



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANDRESSA MEGUMI NIWA

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO, MUTAGÊNICO E
APOPTÓTICO E ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS HT-29 TRATADAS COM CUBEKINA”**

ANDRESSA MEGUMI NIWA

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO, MUTAGÊNICO E
APOPTÓTICO E ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS HT-29 TRATADAS COM CUBEKINA”**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2011

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

N735i Niwa, Andressa Megumi.

Avaliação do efeito citotóxico, mutagênico e apoptótico e análise da proliferação de células HT-29 tratadas com cubebina / Andressa Megumi Niwa. – Londrina, 2011.

56 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 – Colon (Anatomia) – Teses. 2. Células cancerosas – Efeito citotóxico – Teses. 3. Mutagênese – Teses. 4. Apoptose – Indução – Teses. 5. Células cancerosas – Proliferação – Teses. 6. Genética – Expressão – Teses. 7. Cubebina – 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

ANDRESSA MEGUMI NIWA

**“AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO, MUTAGÊNICO E
APOPTÓTICO E ANÁLISE DA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HT-29
TRATADAS COM CUBEKINA”**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Profª. Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus
UEL - Londrina

Profª. Dra. Zaira da Rosa Guterres
UEMS - Mato Grosso do Sul - MS

Londrina, 24 de fevereiro de 2011

DEDICATÓRIA

*Dedico a Deus Parens e Oyassama, que me protegem e me orientam diariamente.
Muito obrigada por mais essa graça recebida.
Dedico aos meus pais, pelo amor incondicional que me faz seguir em frente.
Nada disso seria possível sem o apoio de vocês.*

*"Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir,
mas também sonhar; não apenas planejar,
mas também acreditar."
(Anatole France)*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por mais essa conquista. Ele que sempre me dá muito mais do que eu mereço. Sempre me surpreendendo e, dessa forma, me incentivando a sempre seguir em frente com força e coragem e mostrando que todo esforço vale a pena. Muito obrigada Deus, não apenas por mais essa etapa concluída, mas por tudo que tenho na minha vida!

Muito obrigada ao meu orientador, Mário Sérgio Mantovani, por ter me recebido no laboratório de Genética Toxicológica no ano de 2006 e por aceitar me orientar no mestrado e também no doutorado até o ano de 2015. Muito obrigada por toda dedicação e paciência.

Muito obrigada à Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular e a todos os profissionais: professora Ana Lúcia, professora Ilce, Sueli muito obrigada por ter me recebido tão bem e por sempre atender a todos com muito carinho.

Muito obrigada à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida nesses dois anos de mestrado.

À banca examinadora, muito obrigada por aceitarem o convite. As sugestões foram essenciais para enriquecer o trabalho.

Ao Prof. Dr. Edson Luis Maistro, da Universidade Estadual Paulista de Marília-SP, por ter fornecido a cubebina ao laboratório de Genética Toxicológica para realização deste trabalho.

Aos meus pais, quero agradecer sinceramente por tudo! Por todo apoio, todo carinho, toda dedicação que tenho recebido desde sempre! Não tenho a menor dúvida de que vocês são os melhores pais do mundo e agradeço todos os dias por ser uma filha de muita sorte! Amo vocês incondicionalmente e dedico esse trabalho a vocês. Sem o apoio de vocês com certeza eu não teria chegado até aqui. Muito obrigada!

Ao Douglas, meu amor, meu amigo, muito obrigada por ter me apoiado em todos os momentos, sempre me escutando e me aconselhando. Muito obrigada por toda paciência e por todo carinho e amor que tem me dado sempre! Obrigada por escutar meus desabafos, secar minhas lágrimas e sempre conseguir colocar um sorriso no meu rosto. Te amo muito! Muito obrigada por tudo!

Nati e Diogo: Amigos? Não, são muito mais que isso, são meus irmãos e fazem parte da minha vida e da minha família. Vivemos momentos tão incríveis nesses 6 anos de amizade, que não há palavras para descrever. Agradeço imensamente por essa amizade linda que nasceu durante a graduação e que nos proporcionou e ainda nos proporcionará vários momentos inesquecíveis. Vou sentir muito a falta de vocês e vou precisar de muita força para agüentar a saudade. Amo muito vocês dois! Muito obrigada por tudo!

Si, Ju, Má, Gláucia: amigas de laboratório que vão ter que me agüentar por mais um tempinho! Muito obrigada pela amizade, pelas conversas, pelas risadas! Sem vocês, o laboratório não teria a menor graça.

Dani: Muito obrigada pela amizade, pelos conselhos, pelas risadas e por toda ajuda nesse trabalho. Agradeço imensamente por tudo!

Meninas do SAG: Li e Pri. Muito obrigada pelos momentos de descontração, pelas conversas durante o almoço e durante os cafés. Sempre com mensagens sábias para passar para nós. Muito obrigada pela companhia e amizade!

Meus sinceros agradecimentos a todos!

NIWA, Andressa Megumi. **Avaliação do efeito citotóxico, mutagênico e apoptótico e análise da proliferação de células HT-29 tratadas com cubebina**. 2011. 56f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2011.

RESUMO

Produtos naturais que apresentam propriedades benéficas para o organismo humano são de grande interesse dos pesquisadores. A cubebina, extraída da semente da pimenta *Piper cubeba*, vem mostrando resultados promissores, como significativo potencial anti-inflamatório, analgésico e tripanocida. A fim de investigar a segurança da utilização desta lignana, o presente trabalho teve como objetivo analisar a citotoxicidade, mutagenicidade, cinética de proliferação celular, indução de apoptose e expressão gênica em células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) tratadas com cubebina. O ensaio de citotoxicidade MTT foi realizado para determinação das concentrações a serem utilizadas. Nesse ensaio foi verificado que apenas a maior concentração de cubebina testada (100 µg/mL) foi citotóxica. Dessa forma, nos demais testes, a cubebina foi avaliada nas concentrações 1, 5 e 10 µg/mL. Foi verificado que a cubebina não é mutagênica no ensaio do micronúcleo, não altera a cinética de crescimento celular e não induz apoptose em tratamento por 24 horas. A expressão dos genes *CASP8* e *CASP9* não foi alterada em tratamento por 12 horas com cubebina 10 µg/mL e 25 µg/mL. A partir dos dados observados, pode-se inferir que a cubebina, nas condições testadas, é citotóxica em concentrações a partir de 100 µg/mL, sugerindo que seja evitado o uso dessa concentração para seres humanos. Porém, concentrações menores não apresentaram atividades prejudiciais (mutagenicidade e alteração de ciclo celular), contribuindo para seu uso seguro nas concentrações estudadas para fins farmacológicos.

Palavras-chave: Cubebina. Células HT-29. Citotoxicidade. Mutagenicidade.

NIWA, Andressa Megumi. **Evaluation of cytotoxic, mutagenic and apoptotic effect and proliferation analysis of HT-29 cells treated with cubebin.** 2011. 56f. Dissertation (Master's degree in Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2011.

ABSTRACT

Natural products that exhibit beneficial properties to the organism are attracting increasing researchers' interest. The cubebin, extracted from the seeds of the pepper *Piper cubeba*, has shown promising results, as significant potential anti-inflammatory, analgesic and trypanocidal. In order to investigate the safe use of this lignan, this study aims to examine the cytotoxicity, mutagenicity, cell proliferation kinetics, induction of apoptosis and gene expression in human colon adenocarcinoma cells (HT-29) treated with cubebin. The MTT cytotoxicity assay was performed to determine the concentrations to be used. In this test we noticed that only the highest concentration of cubebin tested (100 µg/ml) was cytotoxic. Thus, cubebin was tested at 1, 5 and 10 µg/mL concentrations in other tests. It was found that cubebin is not mutagenic by the micronucleus test, does not alter the kinetics of cell growth and does not induce apoptosis in treatment for 24 hours. The expression of genes *CASP8* e *CASP9* was not altered in treatment for 12 hours with cubebin 10 µg/mL e 25 µg/mL. Observing data, we can suggest that cubebin, under the conditions tested, is cytotoxic in concentrations higher than 100 µg/mL, suggesting warning about the use of this concentration for humans. However, lower concentrations have no harmful activities (mutagenicity and alteration of cell cycle), contributing to its safe use in the studied concentrations for pharmacological purposes.

Keywords: Cubebin. HT-29 cells. Cytotoxicity. Mutagenicity.

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 – Sequência de <i>primers</i> utilizados na reação de PCR em tempo real	35
---	----

ANEXOS

Tabela 1 – Média das absorvâncias obtidas pelo ensaio de citotoxicidade MTT	49
Tabela 2 – Média do nº de células binucleadas com micronúcleos e Índice de Divisão Nuclear (IDN)	49
Tabela 3 – Média das contagens celulares obtidas pelo ensaio de cinética de proliferação celular	50
Tabela 4 – Média do nº de células apoptóticas	50
Tabela 5 – Média das razões obtidas pela técnica RT-PCR em tempo real para avaliação da expressão relativa do gene <i>CASP</i>	50
Tabela 6 – Cálculo da razão referente à expressão do gene <i>CASP8</i> conforme método de Pfaffl <i>et al.</i> (2001)	51
Tabela 7 – Média das razões obtidas pela técnica RT-PCR em tempo real para avaliação da expressão relativa do gene <i>CASP</i>	51
Tabela 8 – Cálculo da razão referente à expressão do gene <i>CASP9</i> conforme método de Pfaffl <i>et al.</i> (2001)	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Piper cubeba</i> e suas sementes.....	15
Figura 2 – Molécula da cubebina	16
Figura 3 – Morfologia de uma célula normal e uma célula apoptótica.....	22
Figura 4 – Formação de células binucleadas com micronúcleo.....	23

ARTIGO

Figura 1 – Porcentagem de sobrevivência celular.....	37
Figura 2 – Cinética de proliferação celular	38
Figura 3 – Mutagenicidade e Índice de Divisão Nuclear	39
Figura 4 – Número médio de células apoptóticas	40
Figura 5 – Expressão relativa do gene <i>CASP8</i>	41
Figura 6 – Expressão relativa do gene <i>CASP9</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS

5 α-RII	5 α -redutase II
5-LOX	5-lipoxigenase
ANOVA	(<i>Analise of Variance</i>) – Análise de Variância
B16	Linhagem celular de melanoma de rato
cDNA	DNA complementar
Cyt-B	Citocalasina-B
COX	Ciclooxigenases
Ct	Cycle threshold
DEPC	<i>Diethylpyrocarbonate</i>
DHT	Diidrotestosterona
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	(<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>) - ácido etilenodiamino tetra-acético
GPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
HPLC	(<i>High Performance (pressure) Liquide Chromatography</i>) – Cromatografia Líquida de Alta Performance
HT-29	linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano
IC₅₀	Concentração na qual a droga alcança 50% da inibição máxima
IDN	Índice de Divisão Nuclear
LNCaP	Linhagem celular tumoral de próstata humana
MDA	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana
MIQE	(<i>The Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments</i>) – Informações Mínimas para Publicação de Experimentos de PCR em tempo real quantitativo
MMS	Metilmetanosulfonato
MN	Micronúcleo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
PrEC	Células primárias normais de epitélio de próstata humana
PSA	Antígeno específico da próstata

RNA_m

RNA mensageiro

RT-PCR

Transcriptase Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	27
3.1 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, MUTAGÊNICO E APOPTÓTICO DA CUBEBINA E SUA INFLUÊNCIA NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HT-29	27
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A busca por compostos em alimentos que trazem benefícios à saúde iniciou-se desde a antiguidade e desperta o interesse dos pesquisadores até os dias atuais. Assim, o consumo de produtos naturais com fins benéficos tornou-se uma boa alternativa para a prevenção de algumas doenças.

As plantas formam a base da sofisticada medicina tradicional que existe há milhares de anos e continua proporcionando à humanidade novos medicamentos. Produtos naturais e seus derivados representam mais de 50% de todas as drogas usadas clinicamente no mundo e a maioria da população mundial ainda depende de plantas medicinais e outros materiais para seus cuidados com a saúde. As plantas medicinais contêm, tipicamente, uma mistura de diferentes classes de compostos químicos, que podem atuar individualmente, aditivamente ou em sinergia para melhorar a saúde (FAKIM, 2006). Assim, plantas medicinais são definidas como aquelas que possuam em sua composição princípios ativos, cuja ação provoca no organismo humano e animal reações que podem variar entre a cura ou abrandamento de doenças (CRUZ *et al.*, 2001).

A medicina tradicional e outras terapias derivadas de plantas têm sido praticadas por milhares de anos para o tratamento de doenças tanto na cultura oriental quanto na ocidental (AHMAD *et al.*, 2006). A procura por estes recursos ocorre devido a alguns fatores, como os elevados custos da medicina ocidental, os efeitos colaterais provocados pelos fármacos sintéticos, o crescente interesse pelo potencial terapêutico e econômico que representam, bem como a demanda de novos produtos pela indústria farmacêutica (SILVA; PECINALLI, 2001).

Além disso, o uso de fitoterápicos para tratar uma ampla gama de problemas foi promovido por: i. desenvolvimento de novas doenças com complicações graves, para as quais ainda não há tratamento adequado, ii. a crença de que medicamentos provenientes de ervas são inócuos, em contraste com as drogas convencionais, iii. a idéia de que o que é natural só pode ser bom; iv. a atenção especial que os movimentos ecológicos dão para os medicamentos fitoterápicos nos países ocidentais; e v. a crença de que os fitoterápicos são naturalmente superiores às drogas sintéticas. Entretanto, um grande número de plantas medicinais usadas nos países ocidentais não foi submetido a testes científicos rigorosos e sua qualidade é extremamente variável (CAPASSO *et al.*, 2000). Assim, verificar a segurança do consumo desses compostos é de grande importância para a proteção da saúde humana.

