



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA ISABELA BIAZI

**ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E DOS EFEITOS EM VIAS
MOLECULARES DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS
COMPOSTOS PIPERLONGUMINA E CIS-NEROLIDOL NA
LINHAGEM HepG2/C3A**

Londrina
2019

BRUNA ISABELA BIAZI

**ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E DOS EFEITOS EM VIAS
MOLECULARES DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS
COMPOSTOS PIPERLONGUMINA E CIS-NEROLIDOL NA
LINHAGEM HEPG2/C3A**

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

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani

Londrina
2019

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

Biazi, Bruna Isabela.

Estudo da citotoxicidade e dos efeitos em vias moleculares de expressão gênica dos compostos piperlongumina e cis-nerolidol na linhagem HepG2/C3A / Bruna Isabela Biazi. - Londrina, 2019.
83 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2019.

Inclui bibliografia.

1. câncer - Tese. 2. viabilidade celular - Tese. 3. substâncias naturais - Tese. 4. cultura celular - Tese. I. Mantovani, Mário Sérgio . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

BRUNA ISABELA BIAZI

**ESTUDO DA CITOTOXICIDADE E DOS EFEITOS EM VIAS
MOLECULARES DE EXPRESSÃO GÊNICA DOS COMPOSTOS
PIPERLONGUMINA E CIS-NEROLIDOL NA LINHAGEM HEPG2/C3A**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^a. Dr^a. Ingrid Felicidade
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof^a. Dr^a. Lúcia Regina Ribeiro
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof^a. Dr^a. Roberta Losi Guembarovski
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular e seus coordenadores pela organização e apoio ao desenvolvimento científico. Ao meu orientador, Prof. Mário Sérgio Mantovani, pela confiança e por me acolher mais uma vez em seu laboratório.

Aos meus colegas de laboratório, pela amizade e o incansável auxílio durante a execução dos projetos.

Agradeço as agências de fomento, CNPq, CAPES, Fundação Araucária e ao FINEP, pelos investimentos concedidos para o desenvolvimento de projetos no Laboratório de Genética Toxicológica da UEL. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida em meu doutorado.

Agradeço aos meus familiares pela credibilidade e confiança que sempre colocaram em mim.

*Quando, porém, vier o que é perfeito,
o que é imperfeito desaparecerá.*
1 Coríntios 13:10

BIAZI, Bruna Isabela. **Estudo da citotoxicidade e dos efeitos em vias moleculares de expressão gênica dos compostos piperlongumina e cis-nerolidol na linhagem HepG2/C3A**. 2019. 83 f. Tese (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Os fitoquímicos são substâncias naturais de origem das plantas que podem apresentar efeitos benéficos, como antiproliferativos, antioxidantes e anti-inflamatórios. Os fitoquímicos piperlongumina (PLN) e cis-nerolidol (C-NER) são um alcalóide e um sesquiterpeno, respectivamente, que apresentam atividade antiproliferativa. Este estudo objetivou analisar os efeitos citotóxicos e em vias moleculares alvos da PLN e do C-NER que induzem ao efeito antiproliferativo na linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2/C3A). Os resultados mostram que a citotoxicidade, a genotoxicidade, e o estresse de retículo endoplasmático induzidos pela PLN estão relacionados ao aumento observado de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os danos causados nas células induziram a parada de ciclo celular em G2 e mitose, e a morte celular por apoptose. Também foi observado redução do potencial mitocondrial e a formação de células com fuso mitótico em formato monoastral. No estudo molecular, foi observado aumento da expressão de mRNAs de genes de estresse oxidativo (*GSR* e *SOD1*), estresse de retículo endoplasmático (*ERN1* e *HSPA14*), danos no DNA (*MDM2*), ciclo celular (*CDKN1A*), apoptose (*BAK1* e *BBC3*) e de metabolismo de xenobióticos (*CYP1A2* e *CYP3A4*); a redução da expressão ocorreu em um gene de ciclo celular (*CCNA2*). O C-NER induziu a citotoxicidade devido a indução de estresse de retículo endoplasmático. Como consequência, foi observado parada do ciclo celular em G1 e indução de morte celular por paraptose. No estudo molecular, foi observado aumento da expressão de mRNAs de genes de proliferação e apoptose (*MYC* e *BBC3*), estresse de retículo endoplasmático (*EIF2AK3* e *ERN1*) e metabolismo de xenobióticos (*CYP1A2* e *CYP2C19*); foi observado redução da expressão de mRNAs de genes de apoptose (*BAK1*, *BAX*, *CAPN1*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1* e *TP53*), ciclo celular (*CCND1*, *CCNE1*, *CDK1*, e *CDK2*), e metabolismo de xenobióticos (*CYP2D6* e *CYP3A4*). Conclui-se portanto que o efeito antiproliferativo destes dois fitoquímicos ocorre pela parada do ciclo celular e pela indução de morte. Os dados também contribuem, para o entendimento de suas vias de ação, envolvidas no efeito antiproliferativo da PLN e do C-NER, e conseqüentemente possibilita uma melhor aplicabilidade do uso destas substâncias em estudos futuros.

Palavras-chave: Viabilidade celular. Ensaio do cometa. Quimioterapia.

BIAZI, Bruna Isabela. **Cytotoxic and molecular pathways effects of piperlongumin and cis-nerolidol in gene expression of HepG2/C3A cell line.** 2019. 83 p. Thesis (Master Genetics and Molecular Biology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

Phytochemicals are natural substances of plant origin that may have beneficial effects, such as, antiproliferative, antioxidant, anti-inflammatory, and others. The phytochemicals piperlongumine (PLN) and cis-nerolidol (C-NER) are an alkaloid and a sesquiterpene, respectively, which have antiproliferative activity. This study aimed to analyze the cytotoxic and molecular pathways of PLN and C-NER of gene expression that induce the antiproliferative effect in the human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2/C3A). The results show that cytotoxicity, genotoxicity, and endoplasmic reticulum stress induced by PLN are related to the increase of reactive oxygen species (ROS). Damage to cells induced cell cycle arrest in G2 and mitosis, and cell death by apoptosis. Reduction of mitochondrial potential and formation of mitotic spindle cells in monastral format were also observed. In the molecular study, we observe upregulation of mRNAs from oxidative stress genes (*GSR* and *SOD1*), endoplasmic reticulum stress (*ERN1* and *HSPA14*), DNA damage (*MDM2*), cell cycle (*CDKN1A*), apoptosis (*BAK1* and *BBC3*) and xenobiotic metabolism (*CYP1A2* and *CYP3A4*); downregulation occurred in a cell cycle gene (*CCNA2*). C-NER induced cytotoxicity due to induction of endoplasmic reticulum stress. As a consequence, was observed G1 cell cycle arrest and induction of cell death by paraptosis. In the molecular study, we observed upregulation of mRNAs from proliferation and apoptosis genes (*MYC* and *BBC3*), endoplasmic reticulum stress (*EIF2AK3* and *ERN1*) and xenobiotic metabolism (*CYP1A2* and *CYP2C19*); downregulation occurred in genes from apoptosis (*BAK1*, *BAX*, *CAPN1*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1* and *TP53*), cell cycle (*CCND1*, *CCNE1*, *CDK1*, and *CDK2*) and xenobiotic metabolism (*CYP2D6*, *CYP2D6* and *CYP3A4*). It is concluded, that the antiproliferative effect of these two phytochemicals occurs by the cell cycle arrest and the induction of death. The data also contribute to the understanding of its pathways involved in the antiproliferative effect of PLN and C-NER and, consequently, allows a better applicability of the use of these substances in future studies.

Keywords: Cell viability. Comet assay. Chemotherapy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** – Estrutura química dos enantiômeros (R-S) e isômeros geométricos (cis-trans) do nerolidol..... 21
- Figura 2** – Estrutura química da piperlongumina..... 22
- Figura 3** – Demonstração *in vitro* de indução de necroptose por droga de interesse..... 25
- Figura 4** – Vias extrínseca e intrínseca de indução de apoptose 27

ARTIGO 1

- Figura 1** – Viabilidade Celular obtida pelo ensaio do MTT após 24 horas de tratamento 42
- Figura 2** – Distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular analisado por citometria de fluxo..... 43
- Figura 3** – Porcentagens de células em fuso monoastral (rosetas) após 24 horas de tratamento com PLN..... 43
- Figura 4** – Análise de morte celular por citometria de fluxo 44
- Figura 5** – Potencial de membrana mitocondrial em ensaio utilizando rodamina 123 45
- Figura 6** – Micrografias utilizando EVOS FL..... 46
- Figura 7** – Análise dos volumes (micrometros) das culturas 3D (esferoides) 47
- Figura 8** – Genotoxicidade avaliada pelo parâmetro *tail moment* obtido pelo ensaio do cometa..... 48
- Figura 9** – Detecção de EROs utilizando o ensaio com DCFDA por citometria de fluxo 48
- Figura 10** – Expressão gênica relativa avaliada pelo ensaio de RT-qPCR 49
- Figura 11** – Análises de caspases 9 e 3/7 ativas..... 50

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Principais quimioterápicos da atualidade de origem natural ou derivados semissintéticos de plantas 18

Tabela 2 – Principais características/diferenças das mortes celulares por necrose, apoptose, paraptose e morte autofágica 28

ARTIGO 1

Tabela S1 – Iniciadores utilizados na PCR em tempo real 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL1	<i>Tyrosine-Protein Kinase ABL1</i>
AP-1	Proteína ativadora 1 (fator de transcrição)
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
BAK1	<i>BCL2 Antagonist/Killer 1</i>
BAX	<i>BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator</i>
BBC3	<i>BCL2 Binding Component 3</i>
BCL2	<i>Apoptosis Regulator</i>
BCL2L1	<i>BCL2 Like 1</i>
CASP3	Caspase 3
CASP7	Caspase 7
CASP8	Caspase 8
CASP9	Caspase 9
CAT	Catalase
CCNA2	Ciclina A2
CCNB1	Ciclina B1
CCNB2	Ciclina B2
CDK1	Quinase dependente de ciclina 1
CDKN1A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
CHK1	<i>Checkpoint Kinase 1</i>
CHK2	<i>Checkpoint Kinase 2</i>
C-NER	Cis-nerolidol
CPT	Camptotecina
CYP1A2	<i>Cytochrome P450 Family 1 Subfamily A Member 2</i>
CYP2C19	<i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily C Member 19</i>
CYP2D6	<i>Cytochrome P450 Family 2 Subfamily D Member 6</i>
CYP3A4	<i>Cytochrome P450 Family 3 Subfamily A Member 4</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EIF2AK3	<i>Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3</i>
ERN1	<i>Endoplasmic Reticulum To Nucleus Signaling 1</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GADD45A	<i>Growth Arrest And DNA Damage Inducible Alpha</i>
GPX1	Glutationa peroxidase 1

GSH	Glutathiona reduzida
GSR	Glutathiona redutase
H2AFX	<i>H2A Histone Family Member X</i>
HNF4A	<i>Hepatocyte Nuclear Factor 4 Alpha</i>
HSPA14	<i>Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 14</i>
HSPA5	<i>Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 5</i>
IC50	Metade da concentração inibitória máxima
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LDH	Lactato desidrogenase
MAPKs	Proteínas-quinase específicas de serina/treonina
MDM2	<i>Double Minute 2 Protein</i>
MMP-9	Metalopeptidase 9
MTOR	<i>Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase</i>
MYC	<i>BHLH Transcription Factor</i>
NF- κ B	Fator nuclear kappa B (fator de transcrição)
PLN	Piperlongumina
SOD1	Superóxido dismutase 1
T-NER	Trans-nerolisol
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TP53	Supressor tumoral p53
TRAF2	Fator 2 associado ao receptor de TNF

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	OS FITOQUÍMICOS NA MEDICINA E NA QUIMIOTERAPIA	17
2.2	FITOQUÍMICOS	18
2.3	NEROLIDOL.....	20
2.4	PIPERLONGUMINA.....	22
2.5	TIPOS DE MORTE CELULAR.....	23
2.5.1	NECROSE E NECROPTOSE	23
2.5.2	APOPTOSE.....	25
2.5.3	PARAPTOSE.....	28
2.5.4	MORTE CELULAR AUTOFÁGICA.....	29
3	Objetivo	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
	ARTIGO 1	33
	RESUMO	34
	RESUMO GRÁFICO.....	35
1	Introdução	36
2	Material e métodos	37
3	Análise estatística	42
4	Resultados	42
5	Discussão	50
6	Conclusão	54
	REFERÊNCIAS	56
	Material Suplementar	62

ARTIGO 2	65
ABSTRACT	65
Introduction	65
Material and Methods.....	66
Results	67
Discussion	68
References	71
CONCLUSÃO	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Os fitoquímicos são substâncias naturais de origem vegetal que desempenham diversas funções, tais como, estruturais, atrativas e proteção. Quando consumidas pelo homem, podem desempenhar muitos efeitos benéficos a saúde, como as alterações do estado oxidativo devido à elevação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio, atuando, por exemplo, contra o envelhecimento precoce, desenvolvimento de doenças crônicas e do câncer (FERREIRA E ABREU, 2007; MIN E MIN, 2014; YU, M. et al., 2018). Além disso, estas substâncias podem atuar diretamente sobre receptores ou outras moléculas sensoras que atuam em sistemas específicos de sinalização celular, por exemplo, através do controle molecular da expressão de genes específicos.

