



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

SIMONE CRISTINE SEMPREBON

**(L)-GONIOTALAMINA INDUZ DANOS AO DNA, APOPTOSE
E REDUZ OS NÍVEIS DE RNAm DE *BIRC5* (SURVIVINA) EM
LINHAGEM DE CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-
PEQUENAS (NCI-H460).**

SIMONE CRISTINE SEMPREBON

**(L)-GONIOTALAMINA INDUZ DANOS AO DNA, APOPTOSE
E REDUZ OS NÍVEIS DE RNAm DE *BIRC5* (SURVIVINA) EM
LINHAGEM DE CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-
PEQUENAS (NCI-H460).**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2011

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

S473L Semprebon, Simone Cristine.

(L)-Goniotalamina induz danos ao DNA, apoptose e reduz os níveis de RNAm de *BIRC5* (survivina) em linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas (NCI-H460) / Simone Cristine Semprebon. – Londrina, 2011.
85 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, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Células cancerosas – Pulmões – Teses.
 2. Células cancerosas – Efeito citotóxico – Teses.
 3. Células cancerosas – Proliferação – Teses.
 4. Apoptose – Indução – Teses.
 5. Genética – Expressão – Teses.
 6. Goniotalamina – Teses.
- I. Mantovani, Mário Sérgio. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 576.385.5

SIMONE CRISTINE SEMPREBON

**(L)-GONIOTALAMINA INDUZ DANOS AO DNA, APOPTOSE E
REDUZ OS NÍVEIS DE RNAm DE *BIRC5* (SURVIVINA) EM
LINHAGEM DE CÂNCER DE PULMÃO DE CÉLULAS NÃO-
PEQUENAS (NCI-H460).**

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

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
UEL – Londrina – PR

Profa. Dra Daisy Maria Favero Salvadori
UNESP – São Paulo – SP

Profa. Dra. Silvia Helena Sofia
UEL – Londrina – PR

Londrina, 21 de janeiro de 2011.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a Deus e Nossa Senhora por mais esta graça concedida;
à minha mãe Noeli que não mediu esforços para que
eu pudesse chegar até aqui e ao meu grande amor,
Gabriel, por ter vivido comigo este mestrado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a *Deus* por ter me dado força, calma e coragem para trilhar os caminhos durante o mestrado: à ELE toda honra e toda glória por me guiar em todos os dias da minha vida;

À *Nossa Senhora Aparecida* por interceder sempre em minha vida;

Ao meu *orientador Mário Sérgio Mantovani*, por ter me aceitado no laboratório desde o estágio de iniciação científica no 2º ano da graduação, pelos conselhos, pelas dicas e por ter confiado a mim este projeto que fui muito feliz em desenvolver nestes dois anos. É uma parte muito importante do meu desenvolvimento enquanto pesquisadora. Muito obrigada! Continuaremos juntos no doutorado!

À *CAPES* pelo apoio financeiro.

Aos *professores Fernando Macedo Jr. e Ângelo de Fátima* por terem nos cedido a droga utilizada neste trabalho.

Aos amigos de laboratório *Dê, Diogo, Gláucia, Nati, Ju, Má, Sandra, Dani, Pri, Mari, Zanne, Pathe e Lilian*. Obrigada pelo auxílio no laboratório, pelas conversas, risadas e momentos que compartilhamos.

Nati, obrigada por ter me ajudado a fazer o PIIO continuar vivo mesmo depois da graduação. Extensionistas: “Tenho pensamentos que, se pudesse revelá-los e fazê-los viver, acrescentariam nova luminosidade às estrelas, nova beleza ao mundo e maior amor ao coração dos homens.” - Fernando Pessoa (Sempre me lembro do seu discurso na colação, espero continuar levando este sonho à frente!).

Às amigas do SAG, *Eliane, Pri e Ana Lívia*, pelos momentos de conversas e descontração no laboratório.

Sandra e *Dani*, pelo auxílio na PCR em tempo real. *Sandra*, obrigada pela paciência e por persistir até que conseguíssemos extrair o RNA... E olha que demorou, hein!

Ao *Dário*, pelo apoio técnico;

À *Sueli*, pela paciência e esforços dedicados para que todos os probleminhas burocráticos fossem resolvidos.

Às coordenadoras *Profa. Ilce* e *Profa. Ana Lúcia*, por terem me recebido muito bem ao programa de pós-graduação e por todos os esforços a nós dedicados para a evolução do curso.

Aos *professores Rodrigo Cabral Luiz e Silvia Helena Sofia* pelas dicas e correções na qualificação.

Às *professoras Daisy Salvadori, Silvia Helena Sofia, Rodrigo Cabral Luiz e Vanessa Moraes de Andrade* pelas sugestões e correções na defesa.

Ao *Gabriel, meu grande amor!* Obrigada por ouvir minhas dúvidas, meus medos, minhas aulas. Por me ajudar em decisões fundamentais e participar junto comigo de tudo. Por enxugar às minhas lágrimas e vibrar junto comigo a cada conquista. Obrigada pelo apoio visual (o esqueminha ficou supimpa e o material do Genética nas Férias também! Rs). Obrigada por toda paciência, dedicação, força, amor, carinho e apoio incondicional durante o mestrado e em todos os momentos da minha vida nestes três anos.

*“Amar é ter o horizonte livre para voar,
É libertar-se de si, e ter força para ser dois,
é escolher torna-se um só, e sentir ter a força de milhares...”*

Obrigada por fazer deste poema nossa vida! É o amor da minha vida!
Te amo, meu anjo! Bóra pro doutorado? =)

À *minha mãe Noeli*, obrigada por acreditar nos meus sonhos e mesmo em meio a tantas dificuldades me ajudar a fazê-los acontecer. Sou muito grata por ter tido forças e coragem para vencer as barreiras e me proporcionar oportunidades para que hoje eu esteja aqui! Te amo, mãe! Essa vitória é nossa!

Aos meus avós *Leolinda, Arlindo e Irene*, por terem me apoiado em toda minha vida.

Às *amigas Raquely e Ana Lívia*, por todo apoio e amizade nestes 6 anos. Mesmo de longe são essenciais na minha vida. Amo vocês!

Obrigada a todos que de maneira direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho!

DEDICATÓRIA

***"Se as coisas são inatingíveis... ora!
não é motivo para não querê-las!
Que tristes os caminhos se não fora
a mágica presença das estrelas!"***
(Mário Quintana)

SEMPREBON, Simone Cristine. **(L)-Goniotalamina induz danos ao DNA, apoptose e reduz os níveis de RNAm de *BIRC5* (survivina) em linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas (NCI-H460)**. 2011. 85 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

A (D)-Goniotalamina (D-GNT) é um metabólito secundário encontrado em plantas do gênero *Goniothalamus* sp., que são comuns na Malásia. Esta molécula tem atraído a atenção dos pesquisadores devido à sua citotoxicidade seletiva contra células tumorais e também por sua capacidade em induzir apoptose. A (L)-Goniotalamina (L-GNT) é o enantiômero sintético da (D)-Goniotalamina, e seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, mas estudos demonstram que, em relação a algumas linhagens celulares, esta molécula demonstra uma atividade antiproliferativa mais significativa e também apresenta algumas diferenças no seu mecanismo de ação em relação à forma natural. Neste trabalho, avaliamos os efeitos da L-GNT na citotoxicidade (MTT), cinética de proliferação celular, indução de apoptose, genotoxicidade (Ensaio do Cometa) e na expressão gênica (RT-qPCR) de alguns genes relacionados à apoptose e ciclo celular (*BAX*, *TP53* e *BIRC5*) em linhagem celular de câncer de pulmão de células não-pequenas (NCI-H460). Nossos resultados demonstraram que a L-GNT reduziu a sobrevivência celular de modo dose-dependente, induziu apoptose significativamente na concentração de 25 μM ; que todas as concentrações testadas (2,5; 12,5 e 25 μM) foram genotóxicas e que a maior concentração reduziu significativamente os níveis de expressão de *BIRC5*, gene que codifica para a proteína survivina. Os dados obtidos sugerem que a citotoxicidade demonstrada pela L-GNT se deve à indução de morte celular por apoptose, possivelmente através da indução de danos ao material genético e da regulação negativa dos níveis de expressão do gene *BIRC5*. A modulação da resposta apoptótica e a regulação da expressão de survivina são mecanismos de grande interesse para o desenvolvimento de novos fármacos para a terapia do câncer, logo, nossos dados apontam a L-GNT como um agente anticâncer em potencial e novos estudos devem ser realizados para se elucidar como esta molécula regula a expressão de *BIRC5*.

Palavras-chave: (L)-Goniotalamina. Survivina. *BIRC5*. Apoptose. NCI-H460. Citotoxicidade.

SEMPREBON, Simone Cristine. **(S)-Goniothalamine induces DNA damage, apoptosis and decreased *BIRC5* (survivin) mRNA levels in non-small cell lung cancer cell line (NCI-H460)**. 2011. 85 f. Dissertation (Master's Degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

ABSTRACT

(R)-Goniothalamine (R-GNT) is a secondary metabolite found in plants of the genus *Goniothalamus* sp., which are common in Malaysia. This molecule has attracted the attention of researchers because of its selective cytotoxicity against tumor cells and also by their ability to induce apoptosis. (S)-Goniothalamine (S-GNT) is a synthetic enantiomer of (R)-Goniothalamine, although their mechanism remains unknown, studies show that to some cell lines this molecule shows an antiproliferative activity higher than natural form and some differences in their mechanism. We evaluate the effects of the S-GNT in cytotoxicity (MTT), kinetics of cell proliferation, apoptosis, genotoxicity (Comet assay) and gene expression (RT-qPCR) of some apoptosis and cell cycle genes (*BAX*, *TP53* and *BIRC5*) in small-cell lung cancer cell line from lung cancer in non-small cell lung cancer cell line (NCI-H460). Our results showed that S-GNT decreased cell survival in a dose-dependent manner, significantly induced apoptosis (25 μ M), induced genotoxicity (2.5, 12.5 and 25 μ M), and that the higher concentration significantly down-regulated *BIRC5* gene expression, gene encoding the survivin protein. The modulation of apoptotic response and regulation of survivin expression are mechanisms of great interest for new drugs development to cancer therapy, therefore, our findings indicate the S-GNT as a potential anticancer agent and further studies should be conducted to elucidate how this molecule regulates *BIRC5* expression.

Keywords: (S)-Goniothalamine. Survivin. *BIRC5*. Apoptosis. NCI-H460. Cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira 21
- Figura 2** – Principais alterações morfológicas resultantes da apoptose (1 – Célula normal, 2 – Condensação da cromatina, 3 – Fragmentação do núcleo e formação dos corpos apoptóticos, 4 – Fagocitose)..... 27
- Figura 3** – Mecanismos de apoptose. Vias Extrínseca e Intrínseca 28
- Figura 4** – Planta do gênero *Goniothalamus* SP 38
- Figura 5** – Estruturas químicas da (D)-Goniotalamina e (L)-Goniotalamina 38

ARTIGO

- Figura 1** – Estrutura química da (L)-Goniotalamina..... 79
- Figura 2** – Porcentagens de sobrevivência celular calculadas a partir dos valores de absorvância obtidos através do Ensaio do MTT, em células NCI-H460 tratadas com L-GNT. As barras representam as Médias \pm Desvio Padrão obtidos em três experimentos independentes 79
- Figura 3** – Curva de crescimento celular obtida através de contagem celular em câmara de Neubauer após 24, 48 e 72 horas de tratamento com L-GNT em células NCI-H460 80
- Figura 4** – Avaliação da indução de apoptose *in situ*. A) Gráfico com as porcentagens de células apoptóticas obtidas através de coloração por alaranjado de acridina em células NCI-H460 tratadas com L-GNT por 24 horas. B) Células com morfologia normal. C) Células com morfologia celular características de apoptose..... 81
- Figura 5** – Escore médio de cometas observado após 3 horas de tratamento em células NCI-H460 tratadas com L-GNT. As barras representam as Médias \pm Desvio Padrão obtidos em três experimentos independentes..... 81

Figura 6 – Avaliação da expressão dos genes *BIRC5*, *TP53* e *BAX* por RT-PCR em tempo real após 12 h de tratamento com 25 μ M de L-GNT..... 82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Valores médios \pm desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 24 e 48 horas de tratamento 83
- Tabela 2** – Valores percentuais médios das taxas de sobrevivência celular \pm Desvio Padrão calculados a partir do Ensaio do MTT após 24 e 48 horas de tratamento 83
- Tabela 3** – Valores médios \pm Desvio padrão (10^4) obtidos através do Ensaio de Cinética de proliferação celular após 24, 48 e 72 horas de tratamento 84
- Tabela 4** – Valores médios de células apoptóticas \pm Desvio Padrão e Porcentagem média \pm Desvio Padrão obtidos a partir da análise morfológica das células após 24 horas de tratamento 84
- Tabela 5** – Frequência de células com dano no DNA, distribuição das classes de danos e escore (\pm Desvio Padrão) referentes ao Ensaio do Cometa após 3 horas de tratamento..... 85

LISTA DE ABREVIATURAS

786-0	Linhagem celular de câncer renal humano
$\Delta\psi_m$	potencial de membrana mitocondrial
A1	Bcl-2-related protein A1
AIF	Apoptosis inducing factor
Apaf-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ATP	Trifosfato de adenosina
BAX	BCL2-associated X protein
Bad	BCL2-associated agonist of cell death
Bak	BCL2-antagonist/killer 1
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-B	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)
Bcl-X1	Bcl-2-like protein 1
Bcl-w	Bcl-2-like protein 2
bFGF	Basic fibroblast growth factor
Bid	BH3 interacting domain death agonist
Bim	BCL2-like 11 (apoptosis facilitator)
BIR	Baculoviral repeats
BIRC5	Baculoviral IAP repeat-containing 5
Bik	BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)
Bmf	Bcl2 modifying factor
Bok	BCL2-related ovarian killer
BRCA1	Breast cancer 1, early onset
BrdU	Bromodesoxiuridina
CARD	Domínio de recrutamento de caspases
CASMCs	coronary artery smooth muscle cells
CC	Coiled-coil
CCL 13	Linhagem celular normal de fígado humano
CD95/FAZ	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)
cdc2	Cyclin-dependent kinase 1
CEM-SS	Linhagem celular de leucemia humana
cIAP1	Baculoviral IAP repeat containing 2
c-IAP-2	Baculoviral IAP repeat containing 3

COR-L23	Linhagem celular de câncer de pulmão humano
CPC	Chromosomal passenger proteins
CPCP	Câncer de pulmão de células pequenas
CPCNP	Câncer de pulmão de células não-pequenas
CRMP-1	Collapsin response mediator protein 1
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
D-GNT	(D)-Goniotalamina
DISC	Complexo sinalizador indutor de morte
DUTT1/ROBO1	Roundabout, axon guidance receptor, homolog 1
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EndoG	Endonuclease G
eNOS	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)
ERK	Extracellular-signal-regulated kinase
ERCC2	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2
ERCC3	Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 3 (xeroderma pigmentosum group B complementing)
Fas	TNF receptor superfamily, member 6
FHIT	Fragile histidine triad gene
FUS1	Fused in sarcoma 1
GADD45	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
GNT	Goniotalamina
GSH	Glutathione synthetase
Hela	Linhagem celular de adenocarcinoma de cérvix humano
HepG2	Linhagem celular de hepatoma humano
HepG2R	Drug resistant HepG2
HER2	Human epidermal growth factor receptor 2
HF	Fibroblastos humanos
HIF-1α	Hypoxia-inducible factor-1 alpha
HL-60	Linhagem celular de leucemia promielocítica humana
Hrk	Harakiri, BCL2 interacting protein (contains only BH3 domain)
Hsp90	Heat shock 90

HT-29	Linhagem celular de câncer de cólon humano
IAPs	Inhibitor of Apoptosis proteins
IC50	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
IGFBP3	Insulin-like growth factor binding protein 3
ILP-2	Baculoviral IAP repeat containing 8
KILLER/DR5	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
LC3	Autophagy-related protein
L-GNT	(L)-goniotalamina
LS174T	Linhagem celular de câncer de cólon humano
LOH	Loss of Heterozygosity
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama humano
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)
MDA-MB-231	Linhagem de câncer de mama na linhagem humano
MDBK	Linhagem celular normal de rim bovino
Mdm-2	Double minute 2 protein
MEK	Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase
ML-IAP/Livin	Baculoviral IAP repeat containing 7
MSH2	MutS protein homolog 2
MTT	(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide)
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein
NCI	United States National Cancer Institute
NCI-ADR	Linhagem celular de câncer de mama humano expressando o fenótipo de resistência multidrogas
NCI-H460	Linhagem celular de carcinoma de pulmão de células não-pequenas
NFκBp65	Nuclear factor kappa B p65
nNOS	Nitric oxide synthase 1 (neuronal)
NOS	Óxido nítrico sintetase
O6MGMT	O6-Methylguanine DNA methyltransferase
OMI/HTRA2	HtrA serine peptidase 2
ONYX-015	Adenovírus oncolítico
OVCAR03	Linhagem celular de câncer de ovário humano
p16	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

P21/WAF-1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
p53AIP1	Tumor protein p53 regulated apoptosis inducing protein 1
p53	Tumor protein p53
PARP	Polimerase poliADPribose
PCO 3	Linhagem celular de câncer de próstata humano
PD-ECGF	Endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)
PIG3	Tumor protein p53 inducible protein 3
PP2A	Proteína serina/treonina fosfatase 2A
RAF	Quinase Raf
RAR	Retinoic acid receptor
RAS	Proteína G Ras
RASSF1A	RAS association family 1 gene
Rb	Retinoblastoma -associated protein
RING	Really interesting new gene
RNA_m	RNA mensageiro
ROSE	Spécies reativas de oxigênio
RPA	Replication protein A
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase PCR</i>
SEMA3B	Sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3B
SMAC/DIABLO	Direct IAP-binding protein with low pI
Sp1	Sp1 transcription factor
SPD	Derivados de estirilpirona
SRB	Sulforodamina B
ST3	Fibroblastos de pele de camundongo
Stat3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)
TNFR1	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TP53	Tumor Protein p53
UACC62	Linhagem celular de melanoma humano
VDCA	Voltage dependent anionic channel
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VSMCs	Células musculares lisas vasculares
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1	CÂNCER	20
2.1.1	Aspectos Gerais	20
2.1.2	Câncer de Pulmão	22
2.1.3	Quimioterapia do Câncer	24
2.2	APOPTOSE	26
2.2.1	Família Bcl-2: Reguladores da Apoptose	30
2.2.2	TP53: O Guardião do Genoma	31
2.2.3	IAPs: Inibidores da Apoptose	33
2.3	NOVOS FÁRMACOS	36
2.4	GONIOTALAMINA	37
3	OBJETIVOS	45
3.1	GERAIS	45
3.2	ESPECÍFICOS	45
4	ARTIGO	46
	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	FIGURAS	79
	ANEXOS	83

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, na época na época dos faraós no antigo Egito e do mundo clássico, há evidências de casos de câncer encontrados em restos humanos ancestrais e nas descrições médicas (NOBILI et al., 2009). Hoje, esta doença é considerada o maior problema de saúde pública da atualidade. Em 2008, como relatado na última estimativa mundial, ocorreram cerca de 12 milhões de novos casos e 7 milhões de óbitos no mundo em decorrência desta doença (FERLAY et al., 2008).

Dentre os tipos de câncer mais incidentes e que mais matam no mundo está o câncer de pulmão, o qual, de acordo com suas características clinicopatológicas, se divide em dois tipos principais, câncer de pulmão de células pequenas (CPCP), que constituem aproximadamente 20% dos casos, e câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP), responsável pela grande maioria dos casos, cerca de 80% (FERLAY et al., 2008; FORGACS et al., 2001).

A maioria dos alvos terapêuticos é comum às células normais e tumorais, por isso, os fármacos utilizados para o tratamento do câncer exibem inúmeros efeitos colaterais, como náuseas, alopecia, esterilidade, mielossupressão, danos ao epitélio gastrointestinal, e até mesmo aumentam o risco para o desenvolvimento de um novo câncer. Com isso, é grande o interesse no desenvolvimento de novos fármacos que sejam mais eficazes e menos tóxicas ao paciente.

Um alvo interessante para o desenvolvimento destes novos fármacos é a modulação da via apoptótica, a qual se encontra alterada na grande maioria dos cânceres e representa um dos maiores obstáculos para o sucesso no tratamento.

A (D)-Goniotalamina (D-GNT) é um metabólito secundário encontrado em plantas do gênero *Goniothalamus* sp., que são comuns na Malásia. Esta molécula tem atraído a atenção dos pesquisadores devido à sua possível citotoxicidade seletiva contra células tumorais (PIHIE; STANSLAS, 1998; TIAN et al., 2004; WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005) e também por sua capacidade em induzir apoptose, especialmente através da via intrínseca (CHAN et al., 2010; CHAN et al., 2006; CHEN et al., 2005; de FÁTIMA et al., 2008; INAYAT-HUSSAIN et al., 1999, 2003, 2010; LEE et al., 2003a, b; TIAN et al., 2004).