Nesse contexto, as plantas do gênero *Piper*, um dos maiores membros da família Piperaceae, utilizadas popularmente como alimentos e temperos, iscas de peixe, venenos de peixe, alucinógenos, inseticidas, óleos, ornamentos, perfumes e medicamentos (BARRET, 1994). O gênero *Piper* possui mais de 1000 espécies distribuídas nos dois hemisférios, onde crescem como ervas, arbustos, ou, menos freqüentemente, como árvores eretas ou sustentadas (JUNQUEIRA *et al.*, 2007), especialmente na Ásia e no Novo Mundo (NUNES *et al.*, 2007).

Dentro do gênero *Piper*, estão as espécies de *Piper cubeba* L., conhecidas no Brasil como pimenta de Java e em inglês como “Cubeb pepper”, utilizadas como plantas medicinais populares na Europa desde a Idade Média, assim como em muitos outros países, incluindo Arábia, Índia, Indonésia e Marrocos (JUNQUEIRA *et al.*, 2007). As frutas da planta são usadas como tempero e também para o tratamento de gonorréia, disenteria, sífilis, dor abdominal, diarreia, enterites e asma (EISAI, 1995; SASTROAMIDJOJO, 1997). A Figura 1 mostra a imagem da *Piper cubeba* e suas sementes.



Figura 1 – Planta *Piper cubeba* e suas sementes.

Fonte: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Piper_cubeba_muda.jpg e http://www.chilicult.com/hot/en/piper_cubeba.html, acesso em 15/10/10.

Da semente da pimenta *Piper cubeba*, foi extraída a cubebina, objeto de estudo deste trabalho, que pertence ao grupo das lignanas, amplamente distribuídas no reino vegetal (SOUZA *et al.*, 2004). As lignanas (do latim lignum = madeira, lenho) são fitoestrógenos encontrados em uma grande variedade de plantas (KRAJČOVÁ *et al.*, 2009). São dímeros formados através do acoplamento oxidativo de álcoois cinâmicos entre si ou destes com ácidos cinâmicos (BARBOSA FILHO, 2004). Foram primeiramente detectadas

em plantas nas quais ajudam na formação de lignina usada na construção da parede celular (SETCHELL *et al.*, 1988). As lignanas são encontradas na maioria das plantas ricas em fibras, como trigo, cevada e aveia; em legumes, como feijão, lentilha e soja; e outros vegetais como alho, aspargo, brócolis e cenoura (SALEEM *et al.*, 2005). Devido a sua extensa distribuição, suas funções biológicas nas plantas ainda não são claras. Como algumas lignanas apresentam potentes propriedades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante e inseticida, elas provavelmente desempenham um papel importante na defesa das plantas contra vários patógenos biológicos (SALEEM *et al.*, 2005).

A cubebina pertence ao grupo das lignanas dibenzilbutirolactônicas, que vêm despertando grande interesse devido a diversas propriedades biológicas que apresentam, como inibição de fatores de agregação plaquetária, atividades antitumoral, antiviral e anti-inflamatórias (MEDOLA *et al.*, 2007). A Figura 2 mostra a estrutura química da cubebina.

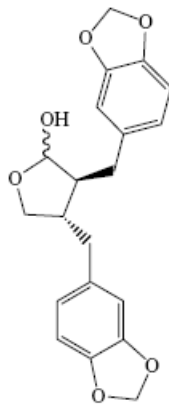


Figura 2 – Estrutura química da cubebina.
Fonte: SOUZA *et al.*, 2005.

Pesquisadores verificaram a presença de diferentes lignanas na planta *Piper cubeba*, sendo que a cubebina foi encontrada em todas as partes (folhas, sementes e caule) (ELFAHMI *et al.* 2007). Estudos mostram que o extrato n-hexano de *Piper cubeba* apresenta significativa atividade leishmanicida *in vitro*, com inibição de mais de 90% das promastigotas de *Leishmania donovani* na concentração de 100 µg/mL por ensaio de citotoxicidade MTT. Já a cubebina, na concentração de 36 µg/mL, mostrou inibição de $79,4 \pm 5,5\%$ das promastigotas *in vitro* (BODIWALA *et al.*, 2007).

Um dos relatos melhor caracterizados a respeito da investigação da ação da cubebina foi proporcionado pelo grupo de Yam *et al.* (2008a). Estes autores verificaram os efeitos da cubebina e quantidades equivalentes encontradas no extrato etanólico da planta

Piper cubeba (denominado P9605) em linhagens celulares de adenocarcinoma de próstata humana dependente de andrógeno (LNCaP) e câncer de próstata insensível a andrógeno (PC-3). Foi encontrado que o extrato P9605 na concentração 30 µg/mL levou a uma redução de 50% da proliferação das células LNCaP, sendo que essa concentração não foi citotóxica em ensaios de citotoxicidade. Com esse resultado, os autores buscaram investigar se a cubebina, a lignana presente em maior quantidade no extrato, era a responsável pelo efeito antiproliferativo observado. Através de análise por HPLC, foi verificado que a cubebina representava aproximadamente 16% do extrato. Assim, 30 µg/mL do extrato continha aproximadamente 5 µg/mL de cubebina. Dessa forma, essa concentração foi testada para averiguar seu potencial antiproliferativo e foi verificado uma diminuição de apenas 25% do crescimento das células LNCaP, o que indica que outros compostos presentes no extrato, além da cubebina, contribuem para o efeito antiproliferativo observado. A análise de apoptose na linhagem LNCaP, sob mesma concentração de cubebina e do extrato revelou aumento do número de células mortas em relação ao controle.

O fato de que somente células LNCaP, que apresentam receptores de andrógenos, terem apresentado alterações quando expostas ao extrato e à cubebina fez com que os autores investigassem a influência destes compostos sob a atividade da enzima 5 α -redutase II (5 α -RII) e quantificação do antígeno específico da próstata (PSA). A enzima 5 α -RII é responsável por converter testosterona em sua forma ativa, a diidrotestosterona (DHT) que tem afinidade por receptores androgênicos, e o PSA é secretado sob estímulo de DHT. Os autores verificaram que a atividade enzimática de 5 α -RII, assim como a secreção de PSA, apresentaram maior redução na presença do extrato do que na presença de cubebina, provavelmente devido a interação de outros compostos presentes no extrato.

Os mesmos autores, em outro trabalho (YAM *et al.*, 2008b), investigaram o efeito antiproliferativo do extrato etanólico de *Piper cubeba* (P9605) em quatro linhagens celulares diferentes: duas linhagens celulares de câncer hormônio-dependente, LNCaP (próstata) e MCF-7 (mama); uma linhagem celular de câncer de mama sem receptor de estrógeno (MDA); e em células primárias epiteliais de próstata humana (PrEC). Encontraram que, exceto nas células MDA, 30 µg/mL do extrato diminuiu significativamente o crescimento celular, induzido por β -estradiol ou diidrotestosterona, de todas as linhagens celulares em pelo menos 50% (YAM *et al.*, 2008b), sendo que as concentrações testadas não eram tóxicas para essas células, como revelado por ensaios de citotoxicidade. Além disso, o extrato P9605 inibiu a atividade de aromatase, que é responsável pela transformação de andrógenos em estrógenos. Esse dado, segundo Carreau *et al.* (2006), pode ser um fator

negativo em relação à segurança da utilização do extrato de *Piper cubeba*, já que concentrações endógenas de estrógeno são importantes para a reprodução masculina. Yam *et al.* (2008b) ainda verificaram que o extrato P9605 é capaz de se ligar a receptores de estrógeno α e β , e possui atividade anti-inflamatória, já que inibe atividade das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2) e 5-lipoxigenase (5-LOX). Ainda foi avaliado se a cubebina, a lignana predominante no extrato de *Piper cubeba*, era a responsável pelos efeitos inibitórios observados. Porém, foi encontrado que a cubebina não afeta a atividade das ciclooxigenases, mas atenuava as ações da 5-lipoxigenase. Esse dado sugere que outros compostos presentes no extrato, além da cubebina, são responsáveis pelas propriedades anti-inflamatórias. Assim, os autores concluem que o extrato de *Piper cubeba* é um candidato de interesse como fitoterápico contra hiperplasia prostática benigna, já que apresenta propriedades antiestrogênica e antiandrogênica, que podem levar a uma diminuição do crescimento da próstata e, por possuir propriedades anti-inflamatórias, pode servir para aliviar seus sintomas dolorosos.

Além dos trabalhos com extratos da planta *Piper cubeba*, existem na literatura outros trabalhos realizados com a cubebina isoladamente. Uma importante propriedade foi avaliada por Bastos *et al.* (1999), que analisaram o potencial tripanocida de sete lignanas isoladas de folhas de *Zanthoxylum naranjilo*, dentre elas a cubebina. Nenhum parasita foi encontrado em amostras de sangue de camundongos contaminados com formas tripomastigotas de duas linhagens diferentes (Bolívia e Y) tratadas com cubebina sob microscopia óptica, nas concentrações 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Outra propriedade da cubebina foi verificada por Bastos *et al.* (2001), que mostraram que a cubebina, na concentração 10 mg/kg, apresentava atividade anti-inflamatória capaz de reduzir em 53% a formação de edema em pata de rato após 2,5 horas da injeção de estímulo inflamatório por carragenina. Ainda no mesmo trabalho, verificaram a atividade analgésica da cubebina, na mesma concentração, através de ensaio de contorções em camundongos induzido por ácido acético 0,6%, em que a cubebina, na mesma concentração, foi eficaz em inibir as contorções em 50% em comparação ao grupo controle. A fim de verificar se a cubebina teria algum efeito antinociceptivo central, Bastos *et al.* (2001) realizaram o teste da placa quente, que mostrou que a cubebina não apresentou nenhum efeito em comparação com o grupo controle, assumindo que a cubebina não tem efeito analgésico no sistema nervoso central. Assim, eles concluíram que a cubebina, um composto não esteroide, apresenta efeitos anti-inflamatório e analgésico similares aos observados em drogas não esteroidais.

Além de buscar compostos que previnam ou tratem doenças, há pesquisadores que buscam compostos que poderiam ser incluídos em produtos cosméticos. Assim, com o objetivo de desenvolver agentes preventivos para o aparecimento de cabelos brancos a partir de fontes naturais, Matsuda *et al.* (2004) verificaram que o extrato etanólico de *Piper nigrum* L. mostrou potente efeito de estimulação da melanogênese. Como consequência deste resultado, lignanas foram isoladas e a cubebina mostrou significativa atividade estimulatória da melanogênese sem nenhum efeito na proliferação celular, em cultura de células B16 de melanoma de roedores (MATSUDA *et al.*, 2004). Hirata *et al.* (2007) verificaram que extratos etanólicos obtidos de diferentes partes de seis espécies de *Piper* nas concentrações de 1 e 2 mg/mL inibiram 50% da atividade da testosterona 5 α -redutase, dados que estão de acordo com os resultados obtidos com o extrato etanólico de *Piper cubeba*, P9605, apresentados por Yam *et al.* (2008a). Dessa forma, é esperado que agentes que tanto estimulem a melanogênese quanto inibam a atividade da testosterona 5 α -redutase atuem como ingredientes preciosos em produtos cosméticos para prevenção de aparecimento de cabelos brancos e calvície (HIRATA *et al.*, 2007).

A fim de assegurar a possível utilização terapêutica do extrato bruto de *Piper cubeba*, Junqueira *et al.* (2007) investigaram seu potencial mutagênico e genotóxico, através do teste do micronúcleo com eritrócitos e reticulócitos policromáticos e ensaio do cometa *in vivo*. Nesse trabalho, foi verificado que altas doses do extrato bruto de *Piper cubeba*, nas concentrações 1,0 e 1,5 g/kg, induziram um significativo aumento no número de células com danos no DNA e com micronúcleos, indicando que o extrato, ou seus metabólitos, apresentaram toxicidade genética em células de roedores. Esses dados mostram que mais estudos são necessários para assegurar a utilização do extrato da *Piper cubeba* e da cubebina pela população, já que dados de toxicidade já foram observados.

A fim de potencializar os efeitos terapêuticos da cubebina, foram desenvolvidos alguns compostos derivados e estudos verificaram que a acetilação e a aminação da cubebina foram eficientes em aumentar sua atividade analgésica, assim como sua atividade anti-inflamatória (SOUZA *et al.*, 2004). A (-)-Hinokinina, derivado oxidado da cubebina, não apresentou efeito genotóxico e apresentou atividade antigenotóxica frente a indução de danos cromossômicos pela exposição à doxorubicina, pela análise de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de sangue periférico de ratos *Wistar* (MEDOLA *et al.*, 2007). Ainda, destaca-se a potente atividade tripanocida da (-)-Hinokinina contra epimastigotas, sendo mais eficiente que o benznidazole, droga padrão utilizada no tratamento da doença de Chagas (SOUZA *et al.*, 2005).

Devido às propriedades terapêuticas promissoras que a cubebina e seus derivados vêm apresentando, é de grande importância verificar a segurança da sua utilização, do ponto de vista do potencial mutagênico e/ou tóxico, já que está presente em plantas do gênero *Piper*, utilizadas na medicina tradicional. Não há estudos sobre mutagenicidade da cubebina e existem poucos dados sobre a sua citotoxicidade. Existem apenas estudos sobre genotoxicidade e efeito protetor de derivados sintéticos da cubebina e sobre extratos da planta *Piper cubeba*, sendo, portanto, dados importantes para assegurar seu consumo *in natura* ou através de medicamentos.

Para avaliar substâncias naturais, ou sintéticas, vários testes são utilizados, incluindo os sistemas-teste de curta duração, que incluem as culturas de células de mamíferos *in vitro* na avaliação de efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos (TAKAHASHI, 2003).

Embora o sistema *in vivo* reproduza com mais semelhança as condições humanas, por efeito da metabolização, o sistema *in vitro* tem se mostrado eficaz na detecção de agentes ambientais mutagênicos e antimutagênicos. As vantagens da utilização das células de mamíferos em cultura se devem à facilidade de padronização das condições experimentais, como a densidade populacional, pH, temperatura e composição do meio de cultivo; possibilidade de aplicação do tratamento em qualquer fase do ciclo celular, além de serem ensaios econômicos e de boa reprodutibilidade; e o material é relativamente uniforme em seus requisitos metabólicos e em seu comportamento (RABELLO-GAY; RODRIGUES, 1991).