A indução de apoptose por fitoquímicos pode ser categorizada entre os inibidores de NF- κ B, ativadores de caspases, inibidores de AP-1, indutores de espécies reativas de oxigênio (EROs) e inibidores do ciclo celular (KUMAR et al., 2016). A piperlongumina (PLN), por exemplo, demonstra atividade anti-inflamatória através da redução da expressão de NF- κ B em células de câncer prostático. Também foi evidenciado que o tratamento com PLN reduz da expressão das interleucinas IL-6, IL-8 e MMP-9 estimuladas por TNF- α (GINZBURG et al., 2014).

Muito ainda se desconhece dos fitoquímicos já identificados, e nesse sentido, busca-se conhecer os mecanismos moleculares de ação destas substâncias a fim de se identificar potenciais efeitos terapêuticos destas drogas para o desenvolvimento de novos fármacos.

O estudo *in vitro* dos efeitos citotóxicos de drogas, tornaram-se muito importante na triagem de novas drogas. As agências reguladoras possuem guias de procedimento pré-clínicos *in vitro* que incluem os ensaios de genotoxicidade e mutagênese para eliminar-se possíveis efeitos carcinogênicos destas drogas (U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2012; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013). Estudos focados na identificação de novas drogas quimioterápicas utilizam estes ensaios *in vitro* com linhagens celulares para a identificação de substâncias com efeitos citotóxicos e antiproliferativos (bloqueio do ciclo celular e/ou indução de morte celular) e, descrição dos mecanismos moleculares de ação para melhor aplicabilidade em terapia.

A cultura de células *in vitro*, além de representar uma forma de triagem que não utiliza animais como modelo biológico, também possibilita a criação de um sistema isolado e controlado que facilita o entendimento de uma determinada via de ação a ser investigada. Portanto, é uma importante ferramenta para o estudo de potenciais drogas quimioterápicas

com efeitos no ciclo celular e na indução de morte celular programada (PALOZZA et al., 2010; ZHANG et al., 2016; ZHU E BU, 2017).

Ao buscar-se um novo quimioterápico, é preciso considerar os diferentes tipos de morte celular que podem ser induzidos por estas drogas e os mecanismos moleculares específicos envolvidos em cada um deles. Isso porque é sabido que em cada câncer ocorrem várias mutações/mudanças de expressão gênica que viabilizam a malignidade de modos distintos entre si. Por exemplo, os cânceres de pulmão de células não pequenas apresentam mais de 15 subtipos genômicos (HUANG et al., 2014). Assim, busca-se vias alternativas de indução de morte para cada determinada neoplasia (BAILEY et al., 2018; CHANOCK, 2018). Além disso, em cada câncer, a instabilidade genética e a rápida proliferação geram uma heterogeneidade intratumoral que permite o surgimento de subpopulações celulares geneticamente diversificadas (HUANG et al., 2014).

O cis-nerolidol (C-NER) e a piperlongumina (PLN) são um sesquiterpeno e um alcaloide, respectivamente, com atividade citotóxica já conhecida pela literatura, entretanto muito de suas vias moleculares ainda necessitam de melhor entendimento. Assim, o objetivo deste estudo, foi avaliar os fitoquímicos cis-nerolidol e a piperlongumina a fim de se conhecer seus efeitos citotóxicos e as suas vias moleculares de ação sobre a linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2/C3A).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 OS FITOQUÍMICOS NA MEDICINA E NA QUIMIOTERAPIA

Essencialmente os medicamentos são originados de três tipos de fontes de substâncias: as naturais (substâncias inorgânicas, de origem animal, ou de origem vegetal); as sintéticas, que podem ser em sua totalidade desenvolvidas em laboratório, ou podem ser modificações de substâncias naturais; e as de origem intermediária, normalmente produzidas com utilização da engenharia genética, ou produtos de fermentação.

A maioria dos fármacos utilizados na medicina moderna é originada de compostos isolados presentes nos materiais utilizados na medicina tradicional, tais como chás e extratos. O grande conhecimento da riqueza química da natureza, pelos povos primitivos e pelos indígenas é considerado fator fundamental para descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. Estes componentes são substâncias de origem natural, principalmente os vegetais (fitoquímicos), e devido à grande variabilidade química destes compostos, estes são a principal fonte de busca de novos medicamentos.

A ideia de produzir moléculas totalmente sintéticas para tentar encontrar alguma aplicabilidade, foi abandonada depois de perceber-se que pouquíssimas substâncias chegavam as etapas finais de testes. Assim, a pesquisa atualmente é focada em estudar as substâncias disponíveis na natureza e fazer pequenas modificações que tragam vantagens, como, maior biodisponibilidade e menores efeitos adversos (VIEGAS JR et al., 2006). Assim, o sucesso da indústria farmacêutica, e do desenvolvimento de melhores terapias, resulta da triagem de substâncias naturais com as tecnologias disponíveis.

O estudo de Newman e Cragg (2012) estimou que das 1355 novas drogas aprovadas, cerca de 15% são de origem biológica (peptídeos ou proteínas isoladas ou sintetizadas biotecnologicamente), 5% são de origem natural (animal ou vegetal), 22% são originados de produtos naturais (normalmente semissintéticos), e 4% são totalmente sintéticos, mas apresentam sítio ativo idêntico a de um produto natural. Em relação às drogas quimioterápicas, 24% são de origem biológica, 12% são de origem natural, 32% são originados de produtos naturais, e 12% são totalmente sintéticos, mas apresentam sítio ativo idêntico a de um produto natural. A Tabela 1 apresenta alguns dos principais quimioterápicos de origem de plantas ou derivados semissintéticos de plantas (DEMAIN E VAISHNAV, 2011).

Tabela 1 – Principais quimioterápicos da atualidade de origem natural ou derivados semissintéticos de plantas.

Quimioterápico	Classificação química	Origem	Aplicação
Vinblastina	alcalóide	<i>Catharanthus roseus</i>	Inibe polimerização do fuso mitótico
Vincristina	alcalóide	<i>Catharanthus roseus</i>	Inibe polimerização do fuso mitótico
Etoposido	alcalóide	<i>Podophyllum peltatum</i>	Inibidor de topoisomerase II
Teniposido	alcalóide	<i>Podophyllum peltatum</i>	Inibidor de topoisomerase II
Taxol	Diterpeno alcaloide	<i>Taxus brevifolia</i> e diversos fungos	Inibe polimerização do fuso mitótico
Navelbina*	alcalóide	<i>Catharanthus roseus</i>	Inibe polimerização do fuso mitótico
Taxotere*	alcalóide	<i>Taxus baccata</i>	Agregação das tubulinas
Camptotecina	alcaloide	Diversas plantas e fungo	Inibidor de topoisomerase I
Topotecan*	alcaloide	Derivado da Camptotecina	Inibidor de topoisomerase I
Irinotecan*	alcaloide	Derivado da Camptotecina	Inibidor de topoisomerase I

* derivados semissintéticos de plantas.

Fonte: Demain e Vaishnav (2011).

2.2 FITOQUÍMICOS

Os fitoquímicos são substâncias naturais presentes em plantas que conferem características como, cor, textura, aroma e sabor. Apesar de não serem considerados essenciais ao organismo humano, produzem efeitos benéficos a saúde quando utilizados a longo prazo. Entre as atividades benéficas destas substâncias, destacam-se as atividades antioxidante e anti-inflamatória que atuam na prevenção do desenvolvimento de doenças crônico-degenerativas e do câncer (BARBIERI et al., 2017). As principais classes de fitoquímicos são os alcaloides, compostos fenólicos (ácidos fenólicos, taninos, estibenos, cumarinas e flavonoides), terpenos, e compostos organosulfurados.

Os alcaloides são compostos de caráter básico produzidos não só por plantas, mas também animais, fungos e bactérias. São substâncias relacionadas ao crescimento e a proteção das plantas. Muitos animais podem adaptar-se a estas moléculas e usá-las em seu próprio metabolismo. Os alcaloides são classificados em alcaloides verdadeiros quando são sintetizados a partir de um aminoácido e possuem anel heterocíclico contendo nitrogênio, em

protoalcalóides quando também se originam de aminoácidos, porém o nitrogênio não está no anel heterocíclico, e em pseudoalcalóides quando não são originados de aminoácidos (SIMÕES et al., 1999). Muitos alcalóides são utilizados como fármacos já que apresentam receptores no sistema nervoso central e muscular, por exemplo, a cafeína (estimulante) e a codeína (analgésico) (BABBAR, 2015). A vimblastina, a camptotecina (não mais utilizada na quimioterapia) e o paclitaxel são exemplos de alcalóides antiproliferativos desenvolvidos como quimioterápicos; a vimblastina, por exemplo, atua bloqueando a mitose através da despolimerização dos microtúbulos do fuso mitótico e, é utilizada em diversos tipos de cânceres, principalmente em linfomas (PANDA et al., 1996; FRESENIUS KABI, 2015).

Os compostos fenólicos são substâncias que apresentam fenol em sua estrutura química e, são classificados em fenóis simples (não-flavonoides ou ácidos) ou polifenóis (flavonoides) dependendo da quantidade de fenóis presente na molécula. As suas funções biológicas nas plantas são estruturais, proteção contra a radiação UVB, atrativas (feromônios), antioxidantes e defesa (LIN et al., 2016). Os flavonoides são fortes antioxidantes e estão distribuídos em diversos grupos de substâncias, entre elas estão os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas antocianinas isoflavonas e chalconas (VAN ACKER et al., 1996). A classe dos não-flavonóides envolve os derivados dos ácidos hidroxicinâmico (por exemplo, ésteres dos ácidos caféico e cumárico) e hidroxibenzóico (por exemplo, ácidos salicílico e gálico) (LIN et al., 2016). Ainda não se utiliza os compostos fenólicos na quimioterapia, entretanto, há muitos estudos pré-clínicos com moléculas, como a quercetina e a curcumina, que apresentam atividade citotóxica e antiproliferativa (WANG et al., 2016; ADIWIDJAJA et al., 2017; JANA et al., 2018).

Os terpenos são substâncias que integram uma classe estruturalmente muito diversificada de substâncias que podem ser encontradas em plantas e animais. Possui fórmula estrutural geral $(C_5H_8)_n$ e sua classificação ocorre de acordo com o número de carbonos presentes. São classificados em hemiterpenos (5C), monoterpenos (10C), sesquiterpeno (15C), diterpenos (20C), triterpenos (30C), tetraterpenos ou carotenoides (40C), e politerpenos (moléculas com mais de 40C) (REDONDO-BLANCO et al., 2017). Os carotenoides, por exemplo, o licopeno e a luteína, compreendem um grupo de pigmentos presentes em plantas e animais que possuem atividade antioxidante e traz muitos benefícios ao organismo humano, atuando principalmente na prevenção de doenças decorridas de alterações da atividade oxidativa (MIN E MIN, 2014; BARROS et al., 2018).

Os compostos organosulfurados são moléculas orgânicas que apresentam o enxofre em sua estrutura química. São aqueles presentes, por exemplo, no alho, cebola, cebolinha e

alho poró, e atribuem odor e sabor característico a estes alimentos. São substâncias solúveis em água (por ex. aliina) ou em óleo (por ex. ajoene, dissulfeto dialílico) com alta atividade antioxidante, sendo muito estudados quanto a sua capacidade de reduzir a incidência de câncer e doenças cardiovasculares (DHAWAN E JAIN, 2005; SEKI E HOSONO, 2015; SUMAN E SHUKLA, 2016). A atividade citotóxica, antiproliferativa e anticâncer destas substâncias também são alvos de estudos, e entre seus mecanismos de ação, está à regulação do ciclo celular, a indução de morte celular programada, inibição da angiogênese e invasão (SEKI et al., 2008; YIE SU, 2013; CAO et al., 2014).

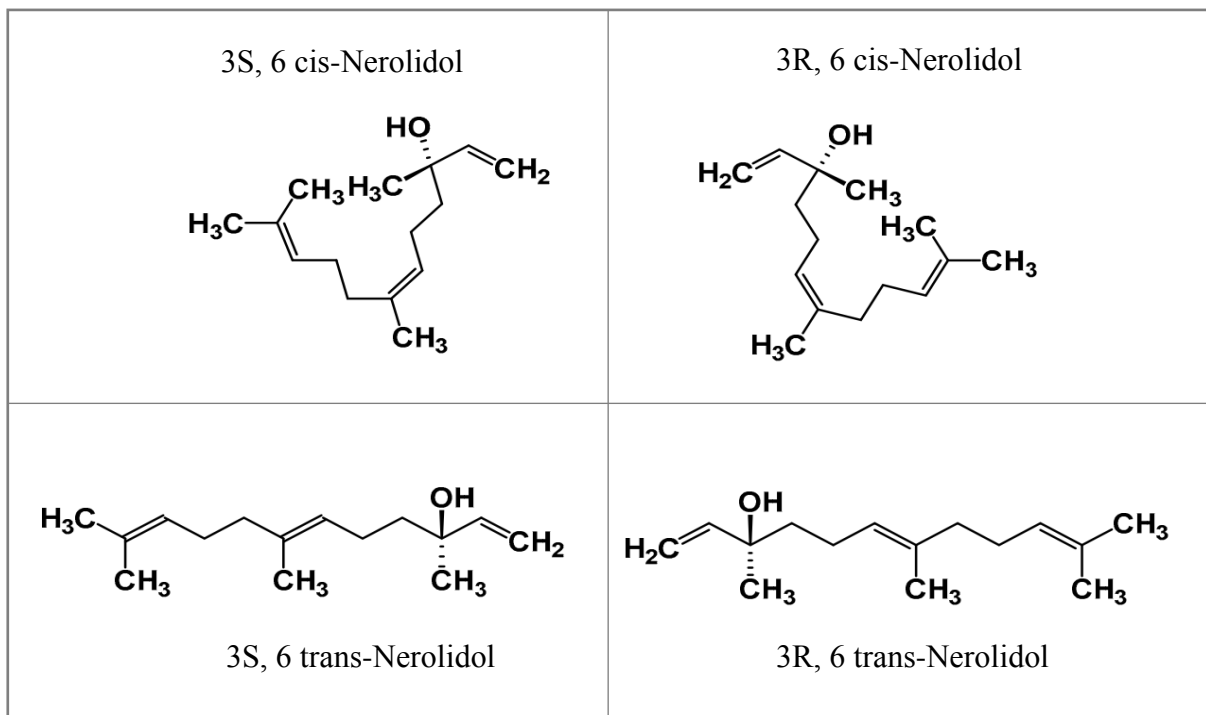
2.3 NEROLIDOL

O nerolidol ($C_{15}H_{26}O$, 222.372 g/mol) é um álcool sesquiterpeno presente no óleo essencial de diversas plantas de odor floral (AGNIHOTRI et al., 2004; NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2005; CABRAL et al., 2018). O nerolidol pode se apresentar sob 4 formas químicas tridimensionais diferentes que consistem em dois enantiômeros (carbono 3 assimétrico) e dois isômeros geométricos (dupla ligação no carbono 6); A Figura 1 apresenta as formas químicas do nerolidol. Os sesquiterpenos possuem diversas funções nas plantas, atuando na fotossíntese, respiração, crescimento e desenvolvimento, e defesa contra herbívoros e patógenos (CHAN et al., 2016).