A (L)-goniotalamina (L-GNT) é o enantiômero sintético da (D)-Goniotalamina, que apresenta maior atividade antiproliferativa contra algumas linhagens celulares e diferente mecanismo de ação em relação à molécula natural (de FÁTIMA et al.,

2006; 2008). Existem poucos dados na literatura a respeito desta nova molécula, por isso é necessário que novos estudos sejam realizados a fim de se proporcionar uma visão mais ampla e detalhada do modo como essa molécula exerce sua atividade antiproliferativa.

Neste trabalho, foram investigados o efeito citotóxico, a cinética de proliferação celular, indução de apoptose *in situ*, genotoxicidade e a expressão de alguns genes relacionados ao processo apoptótico e ciclo celular: *BAX*, *TP53* e *BIRC5* (Survivina), após tratamento com a L-GNT. A escolha da linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas NCI-H460, foi baseada na relevância em se estudar novas estratégias terapêuticas para este tipo de câncer, que é um dos mais incidentes e com as maiores taxas de mortalidade.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CÂNCER

2.1.1 Aspectos Gerais

Nos organismos multicelulares, cada célula deve se comportar de modo equilibrado a fim de garantir o bem-estar de todo o organismo. O câncer é um grupo de doenças que se caracteriza principalmente pelo crescimento descontrolado de células anormais, ou seja, pela quebra do equilíbrio, podendo levar o organismo à morte (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2007). A complexidade no entendimento desta doença se deve aos mais de 100 tipos de cânceres e subtipos de tumores que podem ser encontrados em órgãos específicos (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Esta proliferação fora do controle irá gerar uma massa de células anormais em crescimento constante (neoplasia ou tumor). Se as células neoplásicas permanecerem juntas formando uma massa única, o tumor é denominado como benigno. No entanto, caso adquiram a capacidade de invadir outros tecidos, o tumor é considerado maligno ou câncer.

A tumorigênese é um processo multipassos que dirige a transformação progressiva de uma célula normal em uma célula com características malignas, sendo sugeridas seis principais alterações na fisiologia celular que determinam o crescimento maligno: auto-suficiência em sinais de crescimento, insensibilidade a fatores inibitórios do crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Esta vantagem no crescimento ocorre devido a mutações, que são mudanças no genótipo de uma célula, ou a alterações epigenéticas, quando o padrão de expressão gênica é alterado sem mudanças na sequência de DNA. Grande parte das mutações não traz mudanças na atividade celular ou levam a célula à morte, já uma pequena parte pode ocorrer em genes específicos (proto-oncogenes e supressores tumorais) e, então, determinar vantagens e crescimento desordenado a estas células.

Estas mutações podem ocorrer de maneira espontânea, devido a erros na replicação ou reparo do DNA; de maneira induzida, quando são resultantes da exposição do

organismo a agentes físicos, químicos ou biológicos que causam mudanças no DNA; ou então podem ser herdadas.

No ano de 2008, ocorreram cerca de 12 milhões de novos casos de câncer e 7 milhões de óbitos em todo o mundo, o que aponta esta doença como o principal problema de saúde pública da atualidade (FERLAY et al., 2008). No Brasil, segundo o relatório do INCA (2010), estimativas apontam a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer no ano de 2010, sendo esta estimativa também válida para 2011. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente na população brasileira com 114 mil novos casos, seguido pelos tumores de próstata com 52 mil casos, mama feminina com 49 mil casos, cólon e reto com 28 mil casos, pulmão também com 28 mil casos, estômago com 21 mil casos e cólo de útero com 18 mil novos casos. Os tumores mais incidentes para o sexo masculino serão: câncer de pele não melanoma (53 mil novos casos), próstata (52 mil), pulmão (18 mil), estômago (14 mil) e cólon e reto (13 mil). Já para o sexo feminino serão: câncer de pele não melanoma (60 mil novos casos), mama (49 mil), colo de útero (18 mil), cólon e reto (15 mil) e pulmão (10 mil). A Figura 1 traz os tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010 na população brasileira.

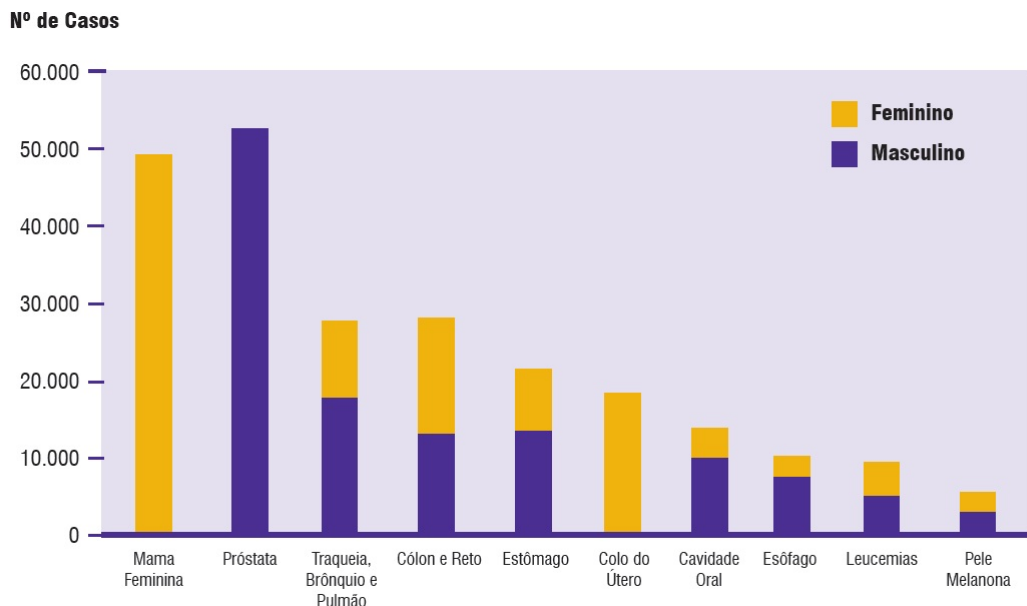


Figura 1 – Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira.

Fonte: INCA (2010).

2.1.2 Câncer de Pulmão

O câncer de pulmão é o principal tipo de câncer no mundo desde a década de 80. Em 2008, na última estimativa mundial, relatou-se cerca de 1,61 milhões de novos casos e 1,38 milhões de mortes em decorrência desta doença (FERLAY et al., 2008). No Brasil, estimativas para o ano de 2010 e 2011, apontam este tipo de câncer como o terceiro mais incidente na população, como demonstrado na Figura 1 (INCA, 2010).

Normalmente, o câncer de pulmão é detectado em estágios avançados, já que não há sintomas nos estágios iniciais. Portanto, permanece como uma doença altamente letal, sendo a sobrevida média cumulativa total em cinco anos de 13% a 20% em países desenvolvidos e 12% nos países em desenvolvimento (INCA, 2010).

Embora seja um dos tipos mais comuns e sua sobrevida média seja muito baixa, esta neoplasia é uma das principais causas de morte evitável, isto porque em países como Estados Unidos e em outros onde o uso do cigarro é comum, cerca de 90% ou mais dos casos são tabaco-relacionados (PARKIN; BRAY; PISANI, 2005) e quando comparados aos não-fumantes, os tabagistas têm cerca de 20 vezes mais chances de desenvolvê-lo (ALBERG; FORD; SAMET, 2007). É estimado que entre 9 a 15% dos casos de câncer de pulmão tenham outras causas que não o hábito de fumar como exposição ao asbesto (DOLL, 1955; O'REILLY et al., 2007), radiação ionizante (PIERCE; SHARP; MABUCHI, 2003), poluição do ar por hidrocarbonetos policíclicos, fumantes passivos (LEWTAS, 2007) e história familiar (MATAKIDOU; EISEN; HOULSTON, 2005).

Apesar dos principais fatores de risco associados ao câncer de pulmão serem ambientais, há uma diferença na suscetibilidade individual a estes carcinógenos. Portanto, o risco para esta doença é refletido de acordo com a interrelação entre a exposição aos agentes etiológicos e a suscetibilidade individual a estes agentes (ALBERG; FORD; SAMET, 2007).

De acordo com as características clinicopatológicas, o câncer de pulmão pode ser classificado em dois grupos: câncer de pulmão de células pequenas (CPCP), que constituem aproximadamente 20% dos casos, e câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP), com cerca de 80% dos casos, sendo este grupo dividido em três subtipos: adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas e carcinoma de grandes células (FORGACS et al., 2001).

Evidências clínicas demonstram que os cânceres de pulmão acumulam 20 ou mais alterações genéticas e epigenéticas em um processo multipassos, como descrito por

Hanahan e Weinberg (2000): auto-suficiência em relação aos sinais de crescimento, evasão da apoptose, insensibilidade a fatores inibitórios do crescimento, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada, invasão tecidual e metástase (FONG et al., 2003).

O aumento da proliferação celular é uma característica do fenótipo maligno, e pode ocorrer por auto-suficiência em relação aos sinais de crescimento e proliferação. No caso do câncer de pulmão, algumas das principais alterações relatadas ocorrem nos receptores EGFR, HER2, na via RAS/RAF/MEK/ERK e no gene *BRCA1* (MACKINNON; KOPATZ; SETHI, 2010).

Outro mecanismo complementar à regulação da proliferação no controle da homeostase do tecido é a apoptose. Este processo também precisa ser altamente regulado, já que defeitos na maquinaria apoptótica levam à sobrevivência celular podendo, assim, contribuir para a expansão celular neoplásica. Defeitos nas vias apoptóticas, podem conferir resistência à quimioterapia, radioterapia e destruição celular mediada pela resposta imune (ANDREEFF; GOODRICH; PARDEE, 2000). As principais alterações encontradas no câncer de pulmão ocorrem nos genes *TP53*, *BAX* e na família de inibidores da apoptose (IAPs) (FONG et al., 2003).

Os genes supressores tumorais exercem um papel crítico no controle da proliferação celular em células normais. Eles se tornam inativos por perda cromossomal de um alelo (perda de heterozigosidade - LOH) e através de mutações gênicas ou hipermetilação epigenética de seu promotor. Algumas alterações características comuns no câncer de pulmão ocorrem nos genes *FHIT*, *RASSF1A*, *FUS1* e *SEMA3B*, *DUTT1/ROBO1*, *RAR*, *TP53*, *Rb* e *p16* (FONG et al., 2003).

A sobrevivência das células tumorais é garantida especialmente pelo potencial replicativo ilimitado adquirido devido à expressão de telomerase, enzima esta que não possui atividade em células somáticas normais e que é detectada em 100% dos casos de CPCP e em 80% de CPCNP. Além disso, a angiogênese sustentada também garante a sobrevivência tumoral. Entre os múltiplos fatores angiogênicos indutores e inibidores da proliferação e migração celular, a expressão de alguns deles, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) e fator de crescimento de célula endotelial derivado de plaqueta (PD-ECGF), é relatada em inúmeros casos de câncer de pulmão (FORGACS et al., 2001).

Outro passo na progressão do câncer de pulmão é a capacidade de invasão tecidual e metástase. Um dos novos candidatos a participantes desta característica é a proteína CRMP-1, responsável por mediar os efeitos das colapsinas. Espécies de câncer de pulmão que

apresentam expressão reduzida desta proteína são associadas com estágios avançados da doença, metástase nos linfonodos e sobrevivência reduzida. Além disso, a superexpressão de lamininas, como por exemplo, da laminina-5, são frequentemente associadas à redução na sobrevivência do paciente (FONG et al., 2003).

Tendo em vista que o câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP) é um dos mais incidentes e com as maiores taxas de mortalidade no mundo, será utilizada como modelo experimental neste trabalho, a linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas, do subtipo carcinoma de grandes células, NCI-H460.

2.1.3 Quimioterapia do Câncer

O tratamento do câncer envolve a participação de diferentes especialidades médicas e também diferentes modalidades de tratamento. Os três principais enfoques no tratamento são: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, os quais são utilizados de acordo com o tipo de tumor e o estágio do seu desenvolvimento.

O interesse no desenvolvimento de drogas contra o câncer se intensificou a partir da década de 50, isto porque, notou-se que enquanto a cirurgia e a radioterapia curavam cerca de 40% dos pacientes, cerca de 60% morriam como resultado de metástase. Sendo assim, para estes pacientes, o câncer deveria ser considerado como uma doença sistêmica e necessitava, portanto, de uma terapia sistêmica tal qual a quimioterapia (VERWEIJ; JONGE, 2000).

No caso de pacientes com câncer de pulmão de células não-pequenas nos estágios iniciais da doença, menos de 25% têm uma chance razoável de cura após a ressecção cirúrgica do tumor. Além disso, apenas metade destes pacientes permanecem livres da doença em um período de 5 anos (BUNN; MAULT; KELLY, 2000). Com isso, a importância da quimioterapia se faz evidente tanto para reduzir o risco de recidiva e micrometástases, quanto para aumentar a sobrevida do paciente.

O objetivo dos fármacos anticâncer é curar, prolongar a vida do paciente, ou promover uma terapia de alívio dos sintomas. No caso de tumores quimiossensíveis, a quimioterapia citotóxica pode até mesmo ser curativa. Já para a maioria dos tumores localizados, há um grande risco de recorrência após os tratamentos primários (cirurgia ou radioterapia) e nestes casos, portanto, é utilizada uma terapia adjuvante que melhora

significativamente a taxa de cura. Outro tipo de tratamento quimioterápico é o neoadjuvante, o qual é utilizado antes da cirurgia para tratar micrometástases e reduzir o tamanho de tumores sensíveis e, dessa forma, preservar o órgão durante a ressecção cirúrgica. No entanto, quando não há chances de cura através da quimioterapia, o que é o caso de grande parte dos tumores sólidos metastáticos, a quimioterapia paliativa é utilizada, com o objetivo de encolher tumores e aliviar sintomas, podendo até mesmo prolongar o período de sobrevivência do paciente (PARNELL; WOLL, 2003).

Segundo Malhotra e Perry (2003), os agentes quimioterápicos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação em algumas classes principais:

- Agentes alquilantes: agem prejudicando a função celular através da formação de ligações covalentes com os grupos amino, carboxila, sulfidril e fosfato em importantes moléculas biológicas. O efeito quimioterapêutico e citotóxico é diretamente relacionado à alquilação do nitrogênio da posição 7 da guanina no DNA. Esta classe de drogas inclui a mostarda nitrogenada, nitrosuréis, complexos de platina, entre outros.

- Antimetabólitos: são análogos estruturais de metabólitos que ocorrem naturalmente e que estão envolvidos na síntese de DNA e RNA. Como estas drogas interferem diretamente na síntese de DNA, são mais ativas na fase S do ciclo celular e têm menor atividade em células em G₀. Os antimetabólitos são divididos em análogos de folato, análogos de purina, análogos de pirimidina, análogos de adenosina, e uréia substituída. Alguns exemplos destes fármacos são o metotrexato, fluoruracila, citarabina, gemcitabina, pentostatina, fludarabina e cladribina.

- Produtos naturais: são componentes que possuem atividade antitumoral isolados de fontes naturais como plantas, fungos e bactérias. Como por exemplo, os alcalóides da vinca, o taxanos e a camptotecina.

- Antibióticos antitumorais: são antibióticos com efeito citotóxico como a bleomicina, antraciclina, doxorubicina, entre outros.

A maior parte dos alvos moleculares sobre os quais os quimioterápicos utilizados hoje na terapia do câncer atuam estão presentes também em células normais. Por exemplo, grande parte dos fármacos anticâncer tem como alvo a divisão celular, no entanto, a rápida divisão não é uma característica específica da célula neoplásica, mas também de alguns tecidos normais. Por isso, estes fármacos produzem alguns efeitos tóxicos como a mielossupressão, comprometimento da cicatrização, alopecia, dano ao epitélio gastrointestinal, esterilidade, teratogenicidade, entre outros. Com isso, há uma grande busca por fármacos que apresentem alta especificidade para alvos moleculares e que atuem

seletivamente contra as células cancerosas, de modo a aumentar a eficácia do tratamento e reduzir a toxicidade (REIS, 2007).

Entretanto, o câncer é uma doença complexa e a escolha de alvos terapêuticos específicos é bastante difícil, isto porque um bom alvo deve ser diferente em uma célula cancerosa quando comparada a uma célula normal. No entanto, entender estas diferenças não é o suficiente, é importante que a droga consiga reconhecer o alvo e consiga matar a célula tumoral e/ou causar a inibição do crescimento tumoral. Além de tudo, o tumor é geneticamente diferente de paciente para paciente e, com isso, cada indivíduo requer diferentes drogas de acordo com o genótipo tumoral (SAGER; LENGAUER, 2003).

Falhas na via apoptótica representam um dos maiores obstáculos para o sucesso no tratamento do câncer. Logo, a modulação deste processo de morte celular é um dos principais mecanismos de interesse no desenvolvimento de novos compostos e estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer (REED, 2002).

2.2 APOPTOSE

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um fenômeno onde a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminem em sua morte. É uma forma de morte coordenada e dependente de energia, onde o estímulo inicial induz uma complexa cascata molecular de eventos, que resulta na ativação de um grupo de cisteína-proteases chamadas “caspases” e outras proteínas-chave, com consequente suicídio celular (ELMORE, 2007).

Em 1972, Kerr; Willie e Currie descreveram as alterações morfológicas que ocorrem e sugeriram o nome “Apoptose” para este tipo de morte celular. Este processo se inicia com o encolhimento da célula e do núcleo, bem como com a condensação da cromatina em massas bem delimitadas acopladas à membrana nuclear. Mais tardiamente, o núcleo se fragmenta (cariorrexe). Então, há a formação de invaginações na membrana plasmática, seguida pela fragmentação da célula em corpos apoptóticos, que são delimitados por membrana, compostos de citoplasma e organelas muito compactadas, com ou sem fragmentos nuclear. Estes corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por macrófagos ou células parenquimais adjacentes (KERR; WILLIE; CURRIE, 1972). Na Figura 2 são demonstradas as principais alterações morfológicas resultantes da apoptose.

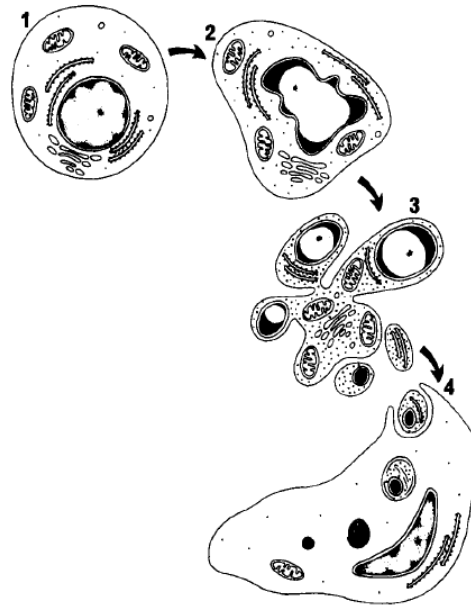


Figura 2 – Principais alterações morfológicas resultantes da apoptose (1 – Célula normal, 2 – Condensação da cromatina, 3 – Fragmentação do núcleo e formação dos corpos apoptóticos, 4 – Fagocitose).

Fonte: Modificado de Kerr; Winterford e Harmon (1994).

Este processo é fundamental no desenvolvimento embrionário para o remodelamento de órgãos, sendo assim essencial no processo de organogênese (JIN; EL-DEIRY, 2005). No organismo adulto está envolvido em vários eventos fisiológicos, como descamação do revestimento intestinal, morte de neutrófilos, renovação dos tecidos, garantindo a homeostase dos tecidos e também atuando como um mecanismo de defesa do organismo, sendo fundamental na remoção de células que sofreram algum dano, prevenindo processos patológicos como o câncer, ou que foram infectadas (REED, 2002).

A desregulação do mecanismo apoptótico está associada a diversas doenças. Segundo Melnikova e Golden (2004):

- A inibição da apoptose e aumento da sobrevivência celular está associada ao câncer; doenças auto-imunes, como o Lupus Eritematoso Sistêmico; doenças inflamatórias, como a asma brônquica e artrite reumatóide; e infecções virais.

- Já o excesso de apoptose com consequente aumento da morte celular está associado a AIDS; doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, doença de Huntington, esclerose múltipla e doença de Parkinson; doenças hematológicas, como a anemia aplásica, síndrome mielodisplásica e linfocitopenia; dano tecidual, como infarto do miocárdio; e outras doenças, como a alopecia e a distrofia muscular.

Durante a apoptose, uma maquinaria de execução é acionada por vários sinais extra ou intracelulares, que resultam em uma intensa clivagem de proteínas celulares por ativação da família das caspases (do inglês *Cysteine Aspartate Proteases*). As caspases são sintetizadas na célula na forma de zimógenos inativos, as procaspases, as quais são ativadas através da clivagem dos resíduos de ácido aspártico por outras caspases ou por auto-ativação. Uma vez ativadas, estas caspases clivam e ativam outras procaspases e outras proteínas-chave (ELMORE, 2007).