Antes de analisar possíveis danos no DNA induzidos pelo composto em estudo, é extremamente importante identificar a partir de qual concentração esse composto é citotóxico, uma vez que quando ocorre morte celular, os dados obtidos podem estar mascarados ou subestimados. Assim, através de ensaios de citotoxicidade é possível identificar as concentrações citotóxicas e conseqüentemente excluí-las dos próximos ensaios de mutagenicidade e genotoxicidade. Com essa finalidade, o ensaio de citotoxicidade MTT analisa a citotoxicidade, viabilidade e proliferação celular. Este método baseia-se na redução do sal de tetrazolium MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), de coloração amarela, em cristais de formazan (1-(4,5-dimetiltiazol-2il)-3,5-difenilformazan), de coloração roxa, que pode ser analisado colorimetricamente após dissolução com dimetilsulfóxido (DMSO). A reação de redução do MTT é geralmente atribuída à atividade mitocondrial, mas também tem sido relatado a enzimas não mitocondriais, assim como a endossomas e a lisossomos (VELLONEN *et al.*, 2004). Dessa forma, a reação ocorre apenas em células vivas.

Outro teste que pode ser utilizado para verificar o efeito citotóxico de drogas nas células é o ensaio de cinética de proliferação celular, que é capaz de identificar se o composto em estudo é capaz de alterar o crescimento celular. Assim, é possível verificar se o tratamento das células com o composto é capaz de atrasar ou acelerar o ciclo celular. Para isso, são realizadas contagens celulares em câmara de Neubauer em diferentes tempos de tratamento (24, 48, 72 e 96 horas) e uma curva de crescimento é obtida de acordo com as contagens realizadas. É importante verificar o efeito de um determinado composto na proliferação celular, já que uma das consequências da exposição a xenobióticos para as células é o distúrbio do ciclo celular, o qual, uma vez alterado, pode interferir nos resultados obtidos, principalmente em ensaios direcionados a análises de alterações genéticas, dependentes do ciclo celular.

Vários fatores podem produzir alterações na proliferação celular, por isso, existe a necessidade de avaliar se o tratamento com o composto em estudo está levando à morte celular. A compreensão do processo de morte celular é essencial para o pesquisador que realiza cultivo de células, independente do seu fim e da sua especialidade, pois é necessária para o estabelecimento das melhores condições de cultivo e de tratamentos celulares, já que alterações na sobrevivência das células podem, conseqüentemente, modular o efeito de interesse (MALUF; POMPÉIA, 2005). Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: autofagia, necrose, mitose catastrófica, senescência e apoptose (OKADA; MAK, 2004). O termo apoptose foi proposto pela primeira vez por Kerr *et al.* (1972) e é definido pelas características morfológicas das células em morte, que incluem formação de bolhas na membrana citoplasmática, condensação da cromatina, fragmentação nuclear, perda da adesão, encolhimento celular, formação de corpos apoptóticos e fagocitose dos corpos apoptóticos pelas células vizinhas ou macrófagos (BURZ *et al.*, 2009). A morte celular por apoptose ocorre normalmente durante o desenvolvimento e envelhecimento e atua como um mecanismo homeostático para manter as populações celulares nos tecidos (NICHOLSON; THORNBERRY, 1997; ZIMMERMANN, *et al.*, 2001; BARIŠIĆ *et al.*, 2003; ELMORE, 2007). Assim, o processo de apoptose remove do organismo as células indesejadas, danificadas ou infectadas por vírus, e quando esse processo é perturbado, podem ocorrer doenças, como câncer, aterosclerose e doenças autoimunes (BARIŠIĆ *et al.*, 2003; VERMEULEN *et al.*, 2005). As caspases são uma família de proteínas do tipo cisteína protease produzidas em quase todas as células animais e que desempenham papel central na maioria das vias de morte que levam à apoptose (LAUNAY *et al.*, 2005). Existem dois tipos de caspases, que são classificadas de acordo com seu pró-

domínio e seu papel na apoptose. Caspases iniciadoras (por exemplo: caspase-8, caspase-9) que possuem pró-domínios longos, estão envolvidas na iniciação da cascata proteolítica. Caspases efetoras (por exemplo: caspase-3, caspase-7) apresentam pró-domínios curtos ou inexistentes, e são responsáveis pela clivagem de substratos (GRIVICICH *et al.*, 2007). Atualmente, pesquisadores indicam que há duas principais vias apoptóticas: a via extrínseca (ou por receptor de morte) e a via intrínseca (ou mitocondrial) (OKADA; MAK, 2004; JIN e EL-DEIRY, 2005; ELMORE, 2007). A via extrínseca opera via receptores de morte na superfície celular e a via intrínseca depende da ativação da mitocôndria pela perda de sinais de fatores de crescimento ou em resposta a estímulo letal a partir do interior da célula (BURZ *et al.*, 2009).

Uma estratégia muito simples e barata para verificar se uma droga é capaz de induzir morte celular por apoptose em cultura de células é através da visualização da morfologia nuclear. Para isso, as células são cultivadas em placas de cultura, contendo em cada poço uma lamínula. As células recebem meio de cultura com o composto em estudo e após determinado tempo de tratamento, as lamínulas são retiradas dos poços e passam por sucessivos banhos em alcoóis em concentrações decrescentes, são fixadas e coradas com laranja de acridina. A análise, baseada na morfologia nuclear, distingue as células apoptóticas, que apresentam cromatina condensada e fragmentada (KASTAN *et al.*, 1995), das células normais com núcleos uniformes, como mostra a Figura 3. As lâminas são posteriormente analisadas em microscópio de fluorescência.

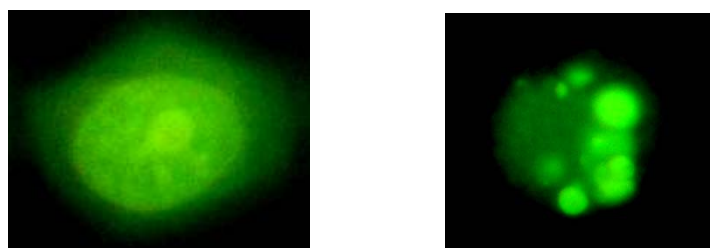


Figura 3 – Análise morfológica de uma célula normal (esquerda) e uma célula apoptótica (direita), visualizadas em microscópio de fluorescência em aumento de 400x.

Além dos testes de citotoxicidade e morte celular, para avaliar a segurança de produtos naturais é de grande importância realizar ensaios de mutagenicidade, a fim de verificar se o tratamento com o composto em estudo é capaz de induzir danos no DNA. Para

medir danos cromossômicos, as análises mais detalhadas são aquelas provenientes da observação de cromossomos e contagem de aberrações em metáfases, porém essas técnicas são complexas e consomem muito tempo. Assim, estimulou-se o desenvolvimento de técnicas mais simples para medir danos cromossômicos. Em virtude disso, Heddle (1973) e Schmid (1975) desenvolveram o Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese, que é um dos métodos preferidos para avaliar danos cromossômicos, pois permite medir perdas e quebras cromossômicas fielmente. Este método proporciona uma análise mais detalhada e simples para medir danos cromossômicos (FENECH, 2000). Uma célula que sofreu um evento de dano no DNA somente vai poder expressar esse dano como um micronúcleo (MN) se completar pelo menos um ciclo de divisão nuclear depois desse evento (FENECH, 1997). Por esse motivo, foi desenvolvido um método especial que identifica as células pela aparência binucleada quando a citocinese é bloqueada pela Citocalasina-B (Cyt-B), um inibidor da polimerização da actina, requerida para a formação do anel de microfilamentos (FENECH, 2000). Desta forma, fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros atrasam ou perdem sua migração durante a divisão celular, ficando retidos no citoplasma na forma de um micronúcleo, como mostra a Figura 4.

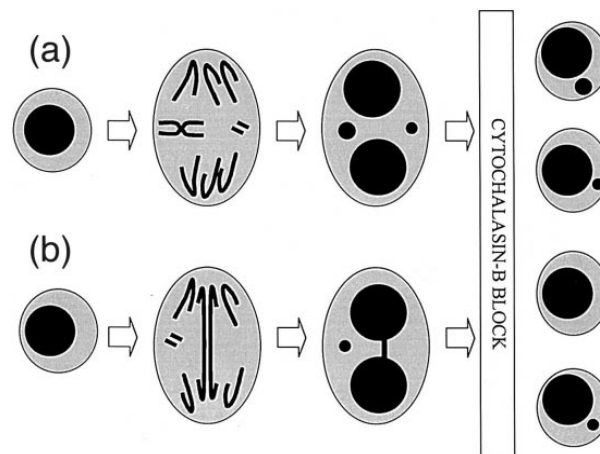


Figura 4 – (a) A origem de MN de cromossomos inteiros atrasados e fragmentos de cromossomos acêntricos em anáfase. (b) A formação de ponte nucleoplasmática de um cromossomo dicêntrico no qual os centrômeros são afastados para pólos opostos da célula; a formação de MN pelo acompanhamento de fragmentos de cromossomos acêntricos também é ilustrado. O papel crítico da citocalasina-B de bloquear a divisão celular no estágio binucleado é também indicado neste diagrama. O exemplo mostrado é de uma célula hipotética com apenas dois pares de cromossomos.

Fonte: Fenech (2000).

Dessa forma, no Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese os dados obtidos não são confundidos por alteração da cinética de divisão celular causada por citotoxicidade do agente testado ou por condições inadequadas das culturas (FENECH, 2000).

Uma das vantagens desse método é tornar possível a medida de extensão e progressão da divisão nuclear em populações de células em divisão. Isso pode ser atingido de forma simples pela medida da frequência de células mononucleadas (MI), binucleadas (MII), trinucleadas (MIII) e tetranucleadas (MIV) depois de um tempo definido seguido da adição de Citocalasina-B. O Índice de Divisão Nuclear (IDN) é medido usando a seguinte fórmula sugerida por Eastmond e Tucker (1989):

$$\text{IDN} = (\text{MI} + 2\text{MII} + 3\text{MIII} + 4\text{MIV}) / \text{N}$$

Onde MI a MIV representam o número de células com um a quatro núcleos e N representa o número total de células analisadas.

O IDN proporciona um importante dado sobre o efeito citostático de um agente químico ou físico particular, ajuda a identificar moléculas que podem estimular a divisão celular e ainda poderia ser utilizado para avaliar imunocompetência por medida da resposta mitogênica de linfócitos (FENECH, 1997).

Recentemente, a reação em cadeia da polimerase em tempo real (*real time PCR – real time polymerase chain reaction*) tem emergido como uma metodologia robusta e amplamente utilizada para investigação biológica, já que consegue detectar e quantificar quantidades muito pequenas de sequencias específicas de ácidos nucleicos (VALASEK; REPA, 2005). Dessa forma, é possível detectar transcritos de genes de interesse obtidos após tratamento das células com o composto em estudo, a fim de conhecer seus mecanismos de ação.

Assim, várias são as ferramentas disponíveis para obtenção de informações valiosas em relação à segurança da utilização de compostos naturais. Tendo em vista que pesquisadores vêm identificando diversas propriedades benéficas da cubebina, em experimentos *in vitro* e *in vivo*, verificar a sua toxicidade é um dos primeiros passos para assegurar sua utilização em humanos.

Uma etapa fundamental em um trabalho é a escolha da linhagem celular a ser utilizada, que deve estar de acordo com os objetivos traçados. Assim, no presente trabalho,

com o objetivo de avaliar a segurança da utilização da cubebina, uma lignana extraída da pimenta *Piper cubeba*, é de interesse estudar os seus efeitos em uma linhagem celular proveniente de algum órgão do trato digestivo, já que a *Piper cubeba* pode fazer parte da alimentação. Dessa forma, foi escolhida a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) e a ocorrência de possíveis danos induzidos pela cubebina em células intestinais puderam ser verificados. Além disso, o adenocarcinoma colorretal é um dos cânceres mais comuns e a segunda causa de morte por câncer no mundo ocidental (KAPITANOVIĆ *et al.*, 2006), sendo importante o estudo de novos compostos em busca de novas terapias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo verificar a segurança da utilização da cubebina, através da análise de citotoxicidade, mutagenicidade, cinética de proliferação celular, indução de apoptose e expressão gênica em cultura de células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) tratadas com cubebina, extraída da semente da pimenta *Piper cubeba*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) avaliar o efeito citotóxico da cubebina em tratamentos por 24, 48 e 72 horas, através do ensaio de citotoxicidade MTT, e determinar as concentrações que serão utilizadas nos demais experimentos;
- b) avaliar o potencial mutagênico da cubebina através do ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese após 27 horas de tratamento;
- c) verificar a cinética de proliferação de células HT-29 tratadas com cubebina através de contagens celulares por 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento;
- d) avaliar o potencial de indução de apoptose após 24 horas de tratamento com cubebina através da análise do padrão de fragmentação do DNA, pela técnica da laranja de acridina *in situ*;
- e) analisar a expressão dos genes *CASP8* e *CASP9* através da técnica RT-PCR em tempo real após 12 de tratamento com cubebina.