Diversas atividades biológicas do nerolidol já são conhecidas e exploradas para o desenvolvimento de novos medicamentos; entre elas estão a propriedade antiparasitária (SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2017), antileishmania (ARRUDA et al., 2005; CEOLE et al., 2017) e antimalaria (SAITO et al., 2016).

O nerolidol (estrutura química não descrita) apresentou atividade genotóxica através do ensaio do cometa de linfócitos de camundongos cultivados *in vitro* e tratados com nerolidol em baixa concentração (13 μ M) (SAITO et al., 2016). Já no estudo realizado com camundongos utilizando o *trans*-nerolidol em concentrações de 250-2000 mg/kg de peso corpóreo, identificou atividade genotóxica e mutagênica através do ensaio do cometa e do micronúcleo de células de sangue periférico (PICULO et al., 2011). Quanto ao *cis*-nerolidol, a genotoxicidade é apresentada no Artigo 2 desta Tese.

Figura 1 – Estrutura química dos enantiômeros (R-S) e isômeros geométricos (cis-trans) do nerolidol.



Fonte: Modificado de Chan et al. (2016).

A atividade citotóxica do nerolidol já é conhecida em diversas linhagens tumorais humanas, entretanto, ainda existe um problema na hora de sintetizar os dados da literatura porque alguns estudos não identificam a forma química utilizada. E isso é um dado relevante, uma vez que é observado diferentes efeitos dos isômeros sobre os modelos biológicos já testados. O trans-nerolidol após 48 horas de tratamento nas linhagem A549 (adenocarcinoma alveolar humano) e DLD-1 (adenocarcinoma colorretal humano) possui IC₅₀ de 28,8 e 26,1 μM , respectivamente, pelo ensaio da resazurina (SYLVESTRE et al., 2007). Já após 72 horas de tratamento em células tumorais de mama MDA-MB-231 e MCF7, utilizando o ensaio do vermelho neutro, obtiveram-se IC₅₀ de 185 e 158 μM . Neste mesmo estudo, quando realizado associação com o quimioterápico doxorrubicina em camundongos inoculados com tumor de Ehrlich, não foi observado redução de massa tumoral, ou alterações de caspases 2 e 3/7 (HANUSOVA et al., 2017). A citotoxicidade da associação do trans-nerolidol com a doxorrubicina também foi realizada em outras linhagens celulares, e foi observado diferentes respostas dependendo da linhagem em teste (AMBROZ et al., 2015; AMBROZ et al., 2017).

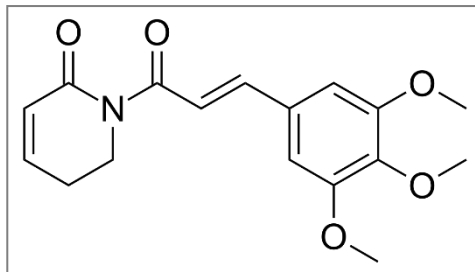
O estudo de Ryabchenko et al. (2008) utilizou um mix contendo as formas cis e trans-nerolidol e encontrou elevada citotoxicidade na linhagem de câncer cervical (HeLa), obtendo IC₅₀ de 1,5 μM . Os dados sobre os efeitos do cis-nerolidol ainda são muito escassos.

A atividade citotóxica cis-nerolidol após 24 horas de tratamento pelo ensaio do LDH foi identificada na concentração de 15 μ M na linhagem HeLa (BORIS et al., 2011).

2.4 PIPERLONGUMINA

A piperlongumina ($C_{17}H_{19}NO_5$, 317,34 g/mol) é um alcaloide verdadeiro presente em diversas espécies de pimentas (CHATTERJEE E DUTTA, 1967). A Figura 2 mostra a estrutura química da piperlongumina.

Figura 2 – Estrutura química da piperlongumina.



Já foram identificadas algumas propriedades biológicas da PLN, entre elas a função antibacteriana, anti-inflamatória, inseticida (BERNARD et al., 1995) e anticâncer. A piperlongumina demonstrou atividade antibacteriana contra *B. subtilis*, *E. aerogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enterica*, *P. mirabilis* e *B. cereus* (REDDY et al., 2008; MGBEAHURUIKE et al., 2018).

A função anti-inflamatória da piperlongumina foi identificada pela redução de NF- κ B, IL-6, IL-8, IL-17 e IL-23 em culturas de células de câncer prostático estimuladas com TNF- α (GINZBURG et al., 2014). Em ensaios *in vitro* e *in vivo*, a PLN demonstrou redução da atividade inflamatória induzida por LPS através de parâmetros de permeabilidade vascular, adesão e migração de células de defesa, e ativação de proteínas pro-inflamatórias (LEE et al., 2013).

A atividade anticâncer da piperlongumina vem sendo elucidada através de estudos utilizando linhagens celulares e modelos animais. A citotoxicidade *in vitro* da PLN utilizando linhagens celulares já foi atestada por diversos estudos presentes na literatura, que utilizaram, por exemplo, ensaios colorimétricos (JIN et al., 2014; XIONG et al., 2015; GAGAT et al., 2018). Sabe-se também que o efeito danoso da PLN ocorre devido ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzidas por esta droga (GOLOVINE et al., 2013; LIU et al., 2013; DHILLON et al., 2014; ROH et al., 2014; XIONG et al., 2015). Além disso, associa-se o estresse

oxidativo induzido pela PLN como o responsável pelo surgimento de danos no material genético (DHILLON et al., 2014; BHARADWAJ et al., 2015). Sabe-se também que a droga induz a parada de ciclo celular em G2/M (DUAN et al., 2016; LIU et al., 2017; THONGSOM et al., 2017; SONG et al., 2018) e que estes eventos estão ligados a indução morte celular por apoptose e/ou autofagia, por exemplo, em linhagens de câncer de mama (JIN et al., 2014; MAKHOV et al., 2014; SHRIVASTAVA et al., 2014), pulmão (LEWIS et al., 2015; WANG et al., 2015; KARKI et al., 2017; ZOU et al., 2018), e rim (MAKHOV et al., 2014; KARKI et al., 2017). O estudo de Mohammad et al. (2018) realizou tratamento com PLN (1 μ M) em culturas 3D (ensaio em Matrigel) e observou aumento de áreas necróticas da cultura.

Os estudos utilizando animais também apresentam resultados promissores. O tratamento com PLN (1,5-3,5 mg/Kg) reduziu o peso e o volume do tumores em camundongos com inoculação de células de câncer de bexiga via subcutânea, (LIU et al., 2017). No estudo de Duan et al. (2016), foi realizado inoculação intraperitoneal de células de câncer gástrico, e foi observado que o tratamento com PLN (3,6 mg/Kg) também reduziu o volume e o peso dos tumores.

Devido a elevada atividade citotóxica da PLN e do grande interesse em melhor investigar a aplicabilidade biológica destas substâncias, alguns estudos realizaram associação da droga com quimioterápicos. No estudo de Gong et al. (2014) foi observado efeito sinérgico na apoptose induzida em linhagem de câncer ovariano humano pela associação da PLN com o paclitaxel ou a cisplatina. Em células de leucemia resistentes a doxorrubicina tratadas com PLN e doxorrubicina, foi observado reversão da resistência a apoptose (KANG E YAN, 2015). Além disso, vários análogos ou derivados da PLN também têm desempenhado atividade citotóxica *in vitro* (ZHANG et al., 2017; ZOU et al., 2017; ZOU et al., 2018) e *in vivo* (ZOU et al., 2018).

2.5 TIPOS DE MORTE CELULAR

2.5.1 Necrose e necroptose

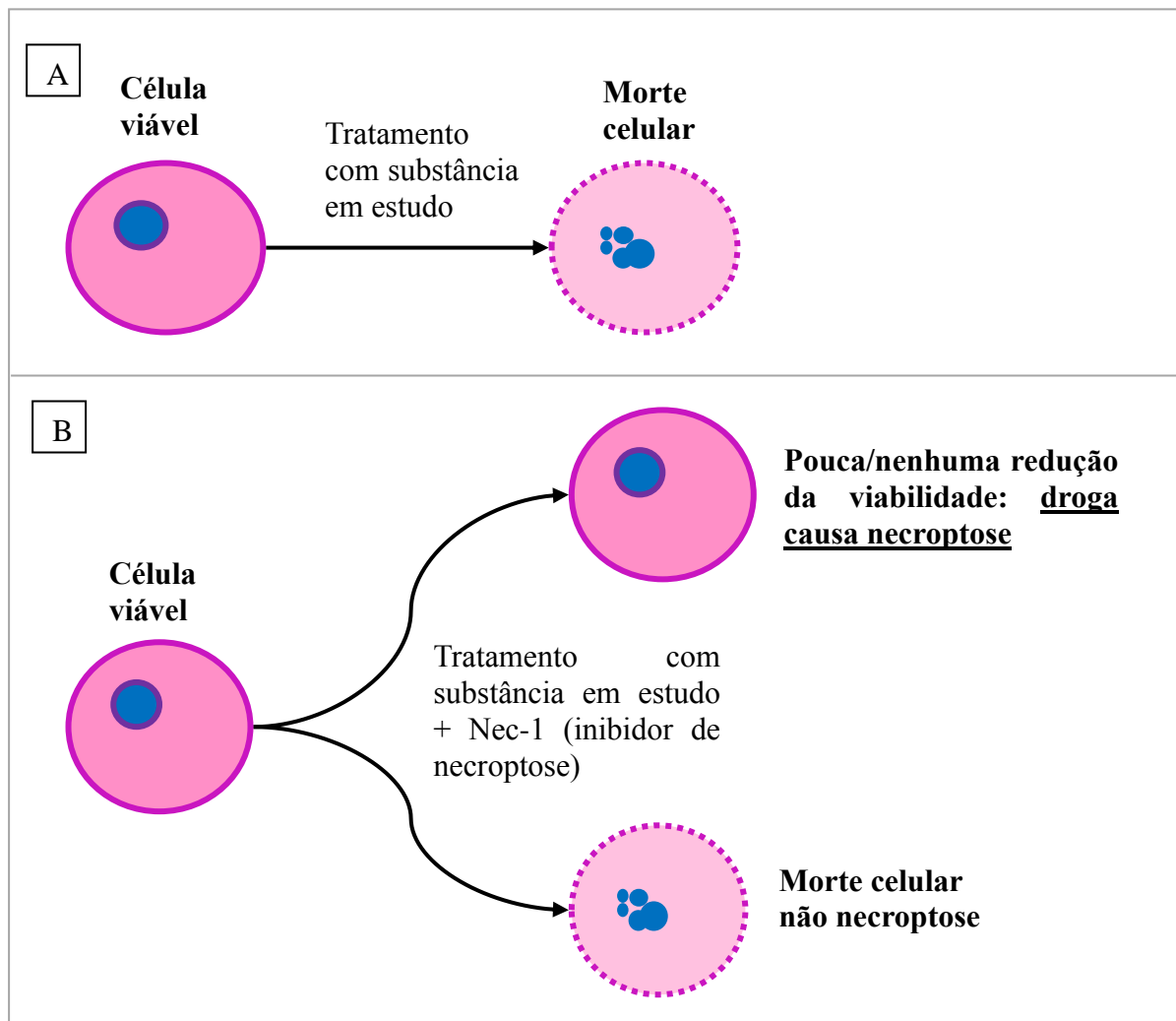
A necrose é o processo de morte celular que normalmente ocorre devido a intensos estresses aos componentes celulares, por exemplo, rápidas alterações osmóticas, choque térmico e altas concentrações de espécies reativas de oxigênio. Estes fatores levam a ruptura

da membrana plasmática e dos compartimentos intracelulares, e assim, o extravasamento de conteúdo intracelular leva a indução do processo inflamatório com o objetivo de eliminar as células lesionadas e o agente injuriante. Estes eventos são comumente descritos como rápidos, acidentais e sem controle molecular, entretanto, já se conhecem alguns tipos específicos de agentes nocivos que seguem etapas e processos moleculares definidos, classificando-os como processos programados de morte celular necrótica (necroptose) (SUN E WANG, 2014). Ainda se desconhece um marcador molecular único para a necroptose (KACZMAREK et al., 2013), porém, já se sabe que a ativação do receptor de quinase RIP3 e inibição de caspase 8 estão envolvidos na indução deste tipo de morte (SUN E WANG, 2014).

