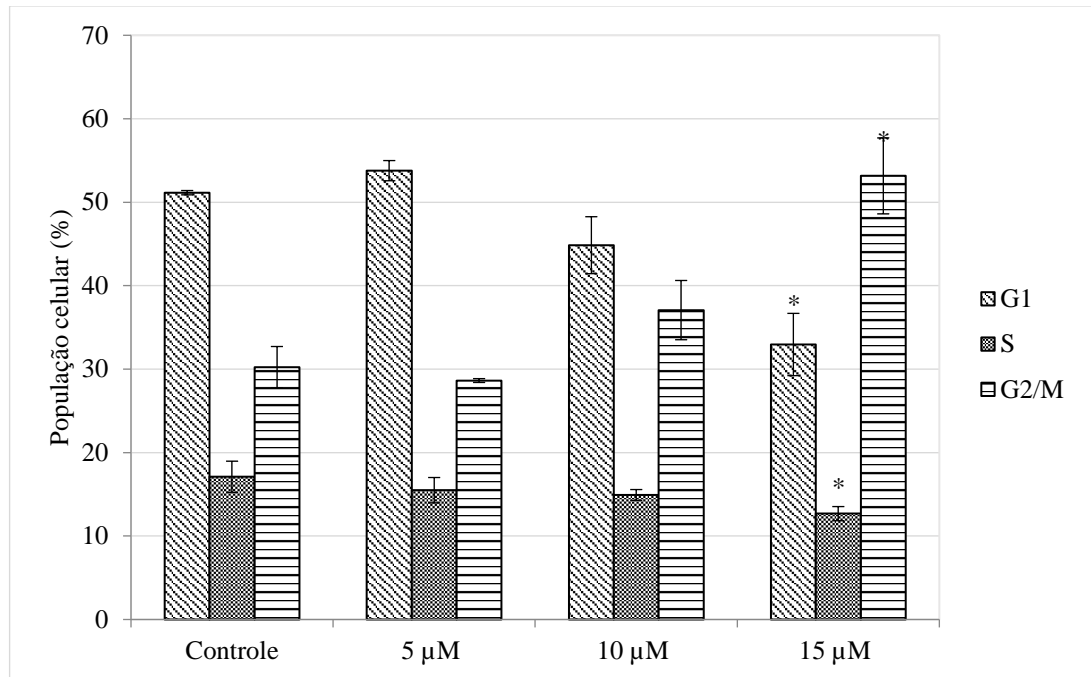
2 **Figura 1** - Viabilidade celular, obtida pelo ensaio de citotoxicidade pelo método da resazurina
 3 de células HepG2/C3A após 24 h de exposição aos tratamentos com plumbagina (5; 10; 15;
 4 17,5μM). (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,05$).

5

6 3.2. Análise das fases do ciclo celular

7 Para o ciclo celular foi observada uma redução significativa da população celular em
 8 G1 ($32,95 \pm 3,73$) e S ($12,64 \pm 0,85$) na concentração de 15 μM em relação ao controle (G1:
 9 $51,14 \pm 0,26$; S: $17,1 \pm 1,87$, respectivamente), e subsequente aumento significativo na fase G2/M
 10 ($53,15 \pm 4,55$) comparado ao controle ($30,22 \pm 2,49$). Os demais tratamentos não apresentaram
 11 alteração em relação ao controle (Figura 2).

1



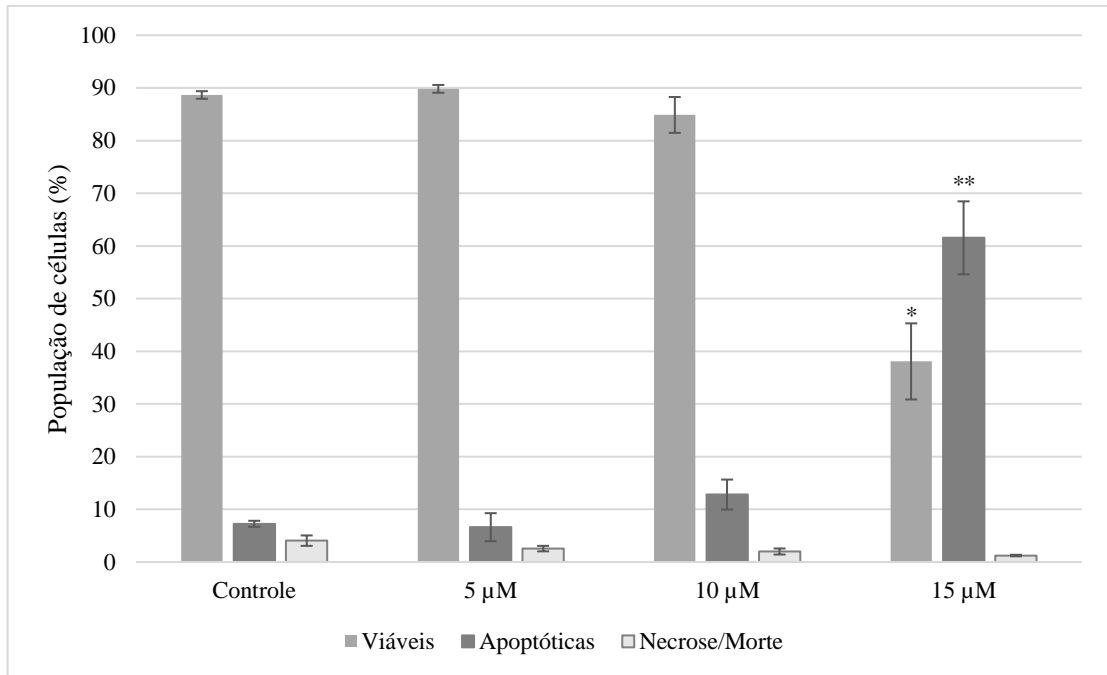
2

3 **Figura 2** - Distribuição das células HepG2/C3A nas diferentes fases do ciclo celular, G1, S,
 4 G2/M (em porcentagem) por citometria de fluxo (marcação com iodeto de propídio), após 24 h
 5 de tratamento com 5; 10 e 15 μM de PB. (*) Estatisticamente significativo em relação ao
 6 controle $p < 0,05$.

7

8 3.3. Análise da morte celular

9 Na análise da apoptose observou-se uma redução significativa na frequência de células
 10 viáveis na concentração de 15 μM ($38,08 \pm 7,2$) em relação ao controle ($88,66 \pm 0,72$) (Figura 3).
 11 Como consequência, houve um aumento na frequência da população de células em apoptose,
 12 na concentração de 15 μM (61,54%) (Figura 4).



1

2 **Figura 3** - Análise de morte celular por citometria de fluxo (marcação com Annexin-CF647/7-
 3 AAD) na linhagem celular HepG2/C3A, após 24 h de tratamento com PB nas concentrações de
 4 5; 10 e 15 µM. (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle ($p < 0,05$). (**)
 5 Estatisticamente significativo em relação do controle (p entre 0,01 e 0,001).