3 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

3.1 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, MUTAGÊNICO E APOPTÓTICO DA CUBEBINA E SUA INFLUÊNCIA NA PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HT-29

Artigo a ser submetido ao periódico *Toxicology in vitro*

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO, MUTAGÊNICO E
APOPTÓTICO DA CUBEFINA E SUA INFLUÊNCIA NA PROLIFERAÇÃO DE
CÉLULAS HT-29**

**INVESTIGATION OF CYTOTOXIC, MUTAGENIC, AND APOPTOTIC
POTENTIAL OF CUBEFIN AND ITS INFLUENCE ON PROLIFERATION OF HT-
29 CELLS**

Niwa, AM¹; de Paula, NP¹; Sartori, D¹; Maistro, EL²; Ribeiro, LR³; Mantovani, MS⁴

Resumo

Produtos naturais que apresentam propriedades benéficas para o organismo humano são de grande interesse dos pesquisadores. A cubebina, extraída da semente da pimenta *Piper cubeba*, vem mostrando resultados promissores, como significativo potencial anti-inflamatório, analgésico e tripanocida. A fim de investigar a segurança da utilização desta lignana, o presente trabalho teve como objetivo analisar a citotoxicidade, mutagenicidade, cinética de proliferação celular, indução de apoptose e expressão gênica em células de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) tratadas com cubebina. O ensaio de citotoxicidade MTT foi realizado para determinação das concentrações a serem utilizadas. Nesse ensaio foi verificado que apenas a maior concentração de cubebina testada (100 µg/mL) foi citotóxica. Dessa forma, nos demais testes, a cubebina foi avaliada nas concentrações 1, 5 e 10 µg/mL. Foi verificado que a cubebina não é mutagênica no ensaio do micronúcleo, não altera a cinética de crescimento celular e não induz apoptose em tratamento por 24 horas. A expressão dos genes *CASP8* e *CASP9* não foi alterada em tratamento por 12 horas com cubebina 10 µg/mL e 25 µg/mL. A partir dos dados observados, pode-se inferir que a cubebina, nas condições testadas, é citotóxica em concentrações a partir de 100 µg/mL, sugerindo que seja evitado o uso dessa concentração para seres humanos. Porém, concentrações menores não apresentaram atividades prejudiciais (mutagenicidade e alteração de ciclo celular), contribuindo para seu uso seguro nas concentrações estudadas para fins farmacológicos.

Palavras-chave: Cubebina. Células. HT-29. Citotoxicidade. Mutagenicidade.

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

² Departamento de Fonoaudiologia, Faculdade de Filosofia e Ciências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Marília, São Paulo, Brasil

³ Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Rio Claro, São Paulo, Brasil.

⁴ Departamento de Biologia Geral – CCB. Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário - P.O. Box 6001, Londrina, Paraná, Brazil - CEP: 86051-990 - e-mail: bioms@uel.br - Phone: 55 43 3371-4977

1 Introdução

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e, por um longo tempo, minerais, plantas e produtos animais foram as principais fontes de produção de medicamentos (RATES, 2001). Assim, apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda fornecem importante contribuição para a saúde (CALIXTO, 2000).

Apesar da ampla utilização de produtos naturais pela população, muitas plantas medicinais nunca passaram por testes científicos rigorosos e suas qualidades são extremamente variáveis (CAPASSO *et al.* 2000). Em virtude da utilização indiscriminada de produtos naturais pela população, cresce a importância de estudos que avaliem a citotoxicidade e mutagenicidade desses compostos a fim de contribuir com dados em relação à segurança do seu consumo.

Nesse contexto, a cubebina é uma lignana extraída da semente da pimenta *Piper cubeba*, conhecida como pimenta de Java ou em inglês como “Cubeb pepper”. A *Piper cubeba* é uma planta medicinal extensamente utilizada na Europa desde a Idade Média, assim como em muitos outros países, incluindo Arábia, Índia, Indonésia e Marrocos (JUNQUEIRA *et al.*, 2007). Suas frutas, além de serem usadas como temperos, também são utilizadas no tratamento de dor abdominal, asma, diarreia, disenteria, gonorréia, enterites e sífilis (EISAI, 1995; SASTROAMIDJOJO, 1997).

A cubebina, objeto de estudo deste trabalho, pertence ao grupo das lignanas dibenzilbutirolactônicas, amplamente distribuídas no reino vegetal e que tem sido investigada por pesquisadores de diversas áreas, levando ao isolamento de vários compostos com atividades biológicas de interesse (SOUZA *et al.*, 2004). Existe uma variedade de lignanas que apresentam atividades anticâncer, antioxidante, antimicrobial, anti-inflamatória, imunossupressora, antiviral e hepatoprotetora (KERNAN *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2007; SALEEM *et al.*, 2005).

Estudos mostram que a cubebina apresenta diversas propriedades benéficas, destacando-se as atividades tripanocida (BASTOS *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2005), analgésica, anti-inflamatória (BASTOS *et al.*, 2001), leishmanicida (BODIWALA *et al.*, 2007) e antiproliferativa (YAM *et al.* 2008). Devido a promissora utilidade terapêutica dessa lignana, o objetivo do presente trabalho é analisar a citotoxicidade, mutagenicidade, cinética de proliferação celular, indução de apoptose e expressão gênica em células HT-29

(adenocarcinoma de cólon humano) tratadas com cubebina, a fim de buscar dados que contribuam com a segurança de sua utilização.

2 Materiais e Métodos

2.1 Cubebina

A cubebina, testada neste estudo, foi obtida do extrato etanólico bruto das sementes da planta *Piper cubeba* e fornecida pelo Prof. Dr. Edson Luis Maistro, da Universidade Estadual Paulista, Marília-SP. A cubebina foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), sendo que a concentração de DMSO não ultrapassou 0,25% em cultura.

2.2 Agentes Indutores de Danos no DNA

Para os ensaios de citotoxicidade MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) e cinética de proliferação celular foi utilizado como controle de indução de danos no DNA a Doxorubicina (Adriblastina®) (Pharmacia) na concentração de 1 µg/mL, diluída em meio de cultura.

No ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese os danos no DNA foram induzidos pelo mutágeno de ação direta metilmetanosulfonato (MMS) (Acros Organics), que foi dissolvido em DMSO e diluído em meio de cultura para concentração final de 200 µM (concentração em cultura de DMSO 0,2%).

Para a avaliação de indução de apoptose em lamínula, foi utilizado como agente indutor de apoptose o quimioterápico Camptotecina (Acros Organics), que foi dissolvido em DMSO e diluído em meio de cultura para concentração final de 15 µg/mL (concentração em cultura de DMSO 1%).

2.3 Linhagem Celular HT-29

A cubebina está presente em pimentas do gênero *Piper* e, portanto, pode fazer parte da alimentação. Por esse motivo, para a realização dos experimentos foi escolhida a linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano (HT-29), já que o intestino é um órgão integrante do trato digestivo.

A linhagem de células HT-29, utilizada neste estudo, foi gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho do CPQBA, pela Universidade de Campinas – UNICAMP. Elas foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm² contendo meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco), ao qual foi adicionada solução antibiótica-antimicótica 100X (Gibco), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco), e mantidas em estufa a 5% CO₂ a 37°C (Ultrasafe HF 212 UV).

Para a realização dos experimentos, foi feita uma padronização para que fossem utilizadas quantidades proporcionais de células em relação à área de crescimento celular e ao volume de meio de cultura contendo tratamento em todos os ensaios. Essa padronização foi respeitada, porque foram observadas variações nos resultados quando ocorriam alterações nessa proporção em experimentos piloto (dados não mostrados). Dessa forma, para os ensaios de citotoxicidade MTT, micronúcleo, cinética de proliferação celular, indução de apoptose e expressão gênica foram semeadas uma quantidade aproximada de $1,6 \times 10^4$ células/cm²/250 µL de meio de cultura.

2.4 Ensaio de Citotoxicidade MTT

O ensaio de citotoxicidade MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) (Invitrogen) foi baseado no protocolo descrito por Mossmann (1983). Foi utilizada uma placa de cultura com 24 poços, onde foram semeadas 3×10^4 células em cada poço, exceto nos poços referentes ao controle sem células (branco). Após 24 horas para estabilização da cultura (5% CO₂, 37°C), o meio de cultura foi retirado dos poços e foram adicionados os respectivos tratamentos: a) controle com células (0,25% de DMSO, correspondente a quantidade de DMSO presente na maior concentração de cubebina testada); b) controle de indução de citotoxicidade com células (Doxorrubicina na concentração 1 µg/mL); e c) cubebina, nas concentrações 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL. Os tratamentos permaneceram em cultura por 24, 48 e 72 horas. Após estes períodos, o meio de cultura foi retirado dos poços e foi adicionada solução de MTT na concentração 0,167 mg/mL, diluído em meio de cultura sem soro. A placa foi novamente incubada a 5% CO₂, 37°C por 4 horas. Após este período, a solução de MTT foi retirada por completo dos poços e foi adicionado DMSO para diluir os cristais de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em Espectrofotômetro (Uniscience) a 550 nm. Foram realizadas três repetições experimentais independentes, sendo que cada tratamento foi realizado em quadruplicata. A análise estatística foi realizada com os valores das absorbâncias obtidas em cada tratamento comparado com o

grupo controle com células. A partir dos valores das absorbâncias obtidas, foi realizado o cálculo da porcentagem de viabilidade celular, dada pela fórmula (HUANG *et al.*, 2005):

$$\text{Porcentagem de viabilidade celular} = \frac{A_{\text{tratado}} - A_{\text{branco}}}{A_{\text{controle}} - A_{\text{branco}}} \times 100$$

Onde, A_{tratado} corresponde à média da absorbância obtida no grupo tratado com cubebina; A_{branco} corresponde à média da absorbância obtida no grupo controle sem células; e A_{controle} corresponde à média da absorbância obtida no grupo controle com células.

2.5 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese

Foram semeadas 10^6 células em cada frasco de cultura de 25 cm². Estas foram cultivadas por 24 horas para estabilização da cultura. A seguir, foram realizados os tratamentos de acordo com os protocolos experimentais de mutagenicidade: a) controle (meio de cultura com 0,025% de DMSO, correspondente a quantidade de DMSO presente na maior concentração de cubebina testada); b) controle de indução de danos no DNA (Metilmetanosulfonato – MMS – na concentração 200 µM); e c) tratamentos com cubebina em três diferentes concentrações (1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL). Para a obtenção de células binucleadas foi adicionado juntamente com os tratamentos a Citocalasina-B (Cyt-B) (Sigma Aldrich) em uma concentração final de 3 µg/mL em cultura por um período de 27 horas. Após este período, as células foram coletadas de acordo com o protocolo de Oliveira *et al.* (2002) com modificações. O meio de cultura foi reservado em tubos cônicos e as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas com Tripsina-EDTA 0,1% (Gibco), a 37°C, inativadas com o meio de cultura reservado e centrifugadas (5 minutos, 1000 rpm). O sobrenadante foi descartado e as células foram homogeneizadas delicadamente com solução hipotônica de citrato de sódio 1%. Foi adicionado formaldeído à suspensão celular, que foi imediatamente homogeneizada. As células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante foi descartado e foi adicionado fixador metal ácido/acético (3:1) ao pellet. Após 10 minutos com o fixador, as células foram centrifugadas e parte do sobrenadante foi descartado, deixando aproximadamente 0,5 mL para ressuspender as células e montar as lâminas. A coloração das lâminas foi feita com Giemsa 5%. Foram analisadas 1000 células binucleadas por tratamento em microscopia óptica, com objetiva de 400x. Para a análise, foram contadas apenas as células binucleadas com a membrana nuclear intacta, sendo que os dois núcleos

principais devem estar totalmente separados e ser distinguidos claramente. O micronúcleo, presente na célula binucleada, deve ter a mesma cor do núcleo (podendo ser ocasionalmente mais escuro), deve ter de 1/16 a 1/3 do diâmetro dos núcleos principais, não pode ser refringente e não pode estar conectado ou sobreposto ao núcleo principal, portanto, seus limites nucleares devem ser distinguidos facilmente. Esses critérios seguem o método de Fenech (2000). Os experimentos foram realizados em três repetições.

2.5.1 Índice de divisão nuclear (IDN)

Nas mesmas lâminas confeccionadas para análise de células binucleadas com micronúcleo, foi possível fazer a análise do Índice de Divisão Nuclear (IDN) através de contagem de células apresentando diferentes quantidades de núcleos. Essa análise é importante para verificar se a droga testada está interferindo na cinética de divisão celular, o que poderia ocasionar desvios na análise das lâminas. O IDN é medido usando a seguinte fórmula sugerida por Eastmond e Tucker (1989):

$$\text{IDN} = (\text{MI} + 2\text{MII} + 3\text{MIII} + 4\text{MIV}) / \text{N}$$

Onde MI a MIV representam o número de células com um a quatro núcleos e N representa o número total de células analisadas (500 células por tratamento). Foram analisadas as três repetições de todos os tratamentos realizados no ensaio do micronúcleo.

2.6 Ensaio de Cinética de Proliferação Celular

Para avaliar as possíveis alterações do ciclo celular, foi realizada a cinética de proliferação através do número de células expostas à cubebina por 24, 48, 72 e 96 horas. Foram semeadas $1,6 \times 10^5$ células por tubo de cultura de 10 cm² juntamente com seus respectivos tratamentos: a) controle (meio de cultura com 0,025% de DMSO); b) controle de indução de danos no DNA (Doxorrubicina 1 µg/mL); e c) tratamentos com cubebina em 3 concentrações: 1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL. Após 24, 48, 72 e 96 horas de tratamento, as células foram tripsinizadas (Tripsina-EDTA 0,1%) (Gibco) e contadas em câmara de Neubauer. Foram semeados quatro tubos de cultura para cada tratamento, correspondente a cada tempo de tratamento. Dessa forma, um tubo de cada tratamento foi contado por dia, durante os quatro dias. A curva de proliferação celular foi montada de acordo com os dados

obtidos nas contagens das células nos quatro tempos de tratamento. Foram realizadas três repetições experimentais independentes.