Funcionalmente, as caspases apoptóticas são divididas em dois grupos: Iniciadoras (2, 8, 9 e 10), as quais ativam as caspases efetoras; Efetoras (3, 6 e 7), que quando ativadas degradam diretamente vários substratos incluindo proteínas regulatórias e estruturais no núcleo, citoplasma e citoesqueleto, levando à execução da morte celular por apoptose (ZIMMERMAN; BONZON; GREEN 2001).

Como mostrado na Figura 3, a ativação das procaspases pode ser desencadeada por ativação dos receptores de morte na superfície celular (via extrínseca) ou então através da via mitocondrial, que ocorre quando a célula é estressada ou danificada (via intrínseca) (JIN; EL-DEIRY, 2005). Estas vias convergem a um mesmo caminho, a execução da apoptose, que se inicia com a clivagem da caspase-3 e resulta em algumas alterações morfológicas na estrutura celular como fragmentação do DNA, degradação do citoesqueleto e de proteínas nucleares, ligação cruzada de proteínas, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para reconhecimento das células fagocíticas e, por fim, em fagocitose (ELMORE, 2007).

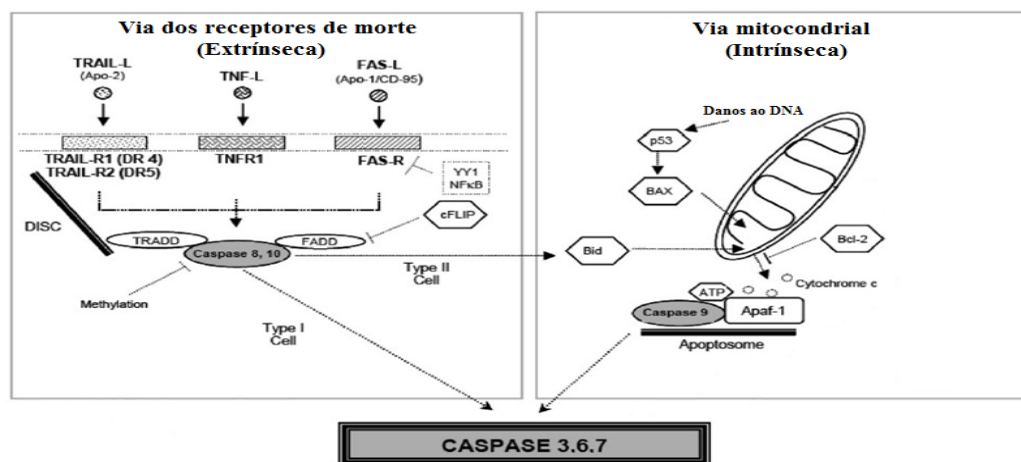


Figura 3 – Mecanismos de apoptose. Vias Extrínseca e Intrínseca.
Fonte: Modificado de Huerta et al. (2007).

A via extrínseca é iniciada quando um ligante de morte extracelular se une ao seu receptor de morte na superfície da membrana. A sequência de eventos que ocorre na via extrínseca é bem caracterizada pelo modelo FasL/FasR. O ligante de morte FasL se une ao seu receptor de morte FasR e a formação deste complexo recruta alguns fatores citosólicos como FADD e a procaspase-8 formando um complexo sinalizador indutor de morte (DISC). A formação de DISC irá, então, desencadear a ativação autocatalítica da procaspase-8, que uma vez ativada irá clivar e ativar a procaspase efetora- 3, induzindo, deste modo, a apoptose (RIELD, 2004).

A via intrínseca de sinalização inicia a apoptose por meio de estímulos diversificados e que não envolvem receptores, tais como danos ao DNA, deprivação de fatores de crescimento, calor, hipóxia, drogas citotóxicas, radiação ou estresse oxidativo, os quais produzem sinais intracelulares que atuam diretamente sobre alvos dentro da célula. Esta via normalmente se inicia na mitocôndria (JIN; EL-DEIRY, 2005). Estes estímulos causam mudanças na membrana mitocondrial, gerando um grande aumento na sua permeabilidade, a qual é acompanhada pelo vazamento de proteínas pró-apoptóticas (citocromo-c, SMAC/DIABLO, AIF, EndoG e OMI/HTRA2 do espaço intermembrana da mitocôndria ao citosol (RIEDL, 2004).

O citocromo-c liberado para o citosol irá se ligar à proteína citosólica Apaf-1, provocando nela uma mudança conformacional que irá facilitar a ligação de ATP/dATP. Este complexo chamado “Apoptossomo” irá se ligar à procaspase-9 e promover sua clivagem dando origem à caspase iniciadora-9 ativa, que será responsável pela ativação das caspases efetoras 3 e 7, resultando em indução de apoptose (HUERTA et al., 2007).

SMAC/DIABLO e HtrA2/Omi são recrutadas para promover a apoptose por inibição das IAPs (*Inhibitors of Apoptosis Proteins*), a fim de aumentar a atividade das caspases. Já as AIF e endonuclease G são responsáveis pela fragmentação do DNA (HUERTA et al., 2007).

Devido à importância fundamental da apoptose para a homeostase do organismo, este processo é minuciosamente regulado. Algumas das proteínas que participam desta regulação e que podem ser bons alvos para a terapia do câncer, já que se encontram alteradas em grande parte dos tumores, são as proteínas da família Bcl-2, p53 e a família de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs).

2.2.1 Família Bcl-2: Reguladores da Apoptose

A família Bcl-2 é uma família de proteínas reguladoras da apoptose que participam ativamente deste processo. Estas proteínas são divididas em duas classes, aquelas que inibem (anti-apoptóticas) e aquelas que promovem (pró-apoptóticas) a apoptose (PETROS; OLEJNICZAC; FESIK, 2004). Funcionalmente, a estequiometria entre proteínas anti e pró-apoptóticas e a interação entre elas determina se a célula irá ou não responder a diferentes estímulos indutores de apoptose (LEVINE; SINHA; KROEMER, 2008; WILLIS et al., 2003).

As proteínas da família Bcl-2 são divididas em três subfamílias de acordo com o número de domínios de homologia a Bcl-2 (BH, Bcl-2 *homology*): as anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, A1 e Bcl-B, com quatro domínios de homologia a Bcl-2 (BH1, BH2, BH3 e BH4), as quais protegem a célula da apoptose; as pró-apoptóticas Bax, Bak e Bok, com três regiões conservadas de homologia a Bcl-2 (BH1, BH2 e BH3), que induzem a apoptose; e as proteínas pró-apoptóticas BH3-only, Bik, Bad, Bid, Bim, Bmf, Hrk, Noxa e Puma, com apenas uma região de homologia a Bcl-2 (BH3), e que desencadeiam ou sensibilizam para a apoptose (ADAMS; CORY, 2007; BORNER, 2002; GHIBELLI; DIEDERICH, 2010).

A apoptose induzida por um determinado estresse requer a participação de ambos os grupos de proteínas pró-apoptóticas, tanto das proteínas BH3-only, que agem como sensores do dano ativando Bax e/ou como antagonistas das proteínas anti-apoptóticas, quanto das proteínas pró-apoptóticas da subfamília de Bax, que quando ativadas agem permeabilizando a membrana mitocondrial externa (ADAMS; CORY, 2007; GHIBELLI; DIEDERICH, 2010). Como resultado, citocromo c e outras proteínas efetoras são liberadas para o citosol levando à ativação da cascata proteolítica e indução de morte celular por apoptose (LESSENE; CZABOTAR; COLMAN, 2008).

Diferentes estímulos levam à ativação de diferentes proteínas pró-apoptóticas BH3-only. Por exemplo, NOXA e PUMA são ativados em resposta à via do p53 após danos ao material genético, Bim e Bad são ativados após a deprivação de citocinas, Bmf é ativado por anoikis e radiação UV, e Bid é ativado pelo receptor de morte Fas (ER et al., 2006; LESSENE; CZABOTAR; COLMAN, 2008).

A proteína pró-apoptótica Bax é a mais estudada entre os membros da subfamília pró-apoptótica. Esta proteína é encontrada na forma de monômeros de 21 KDa que

possuem localização citoplasmática ou perimitocondrial. Normalmente, a ativação de Bax durante a apoptose não requer aumento na transcrição deste gene (ER et al., 2006).

Em resposta a um estímulo apoptótico, as proteínas pró-apoptóticas BH3-only promovem a translocação de Bax para a membrana mitocondrial externa (WILLIS, S. et al., 2003). Então, há a formação de complexos, com 6 a 8 moléculas de Bax, que se integram à membrana após sofrerem mudanças conformacionais (ER et al., 2006).

Dois modelos foram propostos para explicar como ocorre a liberação das moléculas efetoras da mitocôndria. O primeiro modelo sugere que multímeros de Bax formam um megacanal não-específico que induz a queda no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) e o inchaço da mitocôndria, causando a ruptura da membrana mitocondrial externa e a liberação de citocromo-c para o citosol. O segundo modelo sugere que os multímeros de Bax interagem diretamente com canais específicos como o VDCA (*voltage dependent anionic channel*) causando modificações conformacionais que os tornam permeáveis ao citocromo-c (ER et al., 2006). Por outro lado, a formação de homodímeros pelas proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2, podem prevenir o aumento da permeabilidade mitocondrial e impedir a formação de poros na membrana mitocondrial (ANTIGNANI; YOULE, 2006).

2.2.2 TP53: O Guardião do Genoma

O gene humano supressor tumoral *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17 (região p13.1) (BERTHEAU et al., 2008). Os padrões de expressão deste gene são bastante complexos, com mais de 10 diferentes isoformas de proteínas produzidas por splicing e tradução alternativos (HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010).

A proteína p53, codificada pelo gene *TP53*, é um fator de transcrição, considerado o “guardião do genoma”, capaz de regular a expressão de vários genes com uma variedade de funções incluindo parada do ciclo celular, apoptose, mudanças no metabolismo, entre outros (GREEN; KROEMER, 2009). Esta proteína possui três regiões funcionais distintas: uma região N-terminal contendo um domínio de transativação e um domínio rico em prolina necessário para a interação com outras proteínas; um domínio de ligação ao DNA, que está localizado na porção central da proteína; e um domínio de tetramerização e regulação localizado na porção C-terminal (BERTHEAU et al., 2008).

Esta proteína encontra-se envolvida em diversas vias de resposta ao estresse que impedem o crescimento e sobrevivência de células potencialmente malignas. Em condições celulares normais, os níveis de p53 são mantidos muito baixos e isso acontece porque p53 interage com a proteína Mdm-2, a principal reguladora dos níveis de p53, que age como uma ubiquitina-ligase que se liga a ela para que seja destruída pelos proteassomos. Em situações de estresse celular, como danos genotóxicos, ativação oncogênica, deprivação de nutrientes, hipóxia, entre outros, uma proteína-quinase fosforila p53 e reduz sua ligação com Mdm-2, diminuindo desta forma sua degradação e aumentando seus níveis na célula (GOTTLIEB; VOUSDEN, 2010; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010; MEEK, 2009).

Com o aumento nos níveis de p53 na célula será desencadeada a transativação transcricional de seus genes alvo tais como componentes da maquinaria de reparo e replicação (helicases ERCC2 e ERCC3, proteína de replicação RPA, O6MGMT, MSH2), reguladores do ciclo celular (P21/WAF-1, 14-3-3sigma, GADD45), reguladores da apoptose (BAX, CD95/FAS, KILLER/DR5, p53AIP1, PIG3, IGFBP3, NOXA, PUMA), etc. (VOUSDEN, 2009; BOUCHET, 2006). Além disso, p53 também pode inibir a transcrição de Bcl-2, e isto é fundamental no processo de morte celular, já que com excesso de Bax na mitocôndria e baixos níveis da proteína anti-apoptótica Bcl-2, haverá liberação de citocromo c para o citosol (HEMANN; LOWE, 2006).

A p53 escolhe entre a parada no ciclo celular e a apoptose de acordo com a natureza e amplitude do sinal indutor, bem como de acordo com o tipo celular e o tecido (BOUCHET, 2006). Uma possível explicação sobre o motivo da escolha é que os genes envolvidos na parada do ciclo celular possuem alta afinidade por p53 em seus promotores, enquanto sítios de baixa afinidade estão presentes no promotor de genes relacionados à apoptose. Logo, níveis aumentados de p53 poderiam desencadear a apoptose depois de atingir certo limite em seus níveis (CHEN et al. 1996; BERTHEAU et al., 2008).

Como p53 ajuda o organismo a passar com segurança por situações de estresse celular, quando mutada ou ausente, as respostas celulares necessárias não irão ocorrer e, com isso, a célula danificada escapará da apoptose e continuará se dividindo. Em cerca de metade dos cânceres humanos, o gene *TP53* encontra-se mutado, e a na maioria dos casos há aumento dos inibidores, redução dos seus ativadores ou inativação de seus alvos *downstream* (GREEN; KROEMER, 2009). Por isso, p53 é apontada como um alvo importante para a terapia do câncer, já que sua ativação causa citotoxicidade tumoral.

Dentre as várias pesquisas que envolvem a utilização terapêutica de p53, um grande progresso tem sido alcançado com o uso de terapia gênica para entrega de uma cópia

funcional de p53 via vetor adenoviral ou adenovírus oncolítico ONYX-015; pequenas moléculas também têm sido utilizadas para inibir Mdm2; entre várias abordagens que visam modular diretamente a conformação de p53 e induzir seu funcionamento normal (CHEN; WANG; EL-DEIRY, 2010; LEE et al, 2008).

A linhagem utilizada neste trabalho (NCI-H460) expressa níveis de RNAm para p53 comparáveis a aqueles apresentados por células de tecido pulmonar normal (TAKAHASHI et al., 1989).

2.2.3 IAPs: Inibidores da Apoptose

A família IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) constitui uma classe de proteínas regulatórias que desempenham alguns papéis importantes na célula como inibição da apoptose e promoção da progressão do ciclo celular (LI, 2003; RUMBLE; DUCKETT, 2008). Em humanos foram identificadas oito proteínas pertencentes a esta família: cIAP1, c-IAP-2, XIAP, NAIP, Survivina, Apollon, ML-IAP/Livin e ILP-2 (HOLCIK, 2010; NACHMIAS; ASHHAB; BEN-YEHUDA, 2004).

Todas as proteínas desta família possuem de um a três domínios BIR (*baculoviral repeats*), que consistem na presença de aproximadamente 70 resíduos de aminoácidos ligados ao zinco localizados na região amino-terminal; a maioria das IAPs possui um domínio RING (*really interesting new gene*) na região carboxi-terminal; as proteínas c-IAP1 e c-IAP2 apresentam um domínio de recrutamento de caspases (CARD); e a survivina possui um domínio *coiled-coil* (CC), que é responsável por sua interação com *chromosomal passenger proteins* (CPC) durante a divisão celular (DYNEK; VUCIC, 2010).

A principal função atribuída aos membros da família IAP sempre foi a inibição da apoptose, no entanto, hoje, várias outras funções são atribuídas a elas. Algumas IAPs (XIAP, cIAP1, cIAP2) possuem o domínio RING que possui atividade E3 ligase. Este domínio está envolvido na degradação delas mesmas ou de outras proteínas, como as caspases, por ubiquitilação para remoção via proteossomo. Algumas IAPs (XIAP, cIAP1, cIAP2) também estão associadas a receptores de membrana participando da sinalização de moléculas-alvo, e a Survivina e XIAP participam da regulação do ciclo celular (HOLCIK, 2010).

Entre os membros da família IAPs, a survivina é altamente expressa em células cancerosas, enquanto que em tecidos diferenciados normais é raramente expressa. Além disso, o aumento da expressão de survivina em pacientes com câncer é um marcador de prognóstico desfavorável correlacionado com a diminuição sobrevida global em diversas malignidades, incluindo o câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP). Por estes fatores, esta IAP tem sido apontada como um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de neoplasias malignas (ALTIERI, 2003; RYAN; O'DONOVAN; DUFFY, 2009; YIE et al, 2009).

A survivina é o menor membro da família de inibidores de apoptose (IAPs) em mamíferos, contendo somente 142 aminoácidos e 16,5 KDa. Estruturalmente, difere dos demais membros da família IAP por conter um único domínio BIR e pela ausência do domínio ring finger, que é substituído por domínio alfa-hélice *coiled-coil* na região C-terminal (ALTIERI, 2010).

O gene que codifica para a survivina é um gene de cópia única localizado no cromossomo humano 17q25 (ALTIERI, 2008), conhecido como *BIRC5* (*Baculoviral IAP repeat-containing 5*) que pode dar origem a diferentes isoformas de proteínas: Survivina, survivina 2B, survivina Δ Ex3, survivina 3B e survivina 2 α (RYAN; O'DONOVAN; DUFFY, 2009). Em células Hela, o nível endógeno de RNAm de survivina foram indetectáveis na fase G1, aumentado cerca de 6 vezes na fase S e 40 vezes mais na fase G2/M (LI et al., 1998).

A regulação da expressão da survivina é bastante complexa e pode ocorrer em vários níveis como transcrição, *splicing* diferencial, degradação protéica, entre outros. Em nível transcricional, evidências demonstram que a survivina pode ser regulada pela β -catenina; pelo fator de transcrição Sp1; por Stat3; pelo *Hypoxia-inducible factor-1 alpha* (HIF-1 α); e pelo fator de transcrição p53 que tem a capacidade de reprimir transcricionalmente sua expressão. A periodicidade desta IAP no ciclo celular é garantida por poliubiquitinação seguida por degradação proteossomal, que mantém seus níveis baixos durante a intérfase; já na metáfase, sua estabilidade é garantida através de sua fosforilação pela cdc2. A proteína *heat shock 90* (Hsp90), conhecida por sua atividade como chaperona também tem demonstrado um papel na regulação da survivina, isto porque o rompimento na interação survivina-Hsp90 resulta em degradação proteossomal da survivina (ALTIERI, 2003; JOHNSON; HOWERT, 2004; YAMAMOTO; NAGAN; MONDEN, 2008;).

A survivina está presente na célula em vários compartimentos. Um *pool* se localiza no núcleo interfásico; outro, durante a mitose, se localiza no aparato mitótico, em associação direta com os microtúbulos polimerizados; um terceiro *pool*, especialmente

encontrado em células tumorais, se localiza no espaço intermembrana e na matriz da mitocôndria; e uma fração abundante no citosol de células tumorais. Evidências experimentais indicam que estas diversas localizações da survivina estão associadas a funções especializadas dentro do ambiente celular e que são independentemente reguladas. Um exemplo é o *pool* mitocondrial, que parece ser reservado para inibir a apoptose (ALTIERI, 2008).

Na apoptose, a noção de que a survivina tem potencial inibitório é bem estabelecida e demonstrada em vários estudos, os quais indicam que a sua superexpressão resulta em inibição da apoptose (AMBROSINI et al., 1997; DOHI et al., 2004; GROSSMAN et al., 2001; HOFFMAN et al., 2001; MIRZA et al., 2002); e que sua inibição por antagonistas leva à morte celular de modo caspase-dependente (ZHOU et al., 2002). No entanto, existem algumas controvérsias quanto ao seu verdadeiro mecanismo de ação.

Até pouco tempo se acreditava que a survivina exercia seu potencial inibitório da apoptose ao se ligar diretamente e impedir a ativação das caspases -3, -7 e -9. No entanto, este modelo passou a ser questionado, já que esta IAP não possui o *motif* estrutural responsável por mediar a ligação direta às caspases (MITA *et al.*, 2008). Hoje, se acredita que a maioria das IAPs, senão todas, assim como a survivina, não são inibidores significativos de caspases e a XIAP passou a ser exceção à regra como a única IAP com alta afinidade a caspases. Com isso, um novo modelo foi proposto para explicar como se dá a inibição da apoptose pela survivina (ALTIERI, 2010).

O novo modelo propõe que a survivina cause inibição direta do fator pró-apoptótico SMAC/DIABLO e também que necessite de uma interação física com a proteína XIAP para inibir as caspases. Através do auxílio de chaperonas citosólicas, a survivina é transportada para a mitocôndria onde parece se ligar ao fator SMAC/DIABLO, o qual promove a ativação de caspases ao se ligar e neutralizar as IAPs, e mantê-lo longe da XIAP ou então impedindo sua liberação da mitocôndria. Deste modo, este antagonismo permite que XIAP fique livre, consiga interagir diretamente com as caspases e inibi-las, exercendo, portanto, o bloqueio da apoptose (SONG; YAO; WU, 2003). Além disso, estímulos de morte induzem a liberação do pool mitocondrial de survivina para o citosol que se une à XIAP e promove um aumento na sua estabilidade contra a degradação proteossomal, cooperando deste modo com sua com a atividade de inibição direta das caspases (DOHI et al., 2004).