Os estudos que identificam morte celular por necroptose, normalmente o fazem pela demonstração de obtenção de igual resultado de toxicidade de determinada droga associada ao uso de inibidores de apoptose e autofagia (excluindo a possibilidade de ocorrência desses dois tipos de morte) e presença de marcadores de lesões de membrana plasmática, por exemplo, a dosagem de LDH ou a marcação do DNA com moléculas impermeáveis às células íntegras. Utilizando este princípio, um estudo utilizando linhagens de câncer de cólon e de estômago (CT26, HT29, HCT116 e SGC-7901) identificou indução de necroptose pelo fumarato de dimetilo através da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), redução de GSH e ativação de MAPKs (XIE et al., 2015). Também tem sido possível identificar a morte por necroptose utilizando o Nec-1, uma proteína que bloqueia a função de RIP1, e esta última conhecida por induzir a morte celular com padrão morfológico de necrose de modo independente de caspases. Por este princípio, o estudo de Yan et al. (2013) demonstrou a indução concomitante de necroptose e apoptose em culturas de células de hepatocarcinoma (Hep3B) tratadas com trifetilfosfônio. A Figura 3 possui esquema de como a necroptose é demonstrada utilizando Nec-1.

Sabe-se que a cisplatina, um quimioterápico utilizado em diversos tipos de cânceres sólidos, induz a morte celular por apoptose e necrose e, tem sido demonstrado que esta última ocorre de modo programado e parece estar relacionado a nefrotoxicidade causada por esta droga em pacientes em quimioterapia (XU et al., 2015; TRISTAO et al., 2016). Inclusive, quando utilizado Nec-1, foi observado restabelecimento da viabilidade celular de células tubulares tratadas com cisplatina (TRISTAO et al., 2012).

Figura 3 – Demonstração *in vitro* de indução de necroptose por droga de interesse.



A: Numa primeira etapa, é evidenciado que uma determinada substância de interesse provoca a morte celular. **B:** numa segunda etapa, utiliza-se Nec-1, um inibidor de RIP1 (indutor de necroptose) e observa-se se o efeito da droga na viabilidade celular é alterado. Caso o inibidor de necroptose restabeleça a viabilidade celular, deduz-se que a morte celular ocorreu por necroptose, e caso o inibidor não impeça a indução de morte, deduz-se que a morte celular não ocorreu por necroptose.

Fonte: o próprio autor.

2.5.2 Apoptose

A apoptose, também conhecida como morte celular programada do tipo I, é um importante tipo de morte relacionada a eliminação de células indesejadas, com mutações, lesões ou senescentes. Possui mecanismos muito conservados entre plantas e animais, e estes são muito bem descritos quanto às suas vias moleculares de execução (SUN E PENG, 2009). As neoplasias malignas apresentam como uma de suas principais características, a resistência aos sinais de indução de apoptose, e por isso é o tipo de morte celular programada mais bem

conhecido quanto as suas características morfológicas e moleculares. Assim, os genes e proteínas que controlam as vias apoptóticas são os principais estudados quando se busca novas drogas com aplicabilidade na quimioterapia (GERL E VAUX, 2005; OUYANG et al., 2012).

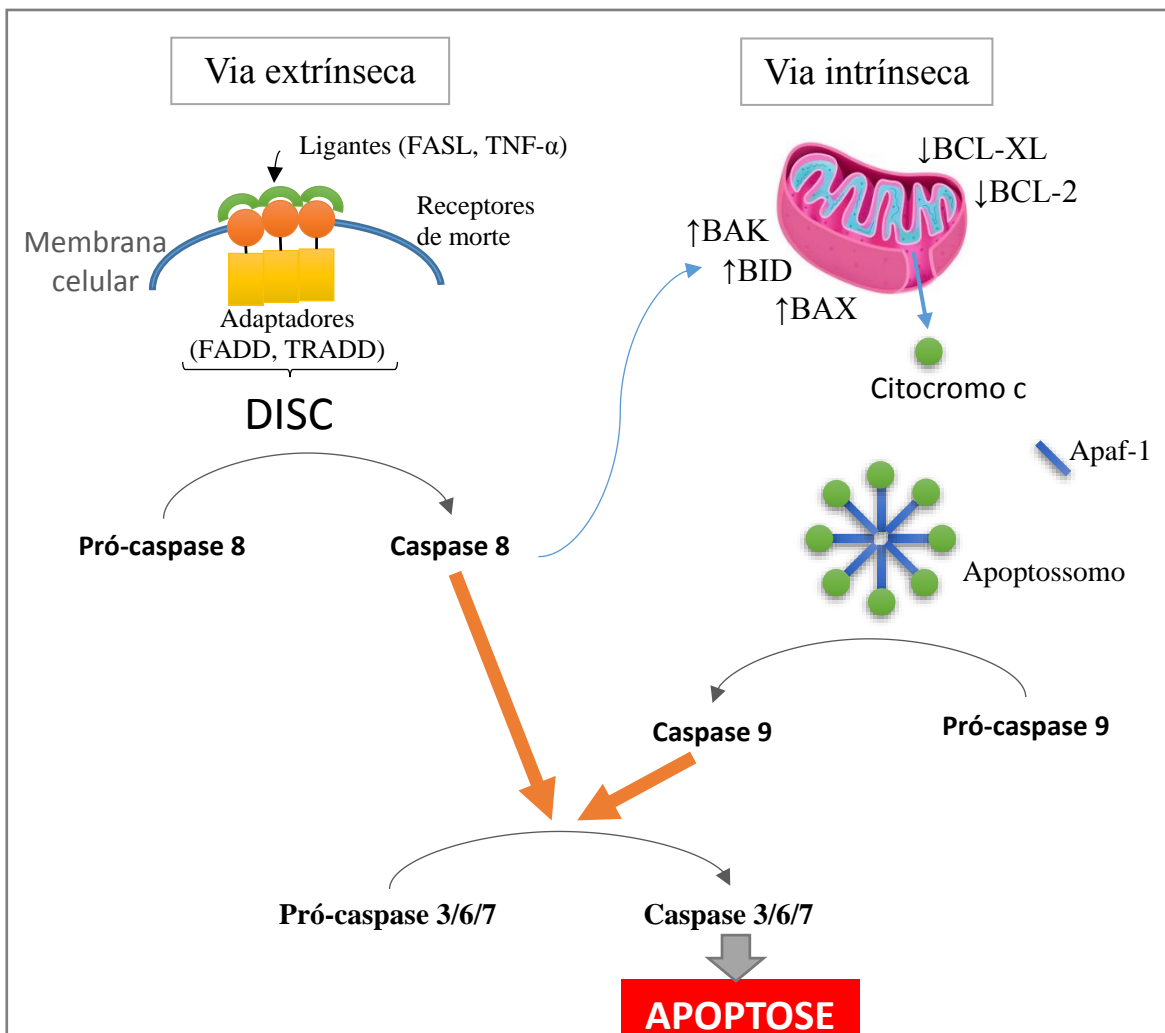
A apoptose é caracterizada pela fragmentação dos componentes celulares em pequenas vesículas para posterior eliminação destas por células fagocíticas. A degradação destes componentes é realizada pela ativação de proteases (pró-caspases). As vias de ativação de caspases ocorrem por dois mecanismos principais que podem ocorrer isoladamente, concomitantemente e independentemente, ou até mesmo podem convergir por vias em comum. São elas as vias extrínseca e intrínseca (ou mitocondrial). A via extrínseca ocorre pela indução de morte celular através da ligação de uma molécula indutora de morte a um receptor de morte presente na face exterior da membrana plasmática das células. Estas moléculas, por exemplo, citocinas, os ligantes de FAS e o TNF- α , podem ser sintetizadas por outras células teciduais ou células do sistema imune que detectam a presença de sinais de danos ou de indução de morte que a célula a ser induzida a morte apresenta. Após a ligação das moléculas indutoras de morte aos receptores, na face intracelular ocorre a formação do complexo DISC pela trimerização dos receptores de moléculas indutoras de morte e associação de duas moléculas adaptadoras (FADD, TRADD) e duas pró-caspases iniciadoras 8, 10 ou 2. As caspases iniciadoras são então ativadas e estas fazem a ativação de caspases efetoras (3, 6 e 7) e de endonucleases (RASTOGI et al., 2009; SAVITSKAYA E ONISHCHENKO, 2015).

A via intrínseca ocorre por modificações de moléculas relacionadas a permeabilidade mitocondrial. Quando a permeabilidade mitocondrial se encontra aumentada, ocorre a liberação do citocromo C para o citoplasma e este liga-se à Apaf-1 para formar o apoptossomo; este último promove a ativação de caspases 9 (iniciadoras) que ativam as caspases efetoras (3, 6 e 7). O controle da permeabilidade mitocondrial é realizado pelas proteínas da família do BCL-2, moléculas estas presentes no citoplasma e no interior de membranas, principalmente mitocondriais e do retículo endoplasmático. O aumento da permeabilidade mitocondrial pode ocorrer pela redução/inativação das proteínas anti-apoptóticas (por ex. BCL2, BCL-XL) e/ou pelo aumento/ativação de proteínas pró-apoptóticas (por ex. BAX, BAK1, BBC3, BID). Este controle pode ocorrer, por exemplo, pela proteína P53 na presença de danos no DNA. O P53 é um fator de transcrição que controla a expressão de diversos genes relacionados ao ciclo celular e a indução de morte por apoptose (BENNETT, 1999; RASTOGI et al., 2009). A via mitocondrial também pode ser ativada através

da caspase 8 – da via extrínseca – uma vez que também pode atuar na ativação da proteína pró-apoptótica BID, membro da família do BCL-2 (SUN E PENG, 2009; SAVITSKAYA E ONISHCHENKO, 2015). A Figura 4 apresenta as vias extrínseca e intrínseca de iniciação da apoptose.

Os derivados de mostarda nitrogenada, as primeiras drogas desenvolvidas para o tratamento de leucemias e ainda hoje utilizadas no tratamento de doenças autoimunes, atuam na modulação das proteínas da família do BCL-2 quando utilizados isoladamente ou podem aumentar o desempenho de outros quimioterápicos quando associados a estes (GIBSON et al., 1999; KONTOS et al., 2014).

Figura 4 – Vias extrínseca e intrínseca de indução de apoptose.



A via extrínseca se inicia pela ligação de moléculas indutoras de morte celular a seus receptores de membrana. Estas moléculas estão presentes no meio extracelular e podem ter sido produzidas pela própria célula, ou por outras células, como as do sistema imune. A via intrínseca é iniciada pelas proteínas da família do Bcl-2 que quando entram em desbalanço entre pró e anti-apoptóticas, aumentam a permeabilidade mitocondrial e permitem a liberação do citocromo c para o citosol. O controle destas proteínas pode ocorrer por diversas vias de sinalização, por exemplo, pela proteína p53

na presença de danos no DNA. A via intrínseca (mitocondrial) também pode ser ativada através da ativação de BID pela caspase 8 (via extrínseca).

Fonte: o próprio autor.

O estudo de Kontos et al. (2014), fez um levantamento de 68 drogas quimioterápicas que atuam na modulação de proteínas da família do BCL-2 pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. Entre elas estão os quimioterápicos clássicos (inibidores de mitose, agentes alquilantes, antimetabólitos, inibidores de topoisomerasas, antraciclinas e intercalantes de DNA) e os que possuem alvos específicos (inibidores de tirosina-quinase e anticorpos monoclonais). Isso nos mostra a importância da apoptose para a quimioterapia, e mesmo que as diferentes drogas possuam complexas vias de controle de sinalização, os danos celulares podem convergir para o mesmo processo de morte celular programada.

2.5.3 Paraptose

Alguns estudos utilizando fitoquímicos identificaram processos de indução de morte celular com características morfológicas e bioquímicas distintas dos processos de morte celular já conhecidos, porém de ocorrência programada (SAMADDER et al., 2009; TORRES-RAMIREZ et al., 2016; NEDUNGADI et al., 2018). Assim, surgiu a designação “paraptose” que alguns autores consideram até que estas vias de morte programada possam englobar mais de um tipo de morte celular ainda não bem caracterizados (WANG et al., 2004). Os estudos de vias de ação de morte ainda desconhecidos são de grande interesse clínico uma vez que as células neoplásicas malignas podem apresentar diferentes tipos de resistência aos sinais de indução de apoptose (LEE et al., 2016). O estudo de Zhou et al. (2018) observou a indução de paraptose em células de linhagem de câncer de mama resistentes à doxorubicina (MCF7/ADR) e à apoptose através do tratamento com nanopartículas de cobre através de ensaios *in vitro* e *in vivo*.

A principal característica atribuída a paraptose é a presença de vacuolização citoplasmática, sem a formação de corpos apoptóticos (cromatina no interior das vesículas, como na apoptose) e tipicamente engloba processos independentes da atuação de caspases (BROKER et al., 2005; NEDUNGADI et al., 2018). A Tabela 2 apresenta as principais características/diferenças entre os processos de necrose, apoptose, paraptose e morte autofágica.

Tabela 2 – Principais características/diferenças das mortes celulares por necrose, apoptose, paraptose e morte autofágica.