2.7 Avaliação de Indução de Apoptose em Laminula – Técnica da Laranja de Acridina *In situ*

Para a avaliação de indução de apoptose, foram cultivadas $1,4 \times 10^4$ células sobre uma laminula em cada poço, em uma placa de cultura de 6 poços. Após 24 horas de estabilização, o meio de cultura foi retirado dos poços e foram adicionados os respectivos tratamentos: a) controle (meio de cultura com 0,025% de DMSO); b) controle de indução de apoptose (Camptotecina 15 $\mu\text{g/mL}$); c) tratamentos com cubebina em 3 concentrações: 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$. Após 24 horas de tratamento, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com PBS, que foi descartado. Foi retirada uma laminula por vez para passar pelos seguintes procedimentos: fixação em fixador Carnoy por 5 minutos e mergulhos sucessivos em etanol 95%, 75%, 50% e 25%. Em seguida, a laminula foi colocada em tampão McIlvaine pH 3,8 por 5 minutos e a coloração foi feita em solução de laranja de acridina na concentração 0,01% por 5 minutos. Para a montagem da lâmina, a laminula foi invertida sobre uma lâmina limpa contendo uma gota de tampão McIlvaine e foi selada com esmalte de unha. A lâmina foi mantida em uma caixa escura juntamente com um papel filtro ou algodão umedecido. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (filtro de excitação de 420-490 nm e filtro de barreira de 520 nm) (Nikon), onde foram contadas 500 células por tratamento, distinguindo as células normais das apoptóticas. Este protocolo segue o modelo de Rovozzo e Burke (1973). Foram realizadas três repetições experimentais independentes.

A análise foi baseada na morfologia nuclear das células, sendo que uma célula normal contém o núcleo intacto e uniforme e uma célula apoptótica apresenta a cromatina condensada e fragmentada.

2.8 RT-PCR em Tempo Real

Para avaliar a expressão dos genes pró-apoptóticos *CASP8* e *CASP9*, foram cultivadas $0,5 \times 10^6$ células HT-29 em cada frasco de cultura de 25 cm^2 para crescimento por um ciclo celular (24 horas) para estabilização. Após este período, as células foram tratadas por um período de 12 horas da seguinte forma: a) controle (meio de cultura com 0,0625% de DMSO); e b) tratamentos com cubebina em 2 concentrações: 10 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$. Após o período de tratamento, as células foram tripsinizadas e seu RNA total foi extraído com Trizol

LS (Invitrogen), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA extraído foi ressuspendido em água DEPC (Invitrogen) e tratado com DNase I Amplification Grade (Invitrogen). Posteriormente, uma parte da amostra foi encaminhada para leitura em espectrofotômetro para cálculo da concentração de RNA e para verificar a pureza da amostra e outra parte foi encaminhada para eletroforese em gel de agarose 0,8% a fim de verificar a sua integridade. A síntese de cDNA foi feita a partir de 1 µg de RNA, com oligo(dT) e com a enzima transcriptase reversa (M-MLV – Invitrogen, Life Technologies). O cDNA (2 µL) foi encaminhado para a reação de PCR em tempo real realizada no termociclador PTC 200 DNA Engine Cycler, usando o sistema de detecção Chromo 4 (MJ Research- BIO RAD) com os primers *CASP8* e *CASP9*. A amplificação dos fragmentos foi detectada através da fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBR Green contido no kit (Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG - Invitrogen). As condições da PCR no termociclador foram as seguintes: um passo inicial a 50°C por 2 min, seguido de 95° por 3 minutos, 39 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 segundos. Os tratamentos foram realizados em duas repetições biológicas e em três repetições mecânicas. Neste trabalho os dados foram normalizados com o gene de referência gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GPDH*). Os primers utilizados e suas referências estão representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Sequência de *primers* utilizados na reação de PCR em tempo real.

Gene	Primers	Referências
<i>GPDH</i>	F:5' ACAAGATTGTGAAGGTCGGTGTCA 3' R:5' AGCTTCCCATTCTCAGCCTTGACT 3'	SUGAYA <i>et al.</i> , 2005 com modificações
<i>CASP8</i>	F:5' GCAAAAGCACGGGAGAAAGT 3' R:5' TGCATCCAAGTGTGTTCCATT3'	CASTANEDA e ROSIN-STEINER, 2006
<i>CASP9</i>	F:5' GCTCTTCCTTTGTTCATCTCC 3' R:5' GTTTTCTAGGGTTGGCTTCG 3'	CHEN <i>et al.</i> , 2009

2.9 Análise Estatística

Os dados obtidos nos ensaios de citotoxicidade MTT, cinética de proliferação celular, micronúcleo e indução de apoptose foram analisados pelo teste estatístico

ANOVA seguido de Dunnett, através do programa GraphPad InStat, considerando $p < 0,05$, comparando os tratamentos com diferentes concentrações de cubebina com o grupo controle.

Os níveis de expressão dos genes em estudo foram determinados pelo método de Pfaffl *et al.* (2001), com análise estatística realizada através do Software REST-384 (PFAFFL *et al.*, 2002).

3 Resultados

3.1 Ensaio de Citotoxicidade MTT

A leitura das absorbâncias do ensaio de citotoxicidade MTT medida espectrofotometricamente, mostrou que as células tratadas com cubebina nas concentrações 1 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$, em tratamentos por 24, 48 e 72 horas, tiveram uma absorbância próxima a do grupo controle, mostrando que essas concentrações não foram citotóxicas. Por outro lado, a concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ foi citotóxica nos três tempos de tratamento, por apresentar diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Os valores das absorbâncias foram convertidos para porcentagem de viabilidade celular e estão representados na Figura 1. Para os demais ensaios, a concentração citotóxica foi descartada, já que os resultados podem ser alterados quando há morte celular, mascarando possíveis respostas celulares de interesse. Dessa forma, foram utilizadas as concentrações 1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$ e 10 $\mu\text{g/mL}$ nos demais ensaios.

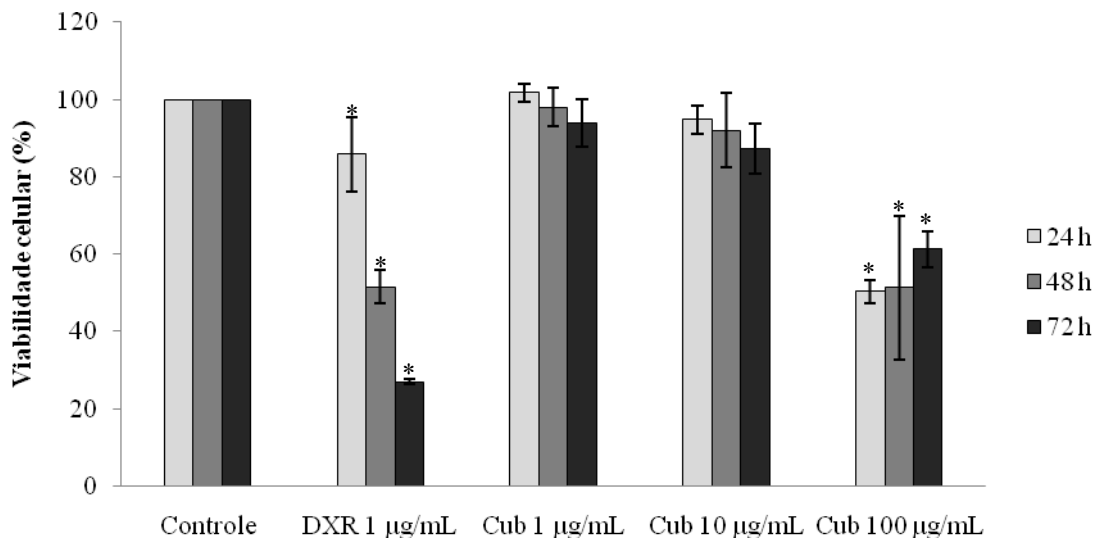


Figura 1 – Porcentagem de viabilidade celular observada no ensaio MTT após 24, 48 e 72 horas de tratamentos com a cubebina.

Controle: meio de cultura com 0,25% de DMSO; **DXR 1 µg/mL:** Doxorrubicina 1 µg/mL (agente indutor de danos no DNA); **Cub 1 µg/mL:** Cubebina 1 µg/mL; **Cub 10 µg/mL:** Cubebina 10 µg/mL; **Cub 100 µg/mL:** Cubebina 100 µg/mL;

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

3.2 Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese e IDN

A Figura 2 mostra os dados obtidos pela análise da mutagenicidade da cubebina pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese e os dados obtidos pelo Índice de Divisão Nuclear (IDN). O número de células binucleadas com micronúcleo detectado nos grupos tratados com cubebina foi próximo ao do grupo controle, não havendo diferença estatisticamente significativa entre eles. Portanto, a cubebina não apresentou atividade mutagênica nas três concentrações testadas (1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL) em células HT-29 em tratamento por 27 horas.

Nenhuma das três concentrações de cubebina testadas alterou o IDN das células HT-29 em tratamento por 27 horas em comparação com o grupo controle. Isso significa que o tratamento das células com cubebina não alterou o padrão de divisão nuclear, dado que confere maior segurança quanto à contagem de células binucleadas com micronúcleo.

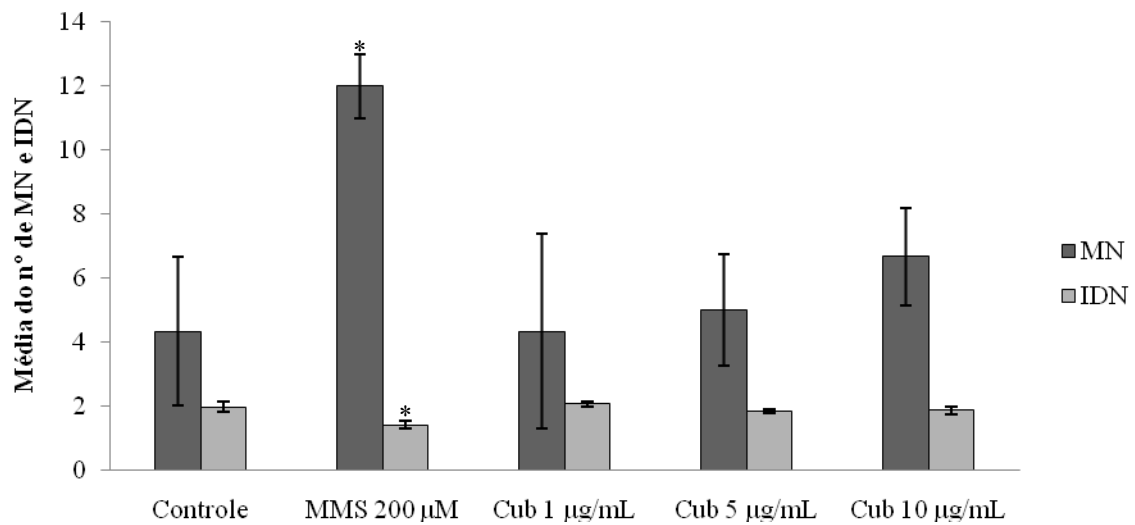


Figura 2 – Média e desvio padrão do número de células com micronúcleo em 3000 células binucleadas analisadas pelo ensaio do micronúcleo e IDN de células HT-29 tratadas com cubebina por 27 horas.

Controle: meio de cultura com 0,025% de DMSO; **MMS 200 µM:** Metilmetanosulfonato 200 µM (agente indutor de danos no DNA); **Cub 1 µg/mL:** Cubebina 1 µg/mL; **Cub 5 µg/mL:** Cubebina 5 µg/mL; **Cub 10 µg/mL:** Cubebina 10 µg/mL; **MN:** Micronúcleo; **IDN:** Índice de Divisão Nuclear.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

3.3 Ensaio de Cinética de Proliferação Celular

Pelo ensaio de cinética de proliferação celular, foi verificado que as três concentrações de cubebina testadas não alteraram o crescimento das células HT-29 em tratamentos por 24, 48, 72 e 96 horas, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (Figura 3).

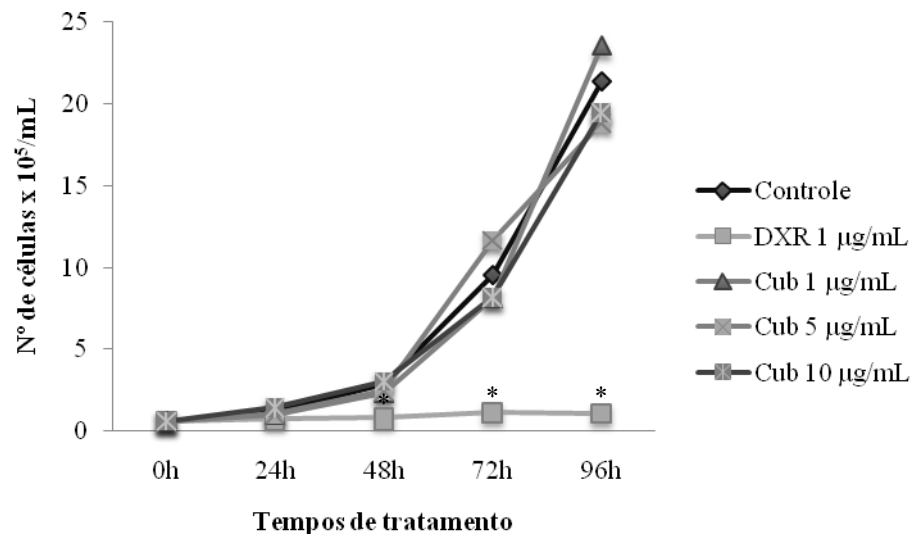


Figura 3 – Curva de crescimento de células HT-29 tratadas com cubebina por 24, 48, 72 e 96 horas.

Controle: meio de cultura com 0,025% de DMSO; **DXR 1 µg/mL** : Doxorrubicina 1 µg/mL (agente indutor de danos no DNA); **Cub 1 µg/mL**: Cubebina 1 µg/mL; **Cub 5 µg/mL**: Cubebina 5 µg/mL; **Cub 10 µg/mL**: Cubebina 10 µg/mL.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

3.4 Avaliação de Indução de Apoptose em Laminula – Técnica da Laranja de Acridina *In situ*

A análise de indução de apoptose mostrou que as três concentrações de cubebina testadas não induziram morte celular por apoptose em tratamentos por 24 horas, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa no número de células apoptóticas encontradas nos grupos tratados com cubebina em relação ao grupo controle (Figura 4).