Além de sua função na apoptose, a survivina também exerce uma outra importante função na célula, participa da regulação do ciclo celular. Durante a mitose, é demonstrada associação da survivina com a tubulina polimerizada, envolvendo os centrossomos, microtúbulos da metáfase e no fuso da anáfase, sugerindo seu papel na

regulação da dinâmica dos microtúbulos (LI et al., 1998). Também se nota a presença da survivina nos cinetócoros dos cromossomos em metáfase associada a reguladores da citocinese, como Aurora B, quinase, INCENP, e Borealina/Dasra, sugerindo sua importância na segregação cromossômica e na citocinese. A divisão celular na ausência de survivina resulta em defeitos no alinhamento cromossômico, falha na citocinese e eventualmente morte celular, neste caso relacionada à divisão celular aberrante (LENS; VADER; MEDEMA, 2006).

A alta expressão de survivina em tumores está relacionada a um fenótipo mais agressivo, diminuição da resposta tumoral a agentes quimioterápicos, e redução na sobrevivência, quando comparados a tumores negativos para a expressão desta IAP (JOHNSON; HOWERT, 2004). Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado que a inibição da survivina reduz o potencial de crescimento tumoral e sensibiliza as células tumorais a responderem aos tratamentos radio e quimioterápicos (ZAFFARONI; DAIDONE, 2002). Com isso, há um grande interesse biomédico na manipulação da expressão da survivina para o desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos.

2.3 NOVOS FÁRMACOS

O homem sempre utilizou a natureza tanto como fonte para obtenção de alimentos, como também como fonte de inspiração na formulação de tratamentos para alívio e cura de doenças. O primeiro composto farmacologicamente ativo isolado de uma planta foi a morfina do ópio, isolado da planta *Papaver somniferum* há cerca de 200 anos atrás por Friedrich Sertürner, iniciando uma era em que drogas extraídas de plantas poderiam ser purificadas, estudadas e administradas em doses precisas. Com isso, a pesquisa farmacêutica de expandiu, especialmente durante a Segunda Guerra Mundial, aumentando a expectativa de vida da população. Na década de 90, cerca de 80% de todos os fármacos utilizados eram derivados de produtos naturais ou análogos a eles (LI; VEDERAS, 2009).

Várias substâncias naturais possuem potentes efeitos citotóxicos e, por isso, passaram a ser utilizadas como fármacos anticâncer. A pesquisa por agentes antineoplásicos derivados de fontes naturais se iniciou na década de 50 com a descoberta dos alcalóides de vinca (vimblastina e vincristina). Com isso, em 1960, o *United States National Cancer Institute* (NCI) iniciou uma extensa pesquisa com plantas na década de 60, que levou à

descoberta de muitas drogas com atividade citotóxica, tais como o taxano e a camptotecina (CRAGG; NEWMAN, 2006).

Hoje, cerca de 60% das drogas utilizadas na terapia do câncer são derivadas de fontes naturais (plantas, animais e microorganismos), ou foram obtidas através de modificação estrutural e também da síntese de novos compostos baseados em moléculas naturais (CRAGG; NEWMAN, 2006; NOBILI et al., 2009).

Dentre os principais fármacos desenvolvidos a partir de fontes naturais utilizados na quimioterapia do câncer estão o plactaxel, um dos agentes quimioterápicos mais eficazes no tratamento do câncer de mama e ovário, que foi obtido da planta *Taxus brevifolia*; a vimblastina e a vincristina que foram extraídas de *Catharrantus rose* (planta nativa das florestas tropicais de Madagascar); e o etoposídeo e o teniposídeo (extraídos da resina da raiz do podófilo - *Podophyllum peltatum L. P. emodi*) (NOBILI et al., 2009).

2.4 GONIOTALAMINA

Uma molécula obtida a partir de fonte natural e que tem chamado a atenção de pesquisadores devido ao seu elevado potencial em induzir morte celular por apoptose é a Goniotalamina.

A Goniotalamina (GNT) é uma estiril lactona, um componente fenólico de baixo peso molecular, encontrada em membros da família Annonacea, em plantas do gênero *Goniothalamus* sp. (Figura 4) (MEREYALA et al., 2001), que em sua forma natural apresenta a configuração absoluta *D* (Dextrógiro), como demonstrado na Figura 5. Dentre as estiril lactonas encontradas nas *Goniothalamus* estão a altolactona, a cardiopetalolactona e a goniotalamina, (WIART, 2007). As plantas deste gênero são comuns na Malásia (MEREYALA et al., 2001) e utilizadas na medicina oriental para o tratamento de diversos males como resfriado, febre, cólera, malária (JANTAN et al., 2005) e como abortivo (SAM et al., 1987).



Figura 4 – Planta do gênero *Goniothalamus* sp.

Fonte: www.toptropicals.com

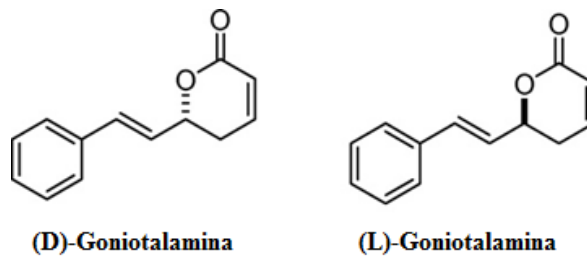


Figura 5 – Estruturas químicas da (D)-Goniotalamina e (L)-Goniotalamina.

Fonte: Modificado de de Fátima et al. (2008).

Dentre os principais efeitos biológicos da (D)-Goniotalamina estão as atividades antibacteriana (MOSADDIK et al., 2003), antifúngica (MARTINS et al., 2008), larvicida (SENTHIL-NATHAN et al., 2008), tripanocida (de FÁTIMA et al., 2006a) e antiproliferativa contra várias linhagens de células tumorais (CHEN et al., 2005; de FÁTIMA et al., 2005, 2008; INAYAT-HUSSAIN et al., 2003, 2009; RAJAB et al., 2005; ; TIAN et al., 2004; WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005). Em modelo experimental *in vivo*, a D-GNT também demonstrou atividade tumoricida e tumoristática em tecido mamário de ratos (MEENAKSHI et al., 2000). Uma das atividades que tem despertado o interesse por esta molécula é seu efeito citotóxico significativo em células neoplásicas, mas não significativo em células normais (PIHIE; STANSLAS; DIN, 1998; TIAN et al., 2004; WATTANAPIROMSAKUL et al., 2005).

Isto foi demonstrado pela primeira vez no trabalho de Pihie, Stanlas e Din (1998), onde a atividade antiproliferativa da Goniotalamina (GNT) foi estudada em diferentes linhagens celulares, e comparada com o Tamoxifeno, um medicamento utilizado no

tratamento do câncer de mama. O número de células vivas foi avaliado pela técnica de coloração por Azul de metileno e se observou que a GNT demonstrou forte atividade antiproliferativa em MCF-7 na concentração de $6,30 \times 10^{-7}$ M e que, no entanto, nesta mesma concentração não houve inibição na proliferação das células normais de fígado humano, CCL 13, e das células normais de rim bovino, MDBK.

Alguns anos mais tarde, Tian et al. (2004) investigaram os efeitos da Goniotalamina e mais duas estiril-lactonas em três linhagens de hepatócitos: HepG2, *drug resistant* HepG2 (HepG2R) e em cultura primária de hepatócitos normais de camundongo. Primeiro, foi realizado o ensaio do MTT, onde as concentrações utilizadas foram 3,125–100 μ M por 48h; a análise morfológica foi feita em microscópio de fluorescência com coloração por Alaranjado de acridina/Brometo de etídeo após tratamento de 12 horas com 15 μ M de Goniotalamina; em seguida, foi realizada análise em citometria de fluxo. No ensaio do MTT, os autores observaram que houve uma diminuição drástica na proliferação celular nas três linhagens de modo concentração-dependente. No tratamento com a Goniotalamina, os IC50 foram 8,83 μ M para HepG2, 8 μ M para HepG2R e de 23,33 μ M para a linhagem normal de hepatócito de camundongo, mostrando uma citotoxicidade mais significativa contra as células cancerosas. A observação morfológica mostrou várias células apoptóticas no tratamento com a Goniotalamina. Na análise por citometria de fluxo, notou-se parada de ciclo em G2/M acompanhada por uma detectável fração de células apoptóticas.

Também no trabalho de Wattanapiromsakul et al. (2005) esta citotoxicidade seletiva foi demonstrada através do Ensaio da Sulforodamina B (SRB). Nas linhagens celulares malignas os valores de IC50 foram os seguintes: células de câncer de cólon (LS174T) com IC50 de $0,51 \pm 0,02$ μ g/ml; células de câncer de mama (MCF-7) com IC50 de $0,95 \pm 0,02$ μ g/ml; e células de câncer de pulmão (COR-L23) com IC50 de $3,51 \pm 0,03$ μ g/ml. Já para linhagens de células normais, se observou uma citotoxicidade moderada com concentrações de IC50 maiores do que aqueles apresentados para as linhagens de células cancerosas: fibroblastos de pele de camundongo (ST3) com IC50 de $26,73 \pm 1,92$ μ g/ml e fibroblastos humanos (HF) com IC50 de $11,99 \pm 0,15$ μ g/ml.

Além dos estudos que demonstram a citotoxicidade seletiva da Goniotalamina, diversos autores observaram que a atividade antiproliferativa desta molécula se dá de modo concentração-dependente. Isto foi observado no estudo de Lee et al. (2002), onde derivados de estirilpirona (SPD), um componente farmacologicamente ativo extraído de *Goniothalamus* sp., inibiram a proliferação de células da linhagem de câncer de mama (MCF-7) de maneira dose-dependente nas concentrações de 10^{-5} a 10^{-8} M, com o IC50 de 10^{-6} M.

Também no estudo de Chen et al. (2005), a viabilidade celular foi analisada pelo ensaio do MTT, utilizando as concentrações de 1, 3, 10 e 30 μM de Goniotalamina com os tempos de 24, 48 e 72 horas de tratamento, e o resultado mostrou uma resposta dose-dependente na inibição da viabilidade celular, com IC50 de 1,46 μM após 72 horas de tratamento. Na linhagem de células musculares lisas vasculares (VSMCs), os efeitos da goniotalamina na proliferação celular foram investigados através do Ensaio de proliferação celular Bromodesoxiuridina (BrdU) e mais uma vez se observou uma diminuição na proliferação celular de modo dose-dependente (CHAN et al., 2006). Também de Fátima et al. (2005), ao avaliarem a atividade antiproliferativa da (D)-Goniotalamina em várias linhagens celulares de câncer: MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama expressando o fenótipo de resistência multidrogas), NCI 460 (pulmão, non-small cells), UACC62 (melanoma), 786-0 (rim), OVCAR03 (ovário), PCO 3 (próstata) e HT-29 (cólon); demonstraram que todas as linhagens apresentam redução na proliferação celular de maneira dependente da concentração quando tratadas com a (D)-Goniotalamina, sendo que nas linhagens NCI-ADR e 786-0, esta molécula apresentou maior potencial antiproliferativo do que a Doxorrubicina.

Vários estudos mostraram que a atividade antiproliferativa da Goniotalamina se deve principalmente à indução da via intrínseca da apoptose.

Como mostrado no estudo de Tian et al. (2004), onde, através de análise morfológica em microscópio de fluorescência com coloração por Alaranjado de acridina/Brometo de etídeo e também por citometria de fluxo, se detectou uma significativa fração de células em apoptose após tratamento de 12 horas com 15 μM de Goniotalamina.

No estudo de Inayat-Hussain et al. (1999), a detecção de apoptose nas células Jurkat T expostas por 5 horas a concentrações entre 1-30 $\mu\text{g/mL}$ foi feita através de citometria de fluxo por coloração com anexina V/iodeto de propídeo. Neste trabalho, os resultados mostraram que a Goniotalamina induz apoptose de modo dependente da concentração. Também se observou através de *immunoblotting* que no grupo tratado, houve uma diminuição nos níveis de procaspase-3 e procaspase-7, e isto foi acompanhado pelo aparecimento de bandas de 17 KDa e 19 KDa que representam as subunidades maior das enzimas caspase-3 e caspase-7 cataliticamente ativas, respectivamente. Além disso, foi verificado um aumento na clivagem de PARP (polimerase poliADPribose), comprovando a indução de apoptose.

Também no estudo de Lee et al. (2003a) com derivados de estirilpirona (SPD), se notou um aumento significativo da apoptose nas células da linhagem MCF-7, e na concentração do IC50 para esta linhagem (10^{-6} M), houve aumento na expressão da proteína pró-apoptótica Bax e não houve alteração na expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2.

Estes mesmos autores em 2003, demonstraram que após o tratamento com esta mesma concentração, houve um acúmulo de citocromo-c; diminuição do zimógeno da caspase 9 durante o tratamento gerando sua forma ativa; e ativação da caspase executora 7, indicando que a via intrínseca de apoptose foi ativada (Lee et al., 2003b).

Em 2003, Inayat-Hussain et al., investigaram os mecanismos da goniotalamina em induzir apoptose nas células de leucemia promielocítica humana HL-60 através do ensaio da anexina V após tratamento com 10 µg/mL por 14 horas; também mediram o potencial de membrana mitocondrial durante a apoptose; e além disso, avaliaram as caspases 3, 7 e 9 por *immunoblotting*. Os resultados mostraram que a Goniotalamina induziu apoptose em células HL-60; que houve perda de potencial de membrana mitocondrial; e ativação da caspase iniciadora 9 e das caspases efetoras 3 e 7, sugerindo que a Goniotalamina induz apoptose pela via intrínseca de modo dependente de caspases.

No estudo de Chen et al. (2005), a análise da apoptose na linhagem de câncer de mama MDA-MB-231 mostrou um aumento significativo no número de células apoptóticas nos grupos tratados com 30 µM de goniotalamina por 24 e 48 horas. Os mecanismos pelos quais a Goniotalamina induz apoptose também foram estudados e se verificou aumento de citocromo-c no citosol de modo tempo-dependente nas células tratadas; ativação de caspase-3 e aumento na clivagem de PARP após 6 horas de tratamento.

No estudo de Chan et al. (2010), foi observado que houve aumento concentração-dependente na taxa de apoptose da concentração mais baixa (10 µM) à mais alta (100 µM) na linhagem *coronary artery smooth muscle cells* (CASMCs). As concentrações de 100 e 50 µM resultaram em aumento significativo da taxa de apoptose e, por isso, foram utilizadas nos experimentos subsequentes. A fim de entender o papel das caspases na apoptose desencadeada pela GNT, um inibidor de caspase foi utilizado, e observou-se uma inibição significativa na taxa de apoptose. Depois disso, se estudou o papel das caspases-2, 3, 8 e 9 e pôde se observar um aumento na atividade da caspase-2, da caspase-3 e da caspase-9, no entanto, não houve ativação da caspase-8, sugerindo que, neste caso, esta caspase não é necessária como uma caspase iniciadora, e que, portanto, a via extrínseca não se encontra ativada, mas sim a via intrínseca. Experimentos seguintes mostraram um aumento no nível citosólico de citocromo-c. Neste estudo também se examinou a expressão da proteína p53 e se pôde notar que houve aumento nos seus níveis após tratamento com a GNT e que a expressão da proteína Mdm2 não foi alterada significativamente.

Alguns autores observaram que a GNT induz danos ao DNA e em parte destes trabalhos é sugerido que a citotoxicidade decorrente do tratamento se deve à indução de morte celular como consequência da indução de danos ao material genético.

No estudo de Tsafe et al. (2004), a análise de genotoxicidade foi realizada através do Ensaio da Aberração Cromossômica após a escolha das concentrações de Goniotalamina pelo Índice Mitótico (MI). A concentração do MIC25 (20 μ M), que foi a concentração que matou 75%, deixando somente 25% de células mitóticas em comparação ao controle, foi muito tóxica e não restaram células suficientes para a análise; já nos grupos que receberam os tratamentos MIC50 (10 μ M), a concentração que matou 50% das células mitóticas em relação ao controle, e MIC100 (5 μ M), a concentração que não demonstrou morte celular, houve aumento significativo na genotoxicidade e os principais tipos de aberrações encontradas foram *gaps* em cromátides e em cromossomos inteiros, quebras e trocas, endoreduplicação e anéis cromossômicos. A análise da anti-genotoxicidade demonstrou que a Goniotalamina não apresentou nenhuma atividade anti-genotóxica.

No estudo de Rajab et al. (2005), se analisou a citotoxicidade e genotoxicidade da Goniotalamina nas linhagens de células leucêmicas HL-60 e CEM-SS. No ensaio do MTT se mensurou a citotoxicidade das células expostas à GNT por 72 horas nas concentrações de 0 a 30 μ g/mL, os valores do IC50 obtidos foram de 4,5 μ g/mL para HL-60 e de 2,4 μ g/mL para CEM-SS. A genotoxicidade foi determinada através do Ensaio do Cometa com duas horas de tratamento com as concentrações do IC10 e do IC25. Em ambos os tratamentos houve indução de genotoxicidade após o tratamento e, do mesmo modo que na citotoxicidade, a GNT foi mais potente para a linhagem CEMSS do que para HL-60.

Chan et al. (2006) investigaram os mecanismos de toxicidade da Goniotalamina em células musculares lisas vasculares (VSMCs) sobre a citotoxicidade, modo de morte celular, proliferação celular e danos no DNA. O ensaio do MTT foi utilizado para se determinar a citotoxicidade e demonstrou que, após 72 horas de tratamento, o IC50 foi de 4,4 μ g/mL. A análise para detecção de apoptose e necrose foi feita pela coloração Alaranjado de acridina/ Iodeto de propídeo, após 24, 48 e 72 horas de tratamento. Em todos os tempos, a porcentagem de células apoptóticas do tratamento com a concentração do IC50 foi maior do que a porcentagem de células necróticas. Os efeitos da goniotalamina na proliferação celular foram investigados através do Ensaio de proliferação celular Bromodesoxiuridina (BrdU) e se observou uma diminuição na proliferação celular de modo dose-dependente. O Ensaio do Cometa foi utilizado para avaliação de danos no material genético e se notou que houve um aumento significativo de danos nas concentrações IC10 (2,5M) e IC25 (7,5M) após 2 horas de

tratamento. Através deste estudo, pôde-se concluir que a Goniotalamina inicialmente induz danos no DNA e posteriormente leva à citotoxicidade, principalmente através da apoptose em células musculares lisas vasculares (VSMCs).

Inayat-Hussain et al. (2010) sugeriram que a capacidade da GNT em induzir danos ao DNA se deve à ocorrência de estresse oxidativo. Neste trabalho, quando as células Jurkat T foram tratadas com 50 μ M de GNT por 2 horas, notou-se um aumento significativo na produção de ROS (espécies reativas de oxigênio) e perda de GSH. Depois disso, também se analisou os danos ao DNA através do Ensaio do Cometa, e consistente com a perda de GSH e aumento na produção de ROS, os resultados mostraram aumento significativo de danos ao material genético. Neste trabalho também se notou um aumento significativo na taxa de apoptose e, com isso, foi sugerido que a GNT induz danos ao DNA e estresse oxidativo com consequente indução de apoptose (INAYAT-HUSSAIN et al., 2010). O estudo de Chen et al. (2005), também mostrou que a Goniotalamina aumenta a formação de espécies reativas de oxigênio.

Recentemente, foi sintetizada a (L)-Goniotalamina (L-GNT) (de FÁTIMA et al., 2006b), que é o enantiômero sintético da (D)-Goniotalamina (D-GNT) (Figura 4). O mecanismo de ação desta nova molécula ainda é pouco conhecido, já que embora tenha as mesmas propriedades químicas e físicas da molécula natural, suas atividades biológicas podem diferir bastante, isto porque a interação dos enantiômeros com os receptores biológicos é bastante específica, como colocar a mão em uma luva (TUCKER, 2000).

Ao comparar as atividades das moléculas D-GNT e L-GNT através do Ensaio da Suforamida B, em várias linhagens celulares de câncer: MCF-7 (mama), NCI-ADR (mama expressando o fenótipo de resistência multidrogas), NCI 460 (pulmão, *non-small cells*), UACC62 (melanoma), 786-0 (rim), OVCAR03 (ovário), PCO 3 (próstata) e HT-29 (côlon); de Fátima et al. (2006b) demonstraram que ambos os compostos possuem atividade antiproliferativa contra as linhagens testadas, e que para a linhagem NCI-ADR, a (D)-Goniotalamina mostrou-se de 10 a 20 vezes mais poderosa que (L)-Goniotalamina e Doxorubicina, já para as células renais (786-0) a (L)-Goniotalamina foi 600 vezes mais potente que a (D)-Goniotalamina.