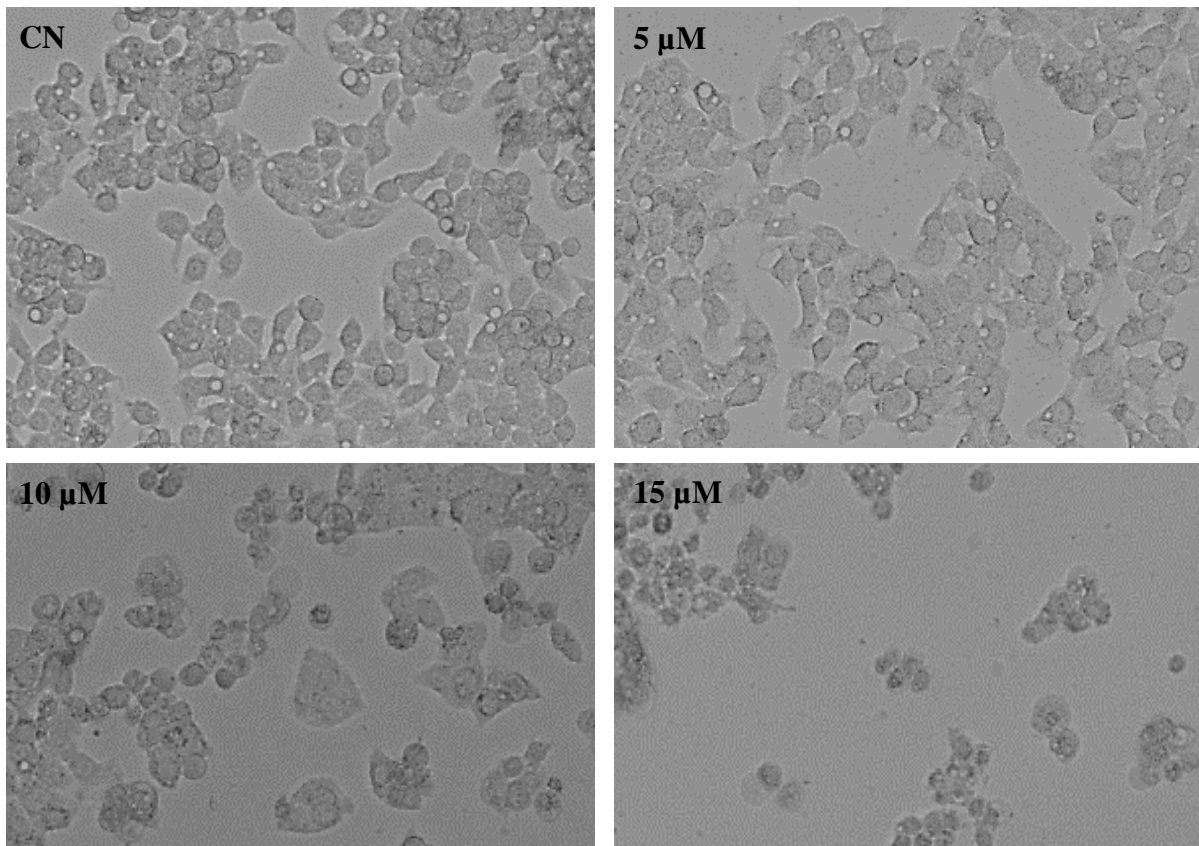
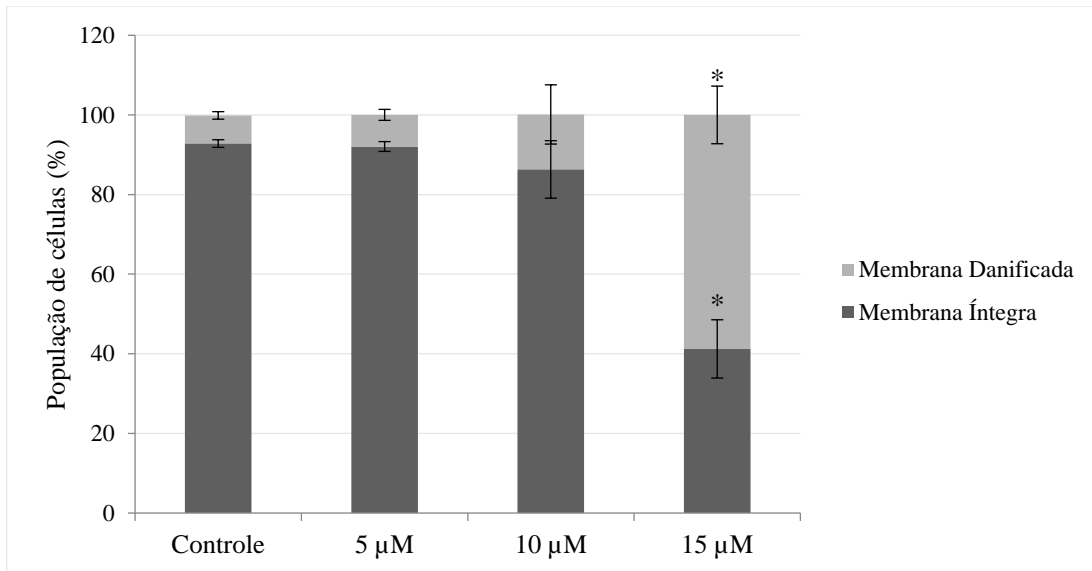


Figura 4 - Imagens obtidas através do Microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) de células HepG2/C3A tratadas por 24 h com diferentes concentrações de PB (5; 10 e 15 µM) e o controle negativo em aumento de 100x.

1 3.4. Análise da integridade de membrana

2 Na análise de integridade de membrana (Figura 5), o tratamento com PB (15 μ M),
 3 reduziu significativamente a população celular com a membrana íntegra, sendo que 60% das
 4 células apresentam membrana danificada.



5

6 **Figura 5** - Análise de integridade de membrana por citometria de fluxo (marcação com iodeto
 7 de propídio) na linhagem celular HepG2/C3A, tratada com PB nas concentrações de 5; 10, e 15
 8 μ M. (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle $p < 0,05$.

9

10 3.5. Ensaio do Cometa

11 No ensaio do cometa, a PB apresentou atividade genotóxica significativa ($p < 0,05$) nas
 12 concentrações 5 μ M ($6,82 \pm 2,85$), 10 μ M ($26,02 \pm 3,20$) e 15 μ M ($38,17 \pm 6,77$), em relação ao
 13 controle ($0,15 \pm 0,05$) após 3 h de tratamento (Figura 6), apresentado pelo parâmetro *Tail*
 14 *moment*. O aumento dos níveis de danos no DNA corresponde a um maior comprimento da
 15 cauda do cometa (Steinert, 1996) como pode ser verificado na Figura 7, comparando os
 16 nucleoides do controle negativo (A), com nucleoides obtidos do tratamento com PB a 10 μ M
 17 (B) observados em microscópio de fluorescência em aumento de 200x.

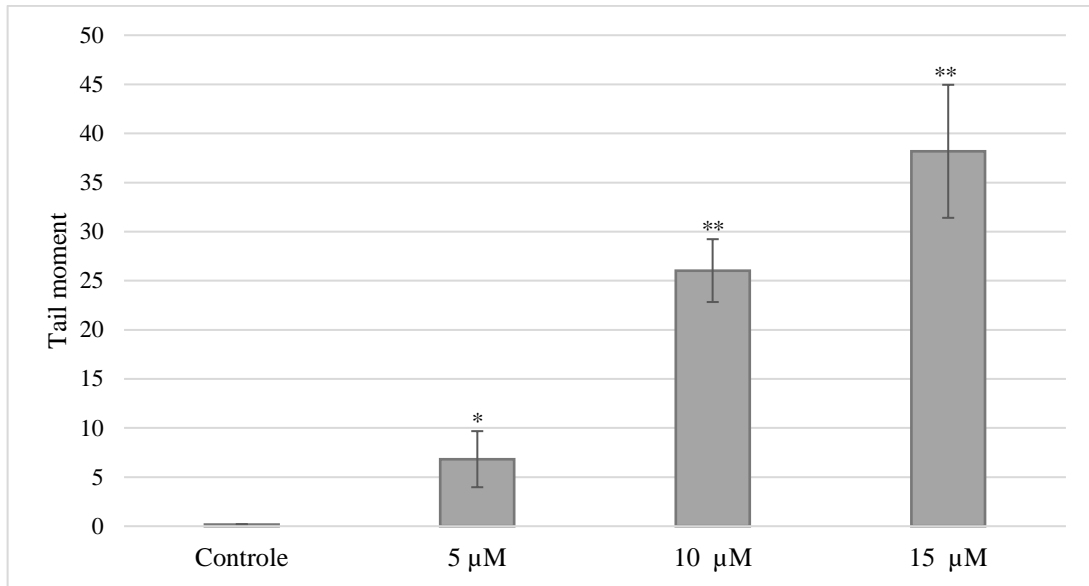


Figura 6 - Análise de danos de DNA através do ensaio cometa após 3 h de tratamento com a PB, nas concentrações 5; 10 e 15 µM. (*) Estatisticamente significativo em relação ao controle p entre 0,01 e 0,05. (**) Estatisticamente significativo em relação do controle, p entre 0,01 e 0,001.

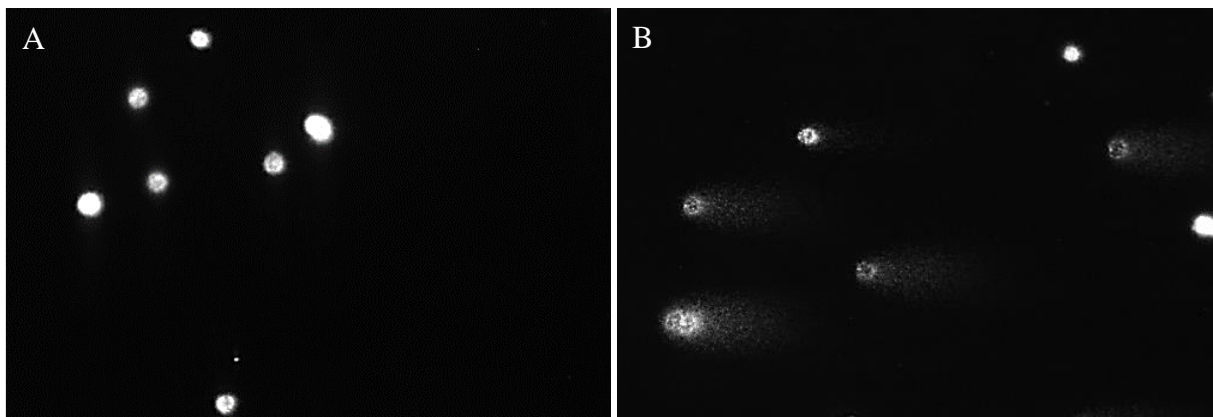
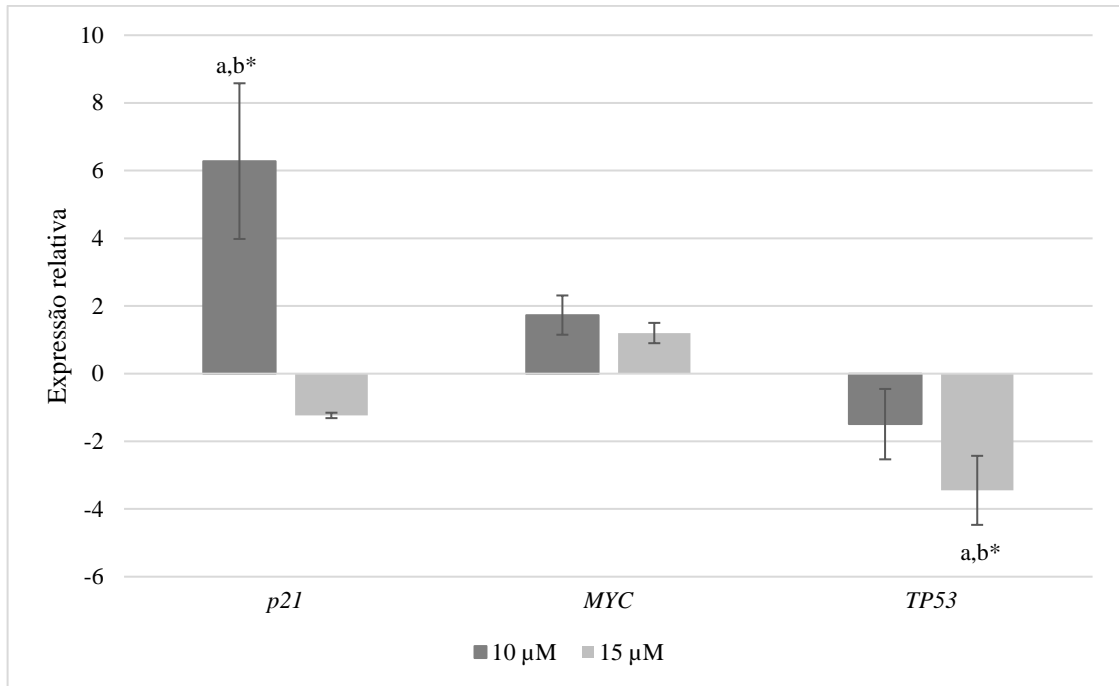