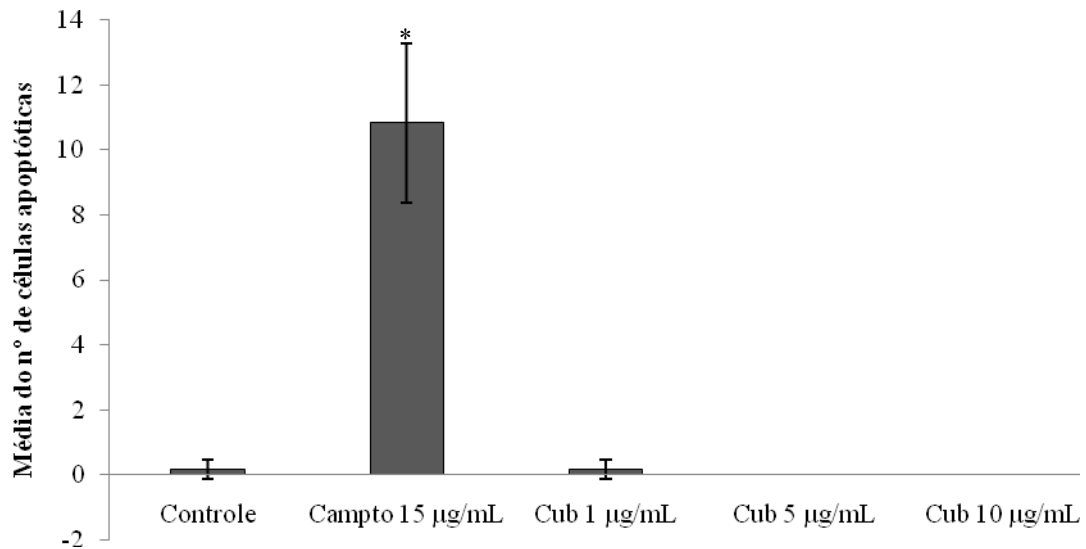


Figura 4 – Ensaio de indução de apoptose. Média e desvio padrão do número de células apoptóticas em 1500 células HT-29 analisadas tratadas com cubebina por 24 horas.

Controle: meio de cultura com 0,025% de DMSO; **Campto 15 µg/mL:** Camptotecina 15 µg/mL (agente indutor de danos no DNA). **Cub 1 µg/mL:** Cubebina 1 µg/mL; **Cub 5 µg/mL:** Cubebina 5 µg/mL; **Cub 10 µg/mL:** Cubebina 10 µg/mL.

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

3.5 RT-PCR em Tempo Real

A fim de investigar se a cubebina é capaz de induzir apoptose pela via extrínseca ou pela via intrínseca, foi verificada a expressão dos genes *CASP8* e *CASP9*, através da análise dos níveis de RNAm destes genes nas células HT-29 após tratamento de 12 horas com cubebina nas concentrações 10 µg/mL e 25 µg/mL.

Analisando-se os valores relativos de expressão e fazendo-se a normalização pelo gene constitutivo *GPDH* (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), encontrou-se que a cubebina nas concentrações 10 µg/mL e 25 µg/mL não alterou a expressão dos genes *CASP8* e *CASP9* em relação ao controle (Figura 5 e 6, respectivamente). Esses dados confirmam os resultados obtidos pela análise morfológica, em que as células tratadas com cubebina não entraram em morte celular por apoptose após 24 horas de tratamento. Assim, o tratamento das células HT-29 com cubebina nas concentrações 10 µg/mL e 25 µg/mL não induz apoptose, nem pela via intrínseca, nem pela via extrínseca.

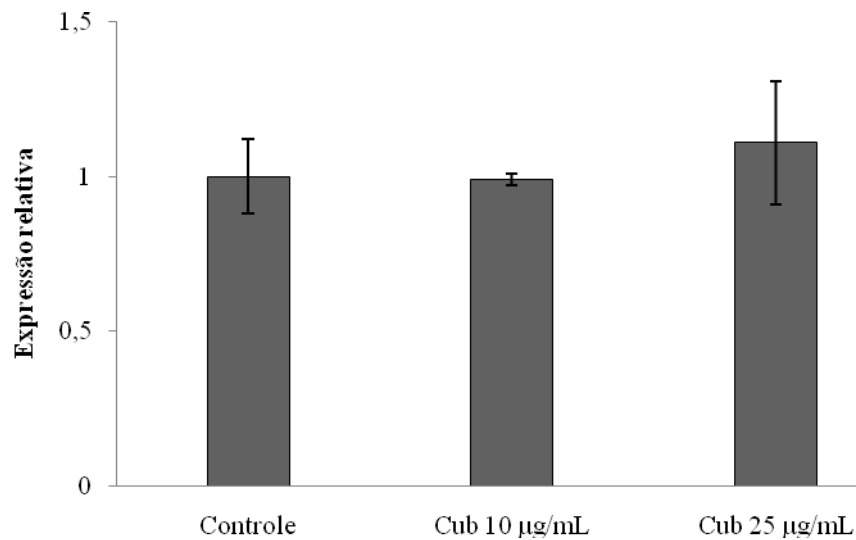


Figura 5 – Avaliação da expressão relativa do gene *CASP8* por RT-PCR em tempo real após 12 horas de tratamento com cubebina nas concentrações de 10 e 25 µg/mL em células HT-29. Os dados foram normalizados com o gene *GPDH*.

Controle: meio de cultura com 0,0625% de DMSO; **Cub 10 µg/mL:** Cubebina 10 µg/mL; **Cub 25 µg/mL:** Cubebina 25 µg/mL;

Diferença estatística não significativa, realizada conforme parâmetros do software REST-384 (PFAFFL, 2002).

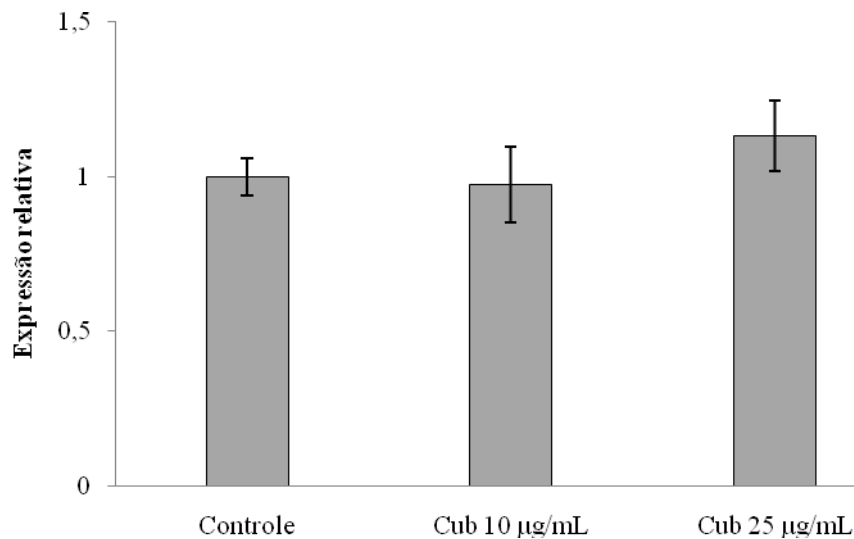


Figura 6 – Avaliação da expressão relativa do gene *CASP9* por RT-PCR em tempo real após 12 horas de tratamento com cubebina nas concentrações de 10 e 25 µg/mL em células HT-29. Os dados foram normalizados com o gene *GPDH*.

Controle: meio de cultura com 0,0625% de DMSO; **Cub 10 µg/mL:** Cubebina 10 µg/mL; **Cub 25 µg/mL:** Cubebina 25 µg/mL;

Diferença estatística não significativa, realizada conforme parâmetros do software REST-384 (PFAFFL, 2002).

4 Discussão

O uso de plantas medicinais pela população em geral é antigo e continua uma prática comum, o que torna os estudos de sua genotoxicidade essenciais (TEIXEIRA *et al.*, 2003). Nesse contexto, a cubebina aparece como uma lignana de grande interesse uma vez que apresenta atividades tripanocida (BASTOS *et al.*, 1999; SOUZA *et al.*, 2005), anti-inflamatória, analgésica (BASTOS *et al.*, 2001) e leishmanicida (BODIWALA *et al.*, 2007).

No presente trabalho, experimentos foram realizados em cultura de células HT-29 com a finalidade de contribuir com dados em relação à segurança da utilização da cubebina. Foi observado que apenas a maior concentração testada de cubebina (100 µg/mL) foi citotóxica em tratamentos por 24, 48 e 72 horas. Como a morte celular pode mascarar ou subestimar os resultados, essa concentração foi descartada para os demais testes, em que a cubebina foi testada nas concentrações 1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL.

O tratamento das células HT-29 com cubebina nas três concentrações testadas por 24, 48, 72 e 96 horas não alterou a cinética de proliferação celular, confirmando a ausência de citotoxicidade demonstrada pelo ensaio MTT para essas concentrações. Não há dados na literatura em relação à citotoxicidade e influência do crescimento de células intestinais tratadas com cubebina. Porém, existem na literatura trabalhos realizados com o extrato da planta *Piper cubeba* em outras linhagens celulares. Yam *et al.* (2008a) verificaram o potencial citotóxico do extrato etanólico de *Piper cubeba* (denominado P9605) também pelo seu efeito na atividade mitocondrial de células de adenocarcinoma de próstata humana (LNCaP). Eles encontraram que o extrato P9605, em concentrações superiores a 40 µg/mL, afeta a viabilidade celular. Porém, não há dados em relação à citotoxicidade da cubebina.

No trabalho de Yam *et al.* (2008b) foi verificado que o extrato etanólico da *Piper cubeba* (P9605) foi capaz de diminuir a proliferação de células de câncer de próstata humana (LNCaP) e de células de carcinoma de mama humano (MCF-7) induzidas por diidrotestosterona e β-estradiol, respectivamente. Porém, essa atividade antiproliferativa encontrada foi devido às propriedades antiandrogênica e antiestrogênica que o extrato apresenta. As células HT-29, utilizadas no presente trabalho, não apresentam receptores hormonais, o que poderia explicar a ausência de alteração no crescimento dessa linhagem celular. Yam *et al.* (2008a) encontraram que o extrato P9605 atua em diferentes aspectos da via de sinalização de andrógeno, reduz a formação de diidrotestosterona, compete com os andrógenos pelos seus receptores, inibe a secreção de antígeno específico da próstata (PSA),

inibe o crescimento celular dependente de andrógeno, induz apoptose e diminui os níveis de receptores de andrógeno.

Yam *et al.* (2008a) mostraram, através de análise por HPLC, que a cubebina representa 16,53% do extrato de *Piper cubeba* P9605. Com o objetivo de verificar se a cubebina é a responsável pelo efeito antiproliferativo observado, eles testaram o extrato e a cubebina isolada em quantidade proporcional que seria encontrada no extrato. Assim, 30 µg/mL do extrato (contendo aproximadamente 5 µg/mL de cubebina) reduziu o crescimento das células LNCaP em 50%. A cubebina testada isoladamente na concentração 5 µg/mL levou a uma diminuição de apenas 25%, indicando que existem outros constituintes no extrato, além da cubebina, que podem contribuir com suas propriedades antiproliferativas.

No presente trabalho, confirmando a ausência de morte celular, o tratamento com cubebina nas concentrações 1, 5 e 10 µg/mL não induziu morte celular por apoptose em tratamento por 24 horas pela análise morfológica. Na análise de expressão dos genes *CASP8* e *CASP9*, envolvidos nas vias extrínseca e intrínseca da apoptose, respectivamente, foi verificado que a cubebina não altera a expressão desses dois genes, confirmando que não há indução de morte celular por apoptose por essas duas vias. Em sistemas de mamíferos, caspase 8 ou caspase 9 usualmente iniciam a sequência de passos levando à ativação de caspases efetoras, que digerem muitas proteínas citoplasmáticas e nucleares cruciais (LOCKSHIN e ZAKERI, 2001). Assim, a avaliação da expressão desses dois genes poderia dar uma informação geral sobre a indução de apoptose nas células HT-29 tratadas com cubebina. Yam *et al.* (2008a) verificaram que o extrato de *Piper cubeba* e a cubebina, na concentração de 30 µg/mL, aumentaram a morte celular por apoptose em cinco e duas vezes, respectivamente, em tratamento por 48 horas de exposição. Essa indução de morte por apoptose explica parcialmente o efeito antiproliferativo do extrato e da cubebina observados por eles. No presente trabalho, a cubebina não induziu apoptose nas células HT-29, dados que contrastam com os observados no trabalho de Yam *et al.* (2008a). Alguns fatores como o tempo de exposição com a droga e maior concentração testada podem ter influenciado para a divergência dos resultados.

Um dado importante que pode contribuir para a investigação do uso da cubebina foi obtido pelo Ensaio do Micronúcleo com Bloqueio da Citocinese. Foi verificado que a cubebina não apresentou atividade mutagênica e não alterou o Índice de Divisão Nuclear (IDN) em células HT-29 nas três concentrações testadas em tratamento por 27 horas. A manutenção do IDN indica que as células, independentemente do tratamento com cubebina, mantiveram o mesmo padrão de divisão nuclear, o que diminui possíveis erros relativos à

contagem de micronúcleos em células binucleadas. A formação de micronúcleos mostra de forma clara que a célula sofreu danos e seu material genético danificado ficou retido no citoplasma na forma de um micronúcleo. Assim, a partir dos dados obtidos, pode-se sugerir que a cubebina, nas concentrações testadas, não causou danos clastogênicos e aneugênicos em células HT-29, dados que contribuem para o seu uso seguro. Não há relatos na literatura em relação à mutagenicidade da cubebina. Existem trabalhos realizados com extratos de plantas que contenham cubebina em sua composição ou seus derivados (JUNQUEIRA *et al.*, 2007; MEDOLA *et al.*, 2007; RESENDE *et al.*, 2010).