Em 2008, de Fátima et al. notaram diferenças nos mecanismos de ação destas duas moléculas em células da linhagem de câncer renal (786-0). Neste estudo, os autores investigaram a ação destas moléculas na viabilidade celular, expressão e atividade da óxido nítrico sintetase (NOS) e na expressão de proteínas envolvidas na apoptose e na autofagia em células de câncer renal (786-0) nas concentrações de 0,05; 0,5; 5 e 50 mM. Os resultados

demonstraram que ambos os compostos foram citotóxicos e diminuíram a expressão das isoformas de NOS (eNOS e nNOS) quando comparado ao controle. O IC50 das células renais quando tratadas com a (D)-Goniotalamina foi de 6,4 μ M, e de 4 nM quando tratadas com a (L)-Goniotalamina. Ambos os enantiômeros causaram inibição da expressão de Ras e TNFR1 e inibição da proteína serina/treonina fosfatase 2A (PP2A). A D-GNT reduziu significativamente os níveis da proteína NF κ Bp65; marcadamente inibiu a expressão da proteína Bcl-2; não alterou os níveis de Bax; e também induziu clivagem de PARP. Já a L-GNT, não alterou os níveis de expressão da proteína Bcl-2; induziu uma acentuada inibição de Bax; foi capaz de induzir clivagem de PARP; e curiosamente reforçou a expressão de LC3, um típico marcador de autofagia. Estes resultados levaram à conclusão de que a (D)-Goniotalamina causou a morte celular por apoptose, enquanto a (L)-Goniotalamina causou morte celular principalmente por autofagia, mas também teve a capacidade de induzir apoptose, como foi mostrado pelo aumento na clivagem de PARP.

Devido à escassez de dados em relação à (L)-Goniotalamina, novos estudos são necessários, a fim de se entender o mecanismo de ação pelo qual esta molécula atua e desempenha sua atividade antiproliferativa.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAIS

Avaliar os efeitos da (L)-Goniotalamina nas concentrações de 2,5; 12,5 e 25 μM , na citotoxicidade, cinética de proliferação celular, indução de apoptose, genotoxicidade e na expressão dos genes *BIRC5* (survivina), *TP53* e *BAX* em linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas (NCI-H460).

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito citotóxico da L-GNT através do Ensaio do MTT nos tempos de 24 e 48 horas;
- Verificar o efeito da L-GNT na cinética de proliferação celular nos tempos de 24, 48 e 72 horas;
- Analisar as alterações morfológicas ligadas à apoptose através da Avaliação da indução de apoptose *in situ* após 24 de tratamento com L-GNT;
- Avaliar a genotoxicidade através do Ensaio do Cometa após 3 horas de tratamento com L-GNT;
- Avaliar a expressão dos genes *BIRC5*, *TP53* e *BAX* após 12 horas de tratamento com L-GNT através de RT-PCR em tempo real.

4 ARTIGO

Artigo a ser submetido ao periódico *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*.

(L)-Goniotalamina induz danos ao DNA, apoptose e reduz os níveis de RNAm de *BIRC5* (survivina) em linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas (NCI-H460)

Simone Cristine Semprebon^a, Fernando Macedo Jr.^b, Ângelo de Fátima^c, Sandra Lepri^a, Danielle Sartori^a, Lúcia Regina Ribeiro^d, Mário Sérgio Mantovani^{a,*}.

^aDepartamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

^bDepartamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

^dDepartamento de Patologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

*Dr. Mário Sérgio Mantovani

Departamento de Biologia Geral – CCB

Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário

P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brasil.

CEP: 86051-990

E-mail: biomsm@uel.br

Telefone: 55 43 3371-4977

Fax: 55 43 3371-4207 21

RESUMO

A (D)-Goniotalamina (D-GNT) é um metabólito secundário encontrado em plantas do gênero *Goniothalamus* sp., que são comuns na Malásia. Esta molécula tem atraído a atenção dos pesquisadores devido à sua citotoxicidade seletiva contra células tumorais e também por sua capacidade em induzir apoptose. A (L)-Goniotalamina (L-GNT) é o enantiômero sintético da (D)-Goniotalamina, e seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, mas estudos demonstram que, em relação a algumas linhagens celulares, esta molécula demonstra uma atividade antiproliferativa mais significativa e também apresenta algumas diferenças no seu mecanismo de ação em relação à forma natural. Neste trabalho, investigamos as atividades da L-GNT na linhagem celular de câncer de pulmão de células não-pequenas (NCI-H460). Nós observamos que as células expostas ao tratamento com este composto apresentaram citotoxicidade significativa de modo concentração dependente e, de acordo com os dados que obtivemos através da avaliação da apoptose *in situ* e do Ensaio do Cometa, sugerimos que esta citotoxicidade ocorra devido à potencialidade desta molécula em induzir danos ao material genético, com conseqüente indução de morte celular por apoptose. A redução significativa dos níveis de RNAm de *BIRC5*, gene que codifica para a proteína survivina, foi um achado importante mostrado pela primeira vez neste estudo e que também pode explicar a inibição da proliferação celular e indução de apoptose em células tumorais causadas por este composto. A modulação da expressão deste gene é um alvo de grande interesse para o desenvolvimento de novos fármacos para a terapia do câncer, isto porque ele se encontra superexpresso em células tumorais, enquanto em células normais é raramente expresso. Logo, nossos dados apontam a L-GNT como um agente anticâncer em potencial e novos estudos devem ser realizados para se elucidar como esta molécula regula a expressão de *BIRC5*.

Palavras-chave: (L)-Goniotalamina. Survivina. BIRC5. Apoptose. NCI-H460. Citotoxicidade.

1 INTRODUÇÃO

Desde a década de 80, o câncer de pulmão é o principal tipo de câncer no mundo e ainda hoje se encontra entre os mais incidentes e que mais matam. Na última estimativa mundial, cerca de 1,61 milhões de novos casos e 1,38 milhões de mortes foram relatados em decorrência desta doença [1]. De acordo com suas características histológicas, este tipo de câncer se divide em dois principais grupos, câncer de pulmão de células pequenas (CPCP) com aproximadamente 20% dos casos, e câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP), constituindo a grande maioria dos casos, cerca de 80% [2]. Embora todo progresso no entendimento da biologia celular e molecular do câncer e também no desenvolvimento de novos tratamentos para esta doença, a taxa de sobrevivência média cumulativa para o câncer de pulmão ainda é muito baixa, variando, em um período de cinco anos, de 13% a 20% em países desenvolvidos e 12% em países em desenvolvimento [3]. Com isso, é evidente a necessidade de que novas estratégias terapêuticas mais eficazes e com menor toxicidade se desenvolvam.

A natureza é uma fonte riquíssima de inspiração para o desenvolvimento de novos fármacos e estima-se que cerca de 60% das drogas utilizadas na terapia do câncer sejam derivadas de fontes naturais, ou obtidas através de modificação estrutural e da síntese de novos compostos baseados em moléculas naturais [4]. Uma molécula obtida a partir de fonte natural e que tem chamado a atenção da comunidade científica devido ao seu elevado potencial em induzir morte celular por apoptose é a (D)-Goniotalamina (D-GNT), uma esteril lactona encontrada em membros da família Annonacea, em plantas do gênero *Goniothalamus* sp. [5].

Dentre os principais efeitos biológicos desta molécula estão a atividade antibacteriana [6], antifúngica [7], larvicida [8] e tripanocida [9]. Uma propriedade que tem despertado grande interesse por ela é seu efeito citotóxico significativo em células malignas e não significativo nas células normais [10,11,12]. Além disso, esta molécula também desempenha relevante atividade antiproliferativa contra várias linhagens de células tumorais como: mama (MCF-7 [10,12,13,14,15], MDA-MB-231 [16], NCI-ADR [13]); hepatoma (HepG2 [11]); leucemia (HL-60 [17,18], CEM-SS [18], Jurkat-T [19]); cólon (LS174T [12], HT-29 [13]); pulmão (COR-L23 [12], NCI 460, UACC62 [13]; renal (786-0 [13,20]); ovário (OVCAR03) e próstata (PCO 3) [13]. Em modelo experimental *in vivo*, a D-GNT demonstrou atividade tumoricida e tumoristática em tumores mamários de ratos [21].

A modulação da apoptose é um dos mecanismos de maior interesse no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer e estudos demonstram que a atividade antiproliferativa desempenhada pela D-GNT envolve a participação desta via [11,14,15,16,20,22,23].

A (L)-Goniotalamina (L-GNT) (Figura 1) é o enantiômero sintético da (D)-Goniotalamina, e seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, mas estudos demonstram que, em relação a algumas linhagens celulares, esta molécula apresenta uma atividade antiproliferativa mais significativa [24] e também algumas diferenças no seu mecanismo de ação em relação à forma natural, D-GNT. Estas diferenças foram demonstradas na linhagem de células de câncer renal 786-0, onde após o tratamento com D-GNT e L-GNT se observou que a (D)-Goniotalamina induziu morte celular por apoptose, enquanto a (L)-Goniotalamina, induziu morte celular por autofagia, e também desencadeou a resposta apoptótica [20].

A apoptose é uma forma de morte coordenada e dependente de energia, onde o estímulo inicial induz uma complexa cascata molecular de eventos, que resulta na ativação de um grupo de cisteína-proteases chamadas “caspases” e outras proteínas-chave, com consequente suicídio celular [25]. Este processo é fundamental para o controle homeostase dos tecidos e também como mecanismo de defesa do organismo, sendo essencial para a remoção de células que sofreram algum dano, a fim de prevenir processos patológicos como o câncer [26]. Defeitos nesta via representam uma das principais marcas no desenvolvimento tumoral [27] e podem conferir resistência à quimioterapia e à radioterapia, contribuindo para a expansão celular neoplásica. No câncer de pulmão, as principais alterações encontradas na regulação desta via ocorrem em *BAX*, *TP53* e em membros família IAP (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) [28].

A proteína pró-apoptótica Bax, codificada pelo gene *BAX* (*BCL2-associated X protein*), é a mais estudada entre os membros da família Bcl-2 e é encontrada na forma de monômeros de 21 KDa que possuem localização preferencialmente citosólica. Em resposta a um estímulo apoptótico, Bax se transloca para a membrana mitocondrial externa e possibilita o extravasamento de moléculas efetoras para o citosol, contribuindo assim para a execução da apoptose [29].

A proteína p53, codificada pelo gene *TP53* (*Tumor Protein p53*), é um fator de transcrição, considerado o “guardião do genoma”, capaz de regular a expressão de vários genes com uma variedade de funções incluindo parada do ciclo celular, apoptose, mudanças no metabolismo, entre outros [30]. Esta proteína encontra-se envolvida em diversas vias de resposta ao estresse que impedem o crescimento e sobrevivência de células potencialmente

malignas. Em condições celulares normais, os níveis de p53 são mantidos muito baixos, já em situações de estresse celular, como danos genotóxicos, ativação oncogênica, falta de nutrientes, hipóxia, entre outros, seus níveis celulares aumentam. Com o aumento de seu nível na célula, será desencadeada a transativação transcricional de seus genes alvo, tais como Bax e IAPs, entre vários outros, de acordo com o ambiente celular [31].

A família IAP constitui uma classe de proteínas regulatórias que desempenham alguns papéis importantes na célula como inibição da apoptose e promoção da progressão do ciclo celular. Em humanos foram identificadas oito proteínas pertencentes a esta família: XIAP, HIAP1, HIAP2, NAIP, Survivina, Livina, Ts-IAP e Apollon [32]. Entre elas, a survivina, codificada pelo gene *BIRC5* (*Baculoviral IAP Repeat-Containing 5*), é altamente expressa em células cancerosas, enquanto que em tecidos diferenciados normais é raramente expressa, sendo que o aumento de sua expressão em pacientes com câncer é um marcador de prognóstico desfavorável correlacionado com a diminuição da sobrevida global em diversas malignidades, incluindo o câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP). Além disso, o potencial inibitório da apoptose e na regulação do ciclo celular desta IAP tem a apontado como um alvo atrativo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de neoplasias malignas [33].

A escassez de estudos a respeito da (L)-Goniotalamina e a necessidade de esclarecer seu mecanismo de ação tornam essa molécula um importante alvo de estudo. Neste trabalho, foram investigados o efeito citotóxico, a cinética de proliferação celular, indução de apoptose *in situ* e genotoxicidade e a expressão de alguns genes relacionados ao processo apoptótico e ciclo celular: *BAX*, *TP53* e *BIRC5*, após a exposição das células de câncer de pulmão NCI-H460 ao tratamento com L-GNT. A escolha da linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas NCI-H460, foi baseada na relevância em se estudar novas estratégias terapêuticas para este tipo de câncer, que é um dos mais incidentes e com as maiores taxas de mortalidade no mundo.

1.1 MATERIAIS E MÉTODOS

1.2 AGENTES QUÍMICOS

A síntese da (L)-Goniotalamina foi realizada no Laboratório de Pesquisas de Moléculas Bioativas (LPMBA) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL) em colaboração com o Prof. Dr. Ângelo de Fátima do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A substância teste foi inicialmente solubilizada em dimetilsulfóxido (DMSO) a uma concentração de 0,05 M. A solução estoque foi diluída em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (GIBCO) sem Soro Bovino Fetal (SBF) (GIBCO) a 500 μM e mantida a -20°C . Antes do uso, a solução de 500 μM foi diluída nas concentrações testadas: 2,5; 12,5 e 25 μM em meio de cultura. A concentração de DMSO não ultrapassou 0,05% em cultura.

Os agentes utilizados como controle positivo nos experimentos foram a Doxorrubicina (Adriplastina[®] - Pharmacia) no Ensaio de citotoxicidade (18,4 μM), Ensaio de Cinética de Proliferação celular (18,4 μM) e Ensaio do Cometa (0,4 μM); e a Camptotecina (2,9 μM) (Acros Organics) na Avaliação da indução de apoptose *in situ*.

1.3 CULTURA DE CÉLULAS

A linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas (NCI-H460) utilizada no trabalho foi cedida pelo Prof. João Ernesto de Carvalho do CPQBA - UNICAMP. Estas células foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e antibiótico/antimicótico (Gibco), a 37°C e 5% de CO_2 . Nestas condições, o ciclo celular é de 24 horas. Esta linhagem expressa níveis de RNAm para p53 comparáveis a aqueles apresentados por células de tecido pulmonar normal [34].

1.4 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE (MTT)

A citotoxicidade foi avaliada através do Ensaio do MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide) (Invitrogen) descrito por Mossmann [35] com algumas modificações. Em cada poço da placa de cultura (24 poços) foram semeadas 2×10^4 células e incubadas por 24 horas. Após este período, o meio foi removido e as células foram tratadas com as concentrações de 2,5; 12,5 e 25 μM de L-GNT por 24 e 48 h. Após o término de cada período, os tratamentos foram retirados e uma solução de MTT (0,000167 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionada. Então, as placas foram incubadas por 4 h. Depois disso, a solução de MTT foi removida, os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO e as placas foram lidas em espectrofotômetro (Uniscience) a 540 nm. O ensaio foi realizado em quatro replicatas e três experimentos independentes. A porcentagem de sobrevivência celular foi calculada através da fórmula (*Absorbância tratado - Absorbância branco / Absorbância Controle - Absorbância Branco*) $\times 100$.

1.5 CINÉTICA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Em tubos de cultura (10 cm^2) foram semeadas 10^5 células e tratadas com L-GNT nas concentrações de 2,5; 12,5 e 25 μM . Após 24, 48 e 72 h, as células foram tripsinizadas (tripsina-EDTA 0,025%, 37°C), a suspensão celular foi centrifugada (5 minutos, 1000 rpm), ressuspendida em meio de cultura e, então, foi feita a contagem celular em câmara de Neubauer em microscópio óptico. O experimento foi realizado em duas repetições.

1.6 AVALIAÇÃO DA INDUÇÃO DE APOPTOSE *IN SITU*

A identificação das células apoptóticas foi feita por análise morfológica após coloração com alaranjado de acridina seguindo o protocolo de Rovozzo e Burke [36] e modificações de Tsuboy et al. [37]. Em lamínulas, em uma placa de 6 poços, foram semeadas $1,2 \times 10^5$ células e incubadas por 24 horas para estabilização. Após este período, as células

foram tratadas com 2,5; 12,5 e 25 μM de L-GNT e incubadas por 24 horas. Ao final do tempo de tratamento, as lamínulas foram retiradas dos poços da placa e foi feita a fixação das células em fixador Carnoy (Metanol:Ácido acético, 3:1) por 5 minutos. Depois disso, a lamínula foi mergulhada rapidamente em concentrações decrescentes de etanol (95% a 25%), seguida de lavagem com Tampão McIlvaine (Solução de ácido cítrico 0,1 M + Solução de Fosfato dissódico 0,2 M) por 5 minutos, coloração com alaranjado de acridina (0,01%) por 5 minutos e nova lavagem com o tampão. Em cada tratamento foram analisadas 500 células em microscópio de fluorescência (filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520 nm) (Nikon) e o experimento foi realizado em três repetições. Foram consideradas como apoptóticas, as células que apresentavam condensação da cromatina e fragmentação nuclear.

1.7 ENSAIO DO COMETA

O Ensaio do Cometa foi realizado de acordo com as premissas de Tice et al. [38]. Em frascos de cultura de 25 cm^2 foram semeadas 10^6 células e incubadas para estabilização por 24 horas. Após o período de estabilização, as células foram tratadas com 2,5; 12,5 e 25 μM de L-GNT por 3 horas. Depois do período de tratamento, as células foram tripsinizadas (500 μL de tripsina-EDTA 0,025%, 37°C), a suspensão celular foi centrifugada (5 minutos, 1000 rpm) e ressuspensa em 500 μL de meio de cultura. Posteriormente, 20 μL de suspensão celular foram misturados a 120 μL de agarose baixo ponto de fusão (LMP, 0,5%) e depositadas diretamente em uma lâmina pré-gelatinizada com agarose (ponto normal de fusão, 1,5%) em seguida coberta com uma lamínula. Após a solidificação do gel de agarose, a lamínula foi retirada e as lâminas foram colocadas em uma solução de lise por aproximadamente 1 hora. Após a desnaturação (20 minutos) e eletroforese alcalinas (25 V, 300 mA, 20 minutos), as lâminas foram neutralizadas, fixadas e mantidas sob refrigeração até a análise. A análise foi feita visualmente em microscopia de fluorescência (filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520 nm) (Nikon) e coloração com Brometo de Etídeo. Os cometas foram classificados em classe 0 (nucleóides que não apresentavam cauda), classe 1 (nucleóides com cauda menor que o diâmetro do nucleóide), classe 2 (nucleóides com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide) e classe 3 (nucleóides com cauda 2 vezes maior que o diâmetro do nucleóide). 100 células foram analisadas por lâmina, e os experimentos foram feitos em três repetições. A análise da viabilidade celular foi realizada

pelo método de exclusão por azul de trypan, sendo considerados somente os tratamentos com índice superior a 80%.

1.8 RT-PCR EM TEMPO REAL (RT-qPCR)

O experimento de RT-qPCR foi realizado seguindo orientações de MIQE *Guidelines: "The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments"* [39]. Em frascos de cultura de 25 cm², foram semeadas 10⁶ células e incubadas para estabilização por 24 horas. Depois do período de incubação, foram feitos os tratamentos em duplicata (controle; L-GNT - 25µM) e após 12 horas de tratamento, o RNA total foi isolado usando o reagente Trizol-LS (Invitrogen), de acordo com o protocolo do reagente. A integridade do RNA foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose (1%) e a concentração e a pureza foram verificadas em espectrofotômetro através dos valores da razão entre as absorbâncias A_{260}/A_{280} .

A síntese do cDNA foi feita utilizando-se 200 unidades de transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen) e 1 µg de RNA total, com o primer oligo(dT), de acordo com o protocolo da enzima.

As reações de PCR em tempo real foram realizadas no termociclador PTC 200 DNA Engine Cycler, usando o sistema de detecção Chromo 4 (MJ Research- BIO RAD). A detecção da amplificação foi feita por mensuramento da fluorescência emitida pelo corante SYBR Green (Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG - Invitrogen) ao se ligar à dupla fita de DNA. As condições da PCR no termociclador foram as seguintes: um passo inicial a 50°C por 1 min, seguido de 95° por 3 minutos, 35 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 20 segundos, seguidos de 95°C por 10 seg. e 40°C por 1 min. A análise da curva de melting foi realizada no final da reação com temperatura de 50°C até 95°C a cada 0,5°C por 5 seg. Os dados foram normalizados com primers para gliceraldeído-3-fosfatodesidrogenase (GAPDH) [40] amplificados em cada conjunto de experimentos de PCRs. Os primers utilizados foram: TP53 [41], BIRC5 [42], BAX (No. de Acesso NM_004324.3).

Todos os experimentos foram realizados com duas culturas independentes, e cada amostra de cDNA foi analisada em três repetições mecânicas para cada par de primer.

1.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir do Ensaio do MTT, Cinética de Proliferação Celular e Ensaio do Cometa foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), seguida de Teste de Dunnett ($p < 0,05$). Já os dados da Avaliação da indução de apoptose *in situ*, foram submetidos ao Teste Exato de Fisher. Todos os testes estatísticos foram realizados através do programa Graph Pad Prism ® versão 5.00.

No estudo de expressão gênica através de RT-qPCR, a análise dos valores relativos de expressão dos genes e normalização pelo gene de referência GAPDH foram realizadas pelo método de Pffafli et al. [43] através do Relative Expression Software Tool – 384 (REST-384).