Figura 7 - Imagens obtidas através do Microscópio EVOS® FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) com aumento de 200X. (A) Controle negativo; (B) Nucleoides após 3 horas de tratamento na concentração de 10 µM de PB.

3.6. Expressão de mRNA

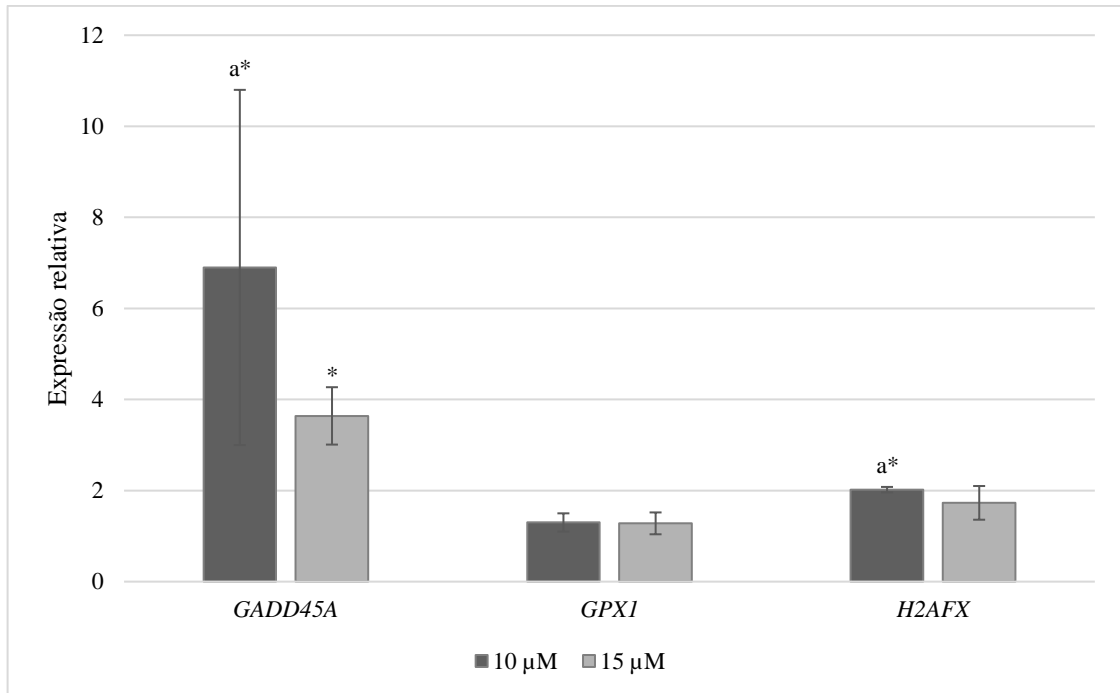
A partir da análise da expressão de mRNA de genes relacionados ao ciclo celular, verificou-se que não houve alteração significativa na expressão do mRNA do gene *MYC* (1,73x; 1,2x). No entanto, observou-se aumento significativo da expressão relativa do mRNA de *p21* (6,28x) na concentração de 10 µM em relação ao controle e à maior concentração, e redução significativa na expressão relativa do mRNA do gene *TP53* (-3,44x) na maior concentração (15 µM), sendo significativamente diferente da expressão relativa na menor concentração testada (-1,4x). (Figura 8).



1

2 **Figura 8** - Expressão relativa de mRNA de genes relacionados a progressão do ciclo celular
 3 (*MYC*, *p21*, *TP53*) obtidos pela técnica de RT-qPCR, após 12 h de tratamento com PB nas
 4 concentrações 10 e 15 μM. Os dados são apresentados como média da expressão relativa. A
 5 razão e a análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009. (a) Diferença
 6 significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$). (b) Diferença significativa entre as concentrações
 7 testadas ($p \leq 0,05$).

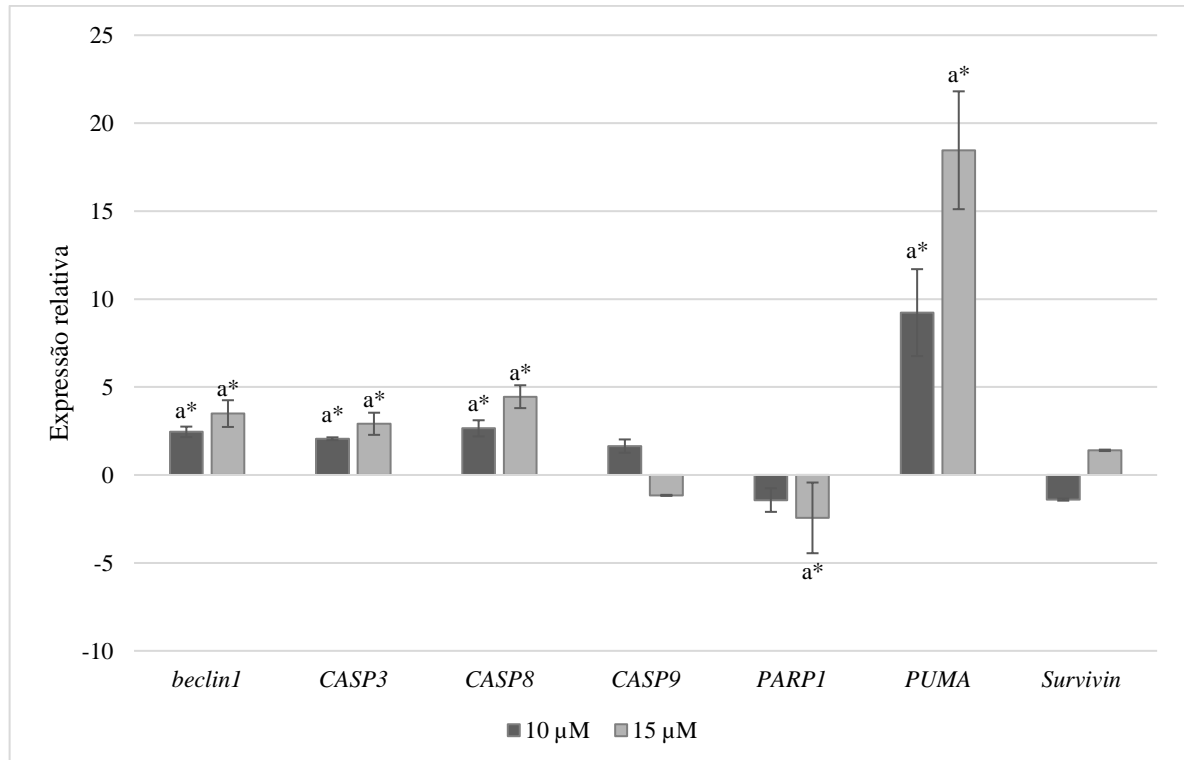
8 Além disso, para os mRNA dos genes marcadores de danos no DNA, em ambas
 9 concentrações observou-se o aumento significativo da expressão relativa do mRNA do gene
 10 *GADD45A* (6,9x; 3,64x) e aumento significativo da expressão de *H2AFX* (2,02x) na
 11 concentração de 10 μM, como mostra a Figura 9. Não houve alteração significativa na
 12 expressão relativa do mRNA do gene *GPXI* (1,3x; 1,28x) relacionado ao estresse oxidativo.