No trabalho de Junqueira *et al.* (2007), a clastogenicidade das sementes da planta *Piper cubeba* foi avaliada e foi observado um aumento estatisticamente significativo na média de micronúcleos em eritrócitos policromáticos em amostras de sangue de camundongos em relação ao grupo controle (que recebeu água), nas concentrações 1,0 g/Kg e 1,5 g/Kg em tratamentos por 48 e 72 horas. O mesmo resultado foi encontrado em células da medula óssea de ratos, em que as mesmas concentrações aumentaram significativamente a média do número de micronúcleos em relação ao grupo controle em tratamento por 24 horas. Segundo Junqueira *et al.* (2007), os efeitos clastogênicos observados poderiam ser atribuídos a alguns compostos com potencial inseticida presentes no extrato da semente de *Piper cubeba* (como aschantina, α -copaeno, ρ -cymeno, di-hidrocubebina, germacreno D, lignanas, limoneno e sesemina), uma vez que vários inseticidas são conhecidos por apresentar efeitos mutagênicos, como demonstrado por Jha *et al.* (2002) e Beard (2006), citado por Junqueira *et al.* (2007). Assim, mais estudos são necessários para investigar os compostos isoladamente para verificar essa hipótese. De acordo com os dados obtidos no presente trabalho, pode-se sugerir que a cubebina não foi o componente da semente de *Piper cubeba* responsável pela ação genotóxica observada *in vivo*. Porém, mais estudos devem ser realizados, principalmente estudos *in vivo*, a fim de confirmar a ausência de indução de danos no DNA pela cubebina.

Produtos naturais são boas fontes para o desenvolvimento de novos medicamentos. Através da síntese de derivados desses produtos é frequentemente possível aumentar suas atividades biológicas (SILVA *et al.*, 2005). Assim, muitos pesquisadores (SOUZA *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2005; MEDOLA *et al.*, 2007; SARAIVA *et al.*, 2007) se interessaram em analisar diversos derivados da cubebina, como (-)-Hinokinina, (-)-*O*-acetil cubebina, (-)-*O*-benzil cubebina, (-)-*O*-(N,N-dimetilaminoatil)-cubebina e (-)-6,6'-dinitrohinokinina, a fim de verificar qual estrutura química é mais favorável para determinados fins farmacológicos.

Medola *et al.* (2007) estudaram o composto (-)-Hinokinina, um derivado obtido pela oxidação da cubebina, e observaram ausência de efeito genotóxico e redução de danos cromossômicos induzidos pela Doxorrubicina pela análise de micronúcleos em eritrócitos policromáticos do sangue periférico de ratos *Wistar* em tratamento por 24 horas. Além disso, verificaram que a (-)-Hinokinina exerce um significativo efeito antioxidante, que poderia ser o possível mecanismo de proteção observado contra os radicais livres formados pela Doxorrubicina. Saraiva *et al.* (2007) mostraram que a (-)-Hinokinina possui atividade contra epimastigotas maior que a droga benznidazole, utilizada como droga padrão no tratamento da doença de Chagas. Esses resultados mostram que a cubebina, uma lignana extraída de um produto natural, vem servindo de ponto de partida para a produção de compostos mais ativos, destacando a importância dos produtos naturais na busca por novos medicamentos.

Outro trabalho que investigou uma possível atividade genotóxica da (-)-Hinokinina foi o de Resende *et al.* (2010), que verificaram que a (-)-Hinokinina não induziu formação de micronúcleos em células de fibroblasto de pulmão de hamster chinês (V79) em concentrações até 128 μM . Além disso, em associação com os agentes indutores de danos no DNA, a (-)-Hinokinina foi capaz de reduzir danos induzidos pelo metilmetanosulfonato (MMS). Em tratamento combinado com doxorrubicina, a (-)-Hinokinina em baixas concentrações também foi eficiente em reduzir os danos no DNA, mas em altas concentrações, ela potencializou os danos causados pela doxorrubicina (RESENDE *et al.*, 2010). Com esses resultados é possível observar que a (-)-Hinokinina pode apresentar efeitos positivos ou negativos em relação à clastogenicidade e outros estudos ainda devem ser realizados antes de sugerir esse composto como possível terapia de doenças.

Dessa forma, de acordo com os dados obtidos, pode-se sugerir que a cubebina possui baixa toxicidade em concentrações até 10 $\mu\text{g/mL}$, já que não é citotóxica, não apresentou potencial mutagênico, não induziu morte celular por apoptose e não alterou o crescimento de células de adenocarcinoma de colón humano (HT-29). Porém, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, a cubebina foi citotóxica para as células HT-29, diminuindo a viabilidade celular para próximo de 50% em tratamento a partir de 24 horas. Dessa forma, é preciso ter cautela na utilização da cubebina, evitando altas concentrações. Novos estudos devem ser realizados, principalmente em células com receptores hormonais, a fim de verificar se esse composto pode alterar outras vias hormonais, podendo ser prejudiciais para o organismo. Além dos experimentos *in vitro*, outras pesquisas com animais ainda devem ser realizados antes de utilizar esse composto em humanos.

Agradecimentos

A presente pesquisa contou com o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná.

Referências

- BASTOS, J.K; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Medica**, v.65, p.541-544, 1999.
- BASTOS, J.K; CARVALHO, J.C.T.; de SOUZA, G.H.B.; PEDRAZZI, A.H.P.; SARTI, S.J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, p.279–282, 2001.
- BEARD, J. DDT and human health. **Science of the Total Environment**, v.355, p.78-89, 2006.
- BODIWALA, H.S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C.S.; SHARMA, S.S.; BHUTANI, K.K.; SINGH, I.P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, v.61, p.418-421, 2007.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.179-189, 2000.
- CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p.S58-S65, 2000.
- CASTANEDA, F; ROSIN-STEINER, S. Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: role of various signal transduction pathways. **International Journal of Medical Sciences**, v.3, p.160-167, 2006.
- CHEN, X.Y.; LIU, J.; XU, K.S. Apoptosis of human hepatocellular carcinoma cell (HepG2) induced by cardiotoxin III through S-phase arrest. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.61, p.307–315, 2009.
- EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.13, p.34-43, 1989.
- EISAI, P.T. **Medicinal herb index in Indonesia**. 2nd edition. Dian Rakyat, Jakarta, 1995, 21 pp.
- FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.

HUANG, Y.H.; SHANG, B.Y.; ZHEN Y.S. Antitumor efficacy of lidamycin on hepatoma and active moiety of its molecule. **World Journal of Gastroenterology**, v.11, n.26, p.3980-3984, 2005.

JHA, A.M.; SINGH, A.C.; BHARTI, M.K. Clastogenicity of carbazole in mouse bone marrow cells *in vivo*. **Mutation Research**, v.521, p.11-17, 2002.

JUNQUEIRA, A.P.F.; PERAZZO, F.F.; SOUZA, G.H.B.; MAISTRO, E.L.. Clastogenicity of *Piper cubeba* (Piperaceae) seed extract in an *in vivo* mammalian cell system. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.656-663, 2007.

KERNAN, M.R.; SENDL, A.; CHEN, J.L.; JOLAD, S.D.; BLANC, P.; MURPHY, J.T.; STODDART, C.A.; NANAKORN, W.; BALICK, M.J.; ROZHON, E.J. Two new lignans with activity against Influenza Virus from the medicinal plant *Rhinacanthus nasutus*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n.6, p.635–637, 1997.

LOCKSHIN, R.A.; ZAKERI, Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v.2, n.7, p.545-550, 2001.

MEDOLA, J.F.; CINTRA, V.P.; SILVA, É.P.P.; ROYO, V.de A.; SILVA, R.da; SARAIVA, J.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A. e; TAVARES, D.C. (-)-Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.638-642, 2007.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

OLIVEIRA, J.M.; JORDÃO, B.Q.; RIBEIRO, L.R.; da EIRA, A.F; MANTOVANI, M.S. Anti-genotoxic effect of aqueous extracts of sun mushroom (*Agaricus blazei* Murill lineage 99/26) in mammalian cells *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology**, v.40, p.1775-1780, 2002.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9, p.2002-2007, 2001.

PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v.30, p.1-10, 2002.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicol**, v.39, p.603-613, 2001.

RESENDE, F.A.; TOMAZELLA, I.M.; BARBOSA, L.C.; PONCE, M.; FURTADO, R.A.; PEREIRA, A.C.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A.; TAVARES, D.C. Effect of the dibenzylbutyrolactone lignan (-)-hinokinin on doxorubicin and methyl methanesulfonate clastogenicity in V79 Chinese hamster lung fibroblasts. **Mutation Research**, v.700, p.62-66, 2010.

ROVOZZO, G.C.; BURKE, C.N. **A manual of basic virological techniques**. New Jersey: Prentice Hall, 1973, p.159.

SALEEM, M; KIM, H.J.; ALI, M.S.; LEE, Y.S. An update on bioactive plant lignans. **Natural Product Reports**, v.22, p.696-716, 2005.

SARAIVA, J.; VEGA, C.; ROLON, M.; SILVA, R.; SILVA, M.L.A.; DONATE, P.M.; BASTOS, J.K.; GOMEZ-BARRIO, A.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* and *in vivo* activity of lignan lactones derivatives against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v.100, p.791-795, 2007.

SASTROAMIDJOJO, S. In: **Obat Asli Indonesia**; Tjokronegoro, A., Ed.; Dian Rakyat: Indonesia, 1997, p.171.

SILVA, R.; SOUZA, G.H.B.; SILVA, A.A.; SOUZA, V.A.; PEREIRA, A.C.; ROYO, V.A.; SILVA, M.L.A.; DONATE, P.M.; ARAÚJO, A.L.S.M.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K. Synthesis and biological activity evaluation of lignan lactones derived from (-)-cubebin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.1033-1037, 2005.

SOUZA, G.H.B.; FILHO, A.A.S.; SOUZA, V.A.; PEREIRA, A.C.; ROYO, V.A.; SILVA, M.L.A.; SILVA, R.; DONATE, P.M.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K. Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (-)-*O*-acetyl, (-)-*O*-methyl, (-)-*O*-dimethylethylamine cubebin and their preparation from (-)-cubebin. **IL FARMACO**, v.59, p.55-61, 2004.

SOUZA, V.A.; SILVA, R.; PEREIRA, A.C.; ROYO, V.A.; SARAIVA, J.; MONTANHEIRO, M.; SOUZA, G.H.B.; FILHO, A.A.S.; GRANDO, M.D.; DONATE, P.M.; BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A. Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.303-307, 2005.

SUGAYA, S; NAKANISHI, H; TANZAWA, H. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. **Mutation Research**, v.578, p.327-332, 2005.

TEIXEIRA, R.O.; CAMPAROTO, M.L.; MANTOVANI, M.S.; VICENTINI, V.E.P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in *in vitro* and *in vivo* assays. **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.4, p.551-555, 2003.

ZHANG, G.L.; LI, N.; LIN, L.L.; WANG, M.W. Recent progresses in studies on bioactive lignans from plants. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v.32, n.20, p.2089-2094, 2007.

YAM, J.; KREUTER, M.; DREWE, J. *Piper cubeba* targets multiple aspects of the androgen-signalling pathway. A potential phytotherapy against prostate cancer growth? **Planta Medica**, v.74, p.33-38, 2008a.

YAM, J.; SCHAAB, A.; KREUTER, M.; DREWE, J. *Piper cubeba* demonstrates anti-estrogenic and anti-inflammatory properties. **Planta Medica**, v.74, p.142-146, 2008b.

ANEXOS

Tabela 1 – Média e desvio padrão das absorvâncias obtidas pelo ensaio de citotoxicidade MTT em células HT-29 tratadas com cubebina.

Tratamentos	Tempos de tratamento		
	24 h	48 h	72 h
Controle	0,549 ± 0,002	1,083 ± 0,134	1,148 ± 0,077
DXR 1 µg/mL	0,478 ± 0,052*	0,595 ± 0,090*	0,365 ± 0,010*
Cubebina 1 µg/mL	0,549 ± 0,010	1,067 ± 0,172	1,081 ± 0,018
Cubebina 10 µg/mL	0,529 ± 0,012	1,010 ± 0,215	1,016 ± 0,015
Cubebina 100 µg/mL	0,310 ± 0,017*	0,612 ± 0,258*	0,735 ± 0,046*

Controle: meio de cultura com 0,25% de DMSO; **DXR 1 µg/mL:** Doxorubicina 1 µg/mL (agente indutor de danos no DNA).

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

Tabela 2 – Avaliação da mutagenicidade da cubebina em células HT-29 em tratamento por 27 horas. Total de células binucleadas analisadas, total de células binucleadas com micronúcleo, valor médio e desvio padrão de células com micronúcleo, valor médio e desvio padrão do Índice de Divisão Nuclear (IDN).

Tratamentos	Total de células analisadas	Total de células com MN	MN (X ± S)	IDN (X ± S)
Controle	3000	13	4,333 ± 2,31	1,97 ± 0,16
MMS 200 µM	3000	37	12,33 ± 1,53*	1,41 ± 0,11*
Cubebina 1 µg/mL	3000	13	4,333 ± 3,06	2,07 ± 0,08
Cubebina 5 µg/mL	3000	15	5,000 ± 1,73	1,83 ± 0,07
Cubebina 10 µg/mL	3000	20	6,667 ± 1,53	1,86 ± 0,11

Controle: meio de cultura com 0,025% de DMSO; **MMS 200 µM:** Metilmetanosulfonato 200 µM (agente indutor de danos no DNA).

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

Tabela 3 – Média e desvio padrão do número de células ($\times 10^5$)/mL contadas em relação ao tempo inicial com $0,6 \times 10^5$ células/mL, pelo ensaio de cinética de proliferação celular em células HT-29 tratadas com cubebina, por 24, 48, 72 e 96 horas.