2 RESULTADOS

2.1 L-GNT INDUZ CITOTOXICIDADE E REDUZ O CRESCIMENTO CELULAR

Como demonstrado através do Ensaio do MTT, a L-GNT reduziu a sobrevivência celular de modo dose-dependente (Figura 2). Em 24 horas, a citotoxicidade foi significativa na concentração de 25 μM , já em 48 h, todas as concentrações (2,5; 12,5 e 25 μM) reduziram significativamente a sobrevivência celular em relação ao controle. O valor mínimo de sobrevivência celular encontrado foi de 74,65% na maior concentração de L-GNT testada (25 μM) após 48 horas de tratamento.

Para avaliar o efeito da L-GNT na cinética de proliferação celular, as células foram incubadas com as mesmas concentrações de L-GNT utilizadas no Ensaio do MTT, e a cada 24 horas realizou-se a contagem das células em câmara de Neubauer. Ao se analisar a curva de proliferação celular (Figura 3), foi possível observar que as células que foram tratadas com as duas maiores concentrações de L-GNT (12,5 e 25 μM) apresentaram menor taxa de proliferação em relação ao controle e à menor concentração de L-GNT (2,5 μM). Esta redução na proliferação celular se deu de modo dose-dependente, mostrando-se significativa após 48 horas de tratamento nas concentrações de 12,5 e 25 μM .

O controle positivo (Doxorrubicina – 18,4 μM) apresentou citotoxicidade significativa em relação ao controle após 24 e 48 h de tratamento, e também apresentou redução significativa na proliferação celular nos tempos de 48 e 72 horas (dados não apresentados).

2.2 L-GNT INDUZ APOPTOSE

A Avaliação da indução de apoptose *in situ* mostrou que houve um aumento na porcentagem de células em apoptose de acordo com o aumento da concentração de L-GNT. Este aumento se mostrou significativo somente no tratamento das células NCI-H460 com a maior concentração de L-GNT (25 μM) (Figura 4A), a qual exibiu um valor percentual médio de células apoptóticas de 5%. As Figuras 4B e 4C mostram, respectivamente, as

imagens de células normais e daquelas com alterações morfológicas características de apoptose. O controle positivo (Camptotecina – 2,9 μM) levou a um aumento significativo na indução de apoptose (dados não apresentados).

2.3 TRATAMENTO COM L-GNT CAUSA GENOTOXICIDADE

Os resultados obtidos através do Ensaio do Cometa demonstraram que houve um aumento significativo na indução de danos ao DNA nas células NCI-H460 em todas as concentrações de L-GNT testadas (2,5; 12,5 e 25 μM), como demonstrado através do escore médio representado na Figura 5. O aumento da frequência de células com danos classe 1 e 2, que ocorreu de acordo com o aumento na concentração de L-GNT, demonstra que a genotoxicidade induzida por esta substância ocorre de modo dose-dependente. O controle positivo (Doxorrubicina: 0,4 μM) apresentou aumento significativo na indução de danos ao DNA (dados não apresentados). A viabilidade celular se manteve acima de 80% em todos os tratamentos.

2.4 L-GNT REDUZ A EXPRESSÃO DO GENE BIRC5

Os resultados obtidos (Figura 6) através de RT-qPCR mostraram que não houve alteração significativa na expressão dos genes *BAX* e *TP53* no grupo tratado em relação ao controle. Já o gene *BIRC5*, teve uma redução de 1,697 de sua expressão no grupo tratado com 25 μM de L-GNT em relação ao grupo controle, sendo esta diferença significativa ($p = 0,001$).

3 DISCUSSÃO

Diversos estudos têm apontado a Goniotalamina como um potente agente antiproliferativo devido ao seu potencial em induzir morte celular por apoptose em células tumorais. No entanto, ainda há poucos estudos em relação à atividade do enantiômero sintético, (L)-Goniotalamina. Por isso, este trabalho buscou estudar os efeitos desta molécula em linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas (NCI-H460). Os resultados obtidos demonstraram que a L-GNT reduz a sobrevivência celular de modo dose-dependente, apresenta indução significativa de apoptose, demonstra potencial genotóxico e reduz os níveis de expressão do gene *BIRC5*.

O alto potencial citotóxico da (D)-Goniotalamina contra diversas linhagens tumorais tem sido demonstrado em vários trabalhos [10-20]. No presente estudo, nossos resultados demonstraram que o enantiômero sintético também apresenta esta potencialidade, como se pôde observar pela redução da taxa de sobrevivência celular da linhagem NCI-H460 após exposição a este composto na concentração de 25 μM após 24 h e em todas as concentrações após 48 h. Em acordo com este dado, também se pôde notar alterações da cinética de proliferação celular. Em 2006, de Fátima et al. [24], também demonstraram que a atividade citotóxica da L-GNT contra várias linhagens tumorais em concentrações entre 0,25 - 250 $\mu\text{g/mL}$ através do Ensaio da Sulforodamina B (SRB) acontece de modo dose-dependente. Para a linhagem NCI-H460, o IC₅₀ encontrado no trabalho destes autores foi de 14,6 μM .

O potencial citotóxico observado através do Ensaio do MTT ocorrido devido à inibição do crescimento celular pode ter resultado da inibição do metabolismo mitocondrial e/ou da indução de apoptose. A morte celular por apoptose é um processo de grande interesse no desenvolvimento de esquemas terapêuticos para o tratamento do câncer [44] e vários autores sugerem que seja este o principal mecanismo pelo qual a (D)-Goniotalamina desempenha sua atividade antiproliferativa [11,14,15,16,17,20,22,20,45].

Assim como no caso da D-GNT, no nosso estudo, observamos que a L-GNT apresenta potencialidade em induzir apoptose nas células NCI-H460 de modo dependente da concentração. Na avaliação da apoptose *in situ*, detectamos que a maior concentração (25 μM), a qual demonstrou citotoxicidade significativa após 24 h de tratamento através do Ensaio do MTT, também foi capaz de induzir apoptose significativamente, sugerindo que a indução de apoptose esteja diretamente relacionada ao potencial citotóxico deste composto. Este resultado está em acordo com o trabalho de de Fátima et al. [24], onde também se

demonstrou a capacidade da L-GNT em induzir apoptose em células da linhagem de câncer renal 786-0. Neste estudo, houve um aumento na clivagem de PARP (polimerase poliADPribose), um indicador do processo apoptótico, após tratamento com 4 nM (valor de IC50 para as células 786-0).

Os mecanismos pelos quais a Goniotalamina induz morte celular não estão completamente esclarecidos, mas vários estudos sugerem que o principal caminho pelo qual ela leva as células à apoptose é a via mitocondrial ou intrínseca. Lee et al. [15], demonstraram que após o tratamento com a (D)-Goniotalamina, a via intrínseca de apoptose foi ativada como observado pelo acúmulo de citocromo-c, ativação da caspase iniciadora-9 e da caspase executora-7. Em 2003, Inayat-Hussain et al. [17], mostraram que este composto induz apoptose em células HL-60 também através da ativação da via intrínseca, com perda de potencial de membrana mitocondrial, ativação da caspase iniciadora-9 e das caspases efetoras 3 e 7. Chan et al. [22] relataram um aumento na atividade das caspases-2, 3 e 9 sem ativação da caspase-8, a qual caracteristicamente é ativada pela via dos receptores de morte (via extrínseca).

A via intrínseca é ativada em resposta a estímulos de morte que ocorrem dentro da célula, tais como danos ao DNA [46]. Diversos estudos demonstram que a (D)-Goniotalamina apresenta potencial genotóxico e sugerem que, talvez, este seja o principal mecanismo pelo qual este composto desencadeie a apoptose, já que quando o dano ao DNA não é passível de reparo, o mecanismo apoptótico é desencadeado [47]. Chan et al. [45] ao avaliarem a indução de danos ao DNA através do Ensaio do Cometa com as concentrações de 0,5 µg/mL e 1,5 µg/mL de Goniotalamina em células VSMCs (*Vascular Smooth Muscle Cells*), demonstraram que houve genotoxicidade altamente significativa de modo concentração-dependente. Estes autores sugeriram que a indução de danos ao DNA é responsável pela citotoxicidade demonstrada por este composto, principalmente através do mecanismo de apoptose. No estudo de Inayat-Hussain et al. [48], foi demonstrado que após tratamento das células leucêmicas Jurkat T com 50 µM de Goniotalamina houve indução de danos ao DNA, resultando em ativação da via intrínseca da apoptose. Rajab et al. [18], detectaram que o tratamento com Goniotalamina nas concentrações do IC10 e IC25 em células leucêmicas da linhagem HL-60 e CEM-SS (IC50 de 4,5µg/mL e 2,4 µg/mL, respectivamente), resultou em indução de danos ao DNA, como detectado através do Ensaio do Cometa. Tsafe et al. [49], também observaram um aumento significativo da genotoxicidade na linhagem CHO (*Chinese Hamster Ovary cell*) após exposição às concentrações de 10 e 5 µM de Goniotalamina através do Ensaio de Aberração Cromossômica

e, além disso, a análise dos danos ao DNA após ativação metabólica, mostraram que esta molécula age como um mutágeno direto, já que causa danos com ou sem ativação metabólica. Alguns trabalhos sugerem que a capacidade da GNT em induzir danos ao material genético esteja diretamente relacionada à ocorrência de estresse oxidativo [16,48].

No presente estudo, a análise da genotoxicidade através do Ensaio do Cometa demonstrou que a (L)-Goniotalamina, assim como a D-GNT, também induz danos ao DNA de modo concentração-dependente em baixas concentrações. Apesar da indução de danos ao DNA ter sido detectada em todas as concentrações testadas, somente a maior concentração (25 μM) induziu apoptose de maneira significativa, sugerindo que o mecanismo de reparo tenha atuado e recuperado parte das células que sofreram danos.

Embora o mecanismo apoptótico possa ser independente da proteína p53, a apoptose após danos ao DNA frequentemente ocorre de modo dependente de p53, a qual modula a suscetibilidade das células à apoptose por ativar genes pró-apoptóticos como *BAX* [50]. No presente estudo, no entanto, mesmo com a indução de danos ao material genético causada pela L-GNT, não se observou nenhuma alteração significativa nos níveis de RNAm de *TP53* e de *BAX*, diferindo dos resultados de de Fátima et al. [20] que observaram uma redução na expressão da proteína pró-apoptótica Bax após exposição das células 786-0 à L-GNT; e do trabalho de Chan et al. [22] onde foi detectado um aumento nos níveis de p53 após tratamento da linhagem *coronary artery smooth muscle cells* (CASMCs) com a D-GNT.

Um achado importante sobre o mecanismo de ação da L-GNT, mostrado pela primeira vez neste estudo, e que pode explicar a inibição da proliferação celular e indução de apoptose em células tumorais causadas por este composto, foi a redução significativa da expressão do gene *BIRC5*, o qual codifica para a proteína survivina. Esta proteína tem duas importantes funções na célula, pode agir suprimindo a apoptose e também regulando o ciclo celular.

Na apoptose, a noção de que a survivina tem potencial inibitório é bem estabelecida e demonstrada em vários estudos, os quais indicam que a sua superexpressão resulta em inibição da apoptose [51-53]; que sua inibição por antagonistas leva à morte celular de modo caspase-dependente [54]; e, além disso, há estudos que indicam que sua inibição, aumenta a citotoxicidade de agentes quimioterápicos por reverter a quimiorresistência das células tumorais a estas drogas, apontando esta proteína como um importante fator de sobrevivência em tumores [55]. Logo, drogas que regulem negativamente a expressão de survivina, assim como a L-GNT, são bastante importantes na terapêutica do câncer.

Até pouco tempo se acreditava que a survivina exercia seu potencial inibitório da apoptose ao se ligar diretamente e impedir a ativação das caspases-3, 7 e 9. No entanto, este modelo passou a ser questionado e, hoje, sugere-se que a survivina cause inibição direta do fator pró-apoptótico SMAC/DIABLO e também que necessite de uma interação física com a proteína XIAP para inibir as caspases. Através do auxílio de chaperonas citosólicas, a survivina é transportada para a mitocôndria onde parece se ligar ao fator SMAC/DIABLO, o qual promove a ativação de caspases ao se ligar e neutralizar as IAPs, e mantê-lo longe da XIAP ou então impedindo sua liberação da mitocôndria. Deste modo, este antagonismo permite que XIAP fique livre, consiga interagir diretamente com as caspases e inibi-las, exercendo, portanto, o bloqueio da apoptose [56]. Além disso, estímulos de morte induzem a liberação do *pool* mitocondrial de survivina para o citosol que se une à XIAP e promove um aumento na sua estabilidade contra a degradação proteossomal, cooperando deste modo com sua atividade de inibição direta das caspases [51].

Vários autores relatam um aumento na ativação das caspases-3, 7 e 9 após tratamento com Goniotalamina [22,17,15). Logo, em acordo com o potencial anti-apoptótico da survivina em se ligar ao fator Smac/DIABLO e também em interagir com a XIAP favorecendo a inibição das caspases, sugerimos que a regulação negativa da survivina possa ser um dos mecanismos responsáveis pelo aumento na ativação das caspases e consequente indução de apoptose após a exposição celular à Goniotalamina. Outros estudos associam a regulação negativa desta IAP à ativação das caspases-3, 7 e 9 [57,58].

Além de sua função na apoptose, a survivina também exerce uma outra importante função na célula, participa da regulação do ciclo celular. Durante a mitose, é demonstrada associação da survivina com a tubulina polimerizada, envolvendo os centrossomos, microtúbulos da metáfase e no fuso da anáfase, sugerindo seu papel na regulação da dinâmica dos microtúbulos [59]. Também se nota a presença da survivina associada aos cinetócoros dos cromossomos em metáfase e a reguladores da citocinese (*Chromosomal Passenger Protein* - CPC), como Aurora B quinase, INCENP e Borealina/Dasra, sugerindo sua importância na segregação cromossômica e na citocinese. A divisão celular na ausência de survivina resulta em defeitos no alinhamento cromossômico, falha na citocinese e, eventualmente, em morte celular, neste caso relacionada à divisão celular aberrante [60].

A survivina demonstra expressão dependente do ciclo celular, e seus maiores níveis são observados na fase G2/M [59]. A redução ou inibição de proteínas que fazem parte do CPC pode resultar em parada mitótica e há trabalhos que correlacionam a inibição da

survivina à parada do ciclo em G2/M [61]. Tian et al. [11] e Chen et al. [16] mostraram que após a exposição de células à Goniotalamina houve parada de ciclo celular em G2/M. Logo, a parada de ciclo nesta fase que ocorre após o tratamento com GNT pode ser explicada pela capacidade deste composto em inibir a expressão da survivina e este pode ser um alvo interessante para futuras investigações a respeito do mecanismo de ação desta molécula.

Um estudo de Hoffman et al. [52] demonstrou que a survivina é regulada negativamente, tanto seus níveis de RNA quanto de proteína, devido à indução de p53, a qual é capaz de se ligar ao promotor do gene *BIRC5* e reprimir sua expressão. Zhou et al. [54], demonstraram que o tratamento com doxorrubicina de células com p53 tipo selvagem, causou acúmulo de p53, resultando em drástica regulação negativa da proteína survivina. Mirza et al. [53], testaram se a expressão de *BIRC5* poderia ser reprimida por indução endógena de p53 após tratamento com Adriamicina, um agente que causa danos ao DNA. Duas linhagens celulares foram utilizadas, uma com p53 tipo selvagem (A549) e uma com o tipo mutante de p53 (T47D). Os resultados demonstraram que os nível de RNAm de *BIRC5* após o tratamento foi reduzido na linhagem A549, enquanto na linhagem T47D permaneceu inalterado, sugerindo que a expressão do tipo selvagem de p53 reprime a atividade transcricional do promotor do gene *BIRC5*. Entretanto, no presente estudo, a análise da expressão deste gene através de RT-qPCR, não mostrou alterações significativas nos seus níveis de RNAm e, por isso, novas vias devem ser estudadas a fim de se elucidar o mecanismo pelo qual a L-GNT leva à regulação negativa do gene *BIRC5*.

CONCLUSÃO

Portanto, o presente estudo demonstrou que a L-GNT apresenta potencialidade em induzir morte celular por apoptose, possivelmente através da indução de danos ao material genético e da regulação negativa dos níveis de expressão do gene *BIRC5*, sem alteração nos níveis de RNAm de *TP53* e *BAX*. Sendo assim, esta molécula se apresenta como um agente terapêutico em potencial para o tratamento do câncer de pulmão, e novos estudos são necessários para se trazer informações adicionais sobre seu mecanismo de ação, principalmente sobre sua capacidade em regular a expressão de *BIRC5*.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio financeiro das instituições: CAPES, CNPq, Fundação Araucária e ao Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho por ter nos cedido a linhagem celular NCI-H460.

REFERÊNCIAS

- [1] J. Ferlay, H-R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, D.M. Parkin, Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008, *Int. J. Cancer* 000 (2010) 000-000.
- [2] E. Forgacs, S. Zöchbauer-Müller, E. Oláh, J.D. Minna, Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer, *Pathol. Oncol. Res.* 7 (2001) 6-13.
- [3] Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimate/2010 - Incidence of Cancer in Brazil, Rio de Janeiro, 2009.
- [4] G.M. Cragg, D.J. Newman, Plants as a source of anti-cancer agents, *J. Ethnopharmacol.* 100 (2006) 72-79.
- [5] C. Wiart, *Goniothalamus* species: a source of drugs for the treatment of cancers and bacterial infections? *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 4 (2007) 299-311.
- [6] M.A. Mosaddik, M.E. Haque, Cytotoxicity and antimicrobial activity of goniothalamine isolated from *Bryonopsis laciniosa*, *Phytother. Res.* 17 (2003) 1155-1157.
- [7] C.V.B. Martins, M.A. de Resende, D.L. da Silva, T.F.F. Magalhães, L.V. Modolo, R.A. Pilli e A. de Fátima, *In vitro* studies of anticandidal activity of goniothalamine enantiomers, *J. Appl. Microbiol.* 107 (2009) 1279-1286.
- [8] S. Senthil-Nathan, M-Y Choi, C-H. Paik, K. Kalaivani. The toxicity and physiological effect of goniothalamine, a styryl-pyrone, on the generalist herbivore, *Spodoptera exigua* Hübner, *Chemosphere* 72 (2008) 1393–1400.
- [9] A. de Fátima, C. Marquissolo, S. de Albuquerque, A.A. Carraro-Abrahão, R.A. Pilli, Trypanocidal activity of 5,6-dihydropyran-2-ones against free trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 1210–1213.
- [10] A.H.L Pihie, J. Stanslas, L.B. Din. Non-steroid receptor-mediated anti-proliferative activity of styrylpyrone derivative in human breast cancer cell lines, *Anticancer Res.* 18 (1998) 1739–1743.
- [11] Z. Tian, S. Chen, Y. Zhang, M. Huang, L. Shi, F. Huang, C. Fong, M. Yang, P. Xiao, The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones, *Phytomedicine* 13 (2006) 181–186.
- [12] C. Wattanapiromsakul, B. Wangsintaweekul, P. Sangprapan, A. Itharat, N. Keawpradub, Goniothalamine, a cytotoxic compound, isolated from *Goniothalamus macrophyllus* (Blume) Hook. f. & Thomson var. *macrophyllus*, *Songklanakarinn J. Sci. Technol.* 27 (2005) 479-487.

- [13] A. de Fátima, L.K. Kohn, M.A. Antônio, J.E. de Carvalho, R.A. Pilli, (R)-Goniothalamine: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines, *Bioorg Med. Chem.* 13 (2005) 2927–2933.
- [14] A.L.T. Chien, A.H.L. Pihie, Styrylpyrone derivative induces apoptosis through the up-regulation of Bax in the human breast cancer cell line MCF-7, *J. Biochem. Mol. Biol.* 36 (2003) 269-274.
- [15] A.T.C. Lee, A.N. Azimahtol, A.N. Tan, Styrylpyrone Derivative (SPD) induces apoptosis in a caspase-7-dependent manner in the human breast cancer cell line MCF-7, *Cancer Cell Int.* 3 (2003) 1-8.
- [16] W-Y. Chen, C-C. Wu, Y-H. Lan, F-R. Chang, C-M. Teng, Y-C. Wu, Goniothalamine induces cell cycle-specific apoptosis by modulating the redox status in MDA-MB-231 cells, *Eur. J. Pharmacol.* 522 (2005) 20-29.
- [17] S.H. Inayat-Hussain, B.O. Annuar, L.B. Din, A.M. Ali, D. Ross, Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniothalamine in HL-60 leukemia cells. *Toxicol. In Vitro* 17 (2003) 433–439.
- [18] N.F. Rajab, Z.A. Hamid, H. Hassan, A.M. Ali, L.B. Din, S.H. Inayat-Hussain, Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of goniothalamine in leukemic cell lines. *Environ. Mutagen. Res.* 27 (2005) 161-164.
- [19] S.H. Inayat-Hussain, L.T. Wong, K.M. Chan, N.F. Rajab, L.B. Din, R. Harun, A. Kizilors, N. Saxena, M. Mourtada-Maarabouni, F. Farzaneh, G.T. Williams, RACK-1 overexpression protects against goniothalamine-induced cell death, *Toxicol. Lett.* 191 (2009) 118–122.
- [20] A. de Fátima, W.F. Zambuzzi, L.V. Modolo, C.A.B. Tarsitano, F.R. Gadelha, S. Hyslop, J.E. de Carvalho, I. Salgado, C.V. Ferreira, R.A. Pilli, Cytotoxicity of goniothalamine enantiomers in renal cancer cells: Involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy, *Chem. Biol. Interact.* 176 (2008) 143–150.
- [21] N. Meenakshii, A. Lee, H.L.P. Azimahtol, S. Hasidah, Increased levels of apoptosis correlate with p53 protein accumulation in response to the styrylpyrone derivative (SPD) treatment of the Huggins tumor, *Malays. Appl. Biol.* 29 (2000) 121–126.
- [22] K.M. Chan, N.F. Rajab, D. Siegel, L.B. Din, D. Ross, S.H. Inayat-Hussain, Goniothalamine induces coronary artery smooth muscle cells apoptosis: the p53-dependent caspase-2 activation pathway, *Tox. Sci.* 116 (2010) 533–548.
- [23] S.H. Inayat-Hussain, A.B. Osman, L.B. Din, A.M. Ali, R.T. Snowden, M. MacFarlane, K. Cain, Caspases-3 and -7 are activated in goniothalamine-induced apoptosis in human Jurkat T-cells, *FEBS Lett.* 456 (1999) 379-383.