1

2 **Figura 9** - Expressão relativa de mRNA dos genes relacionados a danos no DNA (*GADD45A*
3 e *H2AFX*) e estresse oxidativo (*GPXI*) obtidos pela técnica de RT-qPCR, após 12 h de
4 tratamento com PB nas concentrações 10 e 15 μM. Os dados são apresentados como média da
5 expressão relativa. A razão e a análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009.
6 (*) Razão $\leq 0,5$ ou ≥ 2 . (a) Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$). (b) Diferença
7 significativa entre as concentrações testadas ($p \leq 0,05$).

8 Em relação ao mRNA dos genes envolvidos no processo de morte celular por apoptose
9 houve aumento significativo da expressão relativa dos mRNA dos genes *CASP3* (2,06x; 2,91x),
10 *CASP8* (2,64x; 4,45x), *PUMA* (9,23x; 18,46x) e redução de *PARP1* (-2,43x), na concentração
11 de 15 μM, além do aumento significativo da expressão do mRNA do gene relacionado a
12 autofagia *beclin1* (2,45x; 3,49x), em ambas concentrações (Figura 10). Os mRNAs dos genes
13 *Survivin* (1,4x; 0,71x) e *CASP9* (1,64x; 0,85x) também relacionados à morte celular por
14 apoptose, não estiveram significativamente alterados.

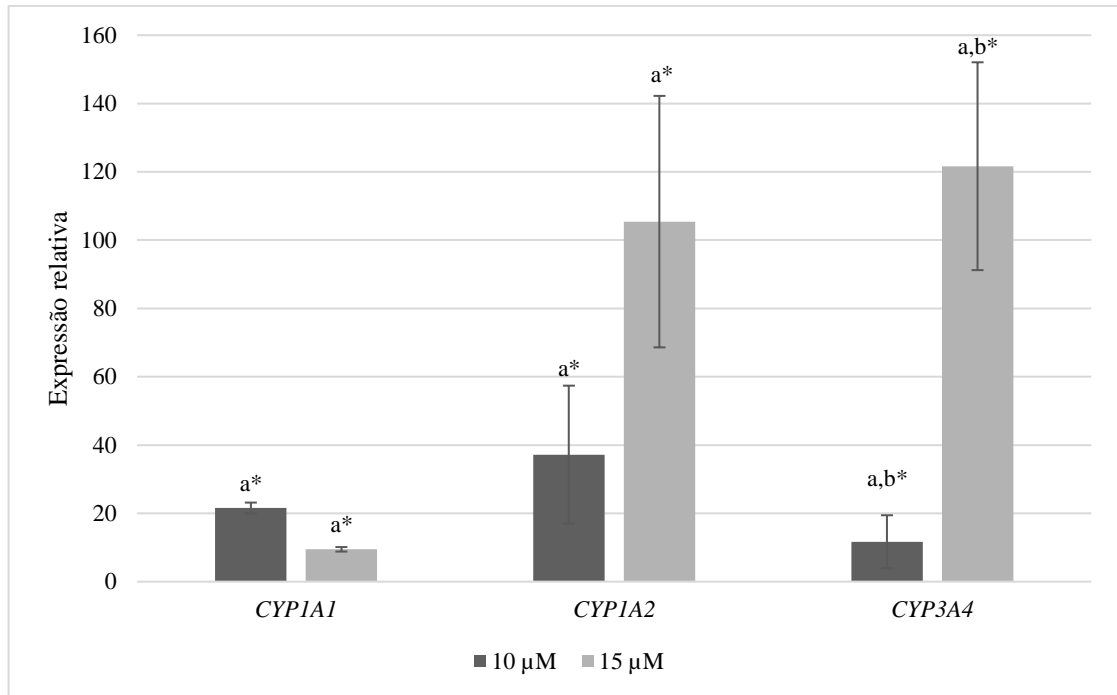


1

2 **Figura 10** - Expressão relativa de mRNA dos genes relacionados morte celular por apoptose
 3 (*CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1*, *PUMA*, *Survivin*) e autofagia (*beclin1*) obtidos pela técnica de
 4 RT-qPCR, após 12 h de tratamento com PB nas concentrações 10 e 15 μM. Os dados são
 5 apresentados como média da expressão relativa. A razão e a análise estatística foram calculadas
 6 pelo software REST 2009; (*) Razão $\leq 0,5$ ou ≥ 2 . (a) Diferença significativa em relação ao
 7 controle ($p \leq 0,05$). (b) Diferença significativa entre as concentrações testadas ($p \leq 0,05$).

8

9 A Figura 11 mostra os valores de expressão relativa do mRNA dos genes relacionados
 10 ao metabolismo de xenobióticos, onde observa-se o aumento significativo do mRNA dos genes
 11 *CYP1A1* (21,55x; 9,47x), *CYP3A4* (11,68x; 121,65x) e *CYP1A2* (37,18x; 105,42x) em ambas
 12 concentrações de PB. Sendo *CYP3A4* significativamente diferente entre duas as concentrações
 testadas.



1

2 **Figura 11** - Expressão relativa de mRNA dos genes envolvidos no metabolismo de
 3 xenobióticos (*CYP1A1*, *CYP3A4* e *CYP1A2*) obtidos pela técnica de RT-qPCR após 12 h de
 4 tratamento com PB nas concentrações 10 e 15 μM. Os dados são apresentados como média da
 5 expressão relativa. A razão e a análise estatística foram calculadas pelo software REST 2009;
 6 (*) Razão $\leq 0,5$ ou ≥ 2 . (a) Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$). (b) Diferença
 7 significativa entre as concentrações testadas ($p \leq 0,05$).

8

9 3.7. Análise de proteínas

10 Após 24 h de tratamento observamos o aumento significativo da concentração de
 11 proteínas Chk2 (Thr68), p53 (Ser15) e p21 (total) na concentração de 10 μM, aumento
 12 significativo de H2AX (Ser139), na concentração de 15 μM, e diminuição significativa das
 13 proteínas MDM2 (total) e Chk1 (Ser345), também nessa maior concentração testada (Figura
 14 12).

15

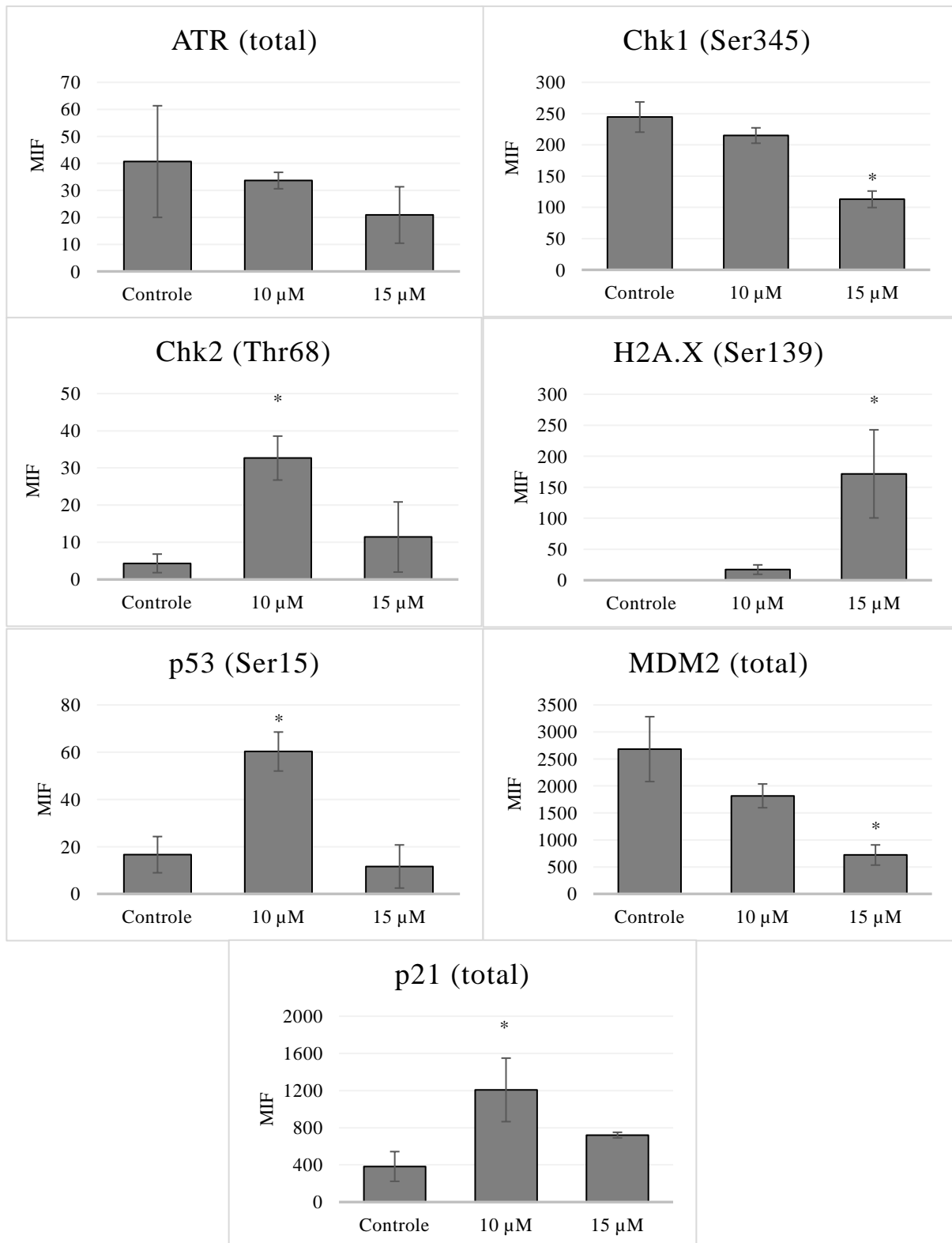


Figura 12 - Média de intensidade de fluorescência de proteínas totais ATR, MDM2 e p21 e proteínas fosforiladas Chk1 (Ser345), Chk2 (Thr68), H2A.X (Ser139), p53 (Ser15) após 24 h de tratamento com PB nas concentrações 10 e 15 μM. (*) Estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle. MIF (Média de Intensidade de fluorescência).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