	Necrose	Apoptose	Paraptose	Morte autofágica
Membrana Plasmática	Rompida	Intacta	Intacta	Degradação gradual
Lisossomos	Rompidos	Intactos	Intactos	Intactos e ativos
Citoplasma	Membranas inchadas e rompidas	Condensado, membranas intactas de organelas	Numerosa vacuolização	Vacuolização e degradação dos componentes celulares
Corpos apoptóticos	Ausente	Presente	Ausente	Ausente

(DANAÏLA et al., 2013; BIALIK et al., 2018)

A paraptose ocorre durante o desenvolvimento e em processos de degeneração nervosa e, é caracterizada pela tumefação do retículo endoplasmático e/ou de mitocôndrias (SPERANDIO et al., 2000). Ainda não se conhece muito bem as vias moleculares envolvidas nos processos paraptóticos, mas atribui-se principalmente a indução de alterações mitocondriais (YUMNAM et al., 2016) e ao estresse de retículo endoplasmático. O estudo de Xue et al. (2018) utilizando as linhagens de carcinoma ovariano humano determinou que o fitoquímico morusina é capaz de induzir paraptose através do aumento do influxo de cálcio nas mitocôndrias advindo da liberação deste cátion pelo retículo endoplasmático em processo de estresse. A hesperidina, um glicosídeo encontrado em frutas cítricas, também atua induzindo a paraptose em células HepG2 através do aumento do influxo de cálcio mitocondrial (YUMNAM et al., 2016).

2.5.4 Morte celular autofágica

A autofagia é um processo de degradação celular que pode levar a morte coordenada pela própria célula (morte celular programada do tipo II) e, pode ser induzida por diversos fatores, entre eles, a falta de nutrientes, o estresse de retículo endoplasmático, infecções ou até mesmo a hipóxia. Ocorre pelo engolfamento do conteúdo citoplasmático por autofagossomos, e posterior fusão à lisossomos formando o autofagolisossomo. Assim, as enzimas lisossomais atuam degradando os componentes do interior desta vesícula. A autofagia compreende um importante mecanismo de homeostasia celular, uma vez que ocorre em níveis basais para a eliminação de componentes celulares anômalos e, em alguns casos, pode atuar na indução de morte celular autofágica ou outros tipos de morte celular. Neste último caso, isso pode ocorrer, por exemplo, quando a maquinaria apresenta fusão defeituosa

entre lisossomos e autofagossomos, ou quando é realizada a degradação de componentes essenciais a viabilidade celular e que na sua ausência induz a algum processo diferente de morte (BIALIK et al., 2018). O estudo de Goodall et al. (2016) identificou que a deleção no gene MAP3K7 em células de próstata de ratos, induz a formação da maquinaria autofágica, porém ocorre morte por necroptose através da sinalização p62/SQSTM1 e recrutamento de RIPK1.

Os autofagossomos são formados por duas camadas de membranas e sabe-se que sua formação se inicia pela membrana do retículo endoplasmático. Porém, o crescimento deste pode ocorrer pela adesão de quaisquer outros compartimentos intracelulares, uma vez que existem zonas de contato entre as organelas que permite a fusão de suas membranas. Após a maturação do autofagossomo, ocorre a aproximação com o lisossomo e posterior fusão mediada por proteínas do citoesqueleto, SNAREs, proteínas motoras e outros componentes. Os lisossomos apresentam somente uma camada de membrana, e inicialmente, o autofagolisossomo permanece com regiões de dupla e de única camadas. Em seguida, as hidrolases lisossomais fazem a degradação da membrana mais interna do autofagolisossomo (BIALIK et al., 2018; YU, L. et al., 2018).

Segundo Klionsky et al. (2003), os genes *ATG* (*autophagy-related* - cerca de 27 genes) estão especificamente envolvidos nas vias autofágicas, entretanto, aproximadamente outros 40 genes associados a outras funções também atuam na autofagia. Existem muitas vias de indução e controle dos processos autofágicos, e o tipo de processo vai depender da origem do agente nocivo. O gene MTOR, por exemplo, codifica uma proteína que inibe a atividade autofágica e tem sua função reprimida quando ocorre falta de nutrientes. O MTOR modula fosfatases e quinases que controlam o estado de fosforilação da proteína ATG13, e quando este último se encontra hipofosforilado ocorre então a indução da autofagia (MARINO E LOPEZ-OTIN, 2004; YU, L. et al., 2018).

Várias drogas antiproliferativas que induzem a autofagia, como a crocetina (ZHANG E LI, 2017), o resveratrol (PARK et al., 2016), a curcumina (GUO et al., 2016; ZHU E BU, 2017) e o fingolimod (LI et al., 2016), são estudadas com o objetivo de obtenção de novos quimioterápicos isolados e/ou coadjuvantes.

Algumas drogas já utilizadas na quimioterapia também induzem aos processos autofágicos (ROPOLO et al., 2012). A gemcitabina, por exemplo, é um nucleosídeo (análogo de citosina) utilizado no tratamento de câncer pancreático. Esta droga possui toxicidade conhecida por induzir apoptose, e tem sido demonstrado que este efeito parece estar relacionado a sua indução de autofagia através da indução da proteína VMP-1 (PARDO et al.,

2010). O estudo de (CHEN et al., 2014) demonstrou que a gemcitabina induz a autofagia através da conversão da proteína LC3-I e de modo independente de MTOR, e que isso é responsável pela toxicidade e indução de apoptose de células de câncer de mama triplo negativo (MDA-MB-231) através da modulação de *TP53* e de genes da família do *BCL2*.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos antiproliferativos da piperlongumina e do cis-nerolidol na linhagem de carcinoma hepatocelular humana (HepG2/C3A).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos citotóxicos da PLN e do nerolidol através do ensaio do MTT;
- Avaliar a atividade genotóxica da PLN e do C-NER pelo ensaio do cometa;
- Analisar o efeito da PLN e do C-NER na progressão do ciclo celular através da citometria de fluxo;
- Analisar o efeito da PLN e do C-NER em induzir apoptose através da citometria de fluxo;
- Estudar as características celulares induzidas pela PLN e do C-NER da cultura através de micrografias;
- Avaliar os efeitos da PLN e do C-NER na expressão de genes de controle de ciclo celular, apoptose, danos no DNA, estresse de retículo endoplasmático e estresse oxidativo.

ARTIGO 1

Manuscrito a ser submetido à revista *Biomedicine & Pharmacotherapy*, FI=3,457.

Efeito antiproliferativo da piperlongumina através da modulação da expressão de genes de ciclo celular, apoptose, danos no DNA, estresse oxidativo e estresse de retículo endoplasmático na linhagem HepG2/C3A

Bruna Isabela Biazi¹, Thalita Alves Zanetti¹, Lilian Areal Marques¹, Adrivanio Baranoski¹, Giuliana Castello Coatti, Mário Sérgio Mantovani¹.

¹Universidade Estadual de Londrina, Londrina – PR, Brasil.

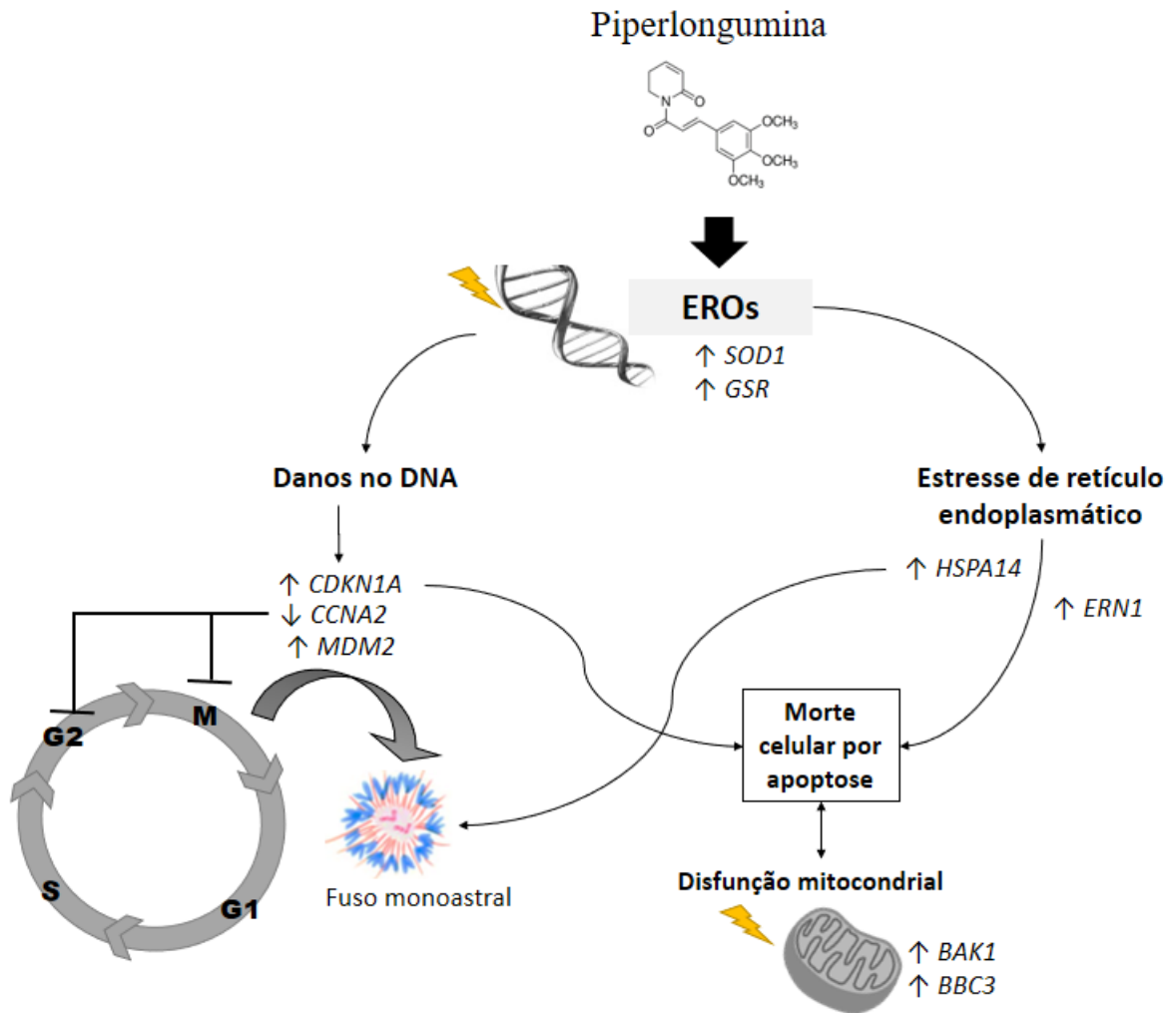
²Case Western Reserve University, Cleveland – OH, EUA.

RESUMO

Entender os mecanismos moleculares de ação de drogas candidatas a quimioterapia, é essencial para o desenvolvimento de novos fármacos com maior efetividade e redução dos efeitos adversos. A piperlongumina (PLN) é um alcalóide com propriedade antiproliferativa, mas com mecanismos de ação pouco elucidados. Este estudo correlacionou os efeitos antiproliferativos da PLN por meio de análises morfológicas e moleculares na linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2/C3A). A citotoxicidade desta droga ficou em concentrações $\geq 20 \mu\text{M}$. A PLN reduziu a proliferação celular detectado pela parada de ciclo celular em G2/M e com o surgimento de fuso com padrão monoastral. Além disso, também foi observado indução de morte celular por apoptose. A apoptose parece ter sido induzida pelo aumento da expressão dos mRNAs pró-apoptóticos *BAK1* (3,1x) e *BBC3* (2,4x), e também foi detectado aumento de caspases 9 e 3/7 ativas. A PLN produz injúria celular através da indução de espécies reativas de oxigênio (EROs) e danos no DNA. Também foi observado alterações na expressão de mRNA dos genes de controle de ciclo celular *CDKN1A* (4,9x) e *CCNA2* (0,5x). Os danos no DNA também ativaram a sinalização via *MDM2*, visto o seu aumento de mRNA para 3,0x; este gene também pode estar associado ao surgimento do fuso monoastral na mitose. Genes associados a degradação de EROs também estiveram com a expressão de mRNA aumentados (*GSR* 2,0x e *SOD1* 2,1x). A PLN também pode induzir ao estresse de retículo endoplasmático uma vez foi observado o aumento na expressão de mRNAs de *ERNI* (4,5x) e *HSPA14* (2,2x). Os genes de metabolismo de xenobióticos apresentaram um aumento na expressão de mRNA para *CYP1A2* (2,2x) e *CYP3A4* (3,4x) induzidos pela PLN. Assim observamos que muitas vias de danos induzidos pelo tratamento com PLN contribuem para os efeitos antiproliferativos, identificando biomarcadores de expressão gênica (mRNAs) e a formação do fuso monoastral.

Palavras-chave: estresse oxidativo, genotoxicidade, sinalização celular.

RESUMO GRÁFICO



1 Introdução

Entender os mecanismos moleculares na indução de morte celular de compostos candidatos a quimioterápicos, é essencial para o desenvolvimento de terapias anticâncer específicas e mais eficazes. Isso porque é sabido que o câncer pode resultar de diversos mecanismos distintos de alterações na expressão de genes de controle de proliferação e morte celular [1]. Porém, só a partir de quando se começou a conhecer melhor sobre os mecanismos moleculares de morte de celular e proliferação, assim como as diferenças existentes em cada tipo de câncer, é que as pesquisas se voltaram a desenvolver medicamentos alvo-específicos [2, 3]. Isso permitiu, para o tratamento de alguns tipos de cânceres, a produção de medicamentos com menores efeitos adversos e redução da recidiva [4-6]. Ainda assim, diversos canceres, por exemplo, o câncer de mama triplo negativo, ainda são tratados com terapias inespecíficas, e por isso tem-se a necessidade de estudar-se novas drogas e seus mecanismos específicos de modo de ação.