- [24] A. de Fátima, L.K. Kohn, J.E. de Carvalho, R.A. Pilli, Cytotoxic activity of (S)-goniothalamin and analogues against human cancer cells, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 622-631.
- [25] S. Elmore, Apoptosis: A review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495-516.
- [26] J.C. Reed, Apoptosis based-therapy, *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 111-121.
- [27] D. Hanahan, R. Weinberg, The Hallmarks of Cancer, *Cell.* 1000 (2000) 57-70.
- [28] K.M. Fong, Y. Sekido, A.F. Gazdar, J.D. Minna, Lung cancer 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications, *Thorax* 58 (2003) 892-900.
- [29] E. Er, L. Oliver, P-F. Cartron, P. Juin, S. Manon, F.M. Vallette, Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax, *Biochim.Biophys. Acta* 1757 (2006) 1301–1311.
- [30] D. Green, G. Kroemer, Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53, *Nature* 459 (2009) 1127-1130.
- [31] B.P. Bouchet, C.C. de Fromental, A. Puisieux, C.M. Galmarini, p53 as a target for anti-cancer drug development, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 58 (2006) 190–207.
- [32] M. Holcik, The IAP proteins, *Trends Genet.* 18 (2002) 537-538.
- [33] A.C. Mita, M.M. Mita, S.T. Nawrocki, F.J. Giles, Survivin: Key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics, *Clin. Cancer Res.* 14 (2008) 5000-5005.
- [34] T. Takahashi, M.M. Nau, I. Chiba, M.J. Birrer, R.K. Rosenberg, M. Vinocour, M. Levitt, H. Pass, A.F. Gazdar, J.D. Minna, p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer, *Science* 246 (1989) 491-494.
- [35] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55-63.
- [36] C.G. Rovoizzo, C.N. Burke, *A manual of basic virological techniques*, Prentice Hall, New Jersey, 1973.
- [37] M.S. Tsuboy, J.C. Marcarini, R.C. Luiz, I.B. Barros, D.T. Ferreira, L.R. Ribeiro, M.S. [Mantovani](#), *In vitro* evaluation of the genotoxic activity and apoptosis induction of the extracts of roots and leaves from the medicinal plant *Coccoloba mollis*, *J. Med. Food* 13 (2010) 1-6.

- [38] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.-C. Ryu, Y. F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35 (2000) 206-221.
- [39] S.A. Bustin, V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M. W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele, C.T. Wittwer, MIQE guidelines: the minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments, *Clin. Chem.* 55 (2009) 611–622.
- [40] S. Sugaya, H. Nakanishi, H. Tanzawa, K. Sugita, K. Kita, N. Suzuki, Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells, *Mutat. Res.* 578 (2005) 327–332.
- [41] D. Javelaund, F. Besançon, Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14arf and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 Ratio, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 37949–37954.
- [42] M. Zhang, J. Yang, F. Li, Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer, *Cancer Res.* 62 (2001) 664–8667.
- [43] M.W. Pfaffl, G.W. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 1-10.
- [44] J.C. Reed, Apoptosis-based therapies. *Nat. Rev. Drug Discov.* 1 (2002) 111-121.
- [45] K.M. Chan, N.F. Rajab, M.H.A. Ishak, A.M. Ali, K. Yusoff, L.B. Din, S.H. Inayat-Hussain, Goniothalamine induces apoptosis in vascular smooth muscle cells, *Chem. Biol. Interact.* 159 (2006) 129–140.
- [46] J. R. Riedl, Y. Shi, Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 (2004) 897-907.
- [47] J.Y.J. Wang, DNA damage and apoptosis, *Cell Death Differ.* 8 (2001) 1047–1048.
- [48] S.H. Inayat-Hussain, K.M. Chan, N.F. Rajab, L.B. Din, S.C. Chow, A. Kizilors, F. Farzaneh, G.T. Williams, Goniothalamine-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis via caspase-2 independent and Bcl-2 independent pathways in Jurkat T-cells, *Toxicol. Lett.* 193 (2010) 108–114.
- [49] N. Umar-Tsafe, M.S. Mohamed-Said, R. Rosli, L.B. Din, L.C. Lai, Genotoxicity of goniothalamine in CHO cell line, *Mutat. Res.* 562 (2004) 91–102.

- [50] W.P. Roos, B. Kaina, DNA damage-induced cell death by apoptosis, *Trends Mol. Med.* 12 (2006) 440-450.
- [51] T. Dohi, E. Beltrami, N.R. Wall, J. Plescia, D.C. Altieri, Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 1117-1127.
- [52] W.H. Hoffman, S. Biade, J.T. Zilfou, J. Chen, M. Murphy, Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 3247-3257.
- [53] A. Mirza1, M. McGuirk, T.N. Hockenberry, Q. Wu, H. Ashar, S. Black, S.F. Wen, L. Wang, P. Kirschmeier, W.R. Bishop, L.L Nielsen, C.B. Pickett, S. Liu, Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway, *Oncogene* 21 (2002) 2613-2622.
- [54] M. Zhou, L. Gu, F. Li, Y. Zhu, W.G. Woods, H.W. Findley, DNA damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303 (2002) 124-131.
- [55] T. Wang, J. Wei, X. Qian, Y. Ding, L. Yu, B. Liu, Gambogic acid, a potent inhibitor of survivin, reverses docetaxel resistance in gastric cancer cells, *Cancer Lett.* 262 (2008) 214-222.
- [56] Z. Song, X. Yao, M. Wu, Direct interaction between survivin and SMAC/DIABLO is essential for the anti-apoptotic activity of survivin during taxol-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 23130-23140.
- [57] A.K. [Tyagi](#), C. [Agarwal](#), R.P. [Singh](#), K.R. [Shroyer](#), L.M. [Glode](#), R. [Agarwal](#), Silibinin down-regulates survivin protein and mRNA expression and causes caspases activation and apoptosis in human bladder transitional-cell papilloma RT4 cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312 (2003) 1178-1184.
- [58] X. Zhong, B. Wu, Y.J. Pan, S. Zheng, Brazilein inhibits survivin protein and mRNA expression and induces apoptosis in hepatocellular carcinoma HepG2 cells, *Neoplasma* 56 (2009) 387-392.
- [59] F. [Li](#), G. [Ambrosini](#), E.Y. Chu, J. Plescia, S. Tognin, P.C. Marchisio, D.C. Altieri, Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by surviving, *Nature* 396 (1998) 580-584.
- [60] S.M.A. Lens, G. Vader, R. H. Medema, The case for Survivin as mitotic regulator. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18 (2006) 616-622.
- [61] M. Ikeda, I. Okamoto, K. Tamura, T. Satoh, K. Yonesaka, M. Fukuoka, K. Nakagawa, Down-regulation of survivin by ultraviolet C radiation is dependent on p53 and results in G2-M arrest in A549 cells, *Cancer Lett.* 248 (2007) 292-298.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados neste estudo pode-se concluir que:

- A (L)-Goniotalamina apresenta potencial citotóxico relevante e capacidade em reduzir a proliferação celular de modo dose-dependente, como demonstrado a partir do Ensaio de Citotoxicidade (MTT) e da Cinética de Proliferação Celular em linhagem de câncer de pulmão de células não-pequenas NCI-H460;
- A Avaliação da indução de apoptose *in situ* mostrou que houve um aumento na porcentagem de células em apoptose de acordo com o aumento da concentração de L-GNT;
- Todas as concentrações testadas neste estudo (2,5; 12,5 e 25 μ M) induziram um aumento significativo na frequência de danos ao material genético, como demonstrado através do Ensaio do Cometa;
- O Ensaio de RT-qPCR demonstrou que a maior concentração de L-GNT utilizada neste estudo apresentou a capacidade de reduzir os níveis de RNAm de *BIRC5*, gene que codifica para a proteína survivina.

Assim como a molécula natural, (D)-Goniotalamina, neste estudo pudemos notar que o enantiômero sintético, (L)-Goniotalamina, também apresenta potencial antiproliferativo, capacidade em induzir apoptose e genotoxicidade. Além disso, nossos dados mostraram pela primeira vez a capacidade desta molécula em regular a expressão de *BIRC5* (survivina). A proteína survivina é altamente expressa em células cancerosas, enquanto que em tecidos diferenciados normais é raramente expressa e o aumento de sua expressão em pacientes com câncer é um marcador de prognóstico desfavorável correlacionado com a diminuição sobrevida global em diversas malignidades, incluindo o câncer de pulmão de células não-pequenas (CPCNP). Logo, a modulação da expressão deste gene é um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos para o tratamento do câncer.

Portanto, pode-se concluir que as atividades desempenhadas pela L-GNT apontam como um agente terapêutico em potencial para o tratamento do câncer de pulmão e que novos estudos são necessários para se elucidar seu papel na regulação da expressão de *BIRC5*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J.M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. **Oncogene**, v. 26, p. 1324-1337, 2007.
- ALBERG, A. J.; FORD, J. G.; SAMET, J. M. Epidemiology of lung cancer*ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd Edition). **Chest**, v.132, p. 29S-55S, 2007.
- ALTIERI, D. C. Survivin, versatile modulation of cell division and apoptosis in câncer. **Oncogene**, v. 22, p. 8581–8589, 2003.
- ALTIERI, D.C. New wirings in the survivin networks. **Oncogene**, v. 27, p. 6276–6284, 2008.
- ALTIERI, D.C. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. **Biochemical Journal**, v. 430,p. 199–205, 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts and Figures 2007**. Atlanta: American Cancer Society, 2007.
- AMBROSINI, G. *et al.*. Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. **Nature**, v. 396, p. 580-4, 1998.
- ANDREEFF, M.; GOODRICH, D. W.; PARDEE, A. B. Cell proliferation, differentiation, and apoptosis. In: BAST, R.C. et al. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 5 ed. Hamilton (ON): BC Decker, 2000.
- ANTIGNANI, A.; YOULE, R. J. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, p. 685–689, 2006.
- BERTHEAU, P. *et al.* *TP53* Status and response to chemotherapy in breast cancer. **Pathobiology**, v. 75, p. 132–139, 2008.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v. 39, p. 615-647, 2003.
- BUNN, P. A.; MAULT, J.; KELLY. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer. **CHEST**, v. 117, p. 119S-122S, 2000.
- CHAN, K.M. et al. Goniotalamin induces apoptosis in vascular smooth muscle cells K.M. **Chemico-Biological Interactions**, v.159, p.129–140, 2006.

CHAN, K.M. et al. Goniiothalamine induces coronary artery smooth muscle cells apoptosis: The p53-dependent caspase-2 activation pathway. **Toxicological Sciences**, v. 116, p. 533–548, 2010.

CHEN, F.; WANG, W.; EL-DEIRY, W. S. Current strategies to target p53 in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 724–730, 2010.

CHEN, W.Y. et al. Goniiothalamine induces cell cycle-specific apoptosis by modulating the redox status in MDA-MB-231 cells. **European Journal of Pharmacology**, v. 522, p. 20-29, 2005.

CHEN, X. et al. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. **Genes & development**, v. 10, p. 2438-2451, 1996.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Ethnopharmacology**, 2006.

BUNN, P.A.; MAULT, J.; KELLY, K. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer. **Chest**, v. 117, p.119S-122S, 2000.

DOHI, T. *et al.* Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 114, 1117-1127, 2004.

DOLL, R. Mortality from lung cancer in **Asbestos workers**. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 12, p. 81-86, 1955.

DYNEK, J. N.; VUCIC, D. Antagonists of IAP proteins as cancer therapeutics. **Cancer Letters**, 2010.

ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, p. 495-516, 2007.

ER, E. *et al.* Mitochondria as the target of the pro-apoptotic protein Bax. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1757, p. 1301–1311, 2006.

FÁTIMA, A. *et al.* (R)-Goniiothalamine: total syntheses and cytotoxic activity against cancer cell lines, **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, p. 2927–2933, 2005.

FÁTIMA, A. *et al.* Trypanocidal activity of 5,6-dihydropyran-2-ones against free trypomastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 4, p. 1210-1213, 2006a.

FÁTIMA, A. *et al.* Cytotoxic activity of (S)-goniothalamin and analogues against human cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p. 622–631, 2006b.

FÁTIMA, A., *et al.* Cytotoxicity of goniothalamin enantiomers in renal cancer cells: Involvement of nitric oxide, apoptosis and autophagy. **Chemico-Biological Interactions**, v.176, p.143–150, 2008.

FERLAY, F. *et al.* Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**, v. 000, 000-000, 2010.

FONG, K.M. *et al.* Lung cancer 9: Molecular biology of lung cancer: clinical implications. **Thorax**, v. 58, p. 892-900, 2003.

FORGACS, E. *et al.* Molecular genetic abnormalities in the pathogenesis of human lung cancer. **Pathology Oncology Research**, v. 7, p. 6-13, 2001.

GHIBELLI, L.; DIEDERICH, M. Multistep and multistak Bax activation. **Mitochondrion**, 2010.

GOTTLIEB, E.; VOUSDEN, K. H. p53 Regulation of metabolic pathways. **Cold Spring Harb Perspectives in Biology**, 2009.

GREEN, D.; KROEMER, G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. **Nature**, v. 459, p. 1127-30, 2009.

GROSSMAN, D. *et al.* Transgenic expression of surviving in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 108, p. 991-999, 2001.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 1000, p. 57-70, 2000.

HEMANN, M. T.; LOWE, S. W. The p53-Bcl-2 connection. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, p.1256–1259, 2006.

HOFFMAN, W. H. *et al.* Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 277, p. 3247–3257, 2002.

HOLCIK, M. The IAP proteins. **TRENDS in Genetics**, v.18, p. 537-538, 2002.

HUERTA, S. *et al.* Screening and detection of apoptosis. **Journal of Surgical Research**, v. 139, p. 143-156, 2007.

- HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. Massively regulated genes: the example of *TP53*. **Journal of Pathology**, v. 220, p. 164–173, 2010.
- INAYAT-HUSSAIN, S.H. et al. Caspases-3 and -7 are activated in goniothalamine-induced apoptosis in human Jurkat T-cells. **FEBS Letters**, v. 456, p. 379-83, 1999.
- INAYAT-HUSSAIN, S.H. et al. Loss of mitochondrial transmembrane potential and caspase-9 activation during apoptosis induced by the novel styryl-lactone goniothalamine in HL-60 leukemia cells. **Toxicology in vitro**, v. 17, p. 433-9, 2003.
- INAYAT-HUSSAIN, S.H. et al. RACK-1 overexpression protects against goniothalamine-induced cell death. **Toxicology Letters**, v. 191, p. 118–122, 2009.
- INAYAT-HUSSAIN, S.H. et al. Goniothalamine-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis via caspase-2 independent and Bcl-2 independent pathways in Jurkat T-cells. **Toxicology Letters**, v. 193, p. 108–114, 2010.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa 2010**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2009.
- JANTAN, I.B.; AHMAD, F.B.; DIN, L.B. Chemical constituents of the bark oil of *Goniothalamus macrophyllus* Hook. f. from Malaysia. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, p. 181–183, 2005.
- JEWERS, K. et al. Goniothalamine and its distribution in four *Goniothalamus* species. **Phytochemistry**, v. 11, p. 2025–30, 1972.
- JIN, Z.; EL-DEIRY, W. Overview of Cell Death Signaling Pathways. **Cancer Biology & Therapy**, v. 4, p. 139-163, 2005.
- JOHNSON, M. E.; HOWERT, E. W. Survivin: A Bifunctional Inhibitor of Apoptosis Protein. **Veterinary Pathology**, v. 41, p. 599-607, 2004.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239-257, 1972.
- KERR, J. F. R.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis, its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, p. 2013-26, 1994.
- LEE, A.T.C.; AZIMAHTOL, A.N; TAN, A.N. Styrylpyrone derivative induces apoptosis through the up-regulation of bax in the human breast cancer cell line MCF-7. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, p. 269-274, 2003a.

LEE, A.T.C.; AZIMAHTOL, A.N; TAN, A.N. Styrylpyrone Derivative (SPD) induces apoptosis in a caspase-7-dependent manner in the human breast cancer cell line MCF-7. **Cancer Cell International**, v. 3, p.1-8, 2003b.

LEE, D-H. *et al.* Role of p53, PUMA, and Bax in wogonin-induced apoptosis in human cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 2020 – 2033, 2008.

LENS, S. M. A.; VADER, G.; MEDEMA, R. H. The case for Survivin as mitotic regulator. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 18, p. 616–622, 2006.

LESSENE, G.; CZABOTAR, P. E.; COLMAN, P. M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. **Nature Review/Drug Discovery**, v. 7, p. 989-1000, 2008.

LEVINE, B.; SINHA, S.; KROEMER, G. Bcl-2 family members: Dual regulators of apoptosis and autophagy. **Autophagy**, v. 1; p. 600-606, 2008.

LEWTAS, J. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. **Mutation Research**, v. 636, p. 95–133, 2007.

LI, F. *et al.* Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. **Nature**, v.396, p. 580-584, 1998.

LI, F. Survivin Study: What is the next wave? **Journal of cellular physiology**, v.197, p. 8–29, 2003.

LI, J. W.-H.; VEDERAS, J.C. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? **Science**, v. 325, p. 161-165, 2009.

MACKINNON, A. C.; KOPATZ, J.; SETHI, T. The molecular and cellular biology of lung cancer: identifying novel therapeutic strategies. **British Medical Bulletin**, v. 95, p. 47–61, 2010.

MALHOTRA, V.; PERRY, M.C. Models of anti-cancer therapy – classical chemotherapy, mechanisms, toxicities and the therapeutic window. **Cancer Biology & Therapy**, v. 2, p. S2-S4, 2003.

MARTINS, C.V.B. *et al.* Antifungal activity of goniothalamine enantiomers. **Letters in Drug Design and Discovery**, v. 5, p. 74-78, 2008.

MATAKIDOU, A., EISEN, T.; HOULSTON, R.S. Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. **British Journal of Cancer**, v. 93, p. 825 – 833, 2005.

MEEK, D. W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? **Nature Review/Cancer**, v.9, p. 714-723, 2009.

MELNIKOVA, I.; GOLDEN, J. Apoptosis-targeting therapies. **Nature Review/Drug Discovery**, v. 3, p. 905-906, 2004.

MEREYALA, H.B.; JOE, M. Cytotoxic activity of styryl lactones and their derivatives. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 1, p. 293-300, 2001.

MIRZA, A. *et al.* Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. **Oncogene**, v. 21, p. 2613–2622, 2002.

MITA, A. C. *et al.* Survivin: Key regulator of mitosis and apoptosis and novel target for cancer therapeutics. **Clinical Cancer Research**, v. 14, p. 5000-5005, 2008.

MOSADDIK, M.A.; HAQUE, M.E. Cytotoxicity and antimicrobial activity of goniotalamin isolated from *Bryopsis laciniosa*. **Phytotherapy Research**, v.17, p.1155-7, 2003.

NACHMIAS, B.; ASHHAB, Y.; BEN-YEHUDA, D. The inhibitor of apoptosis protein family (IAPs): an emerging therapeutic target in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, p. 231–243, 2004.

NOBILI, S. *et al.* Natural compounds for cancer treatment and prevention. **Pharmacological Research**, v. 59, p. 365–378, 2009.

O'REILLY, K. M. A. *et al.* Asbestos-Related Lung Disease. **American Family Physician**, v.75, 2007.

PARKIN, D. M.; BRAY, J. F.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 74-108, 2005.

PARNELL, C.; WOLL, P.J. Principles of cancer treatment by chemotherapy. **Surgery**, v. 21, p. 272-276, 2003.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, p. 83-94, 2004.