Tratamentos	Tempos de tratamento				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
Controle	0,6	1,13 \pm 0,21	2,90 \pm 0,50	9,53 \pm 2,86	21,37 \pm 3,32
DXR 10 μ g/mL	0,6	0,79 \pm 0,22	0,83 \pm 0,22*	1,16 \pm 0,18*	1,09 \pm 0,13*
Cubebina 1 μ g/mL	0,6	1,01 \pm 0,12	2,33 \pm 0,92	8,16 \pm 3,37	23,57 \pm 4,22
Cubebina 5 μ g/mL	0,6	1,05 \pm 0,39	2,47 \pm 1,22	11,66 \pm 1,66	18,87 \pm 2,59
Cubebina 10 μ g/mL	0,6	1,47 \pm 0,50	3,05 \pm 1,07	8,18 \pm 4,78	19,50 \pm 4,11

Controle: meio de cultura com 0,025% de DMSO; **DXR 1 μ g/mL:** Doxorubicina 1 μ g/mL (agente indutor de danos no DNA).

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

Tabela 4 – Total de células apoptóticas, frequência de células apoptóticas, média e desvio padrão do número de células apoptóticas em 1500 células HT-29 analisadas tratadas com cubebina por 24 horas.

Tratamentos	Total de céls apoptóticas	Frequência de céls apoptóticas	Média das 3 repetições
Controle	1	0,002	0,17 \pm 0,29
Campto 15 μ g/mL	33*	0,066*	10,83 \pm 2,47
Cubebina 1 μ g/mL	1	0,002	0,17 \pm 0,29
Cubebina 5 μ g/mL	0	0	0 \pm 0
Cubebina 10 μ g/mL	0	0	0 \pm 0

Controle: meio de cultura com 0,025% de DMSO; **Campto 15 μ g/mL:** Camptotecina 15 μ g/mL (agente indutor de apoptose).

* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ($p < 0,05$) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

Tabela 5 – Média e desvio padrão das razões obtidas pelo método de Pfaffl *et al.* (2001) para avaliação da expressão relativa do gene *CASP8* por RT-PCR em tempo real após 12 horas de tratamento com cubebina nas concentrações de 10 e 25 μ g/mL em células HT-29. Os dados foram normalizados com o gene *GPDH*.

Tratamentos	Razão (X \pm S)
Cubebina 10 μ g/mL	1,00 \pm 0,02
Cubebina 25 μ g/mL	1,11 \pm 0,20

Tabela 6 – Cálculo da razão referente à expressão do gene *CASP8* conforme método de Pfaffl *et al.* (2001).

Cubebina 10 µg/mL								
Repetição 1								
		Controle	Cubebina	Média E	DeltaCt	E ^{ΔCt}	Razão	Média razão
CASP8	Eficiência	1,80	1,86	1,83				
	Ct	23,15	23,12		0,03	1,02		
GPDH	Eficiência	1,93	1,94	1,94			1,01	
	Ct	15,30	15,28		0,02	1,01		1,00
Repetição 2								
		Controle	Cubebina	Média E	DeltaCt	E ^{ΔCt}	Razão	
CASP8	Eficiência	1,87	1,88	1,88				
	Ct	22,68	23,44		-0,76	0,62		
GPDH	Eficiência	1,99	1,95	1,97			0,98	
	Ct	14,7	15,37		-0,67	0,64		
Cubebina 25 µg/mL								
Repetição 1								
		Controle	Cubebina	Média E	DeltaCt	E ^{ΔCt}	Razão	Média razão
CASP8	Eficiência	1,80	1,89	1,84				
	Ct	23,15	22,97		0,18	1,12		
GPDH	Eficiência	1,93	1,88	1,91			0,94	
	Ct	15,30	15,03		0,27	1,19		1,11
Repetição 2								
		Controle	Cubebina	Média E	DeltaCt	E ^{ΔCt}	Razão	
CASP8	Eficiência	1,87	1,84	1,86				
	Ct	22,68	23,24		-0,56	0,71		
GPDH	Eficiência	1,99	2,00	2,00			1,28	
	Ct	14,7	15,56		-0,86	0,55		

Tabela 7 – Média e desvio padrão das razões obtidas pelo método de Pfaffl *et al.* (2001) para avaliação da expressão relativa do gene *CASP9* por RT-PCR em tempo real após 12 horas de tratamento com cubebina nas concentrações de 10 e 25 µg/mL em células HT-29. Os dados foram normalizados com o gene *GPDH*.

Tratamentos	Razão (X ± S)
Cubebina 10 µg/mL	0,98 ± 0,12
Cubebina 25 µg/mL	1,13 ± 0,12

Tabela 8 – Cálculo da razão referente à expressão do gene *CASP9* conforme método de Pfaffl *et al.* (2001).

Cubebina 10 µg/mL							
Repetição 1							
		Controle	Cubebina	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
CASP9	Eficiência	1,85	1,82	1,83			
	Ct	24,31	24,16		0,15	1,10	
GPDH	Eficiência	1,93	1,94	1,94			1,08
	Ct	15,18	15,17		0,017	1,01	
							0,98
Repetição 2							
		Controle	Cubebina	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
CASP9	Eficiência	1,95	1,89	1,92			
	Ct	23,73	24,66		-0,93	0,54	
GPDH	Eficiência	1,99	1,95	1,97			0,87
	Ct	14,56	15,25		-0,69	0,63	
Cubebina 25 µg/mL							
Repetição 1							
		Controle	Cubebina	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
CASP9	Eficiência	1,85	1,82	1,84			
	Ct	24,31	23,92		0,39	1,27	
GPDH	Eficiência	1,93	1,88	1,91			1,03
	Ct	15,18	14,87		0,31	1,22	
							1,13
Repetição 2							
		Controle	Cubebina	Média E	DeltaCt	$E^{\Delta Ct}$	Razão
CASP9	Eficiência	1,95	1,76	1,86			
	Ct	23,73	24,35		-0,62	0,68	
GPDH	Eficiência	1,99	1,98	1,99			1,23
	Ct	14,56	15,43		-0,87	0,55	

REFERÊNCIAS

- AHMAD, I.; AGIL, F.; AHMAD, F.; OWAIS, M. Herbal medicines: prospects and constraints. In: **Modern Phytomedicine: Turning medicinal plants into drugs**. India: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, p.59-76, 2006.
- BARBOSA FILHO, J.M. Lignanas, neolignanas e seus análogos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004. p.557-575.
- BARIŠIĆ, K.; PETRIK, J.; RUMORA, L. **Biochemistry of apoptotic cell death**, v.53, p.151-164, 2003.
- BARRET, B. Medicinal plants of Nicaragua's Atlantic Coast. **Economic Botany**, v.48, p.8-20, 1994.
- BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A. Evaluation of the trypanocidal activity of lignans isolated from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo*. **Planta Medica**, v.65, p.541-544, 1999.
- BASTOS, J.K.; CARVALHO, J.C.T.; de SOUZA, G.H.B.; PEDRAZZI, A.H.P.; SARTI, S.J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of *Zanthoxylum naranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, p.279-282, 2001.
- BODIWALA, H.S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C.S.; SHARMA, S.S.; BHUTANI, K.K.; SINGH, I.P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal of Natural Medicines**, v.61, p.418-421, 2007.
- BURZ, C.; BERINDAN-NEAGOE, I.; BALACESCU, O.; IRIMIE, A. Apoptosis in cancer: Key molecular signaling pathways and therapy targets. **Acta Oncologica**, v.48, p.811-821, 2009.
- CAPASSO, R.; IZZO, A.A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p.S58-S65, 2000.
- CARREAU, S.; DELALANDE, C. SILANDRE, D.; BOURGUIBA, S. LAMBARD, S. Aromatase and estrogen receptors in male reproduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.246, p.65-68, 2006.
- CRUZ, M.; NOZAKI, M.; BATISTA, M.A. Plantas medicinais e alopatia. **Biotechnology, Ciências e Desenvolvimento**. n.11, p.28-34, 2001.
- EASTMOND, D.A.; TUCKER, J.D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.13, p.34-43, 1989.
- EISAI, P.T. **Medicinal herb index in Indonesia**. 2nd edition. Dian Rakyat, Jakarta, 1995, 21 pp.

ELFAHMI; RUSLAN, K.; BATTERMAN, S.; BOS, R.; KAYSER, O.; WOERDENBAG, H.J.; QUAX, W.J. Lignan profile of *Piper cubeba*, an Indonesian medicinal plant. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.35, p.397-402, 2007.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v.35, n.4, p.495-516, 2007.

FAKIM, A.G. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p.1-93, 2006.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutation Research**, v.392, p.11-18, 1997.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v.455, p.81-95, 2000.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Apoptosis: programmed cell death. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.3, p.335-343, 2007.

HEDDLE, J.A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v.18, n.2, p.187-190, 1973.

HIRATA, N.; TOKUNAGA, M.; NARUTO, S.; IINUMA, M.; MATSUDA, H. Testosterone 5 α -reductase inhibitory active constituents of *Piper nigrum* Leaf. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.30, n.12, p.2402-2405, 2007.

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

JUNQUEIRA, A.P.F.; PERAZZO, F.F.; SOUZA, G.H.B.; MAISTRO, E.L. Clastogenicity of *Piper cubeba* (Piperaceae) seed extract in an *in vivo* mammalian cell system. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.656-663, 2007.

KAPITANOVIĆ, S.; ČAČEV, T.; ANTICA, M.; KRALJ, M.; CAVRIĆ, G.; PAVELIĆ, K.; SPAVENTI, R. Effect of indomethacin on *E-cadherin* and *β -catenin* expression in HT-29 colon cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v.80, p.91 – 96, 2006.

KASTAN, M.B.; CANMAN, C.E.; LEONARD, C.J. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v.14, n.1, p.3-15, 1995.

KERR, L.F.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissues kinetics. **British Journal of Cancer**, v.26, p.239, 1972.

KRAJČOVÁ, A.; SCHULZOVÁ, V.; HAJŠLOVÁ, J.; BJELKOVÁ, M. Lignans in flaxseed. **Czech Journal of Food Sciences**, v.27, p.S252-S255, 2009.

LAUNAY, S.; HERMINE, O.; FONTENAY, M.; KROEMER G.; SOLARY, E.; GARRIDO, C. **Vital functions for lethal caspases**, v.24, p.5137-5148, 2005.

MALUF, L.M.P.; POMPÉIA, C. Morte celular: apoptose e necrose. In: PERES, Carmem Maldonato; CURI, Rui. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005. p.22-24.

MATSUDA, H.; KAWAGUCHI, Y.; YAMAZAKI, M.; HIRATA, N.; NARUTO, S.; ASANUMA, Y.; KAIHATSU, T.; KUBO, M. Melanogenesis stimulation in murine B16 melanoma cells by *Piper nigrum* Leaf extract and its lignan constituents. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.10, p.1611-1616, 2004.

MEDOLA, J.F.; CINTRA, V.P.; SILVA, É.P.P.; ROYO, V. de A.; SILVA, R. da; SARAIVA, J.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K.; SILVA, M.L.A. e; TAVARES, D.C. (-)-Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.638-642, 2007.

NICHOLSON, D.W.; THORNBERRY, N.A. **Caspases: killer proteases**, v.22, p.299-306, 1997.

NUNES, J.D.; TORRES, G.A.; DAVIDE L.C.; SALGADO, C.C. Citogenética de *Piper hispidinervum* e *Piper aduncum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.1049-1052, 2007.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumor cells. **Nature reviews**, v.4, p.592-603, 2004.

RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.R. **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto, Ed. Sociedade Brasileira de Genética, p.65, 1991.

SALEEM, M; KIM, H.J.; ALI, M.S.; LEE, Y.S. An update on bioactive plant lignans. **Natural Product Reports**, v.22, p.696-716, 2005.

SASTROAMIDJOJO, S. In: **Obat Asli Indonesia**; Tjokronegoro, A., Ed.; Dian Rakyat: Indonesia, 1997, p.171.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v.31, p.9-15, 1975.

SETCHELL, K.D.R, ADLERCREUTZ, H. Mammalian lignans and phytoestrogens recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease. In: **Role of the gut flora in toxicity and cancer**. San Diego: Editora Rowland IR, 1988. p.315-345.

SILVA, S.; PECINALLI, N. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **INFARMA**, v.16, n.3, p.36-45, 2001.

SOUZA, G.H.B.; FILHO, A.A.S.; SOUZA, V.A.; PEREIRA, A.C.; ROYO, V.A.; SILVA, M.L.A.; SILVA, R.; DONATE, P.M.; CARVALHO, J.C.T.; BASTOS, J.K. Analgesic and anti-inflammatory activities evaluation of (-)-*O*-acetyl, (-)-*O*-methyl, (-)-*O*-dimethylethylamine cubebin and their preparation from (-)-cubebin. **IL FARMACO**, v.59, p.55-61, 2004.

SOUZA, V.A.; SILVA, R.; PEREIRA, A.C.; ROYO, V.A.; SARAIVA, J.; MONTANHEIRO, M.; SOUZA, G.H.B.; FILHO, A.A.S.; GRANDO, M.D.; DONATE, P.M.; BASTOS, J.K.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA, M.L.A. Trypanocidal activity of (-)-cubebin derivatives against free amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.15, p.303-307, 2005.

TAKAHASHI, C.S. Testes citogenéticos *in vitro* e aneuploidias. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. & MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003, cap.6, p.151-168.

VALASEK, M.A.; REPA, J.J. The power of real-time PCR. **Advances in Physiology Education**, v.29, p.151–159, 2005.

VELLONEN, K-S.; HONKAKOSKI, P.; URTTI, A. Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.23, p.181-188, 2004.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D.R.; BERNEMAN, Z.N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Annals of Hematology**, v.84, p.627-639, 2005.

YAM, J.; KREUTER, M.; DREWE, J. *Piper cubeba* targets multiple aspects of the androgen-signalling pathway. A potential phytotherapy against prostate cancer growth? **Planta Medica**, v.74, p.33-38, 2008a.

YAM, J.; SCHAAB, A.; KREUTER, M.; DREWE, J. *Piper cubeba* demonstrates anti-estrogenic and anti-inflammatory properties. **Planta Medica**, v.74, p.142-146, 2008b.

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