1 4. Discussão

2 A PB apresenta atividade citotóxica em diferentes linhagens tumorais. Em nosso estudo,
3 a PB apresentou atividade citotóxica e genotóxica na linhagem tumoral HepG2/C3A. A partir
4 da associação de resultados da expressão de mRNA e/ou proteínas relacionados à morte celular,
5 ciclo celular e metabolismo de xenobióticos, com os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade
6 avaliados foi observado o potencial citotóxico, antiproliferativo e genotóxico deste fitoquímico,
7 demonstrando ter potencial aplicabilidade no desenvolvimento de estratégias para
8 quimioterapia.

9 O efeito citotóxico da PB na linhagem HepG2/C3A foi semelhante ao encontrado em
10 outros trabalhos onde, após 24 h de tratamento, também observaram a redução significativa na
11 população de células em linhagens tumorais de mama (Sameni; Hande, 2016), osteosarcoma
12 (Xue et al., 2015), próstata (Reshma et al., 2016) e ovário (Sinha et al., 2013), expostas às
13 concentrações de 0,5 – 10 μM de PB. Efeito semelhante foi encontrado para a análise da
14 integridade de membrana, onde observamos uma quantidade significativa de células com a
15 membrana danificada na concentração de 15 μM . Os ensaios de ciclo celular, morte celular e
16 cometa permitiram correlacionar os efeitos da PB com os dados da expressão gênica (mRNA e
17 proteína) auxiliando na melhor compreensão dos mecanismos que levaram a citotoxicidade
18 causada pela PB nas células HepG2/C3A.

19 Encontramos indução significativa na expressão dos transcritos *CYP1A1*, *CYP1A2* e
20 *CYP3A4*. Estes genes fazem parte do sistema do citocromo P450, que atuam principalmente na
21 ativação metabólica e metabolismo de vários carcinógenos e também drogas antitumorais
22 (Antona; Sundberg, 2006). Os dados sugerem que a PB pode sofrer metabolização extensiva
23 por *CYP1A1*, *CYP1A2* e *CYP3A4* e este efeito pode estar relacionado a citotoxicidade induzida
24 por PB, em uma tentativa celular de eliminar o xenobiótico, como uma resposta celular ao
25 estresse causado (Lemos; Trindade, 2014). No entanto, a HepG2/C3A não inativou o efeito
26 citotóxico da PB, pois quando avaliamos a concentração efetiva de citotoxicidade (15 μM) esta
27 é semelhante à utilizada em outras linhagens que não possuem esse sistema de metabolização,
28 como demonstrado por Sagar et al. (2014), onde a maior concentração de PB utilizada (20 μM),
29 apresentou citotoxicidade em linhagem tumoral de mama (MCF-7, BT20) e de câncer de
30 próstata (DU145).

31 Indução de danos no DNA é um efeito comum entre quimioterápicos (Zhang et al.,
32 2016) e esse efeito também foi observado nos tratamentos com PB. Células tratadas com PB,
33 em todas as concentrações, mostraram cometas bem característicos, diferentemente do controle,
34 que não apresentou cauda *comet-like*. Outros autores também têm demonstrado que a PB

1 apresenta atividade genotóxica em linhagens celulares como HCT15, HT29 (Subramaniya,
2 2011), L5187Y (Demma; Hallberg; Hellman, 2009) e ME-180 (Srinivas et al., 2004).

3 Os danos no DNA dão início a vias de sinalização que se associam ao local do dano, e
4 fosforilam várias proteínas-alvo, incluindo Chk1 e Chk2. Chk2 é capaz de receber sinais de
5 sensores de danos de DNA e retransmitir esses sinais a maquinaria do ciclo celular, resultando
6 assim em parada na progressão do ciclo, ou em determinadas circunstâncias, à apoptose (Zhang
7 et al., 2012).

8 Em contraste, a proteína Chk1 está ativa mesmo em ciclos não perturbados (Bartek;
9 Lukas, 2003). A proteína Chk1 foi encontrada sobreexpressa em alguns tumores humanos,
10 incluindo mama, cólon, fígado, gástrico, o que mostrou contribuir com a resistência terapêutica.
11 A ideia central é, quando inibida a proteína Chk1, células tumorais perdem a habilidade de
12 responder e reparar o dano no DNA, aumentando assim a morte celular decorrente da terapia
13 (Zhang et al., 2012).

14 No nosso estudo foi possível observar a fosforilação aumentada de Chk2 (Thr68) e
15 diminuída de Chk1 (Ser345) em relação ao controle, sugerindo que a diminuição na fosforilação
16 de Chk1, impediu o reparo do dano do DNA enquanto que a fosforilação aumentada de Chk2,
17 devido aos severos danos no DNA, encaminhou a célula à morte celular. Resultados similares
18 foram encontrados no estudo de Kuo, Hsu e Cho (2006), onde a exposição de células MCF-7 e
19 MDA-MB-231 a 8 μ M de PB, induziu o aumento de Chk2.

20 Quando as células são tratadas com agentes que danificam o DNA, o sinal desse dano é
21 percebido e transmitido, causando a fosforilação de p53. Essa proteína então, ativada,
22 desencadeia a transcrição de genes tal como *GADD45A* (Kleinsimon et al., 2018). O aumento
23 da transcrição de *GADD45A*, observado no tratamento com a PB nas células HepG2/C3A em
24 ambas concentrações, nos leva a sugerir o estresse por danos no DNA, podendo resultar em
25 parada de ciclo celular, como observado no ensaio do cometa e na análise do ciclo celular nas
26 células tratadas com PB (Weng et al., 1999).

27 O tratamento com PB induziu também tanto a nível de mRNA, quanto de proteína, outro
28 biomarcador de danos no DNA, *H2AFX* e H2A.X (Ser139). Este tem se tornado uma poderosa
29 ferramenta a fim de monitorar quebra de dupla fita de DNA (Ivashkevich, 2011). Seu aumento
30 indica que houveram danos, correlacionando-se os resultados encontrados na avaliação da
31 genotoxicidade.

32 Foi observado neste estudo que a PB inibiu a expressão de mRNA do gene *PARP1* na
33 maior concentração testada. A inibição de *PARP1* resulta na inativação do sistema de reparo de
34 DNA e à retenção de quebras espontâneas de fita simples, podendo induzir a formação de

1 quebras de dupla fita, resultando na instabilidade genômica e consequente morte celular por
2 apoptose (Malyuchenko et al., 2015).

3 A parada em G2/M, observada neste estudo, também pode estar relacionada aos danos
4 no DNA causados pela PB. Quando os danos verificados pelos checkpoints no ciclo celular,
5 não podem ser reparados, a célula é normalmente encaminhada à apoptose. Observamos, como
6 causa principal da parada de ciclo a indução da expressão relativa de *p21* e da proteína p21. O
7 mesmo foi observado no estudo de Wang et al. (2008) utilizando células de melanoma
8 (A375.S2), onde as concentrações de 10 e 20 μ M de PB aumentou o número de células em
9 G2/M após 6 e 8 hrs de tratamento, além disso, foi observado o aumento da expressão da
10 proteína p21, corroborando com o encontrado em nosso estudo.