A morte celular induzida por drogas pode ocorrer por vários mecanismos. A regulação da apoptose e a autofagia compreendem os processos moleculares mais conhecidos, sendo a modulação da atividade das proteínas da família do BCL-2, um dos principais mecanismos de indução de morte [7-9]. Esta família compreende um grupo de genes que codificam proteínas pró ou anti-apoptóticas, e o desbalanço entre as quantidades destas proteínas dentro da célula é que dissipará a sinalização da morte por uma das vias da apoptose (via intrínseca). A via extrínseca da apoptose envolve a ação de moléculas de indução de morte (por ex. TNF- α , ligante de Fas) ligando-se a receptores externos da membrana plasmática; a sinalização intracelular é então dissipada após a ligação de moléculas adaptadoras FADD e TRADD na região interna dos receptores [10, 11]. Na autofagia, cerca de 27 genes (genes ATG) estão envolvidos na execução das vias autofágicas, e outros 40 genes relacionados a outras vias também podem atuar na autofagia [12, 13].

A piperlongumina (PLN) é um alcaloide encontrado em diversas espécies de pimentas. Dentro das propriedades biológicas deste composto, destaca-se sua atividade antiproliferativa. Estudos *in vitro* e *in vivo* já identificaram a propriedade inibitória da PL em células de linfoma de Burkitt [14, 15], glioblastoma [16, 17], câncer de cólon [18, 19], pâncreas [20], próstata [21], mama [22-25], rim [23, 26], cabeça e pescoço [27], pulmão [28], entre outras.

A PLN causa aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) [16, 17, 29], e a esse efeito é atribuído suas propriedades danosas às células, por exemplo, interferindo

na migração celular através da indução de estresse de retículo endoplasmático (ER) via EROs-ERE-MAPKs-CHOP [30], ou induzindo autofagia e apoptose em células primárias de leucemia mieloide através da via EROs-p38/JNK [31].

Este estudo avaliou os efeitos da piperlongumina em células HepG2/C3A quanto aos parâmetros de citotoxicidade, genotoxicidade, proliferação, morte celular, estresse oxidativo e potencial mitocondrial. Além disso, correlacionou-se estes efeitos aos achados na expressão relativa de genes envolvidos nestes processos. Isto nos possibilite compreender os mecanismos morfológicos e moleculares deste composto, contribuindo para um melhor entendimento de sua aplicabilidade como um futuro quimioterápico. Além disso, a HepG2/C3A é uma linhagem celular amplamente utilizada para estudar-se mecanismos de ação de drogas uma vez possui ativo o seu sistema de metabolização de xenobióticos.

2. Material e métodos

2.1 Agentes químicos

A Piperlongumina ($C_{17}H_{19}NO_5$) foi obtida da Sigma-Aldrich ($\geq 97\%$ - cat. n. SML0221), dissolvida em DMSO (30 mM) e estocada a -20°C . A solução foi diluída em meio de cultura para ser utilizada nos tratamentos, e a maior concentração utilizada (50 μM) apresentou 0,17% de DMSO; foi realizado o tratamento controle de veículo com esta mesma concentração de DMSO (0 μM de PLN). A Doxorrubicina (DXR – Pharmacia - CAS 23214-92-8) e o tert-butil (Sigma-Aldrich, cat. n. 458139) foram utilizados nos ensaios do Cometa e de geração de EROs, respectivamente, como controles positivos, e para os demais ensaios foi utilizado a Camptotecina (CPT – Merck Millipore - CAS 7689-03-4).

2.2 Cultura Celular

A linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2/C3A) foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro, livre de micoplasma. As células foram mantidas em meio DMEM (Gibco, CAT- 12800-017) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco, CAT - 12657-029) e 0,1% de penicilina/estreptomicina (Invitrogen CAT- 15240-096) mantidas em estufa úmida com 5% de CO_2 à 37°C . Em todos os testes as células foram semeadas e mantidas durante 24 horas para estabilização antes de receberem os tratamentos.

A densidade celular utilizada nos ensaios foi determinada por titulação utilizando o equipamento xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. Foram utilizadas $2,5 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços para os ensaios MTT e análise de caspases, $1,25 \times 10^5$ células/poço em placas de 24 poços para a contagem de rosetas, $61,7 \times 10^5$ células/poço em placas de 6 poços para os ensaios de citometria, cometa, extração de RNA total e para a obtenção de micrografias, e 650 células/poço em placas de 96 poços para o ensaio em 3D.

2.3 Citotoxicidade por MTT

A viabilidade celular foi estimada pelo ensaio do MTT segundo Mosmann [32] com modificações. Após 24 horas de tratamento (0-50 μ M de PLN e 1 μ M de CPT), as células foram encubadas por 4 horas em meio sem soro contendo MTT (500 μ g/mL). O meio de cultura foi removido e os cristais de formazan aderidos ao fundo da placa foram diluídos em DMSO para a leitura em espectrofotômetro (TP Reader – Thermo Plate, China) em comprimento de onda de 540 nm. A viabilidade celular foi estimada pela fórmula: [(absorbância média do tratado/ absorbância média do controle) x 100]. O IC₅₀ foi determinado utilizando o programa GraphPad Prism. O experimento foi realizado em três placas (repetições) contendo 6 réplicas/tratamento/placa.

2.4 Avaliação Celular por Citometria de Fluxo

A morte celular por apoptose e o ciclo celular foram avaliados em citômetro de fluxo Guava EasyCyte (Merck Millipore). Após 24 de tratamento (0-40 μ M de PLN), as células foram colhidas por tripsinização, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspendidas em 500 μ L de PBS. Para avaliar a morte celular por apoptose, foi utilizado o kit BD Pharmingen TM – *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (CAT- 559763) segundo o protocolo do fabricante; as porcentagens de células viáveis (ausência de marcação por anexina e 7-AAD), em apoptose inicial (marcadas com anexina) e apoptose tardia (marcadas com anexina e 7-AAD), e necrose (marcadas com 7-AAD) foram determinadas. Para avaliar o ciclo celular, 5 μ L de RNase (2 μ g/mL, Invitrogen - CAT: 12091-021) foi adicionado em 100 μ L suspensão celular e mantidas à 37° C durante 30 minutos. Para a lise celular e marcação do DNA, foi utilizado o kit *Guava Cell Cycle Reagent* (CAT: 4500-0220) segundo o protocolo do fabricante. As porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo (G1, S e G2/M) foram determinadas de acordo com a intensidade de fluorescência emitida por cada célula. Para cada

ensaio foram analisadas 5000 células por tratamento/experimento. Os ensaios foram realizados em três repetições (experimentos) simultâneas.

2.5 Obtenção de micrografias

O sistema em contraste de fase foi utilizado para observação das alterações morfológicas e densidade celular presente; já o sistema de fluorescência foi utilizado para captação de fluorescência do filtro vermelho (laser azul) para a detecção de rodamina 123, e fluorescência azul (UV) para a marcação de DNA utilizando Hoechst 33342. Após 24 horas de tratamento (0-40 μM de PLN), adicionou-se diretamente ao meio de cultura 2 μL de rodamina 123 (1 mg/mL; cat. n. R8004, Sigma-Aldrich) e 1 μL de Hoechst 33342 (2 mg/mL; cat. n. B2261); o meio de cultura foi homogeneizado e as culturas foram incubadas a 37°C por 20 minutos. Após isso, o meio de cultura foi retirado, lavou-se a cultura uma vez utilizando PBS a 37°C, e adicionou-se 1 mL de PBS para então as capturas no microscópio *EVOS® Microscope FL Auto Cell Imaging System 4* (Thermo Fisher) serem realizadas.

2.6 Contagem de células com fuso em formato monoastral

Após 4 horas de tratamento (0-40 μM de PLN) adicionou-se 1 μL de Hoechst 33342 (2 mg/mL; cat. n. B2261) diretamente ao meio de cultura que foi homogeneizado e permaneceu incubado a 37°C por 20 minutos. O meio de cultura foi retirado, lavou-se a cultura uma vez utilizando PBS a 37°C, e adicionou-se 1 mL de PBS e levou as culturas para microscópio de fluorescência para a contagem das células em formato de roseta. Foram analisadas 500 células por tratamento/repetição em três repetições simultâneas.

2.7 Formação de esferoides (cultura tridimensional)

Para a obtenção de culturas 3D em formato de esferoides, 50 μL de agarose diluída em meio de cultura (1,5%) foi utilizada para cobrir os poços da placa de 96 poços. Foram semeadas 650 células por poço diluídas em 50 μL de meio de cultura. A placa foi submetida à centrifugação a 2500 rpm por 5 min para que as células permanecessem centralizadas ao fundo de cada poço. Após 48 horas, foi adicionado mais 100 μL de meio de cultura e aguardou-se mais 72 horas para a formação das estruturas esféricas. Após isso, removeu-se 100 μL de meio e adicionou-se 150 μL de meio de cultura fresco contendo os tratamentos de PLN para as concentrações finais de 0, 10, 20 e 40 μM . O volume dos esferoides foi determinado utilizando a fórmula: $V=(4\pi r^3)/3$, onde r (raio) foi determinado utilizando-se o

software ImageJ no processamento das micrografias; as imagens dos esferoides foram obtidas pelo microscópio EVOS FL em contraste de fase (magnitude: 100 X) e capturadas em 24, 48 e 72 horas após receberem os tratamentos. Os experimentos foram realizados em três placas (repetições) contendo 6 réplicas/tratamento/placa.

2.8 Avaliação de genotoxicidade

Utilizou-se o ensaio do cometa [33] para análise do potencial da PLN em causar danos ao material genético. Após 3 horas de tratamento (0 e 40 μM de PLN), as células foram tripsinizadas, centrifugadas (1000 rpm por 5 minutos) e ressuspensas em 200 μL de meio de cultura. As células foram então diluídas em agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) e distribuídas em lâminas pré-gelatinizadas com agarose comum. As células foram lisadas (NaCl 2,25 M, EDTA 90 mM, Tris-HCl 9 mM, DMSO 10% e TritonX-100 1%) por 60 min à 4°C e submetidas a condições alcalinas (tampão de eletroforese (EDTA-titriplex 1 mM e NaOH 0,3 N) por 20 minutos. A eletroforese foi realizada em pH 13, 25V, 300mA por 20min. Após isso, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 N e pH 7,5 corrigido com HCl), fixadas com etanol absoluto (PA) e armazenadas a 4°C. Para análise utilizou-se 100 μL de solução contendo brometo de etídeo (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). As micrografias foram obtidas utilizando-se o microscópio EVOS® Microscope FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) em aumento de 200 vezes, e os cometas foram analisados pelo programa CometScore ©. O parâmetro *Tail moment* foi utilizado para as análises. Foram analisadas 100 células para cada tratamento/repetição em três repetições experimentais. Para cada tratamento, analisou-se 100 células para cada uma das três repetições.

2.9 Análise de expressão gênica relativa utilizando RT-qPCR

O ensaio foi utilizado para determinar mudanças no padrão de expressão de transcritos de genes relacionados as vias moleculares dos ensaios anteriormente avaliados. No material suplementar (Tabela S1) encontram-se os iniciadores dos genes analisados de apoptose (*BAK1*, *BAX*, *BBC3*, *BCLXL*, *CASP3*, *CASP7*, *CASP8* e *CASP9*), ciclo celular (*CCNA2*, *CCNB1*, *CCNB2*, *CDK1*, *CDKN1A* e *TP53*), sinalização de danos no DNA (*CHK1*, *CHK2*, *GADD45A*, *H2AFX* e *MDM2*), controle de proliferação (*HNF4A*, *MTOR*, *MYC*, *TNF* e *TRAF2*), estresse oxidativo (*CAT*, *GPX1*, *GSR* e *SOD1*), estresse de retículo endoplasmático (*ABL1*, *ATF6*, *EIF2AK3*, *ERN1*, *HSPA14* e *HSPA5*), e metabolismo de xenobióticos (*CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP2D6* e *CYP3A4*). Após 12 horas de tratamento (0 e 20 μM de PLN)

o RNA total foi extraído utilizando-se o Kit RNeasy (cat. N° 74106, Qiagen) segundo as especificações dos fabricantes. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro, e a pureza do RNA estimada pela razão das absorvâncias 260nm/280nm, sendo que somente as amostras com a razão entre 1,8 e 2,1 foram validadas. A integridade do RNA foi verificada em gel de agarose denaturante (1%).

A síntese do cDNA foi realizada de acordo com o protocolo de Biazi et al. [34]. A reação em tempo real foi realizada no equipamento CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Para tal, foi utilizado o kit SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix (cat. N° 172-5260 Bio-Rad), para um volume final de 11 µL, utilizando 5 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 250 ng de cDNA. A PCR em tempo real foi realizada nas seguintes condições: 95°C por 5 minutos e 45 ciclos de 95°C/15 segundos, 60°C/20 segundos, 72°C/20 segundos. Como genes de referência, foram utilizados os genes *GAPDH* e *RPL13A*. Os experimentos foram realizados em 3 repetições simultâneas.