PIERCE, D. A.; SHARP, G. B.; MABUCHI, K. Joint Effects of Radiation and Smoking on Lung Cancer Risk among Atomic Bomb Survivors. **Radiation Research**, v. 159, p. 511–520, 2003.

PIHIE, A.H.L.; STANSLAS, J.; DIN, L.B. Non-steroid receptor-mediated anti-proliferative activity of styrylpyrone derivative in human breast cancer cell lines. **Anticancer Research**, v.18, p.1739–43, 1998.

- RAJAB, N.F. Evaluation of the cytotoxic and genotoxic effects of goniotalamin in leukemic cell lines. **Environmental Mutagen Research**, v. 27, p. 161-164, 2005.
- REED, J.C. Apoptosis based-therapy. **Nature Reviews/Drug Discovery**, v. 1, p. 111-121, 2002.
- REIS, M. Pharmacogenetics applied to cancer. Individualized chemotherapy and molecular specificity. In: Simpósio Farmacogenética, n. 39(4), 2006, Ribeirão Preto. **Simpósio Farmacogenética Capítulo VIII**. Ribeirão Preto: Medicina, 2006. p. 577-86.
- RIELD, S. J. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature Reviews/Molecular cell biology**, v. 5, 897-907, 2004.
- RUMBLE, J. M.; DUCKETT, C. S. Cell science at a glance: Diverse functions within the IAP family. **Journal of Cell Science**, v. 1, p. 3505–3507, 2008.
- RYAN, B.M.; O'DONOVAN, N.; DUFFY, M. J. Survivin: A new target for anti-cancer therapy. **Cancer Treatment Reviews**, v. 35, p. 553–562, 2009.
- SAGER, J. A.; LENGAUER, C. New paradigms for cancer drug discovery. **Cancer Biology & Therapy**, v. 2, p. 452-455, 2003.
- SAM, T.W. et al. Goniotalamin oxide—an embryotoxic compound from *Goniotalamus macrophyllus* (Annonaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 28, p. 2541–2544, 1987.
- SENTHIL-NATHAN, S. et al. The toxicity and physiological effect of goniotalamin, a styryl-pyrone, on the generalist herbivore, *Spodoptera exigua* Hübner. **Chemosphere**, v. 72, p. 1393–1400, 2008.
- SONG, Z.; YAO, X.; WU, M. Direct Interaction between Survivin and Smac/DIABLO Is Essential for the Anti-apoptotic Activity of Survivin during Taxol-induced Apoptosis. **The journal of biological chemistry**, v. 278, p. 23130–23140, 2003.
- TAKAHASHI, T. et al. p53: A frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. **Science**, v. 246, p. 491-494, 1989.
- TIAN, Z. et al. The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactones. **Phytomedicine**, v. 13, p. 181–186, 2006.
- TSAFE, N.U. et al. Genotoxicity of goniotalamin in CHO cell line. **Mutation Research**, v. 562, p. 91–102, 2002.
- TUCKER, G.T. Chiral switches. **Lancet**, v. 355, p. 1085-87, 2000.

VERWEIJ, J.; JONGE, M.J.A. Achievements and future of chemotherapy. **European Journal of Cancer**, v. 36 , p.1479-1487, 2000.

WATTANAPIROMSAKUL, C. et al. Goniotalamin, a cytotoxic compound, isolated from *Goniotalamus macrophyllus* (Blume) Hook. f. & Thomson var. *macrophyllus*. **Songklanakarinn Journal of Science and Technology**, v. 27, p. 479-487, 2005.

WIART, C. Goniotalamus Species: A source of drugs for the treatment of cancers and bacterial infections? **eCAM**, v.4, p.299-311, 2007.

WILLIS, S. *et al.* The Bcl-2-regulated apoptotic pathway. **Journal of Cell Science**, v.116, p. 4053-4056, 2003.

YAMAMOTO, H.; NAGAN, C. Y.; MONDEN, M. Cancer cells survive with survivin. **Cancer Science**, v. 99, p. 1709-1714, 2008.

YIE, S-M. et al. Clinical significance of detecting survivin-expressing circulating cancer cells in patients with non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 63, p. 284-290, 2000.

ZAFFARONI, N.; DAIDONE, M. G. Survivin expression and resistance to anticancer treatments: perspectives for new therapeutic interventions. **Drug Resistance Updates**, v. 5, p. 65–72, 2002.

ZIMMERMANN, K.C.; BONZON, C.; GREEN, D.R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, p. 57-70, 2001.

ZHOU, M. *et al.* DNA Damage induces a novel p53-survivin signaling pathway regulating cell cycle and apoptosis in acute lymphoblastic leukemia cells. **THE Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 303, p. 124–131, 2002.

FIGURAS

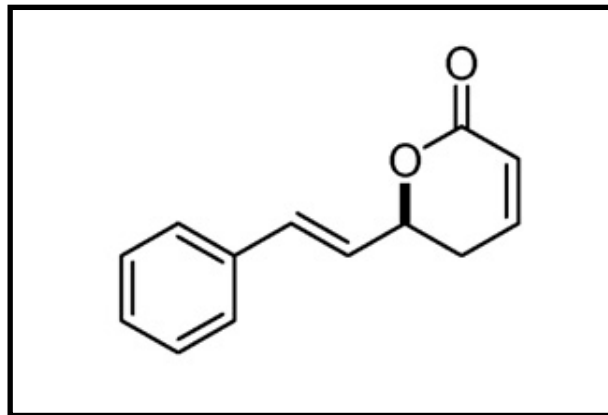


Figura 1 – Estrutura química da (L)-Goniotalamina.

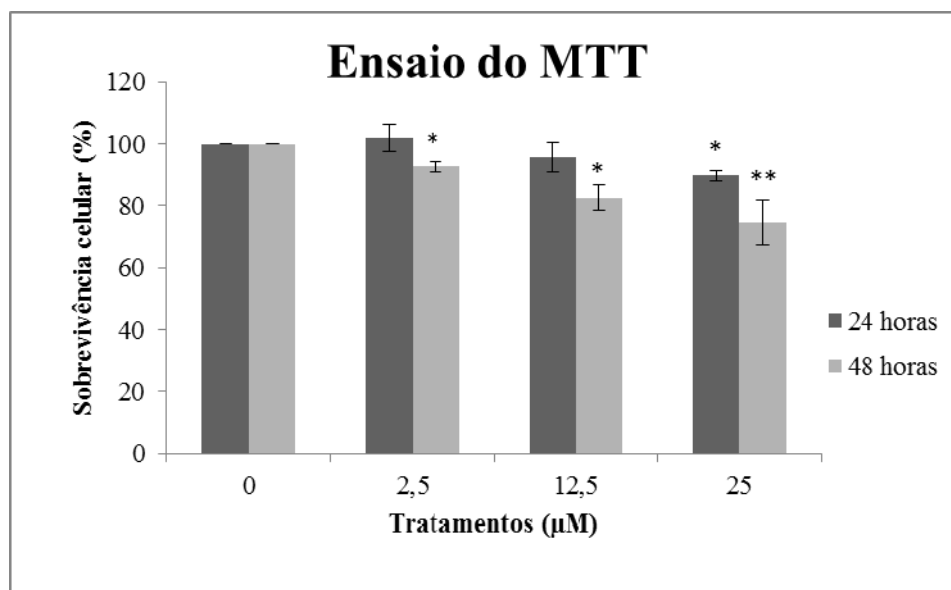


Figura 2 – Porcentagens de sobrevivência celular calculadas a partir dos valores de absorvância obtidos através do Ensaio do MTT, em células NCI-H460 tratadas com L-GNT. As barras representam as médias \pm desvio Padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) em relação ao controle.

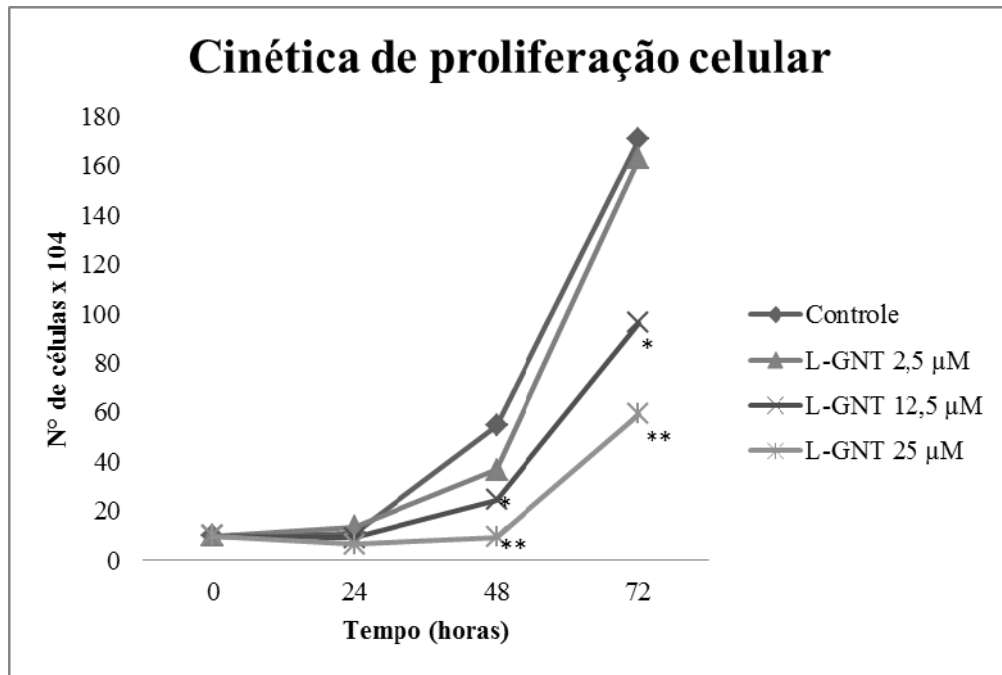


Figura 3 – Curva de crescimento celular obtida através de contagem celular em câmara de Neubauer após 24, 48 e 72 horas de tratamento com L-GNT em células NCI-H460. Diferença estatística: * ($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$) em relação ao controle.

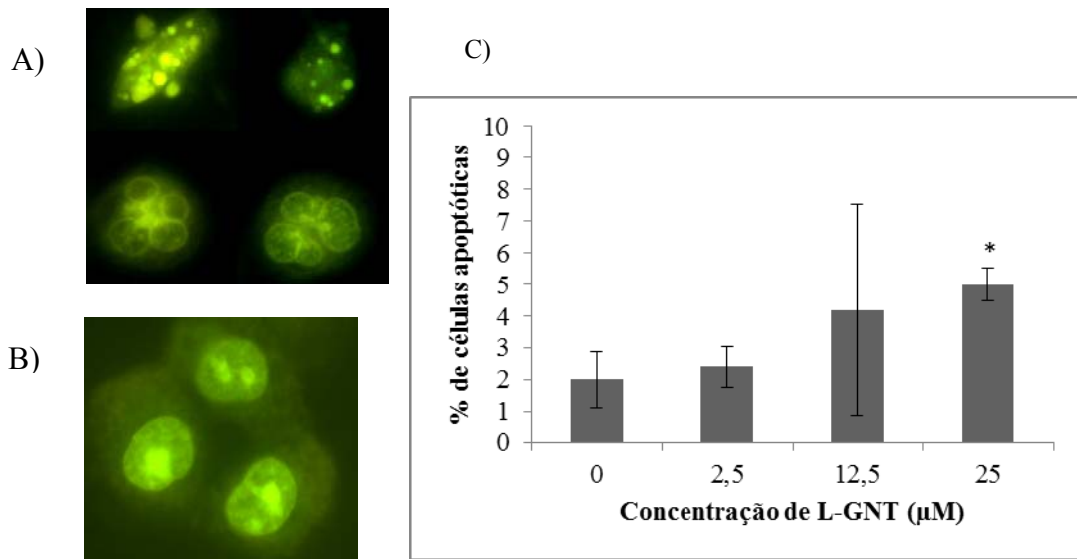


Figura 4 – Avaliação da indução de apoptose *in situ*. A) Células com morfologia celular características de apoptose. B) Células com morfologia normal. C) Gráfico com as porcentagens de células apoptóticas obtidas através de coloração por alaranjado de acridina em células NCI-H460 tratadas com L-GNT por 24 horas. As barras representam as médias \pm desvio Padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística: * ($p < 0,05$) em relação ao controle.

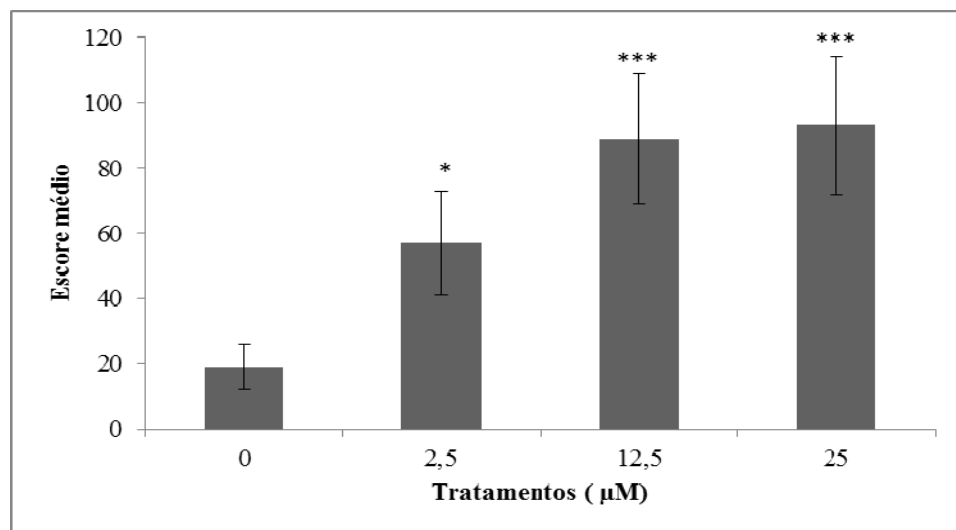


Figura 5 – Escore médio de cometas observado após 3 horas de tratamento em células NCI-H460 tratadas com L-GNT. As barras representam as médias \pm desvio Padrão obtidos em três experimentos independentes. Diferença estatística: * ($p < 0,05$); *** ($p < 0,001$) em relação ao controle.

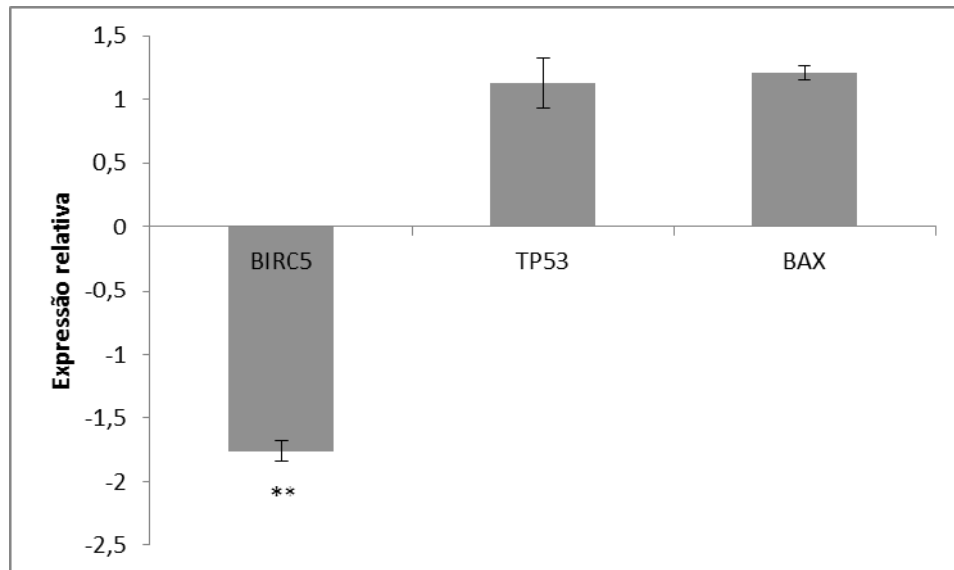


Figura 6 – Avaliação da expressão dos genes *BIRC5*, *TP53* e *BAX* por RT-PCR em tempo real após 12 h de tratamento com 25 μ M de L-GNT. Diferença estatística: ** ($p = 0,001$) em relação ao controle.

ANEXOS

Tabela 1 – Valores médios \pm desvio padrão da absorbância obtida no teste de citotoxicidade MTT, após 24 e 48 horas de tratamento.

Tratamentos	Média \pm desvio padrão	
	24 horas	48 horas
Controle	0,5895 \pm 0,0443	1,7595 \pm 0,2892
Controle positivo	0,2715 \pm 0,01809	0,13 \pm 0,0338
L-GNT 2,5 μM	0,595 \pm 0,0534	1,597 \pm 0,6088 *
L-GNT 12,5 μM	0,5675 \pm 0,0541	1,476 \pm 0,3039 *
L-GNT 25 μM	0,5115 \pm 0,0848 *	1,3805 \pm 0,3169 **

Controle positivo: Doxorubicina (18,4 μ M).

Dados analisados por ANOVA seguida de teste de Dunnet.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.05$)

** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.01$)

Tabela 2 – Valores percentuais médios das taxas de sobrevivência celular \pm Desvio Padrão calculados a partir do Ensaio do MTT após 24 e 48 horas de tratamento

	Taxa de sobrevivência celular (%) \pm Desvio Padrão	
	24 horas	48 horas
Controle	100 \pm 0,00	100 \pm 0,00
L-GNT 2,5 μM	101,83 \pm 4,83	92,77 \pm 4,04 *
L-GNT 12,5 μM	95,79 \pm 1,77	82,64 \pm 7,11 *
L-GNT 25 μM	89,76 \pm 10,67 *	74,65 \pm 9,57 **

Dados analisados por ANOVA seguida de teste de Dunnett.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.05$)

** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.01$)

Tabela 3 – Valores médios \pm Desvio padrão (10^4) obtidos através do Ensaio de Cinética de proliferação celular após 24, 48 e 72 horas de tratamento

Tratamentos	Média \pm desvio padrão		
	24 horas	48 horas	72 horas
Controle	10,875 \pm 3,359	54,625 \pm 10,076	170,75 \pm 13,082
Controle positivo	7,063 \pm 2,387	7,563 \pm 1,856 **	9,875 \pm 1,945 **
L-GNT 2,5 μM	13,563 \pm 0,796	36,875 \pm 11,490	162,75 \pm 23,688
L-GNT 12,5 μM	9,125 \pm 1,945	24,563 \pm 6,276 *	96,375 \pm 16,440 *
L-GNT 25 μM	6,688 \pm 0,2652	9,563 \pm 0,265 **	59,25 \pm 31,466 **

Controle positivo: Doxorubicina (18,4 μ M).

Dados analisados por ANOVA seguida de teste de Dunnet.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.05$)

** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.01$)

Tabela 4 – Valores médios de células apoptóticas \pm Desvio Padrão e Porcentagem média \pm Desvio Padrão obtidos a partir da análise morfológica das células após 24 horas de tratamento

Tratamentos	Média \pm desvio padrão	% \pm desvio padrão
Controle	10 \pm 4,4	2,4 \pm 0,87
Controle positivo	190 \pm 21,2 ***	36,4 \pm 4,23 ***
L-GNT 2,5 μM	12 \pm 3,2	2,6 \pm 0,64
L-GNT 12,5 μM	21 \pm 16,6	3,8 \pm 3,31
L-GNT 25 μM	25 \pm 2,6 *	5,2 \pm 0,53 *

Controle positivo: Camptotecina (2,9 μ M).

Dados analisados pelo Teste Exato de Fisher.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.05$)

*** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.001$)

Tabela 5 – Frequência de células com dano no DNA, distribuição das classes de danos e escore (\pm Desvio Padrão) referentes ao Ensaio do Cometa após 3 horas de tratamento

Tratamento	Frequência de células com dano \pm Desvio Padrão	Classes do Cometa \pm Desvio Padrão				Escore médio \pm Desvio Padrão
		0	1	2	3	
Controle	19 \pm 6,658	81 \pm 6,658	17 \pm 6,11	2 \pm 0,577	0,00 \pm 0,00	19 \pm 7
Controle positivo	52 \pm 17,21	48 \pm 3,464	40 \pm 7,211	11 \pm 9	1 \pm 1	63 \pm 14 **
L-GNT 2,5 μM	47 \pm 11,719	55 \pm 10,149	39 \pm 5,860	8 \pm 5,86	0,00 \pm 0,00	57 \pm 16 *
L-GNT 12,5 μM	75 \pm 13,908	30 \pm 9,074	51 \pm 3,215	23 \pm 10,116	1 \pm 0,577	89 \pm 20 ***
L-GNT 25 μM	77 \pm 11,594	22 \pm 11,240	59 \pm 1,528	17 \pm 10,067	1 \pm 0,00	93 \pm 21 ***

Controle positivo: Doxorrubicina (0,4 μ M).

Dados analisados por ANOVA seguida de teste de Dunnet.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.05$).

** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.01$).

*** Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle negativo ($p < 0.001$).