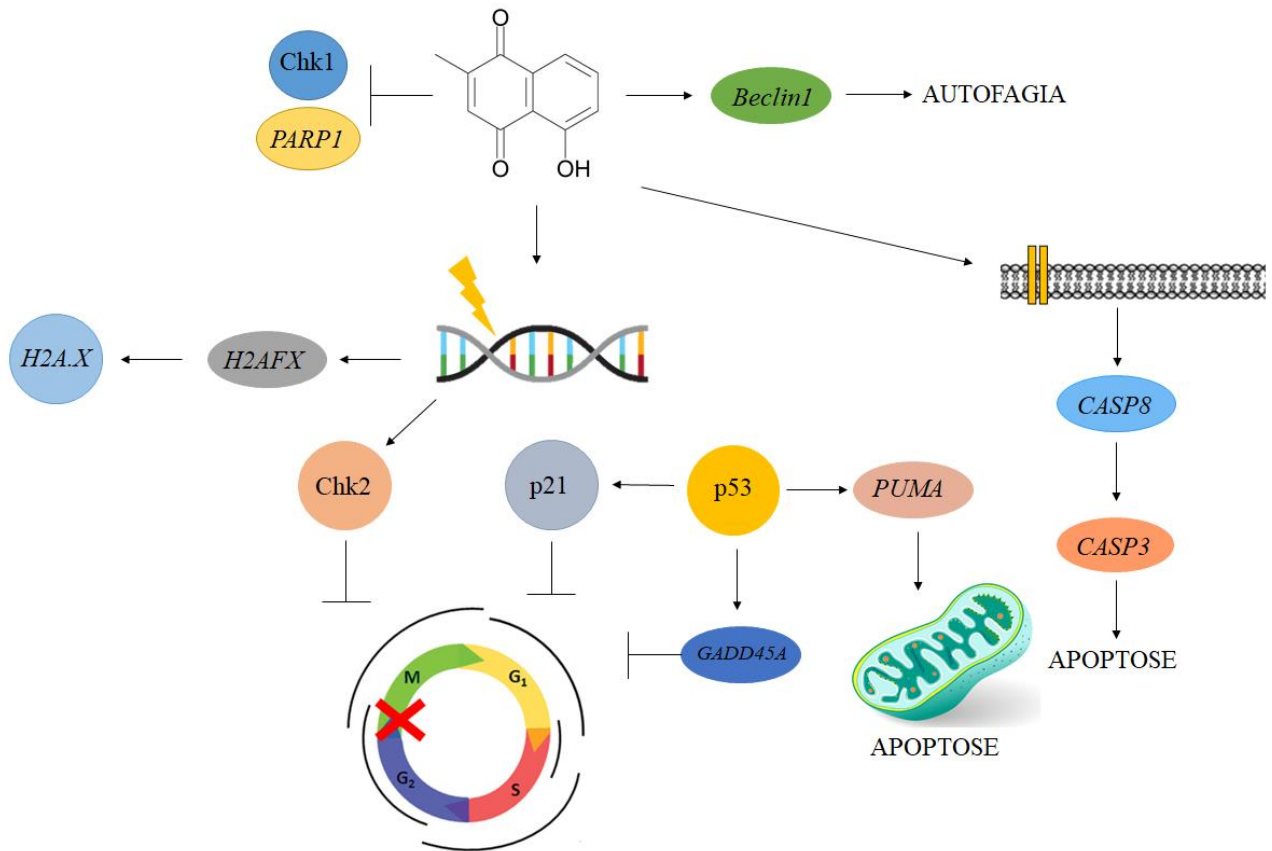
11 Os danos no DNA e a parada de ciclo celular possivelmente induziram a sinalização de
12 morte celular programada (apoptose), como verificado na citometria de fluxo. Conforme os
13 dados da expressão gênica, podemos atribuir a atividade apoptótica da PB em células
14 HepG2/C3A à alteração na expressão dos mRNAs dos genes *CASP3*, *CASP8* e *PUMA*. A
15 regulação positiva de *CASP3* e *CASP8* sugerem a realização de apoptose de modo dependente
16 de caspase pela via extrínseca em ambas concentrações utilizadas.

17 O mRNA do gene *PUMA* é induzido por uma ampla gama de estímulos apoptóticos
18 através de mecanismos dependentes e independentes de p53, induzindo a apoptose através da
19 disfunção mitocondrial (Yu; Zhang, 2008). A expressão aumentada de *PUMA* encontrada no
20 nosso estudo sugere que a PB também é capaz de induzir apoptose pela via intrínseca.

21 Há muitas evidências que sugerem que a indução de p53 em resposta à danos no DNA
22 é controlada em níveis pós-transcricionais, principalmente devido a maior estabilidade da
23 proteína. Portanto, é viável que apesar de uma diminuição na expressão do mRNA do gene
24 *TP53*, sua atividade pôde ser mantida ou até mesmo aumentada (Novakovic et al., 2006) como
25 demonstrado no ensaio de expressão de proteína, onde os níveis de p53 aumentaram
26 significativamente após o tratamento com a PB. A proteína p53 tem sua função supressora de
27 tumor regulada de forma negativa pela proteína MDM2, porém, a fosforilação da proteína p53
28 é suficiente para revogar a repressão de MDM2 durante a resposta ao estresse, como foi
29 demonstrado no ensaio de expressão proteica.

30 A expressão aumentada do mRNA do gene *beclin1* nos leva a inferir que a PB também
31 pôde ser capaz de induzir morte por autofagia em ambas concentrações testadas. Quando as
32 células percebem estresse interno, como por exemplo, dano no DNA (Cai et al., 2015), podem
33 sofrer autofagia induzida por *beclin1* (Li et al., 2014). Outros estudos demonstraram que a PB

1 foi capaz de induzir autofagia nas linhagens tumorais de pulmão A549 e H23 através do
2 *upregulation* de *beclin1* (Li et al., 2014).



3 **Figura 13** – Resumo gráfico das atividades citotóxicas e genotóxicas desencadeadas na célula
4 HepG2/C3A após os tratamentos com a PB.

5. Conclusão

6 O presente estudo demonstrou que a PB é metabolizada pelas enzimas CYP1A1,
7 CYP1A2 e CYP3A4 e que a extensiva metabolização realizada é uma tentativa de destoxificar
8 as células, no entanto não inativou o efeito citotóxico. Além disso, a citotoxicidade da PB
9 também esteve relacionada a indução de danos genotóxicos como observado pela parada de
10 ciclo celular e confirmada pelo ensaio do cometa e indução da expressão de genes e proteínas
11 de sinalização de danos ao DNA (*H2AFX*, *GADD45A*, *H2A.X*, *Chk1* e *Chk2*) e ciclo celular
12 (*p21* e *p53*). Estas alterações intracelulares parecem induzir a morte celular por apoptose e
13 autofagia, uma vez que vários genes (*Beclin1*, *CASP3*, *CASP8*, *PARP1* e *PUMA*) envolvidos
14 nesta via estiveram com suas expressões moduladas pela PB (Figura 13).

15 Sendo assim, este fitoquímico se apresenta como um potencial agente terapêutico para
16 o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer.

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2
3 Antona, C.R.; sundberg, M.I. 2006. Cytochrome P450 pharmacogenetics and cancer.
4 *Oncogene*, 25, 1679-1691.

5
6 Awasthi, B.P., Kathuria, M., Pant, G., Kumari, N., Mitran, K. 2016. Plumbagin, a plant-derived
7 naphthoquinone metabolite induces mitochondria mediated apoptosis-like cell death in
8 *Leishmania donovani*: an ultrastructural and physiological study. *Apoptosis*. 21, 941-953.

9
10 Bartek, J.; Lukas, J. 2003. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer*
11 *cell*, 3, 421-429.

12
13 Cai, Y., Arikath, J., Yang, L., Guo, M.L., Periyasamy, P., Buch, S. 2016. Interplay of
14 endoplasmic reticulum stress and autophagy in neurodegenerative disorders, *Autophagy*, 12,
15 225-244.

16
17 Cretu, A., Sha, X., Tront, J., Hoffman, B., Liebermann, D.A. 2009. Stress sensor Gadd45
18 genes as therapeutic targets in cancer. *Cancer therapy*, 7, 268-276.

19
20 Collins, A. R., Oscoz, A. A., Brunborg, G., Gaivão, I., Giovannelli, L., Kruszewski, M.,
21 Smith, C. C., Stetina, R. 2008. The comet assay: topical issues. *Mutagenesis*, 23, 143-51.

22
23 Demma, J., Hallberg, K., Hellman, B. 2009. Genotoxicity of plumbagin and its effect on
24 catechol and NQNO-induced DNA damage in mouse lymphoma cells. *Toxicology in vitro* 23,
25 266-271.

26 Foufelle, F., Fromenty, B. 2016. Role of endoplasmatic reticulum stress in drug-induced
27 toxicity. *Pharmacology Research & Perspectives*, 4, 1-28.

28 Gaascht, F., Teiten, M.H., Cerella, C., Dicato, M., Bagrel, D., Diederich, M. 2014. Plumbagin
29 modulates leukemia cell redox status. *Molecules*. 19, 10011-10032.

30
31 Hoffman, W. H. 2002. Transcriptional repression of the anti-apoptotic surviving gene by wild
32 type p53. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 3247-3257.

33
34 Houtgraaf, J. H., Versmissen, J., Giessen, W. J. van der. 2006. A concise review of DNA
35 damage checkpoints and repair in mammalian cells. *Cardiovascular Revascularization*
36 *Medicine*, 7, 165-172.

37
38 Ivashkevich, A., Redon, C.E., Nakamura, A.J., Martin, R.F., Martin O.A. 2012. Use of γ -H2AX
39 assay to monitor DNA damage and repair in translational cancer research. *Cancer Letters*, 327,
40 123-133.

41
42 Jaiswal, P. K., Goel, A., Mittal, R. D. 2015. Survivin: A molecular biomarker cancer. *Indian*
43 *Journal of Medical Research*, 141, 389-387.

44
45 Kleinsimon, S., Longmuss, E., Rolff, J., Jager, S., Eggert, A., Delebinski, C., Seifert, G. 2018.
46 GADD45A and CDKN1A are involved in apoptosis and cell cycle modulatory effects of
47 viscumTT with further inactivation of the STAT3 pathway. *Scientific Reports*, 8, 5750.

48

- 1 Kuete, V., Omosa, L.K., Tala, V.R.S., Midiwo, J.O., Mbaveng, A.T., Swaleh, S.,
2 Karaosmanoglu, O., Sivas, H. 2016. Cytotoxicity of plumbagin, Rapone and 12 other naturally
3 occurring quinones from Kenya Flora towards human carcinoma cells. *BMC Pharmacology*
4 *and Toxicology*, 17, 1-10.
5
- 6 Kuo, P., Hsu, Y., Cho, C. 2006. Plumbagin induces G2/M arrest and autophagy by inhibiting
7 the AKT/mammalian target of rapamycin pathway in breast cancer cells. *Molecular Cancer*
8 *Therapeutics*, 5, 3209-3221.
9
- 10 Li, J., Shen, L., Lu, F.R., Qin, Y., Chen, R., Li, J., Li, Y., Zhan, H.Z., He, Y.Q. 2012. Plumbagin
11 inhibits cell growth and potentiates apoptosis in human gastric cancer cells in vitro through the
12 NF-KB signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica*, 33, 242-249.
13
- 14 Liu, Y., Caai, Y., He, C., Chen, M., Li, H. 2017. Anticancer properties and pharmaceutical
15 applications of plumbagin: A review. *The American Journal of Chinese Medicine*, 45, 3, 1-19.
16
- 17 Malyuchenko, N.V., Kotova, E.Y., Kulaeva, O.I., Kirpichnikov, M.P., Studiskiy, V.M. 2015.
18 PARP1 inhibitors: antitumor drug design. *Acta Naturae*, 7, 3, 27-37.
19
- 20 McMillian M.K., Li, L., Parker, J.B., Patel, L., Zhong, Z., Gunnet, J.W., Powers, W.J., Johnson,
21 M. D. 2002. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. *Cell biology and*
22 *toxicology*. 18, 157-173.
23
- 24 Niida, H., Nakashini, M. 2006. DNA damage checkpoints in mammals. *Mutagenesis*, 21, 3-9.
25
- 26 Novakovic, P., Stempak, J.M., Sohn, K.J., Kim, Y.I. 2006. Effects of folate deficiency on gene
27 expression in the apoptosis and cancer pathways in colon cancer cells. *Carcinogenesis*, 27, 916-
28 924
29
- 30 Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., Dempfle, L. 2002. Relative expression software tool (REST©) for
31 group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR.
32 *Nucleic Acids Research*, 30, 1-10.
33
- 34 Reshma, R.S., Sreelatha, K.H., Somasundaram, V., Satheesh, K.S., Nadhan, R., Nair, R.S.,
35 Srinivas, P. 2016. Plumbagin, a naphthoquinone derivate induces apoptosis in BRCA ½
36 defective castrate resistant prostate cancer cells as well as prostate cancer stem-like cell.
37 *Pharmacological Research*, 105, 134-145.
38
- 39 Sagar, S., Esau, L., Moosa, B., Khashad, N.M., Bajic, V.B., Kaur, M. 2014. Cytotoxicity and
40 apoptosis induced by a plumbagin derivate in estrogen positive MCF-7 breast cancer cells. *Anti-*
41 *cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 14, 170-180.
42
- 43 Sameni, S., Hande, M. P. 2016. Plumbagin triggers DNA damage response, telomere
44 dysfunction and genome instability of human breast cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*,
45 82, 256-268.
46
- 47 Seshadri, P., Rajaram, A., Rajaram, R. 2011. Plumbagin and juglone induce caspase-3-
48 dependent apoptosis involving the mitochondria through ROS generation in human perioheral
49 blood lymphocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 51, 2090-2107.
50

- 1 Sinha, S., Pal, K., Elkhanany, A., Dutta, S., Cao, Y., Mondal, G., Iyer, S., Somasundaram, V.,
2 Couch, F.J., Shridhar, V., Bhattacharya, R. Mukhopadhyay, D., Srinivas, P. 2013. Plumbagin
3 inhibits tumorigenesis and angiogenesis of ovarian cancer cells in vivo. *International Journal*
4 *of Cancer*, 132, 1201-1212.
5
- 6 Srinivas, P., Gopinath, G., Banerji, A., Dinakar, A., Srinivas, G. 2004. Plumbagin induces
7 reactive oxygen species, which mediate apoptosis in human cervical cancer cells. *Molecular*
8 *Carcinogenesis*, 40, 201-211.
9
- 10 Steinert, S.A. 1996. Contribution of apoptosis to observed dna damage in mussel cells. *Marine*
11 *Environmental Research*, 42, p. 253-259.
12
- 13 Subramaniya, B.R., Srinivasan, G., Sadullah, S.S.M., Davis, N., Subhadara, L.B.R.,
14 Halagowder, D., Sivasitambaram, N.D. 2011. Apoptosis inducing effect of plumbagin on
15 colonic cancer cells depends on expression of COX-2. *PLoS ONE*, 6, 1-11.
16
- 17 Qiu, J.X., He, Y.A., Wang, Y., Xu, R.L., Qin, Y., Shen, X., Zhou, S.F., Mao, Z.F. 2013.
18 Plumbagin induces the apoptosis of human tongue carcinoma cells through the mitochondria-
19 mediated pathway. *Medical Science Monitor Basic Research*, 19, 228-236.
20
- 21 Xue, Y.L., Meng, X.Q., Ma, L.J., Yuan, Z. 2016. Plumbagin exhibits an anti-proliferative effect
22 in human osteosarcoma cells by downregulating FHL2 and interfering with Wnt/ β -catenin
23 signaling. *Oncology Letters*, 12, 1095-1100.
24
- 25 Wang, C.C., Chiang, Y.M., Sung, S.C., Hsu, Y.L., Chang, J.K., Kuo, P.L. 2008. Plumbagin
26 induces cell cycle arrest and apoptosis through reactive oxygen species/c-Jun N-terminal kinase
27 pathways in human melanoma A375.S2 cells. *Cancer Letters*, 259, 82-98.
28
- 29 Weng, X.W., Qimin, Z., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C.,
30 O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Harris, C.C. 1999. GADD45A induction of a G2/M cell cycle
31 checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 96, 3706-
32 3711.
33
- 34 Yu, J., Zhang, L. 2008. PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene*, 27, 71-83.
35
- 36 Zhang, X., Chen, L.X., Ouyang, L., Cheng, Y., Liu, B. 2012. Plant natural compounds: targeting
37 pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents. *Cell Proliferation*, 45, 466-476.
38
- 39 Zhang, J., Dai, Q., Park, D., Deng, X. 2016. Targeting DNA replication stress for cancer
40 therapy. *Genes*, 7, 51, 1-16.
41
- 42 Zhou, X., Li, Y., Chen, X. 2010. Computational identification of bioactive natural products by
43 structure activity relationship. *Journal of Molecular Graphics and Modeling*, 29, 38-45.
44

APÊNDICE

Tabela 1. Valores de viabilidade (médias \pm desvio padrão) obtida do ensaio da resazurina, após 24 h de tratamento com PB.

VIABILIDADE	
TRATAMENTOS	Médias \pm desvio padrão
CONTROLE	10100 \pm 1674,31
5 μM	9570 \pm 166,43
10 μM	9450 \pm 432,78
15 μM	8660 \pm 1575,57 *
17,5 μM	6560 \pm 1918,08 *
CP	6340 \pm 655,76 *

ANOVA seguida de Teste de Dunnet;

Controle positivo (CP): Camptotecina.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$);

Tabela 2. Média das porcentagens da distribuição das células nas fases do ciclo celular (G1, S e G2/M). Valores obtidos após 24 h de tratamento.

	G1 \pm DP(%)	S \pm DP(%)	G2/M \pm DP(%)
CONTROLE	51,14 \pm 0,26	17,1 \pm 1,87	30,22 \pm 0,26
5 μM	53,78 \pm 1,21	15,49 \pm 1,52	28,63 \pm 0,23
10 μM	44,85 \pm 3,41	14,92 \pm 0,65	37,07 \pm 3,55
15 μM	32,95 \pm 3,73*	12,68 \pm 0,85*	53,15 \pm 4,55*

ANOVA seguida de Teste de Dunnet.

* Diferença significativamente estatística em relação ao controle negativo ($p \leq 0,05$).

Tabela 3. Análise de morte celular por citometria de fluxo. Média e desvio padrão da porcentagem de células HepG2/C3A viáveis, em apoptose inicial, tardia e necrose após 24 h de tratamento com plumbagina.

TRATAMENTO	VIÁVEIS \pm DP	APOPTÓTICAS \pm DP	NECROSE/MORTE \pm DP
CONTROLE	88,66 \pm 0,72	7,26 \pm 0,56	4,06 \pm 0,99
5 μM	89,82 \pm 0,74	6,62 \pm 2,65	2,55 \pm 0,52
10 μM	84,87 \pm 3,4	12,81 \pm 2,84	2 \pm 0,57
15 μM	38,08 \pm 7,2*	61,54 \pm 6,92**	1,23 \pm 0,144
CP	29,34 \pm 2,77*	70,04 \pm 2,8*	0,62 \pm 02

ANOVA seguida de Teste de Dunnet;

Controle positivo (CP): Camptotecina.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$);

** Estatisticamente significativo em relação do controle (p entre 0,01 e 0,001).

Tabela 4. Análise de integridade de membrana por citometria de fluxo. Média e desvio padrão da porcentagem de população celular. Valores obtidos após 24 h de tratamento.

TRATAMENTO	MEMBRANA ÍNTEGRA \pm DP	MEMBRANA DANIFICADA \pm DP
CONTROLE	92,80 \pm 0,95	7,06 \pm 0,94
5 μM	92,06 \pm 1,23	7,94 \pm 1,37
10 μM	86,31 \pm 7,20	13,80 \pm 7,4
15 μM	41,22 \pm 7,31*	58,77 \pm 7,24*
CP	55,54 \pm 5,65*	44,91 \pm 5,57*

ANOVA seguida de Teste de Dunnet;

Controle positivo (CP): Camptotecina.

1 * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$);

2

3 **Tabela 5.** Média e desvio padrão dos resultados encontrado no ensaio do cometa utilizando o
4 programa *CometScore*®. Valores obtidos após 3 h de tratamento com plumbagina.

TAIL MOMENT±DP	
CONTROLE	0,150±0,05
5 µM	6,82±2,85*
10 µM	26,02±3,20**
15 µM	38,17±6,77**
CP	7,16±4,49*

5 ANOVA seguida de Teste de Dunnet;

6 Controle positivo (CP): Doxorubicina.

7 * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$);

8 ** Estatisticamente significativo em relação do controle (p entre 0,01 e 0,001).

9

10 **Tabela 6.** Iniciadores utilizados na RT-qPCR

11

Gene	Foward	Reverse
<i>beclin1</i>	5' CAG TAT CAG AGA GAA TAC AGT 3'	5' TGG AAG GTT GCA TTA AAG AC 3'
<i>CASP3</i>	5' GTG CTA CAA TGC CCC TGG AT 3'	5' GCC CAT TCA TTT ATT GCT TTC 3'
<i>CASP8</i>	5' GCA AAA GCA CGG GAG AAA GT 3'	5' TGC ATC CAA GTG TGT TCC ATT 3'
<i>CASP9</i>	5' GCT CTT CCT TTG TTC ATC TCC 3'	5' GTT TTC TAG GGT TGG CTT CG 3'
<i>CYP1A1</i>	5'AAA GAA CCC GCA CCT GGC AC 3'	5'TGA AAT CAT CGC CCT GCC 3'
<i>CYP1A2</i>	5' CAC TAT CAG GAC TTT GAC AAG 3'	5' AGG TTG ACA ATC TTC TCC TG 3'
<i>CYP3A4</i>	5' AGT CTT TCC ATT CCT CAT CC 3'	5' TGC TTT TGT GTA TCT TCG AG 3'
<i>GADD45A</i>	5' TCA GCG CAC GAT CAC3 TGT C 3'	5' CCA GCA GGC ACA ACA CCA C 3'
<i>GAPDH</i>	5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3'	5' GGAAGATGGTGATGGGATTT 3'
<i>GPX1</i>	5' CAA CCA GTT TGG GCA TCA G 3'	5' CGA TGT CAA TGG TCT GGA AG3'
<i>H2AFX</i>	5' AAT CCA AGC ACC TAG ATA CC 3'	5' CAG AAT TCC AGT TCA GAA GC 3'
<i>MTOR</i>	5' GGA GGA GAA ATT TGA TCA GG 3'	5' GGG CAA CAA ATT AAG GAT TG 3'
<i>MYC</i>	5' TGA GGA GGA ACA AGA AGA TG 3'	5' ATC CAG ACT CTG ACC TTT TG 3'
<i>p21</i>	5' CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC3'	5' CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG3'
<i>PARP</i>	5' AAA AGG AGG TGG AAA AGA TG 3'	5' GCT AAG AAC AAC TCC TGA AG 3'
<i>PUMA</i>	5' GTA AGA TAC TGT ATA TGC GCT 3'	5' TTT TCC ACT GTT CCA ATC TG 3'
<i>Survivin</i>	5' AGC CCT TTC TCA AGG ACC AC 3'	5' TGG CTC GTT CTC AGT GGG GCA GT 3'
<i>TP53</i>	5' TAC CAC CAT CCA CTA CAA CT 3'	5' GAC AGG CAC AAA CAC GCA C 3'

12

13 **Tabela 7.** Expressão relativa dos genes de morte celular, estresse oxidativo, progressão do ciclo
14 celular e danos no DNA, normalizada com o gene de referência *GAPDH* utilizando o programa
15 REST. Os valores de *fold-change* representam quantas vezes o gene foi mais ou menos expresso
16 em relação ao grupo controle.

GENE	Tratamento	Expressão	Std. Error	Fold-change
<i>beclin1</i>	PB 10 µM	2,45	±0,3	2,45 *a
	PB 15 µM	3,49	±0,76	3,29 *a
<i>CASP3</i>	PB 10 µM	2,06	±0,08	2,91 *a
	PB 15 µM	2,91	±0,63	2,06 *a
<i>CASP8</i>	PB 10 µM	2,65	±0,46	2,65 *a

<i>CASP9</i>	PB 15 μ M	4,45	$\pm 0,65$	4,45 *a
	PB 10 μ M	1,64	$\pm 0,38$	1,64
<i>GADD45A</i>	PB 15 μ M	0,85	$\pm 0,03$	-1,16
	PB 10 μ M	6,9	$\pm 3,9$	6,9 *a
<i>GPX1</i>	PB 15 μ M	3,64	$\pm 0,63$	3,64 *a
	PB 10 μ M	1,3	$\pm 0,2$	1,3
<i>H2AFX</i>	PB 15 μ M	1,28	$\pm 0,24$	1,28
	PB 10 μ M	2,02	$\pm 0,06$	2,02 *a
<i>MYC</i>	PB 15 μ M	1,73	$\pm 0,37$	1,73
	PB 10 μ M	1,73	$\pm 0,58$	1,73
<i>P21</i>	PB 15 μ M	1,2	$\pm 0,3$	1,2
	PB 10 μ M	6,28	$\pm 2,3$	6,28 *a,b
<i>PARP1</i>	PB 15 μ M	0,81	$\pm 0,08$	-1,23
	PB 10 μ M	0,71	$\pm 0,67$	-1,4
<i>PUMA</i>	PB 15 μ M	0,41	$\pm 2,01$	-2,43 *a
	PB 10 μ M	9,23	$\pm 2,47$	9,23 *a
<i>Survivin</i>	PB 15 μ M	18,46	$\pm 3,35$	18,46 *a
	PB 10 μ M	1,40	$\pm 0,06$	1,4
<i>TP53</i>	PB 15 μ M	0,715	$\pm 0,04$	-1,39
	PB 10 μ M	0,67	$\pm 1,04$	-1,49
	PB 15 μ M	0,29	$\pm 1,02$	-3,44 *a,b

1 (*) Razão $\leq 0,5$ ou ≥ 2 .

2 (a) Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$). (b) Diferença significativa entre as concentrações
3 testadas ($p \leq 0,05$).

4
5 **Tabela 8.** Expressão relativa dos genes de metabolismo de xenobióticos, normalizada com o
6 gene de referência *GAPDH* utilizando o programa REST. Os valores de *fold-change*
7 representam quantas vezes o gene foi mais ou menos expresso em relação ao grupo controle.

GENE	Tratamento	Expressão	Std. Error	Fold-change
CYP1A1	10 μ M	11,68	$\pm 1,6$	11,68 a*
	15 μ M	9,47	$\pm 0,66$	9,47 a*
CYP1A2	10 μ M	37,18	$\pm 20,21$	37,18 a*
	15 μ M	105,42	$\pm 36,82$	105,42 a*
CYP3A4	10 μ M	21,556	$\pm 7,76$	21,55 a,b*
	15 μ M	121,65	$\pm 30,43$	121,65 a,b*

8 (*) Razão $\leq 0,5$ ou ≥ 2 .

9 (a) Diferença significativa em relação ao controle ($p \leq 0,05$). (b) Diferença significativa entre as concentrações
10 testadas ($p \leq 0,05$).

11
12 **Tabela 9.** Média da intensidade de fluorescência e desvio padrão obtidos na análise de proteína
13 utilizando o aparelho MAGPIX® System. Valores obtidos após 24 h de tratamento com
14 plumbagina.

PROTEÍNA	CONTROLE \pm DP	10 μ M \pm DP	15 μ M \pm DP
ATR (total)	40,67 \pm 20,66	33,64 \pm 3,03	20,89 \pm 10,44
Chk1 (Ser345)	244,44 \pm 24,15	214,89 \pm 12,31	112,89 \pm 13,19*
Chk2 (Thr68)	4,33 \pm 2,49	32,66 \pm 5,91*	11,42 \pm 9,43
H2A.X(Ser139)	0	17,16 \pm 7,58	171,61 \pm 71,12*
p53 (Ser15)	16,16 \pm 7,67	60,28 \pm 8,25*	11,61 \pm 9,13
MDM2 (total)	2681,5 \pm 600	1816,39 \pm 219,95	720,5 \pm 186,9*

p21 (total)	383,05±159,98	1207,11±341,6*	720,5±30,39
--------------------	---------------	----------------	-------------

1 ANOVA seguida de Teste de Dunnet;

2 * Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$);

3