2.10 Avaliação de caspases ativas

Este ensaio foi utilizado para a detecção das caspases ativas após tratamento contendo PLN. As caspases atuam durante o processo de morte celular por apoptose ativando DNases e clivando proteínas estruturais para a fragmentação dos compartimentos celulares. Após 24 horas de tratamento (0, 10 e 20 µM de PLN), realizou-se a análise das caspases 3/7 e 9 utilizando-se os reagentes Caspase-Glo® 9 e 3/7 Assay (Promega, cat. n. G8211 e G8091) segundo as especificações do fabricante. Os ensaios utilizam substratos para as caspases e a clivagem do material gera um produto luminescente através da atividade de luciferase. A leitura foi realizada no aparelho GLOMAX. Os experimentos foram realizados em 3 repetições simultâneas.

2.11 Detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de atividade mitocondrial

Estes ensaios utilizam a detecção de fluorescência emitida pelo DCFDA após oxidação pelas EROs e pela captação de rodamina 123 pelas mitocôndrias com potencial mitocondrial ativo. Após 24 horas de tratamento (0-40 µM de PLN), adicionou-se DCFDA (concentração final de 25 µM) ou rodamina 123 (1 mg/mL) e incubou-se as placas por 20 minutos a 37°C; após isso, as células foram colhidas, centrifugadas a 1000 rpm durante 5 minutos e ressuspensas em PBS. A detecção de fluorescência (5000 células) foi realizada pelo citômetro Guava EasyCyte (Merck Millipore) em filtro verde (laser azul) para o DCFDA

e filtro vermelho (laser azul) para a rodamina 123. Os experimentos foram realizados em 3 repetições simultâneas.

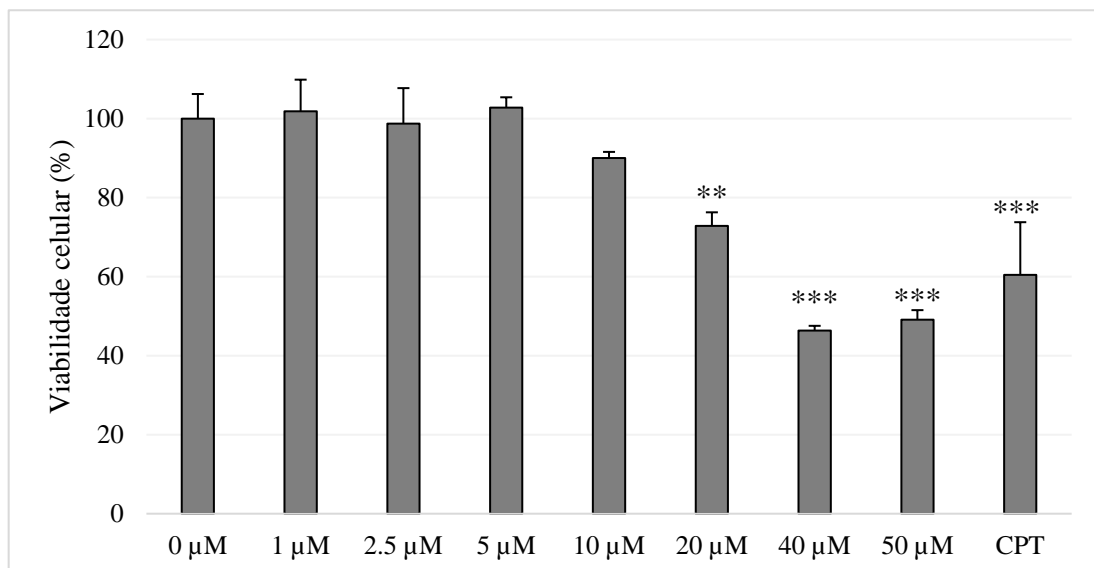
3 Análise estatística

Os ensaios, com exceção da RT-qPCR, foram avaliados por análise de variância (ANOVA) com os pós teste de Tukey, e Kruskal–Wallis para o ensaio do cometa e a cultura 3D. Para a análise de expressão gênica relativa, utilizou-se o programa REST 2009 e fold-change ≥ 2 . Para todos os ensaios, as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

4 Resultados

Após 24 horas de tratamento, a PLN reduziu a viabilidade celular significativamente para 72, 46 e 49% nas concentrações de 20, 40 e 50 μM respectivamente (Figura 1); o IC₅₀ foi de 40 μM .

Figura 1. Viabilidade Celular obtida pelo ensaio do MTT após 24 h de tratamento com PLN



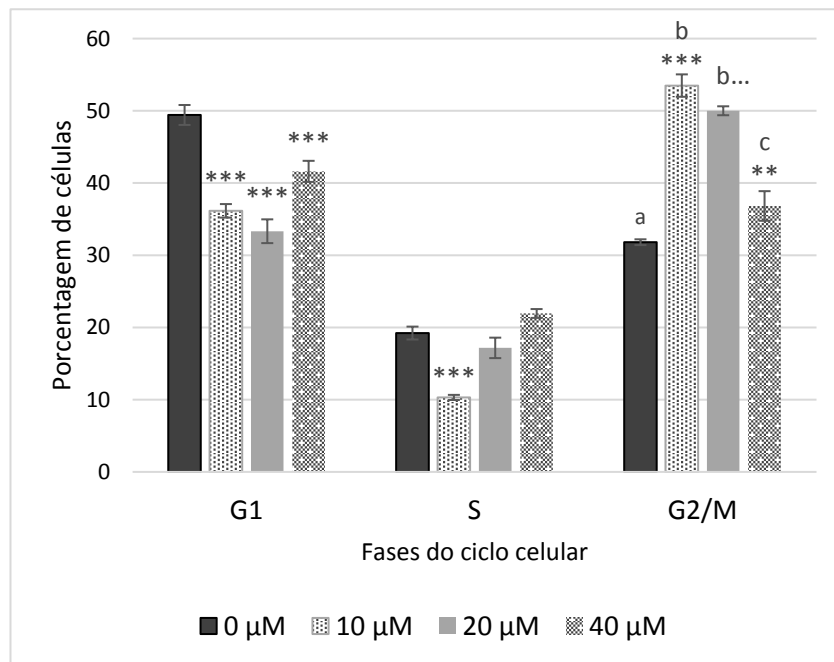
em concentrações de 0-50 μM .

** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle (0 μM). CPT: Controle positivo utilizando camptotecina 1 μM .

Corroborando com os resultados do MTT, a análise da distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular (Figura 2), demonstra parada em G₂/M, uma vez que foi

observado redução significativa da porcentagem de células em G1 e aumento em G2/M para todas as concentrações testadas de PLN, e redução de S em 10 μM . A contagem das células com fuso mitótico em padrão monoastral demonstra aumento significativo das rosetas de modo dose-dependente (Figura 3).

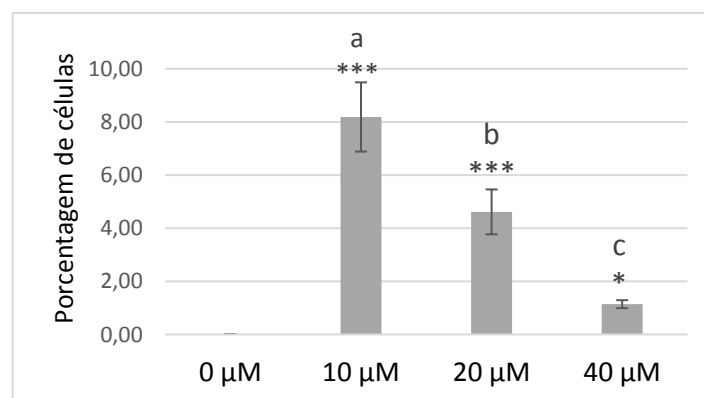
Figura 2. Distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular após 24 horas de



tratamento com PLN.

** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle (0 μM). Letras diferentes indicam diferença significativa.

Figura 3. Porcentagem de células em fuso monoastral (rosetas) após 24 horas de tratamento

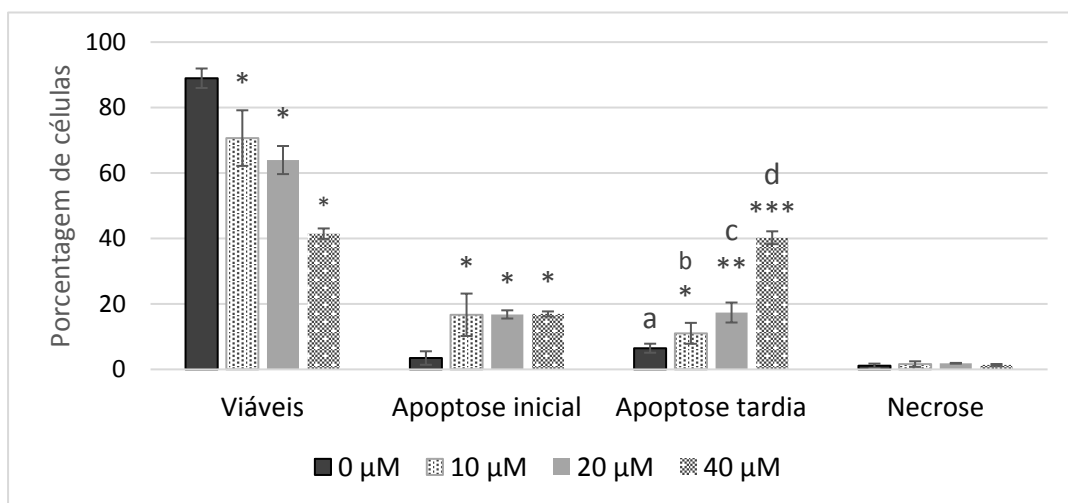


com PLN.

* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle (0 μM). Letras diferentes indicam diferença significativa.

Todas as concentrações testadas de PLN reduziam significativamente a porcentagem de células viáveis e, aumentaram as células em apoptose inicial e tardia. Na apoptose tardia houve aumento significativo entre as concentrações testadas (resposta dose-dependente). Nenhuma das concentrações induziu o surgimento de população celular em necrose (Figura 4).

Figura 4. Porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial, apoptose tardia e necrose após

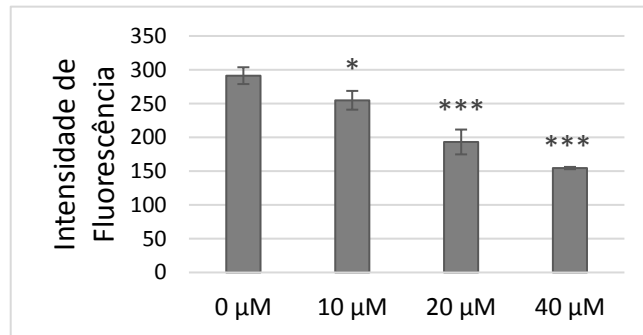


24 horas de tratamento com PLN.

* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle (0 μM). Letras diferentes indicam diferença significativa.

O potencial mitocondrial avaliado utilizando rodamina 123, após 24 horas de tratamento com PLN, esteve significativamente reduzido para as três concentrações analisadas (Figuras 5). A redução da intensidade da fluorescência do vermelho da rodamina também pode ser observada na Figura 6, do qual estão apresentadas as micrografias das culturas. Os quadros A, B, C e D representam os tratamentos 10, 20 e 40 μM de PLN, respectivamente. Também é possível observar na fluorescência do azul (marcação do DNA) a presença de núcleos com padrão morfológico de parada de ciclo celular pela formação de *rosetas* (fuso monoastral; setas verdes nos quadros B e C), e a formação de células picnóticas (compactação da cromatina evidenciada pelo aumento da intensidade de fluorescência e redução do volume nuclear) e a formação de corpos apoptóticos, que representam alterações presentes em células apoptóticas (setas vermelhas).

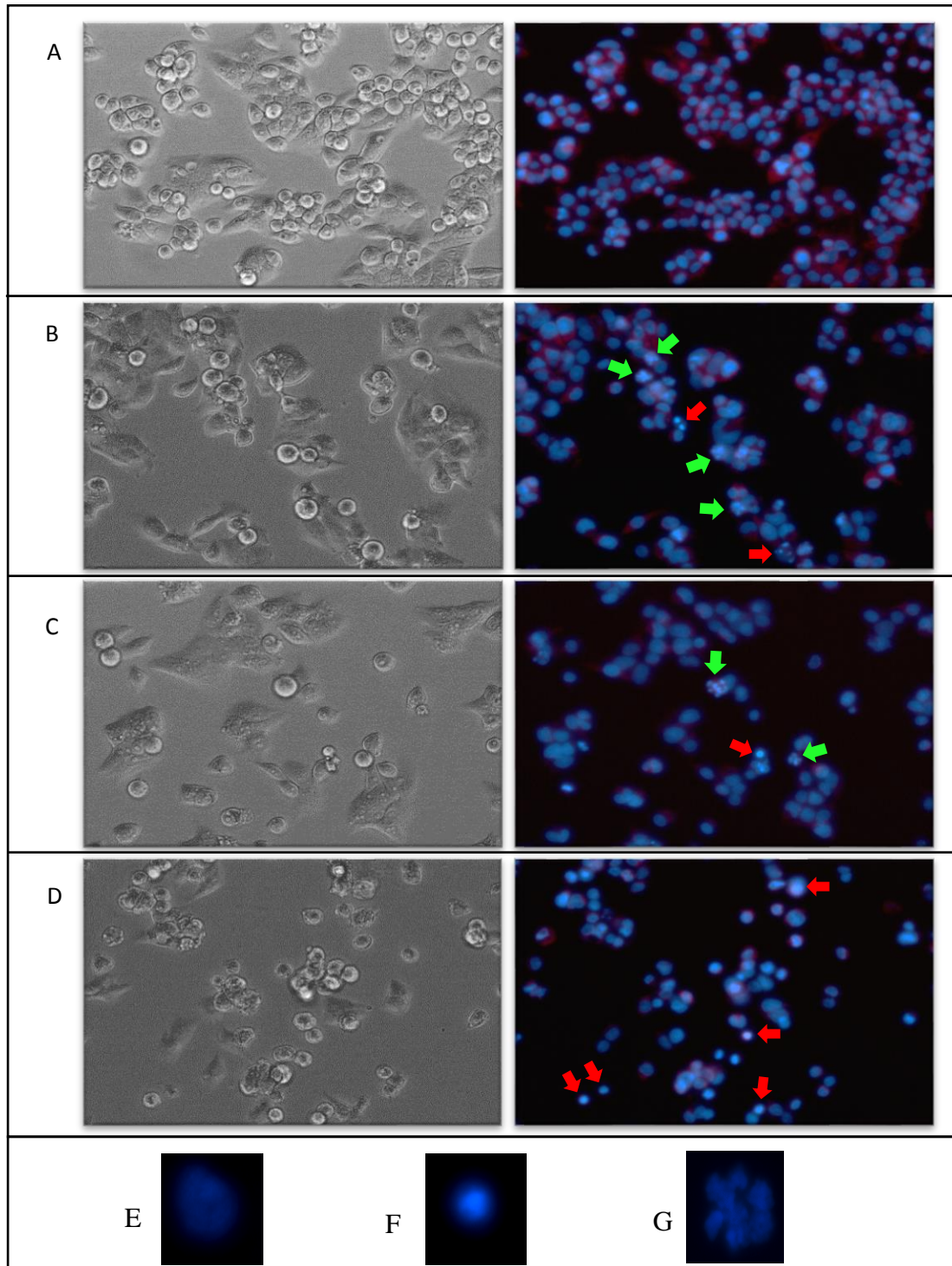
Figura 5. Potencial de membrana mitocondrial após 24 horas de tratamento em ensaio



utilizando rodamina 123.

* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle (0 μM).

Figura 6. Micrografias obtidas após 24 horas de tratamento utilizando o microscópio EVOS



FL.

Na coluna esquerda encontram-se os tratamentos contendo PLN nas concentrações de 0 (A), 10 (B), 20 (C) e 40 μM (D) por microscopia de contraste de fase. Observar as alterações morfológicas e redução da densidade celular das culturas que receberam tratamentos contendo PLN. Na coluna à direita encontram-se os mesmos quadrantes referidos ao lado esquerdo visualizados na microscopia de fluorescência; em azul vê-se os núcleos marcados com Hoechst 33342 e em vermelho a marcação utilizando rodamina. Nas setas verdes estão indicados os núcleos em formato de “roseta” e em vermelho os núcleos com padrões morfológicos de apoptose (picnose e corpos apoptóticos); observar

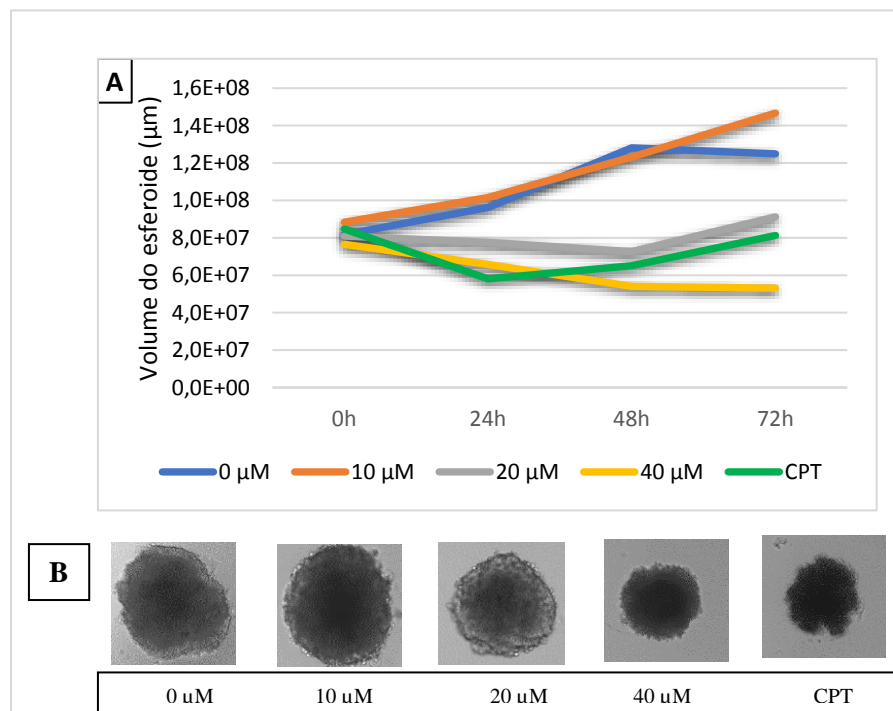
a redução na intensidade da marcação em vermelho nos tratamentos contendo PLN. **E**: célula interfásica; **F**: célula em apoptose (picnose); **G**: roseta.

A análise da cultura tridimensional (Figura 7) evidenciou após 24, 48 e 72 horas de tratamento, redução significativa de volume dos esferoides que receberam os tratamentos nas concentrações de 20 e 40 μM em relação ao controle (0 μM). Além disso, na maior concentração testada (40 μM) os esferoides apresentaram modificação morfológica similar ao controle positivo (camptotecina 2.5 μM), do qual é evidenciado apenas a presença de “massa” contendo restos celulares e ausência de características de células vivas (presença de núcleo e delimitação citoplasmática, por exemplo).

O ensaio do cometa demonstrou o efeito genotóxico significativo da PLN nas células HepG2/C3A. A Figura 8 apresenta o parâmetro *tail moment* com médias de 0,9, 433 e 11,7 para os 0, 40 μM e controle positivo, respectivamente.

Foi evidenciado indução significativa da formação de EROs pela PLN nas concentrações de 20 e 40 μM , sendo as medidas de fluorescências de 1513, 1845 e 1931 para as concentrações de 0, 20 e 40 μM , respectivamente (Figura 9), sendo que as concentrações de 10 e 20 não diferiram significativamente entre si, e já a de 40 foi significativamente maior que as outras duas menores concentrações.

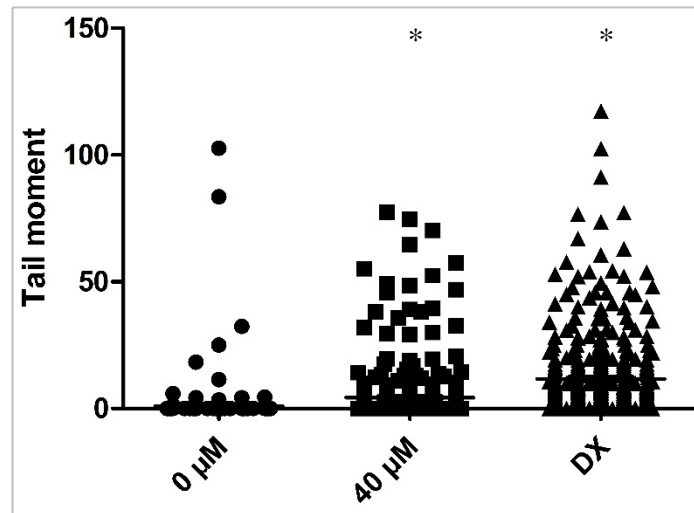
Figura 7. A: Análise dos volumes (micrometros) das culturas 3D (esferoides) tratadas com PLN nas concentrações de 0-40 μM antes de receberem os tratamentos (0h) e após 24, 48 e 72



horas.

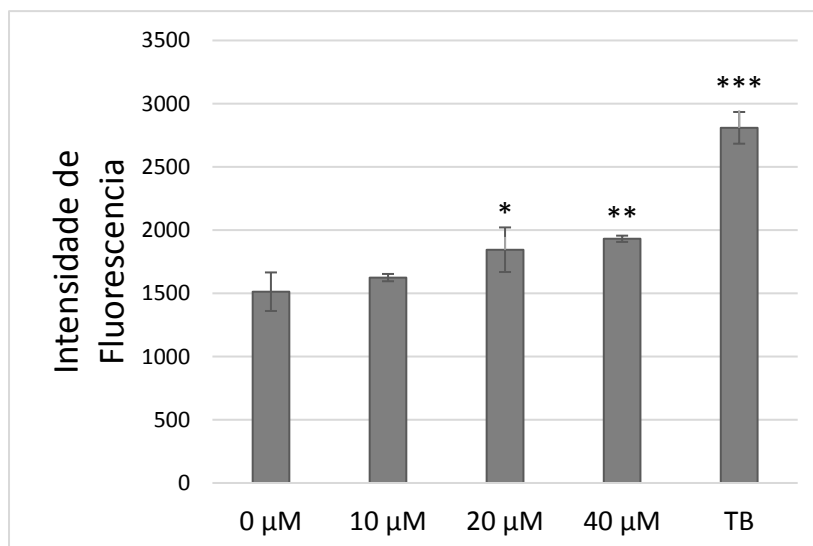
CPT: controle positivo utilizando camptotecina 2,5 μM . **B:** Micrografias (100 x) dos esferoides após 72 horas de tratamento.

Figura 8. Genotoxicidade avaliada pelo parâmetro *tail moment* obtido pelo ensaio do cometa após 3 horas de tratamento com PLN.



DX: Controle positivo utilizando doxorrubicina 1 μM . * $p \leq 0,05$ em relação ao controle (0 μM).

Figura 9. Detecção de EROs utilizando o ensaio com DCFDA por citometria de fluxo após



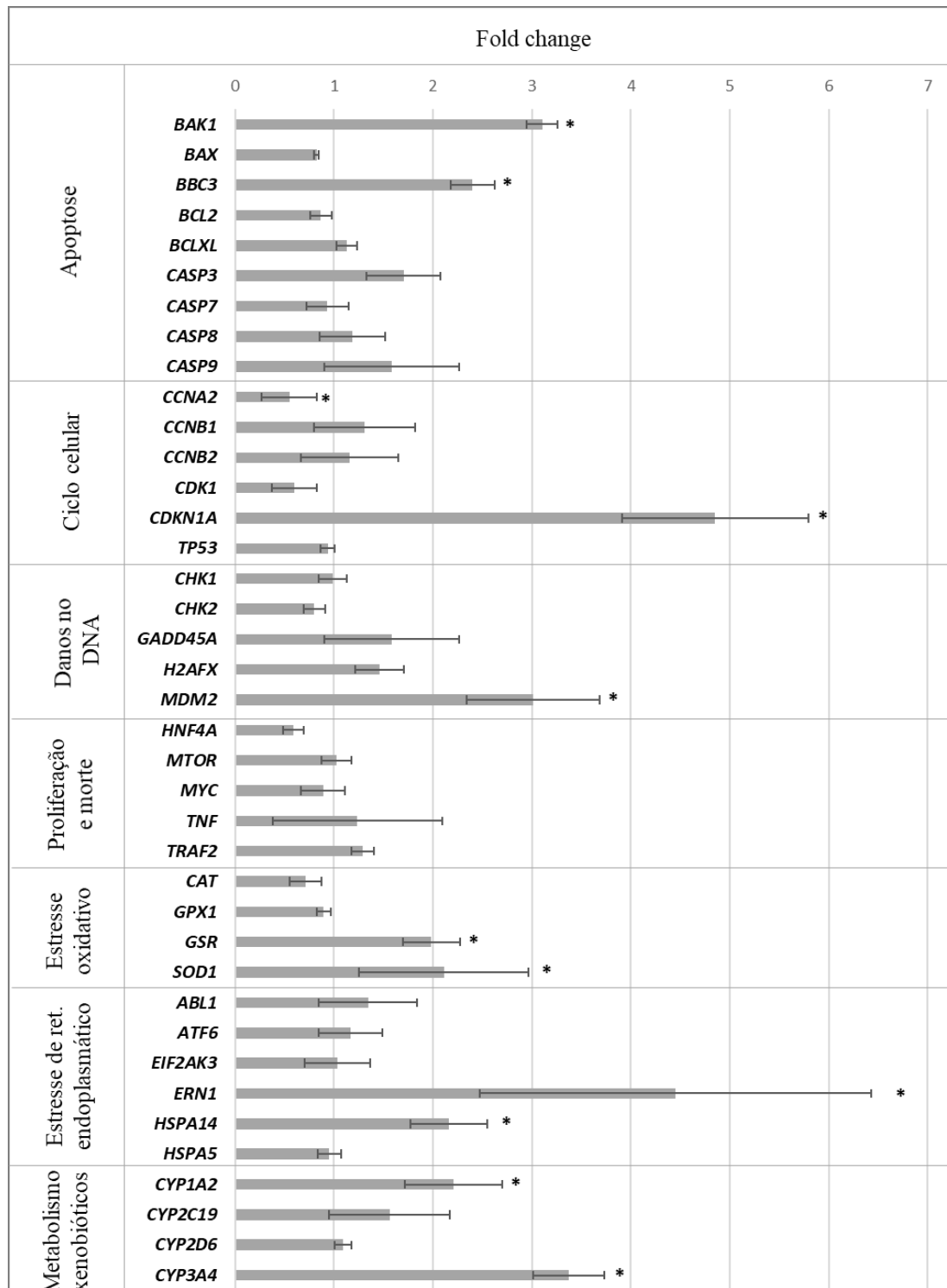
24 horas de tratamento com PLN.

TB: controle positivo utilizando tert-butil 200 μM . * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ em relação ao controle (0 μM).

Os dados obtidos na análise de expressão gênica relativa estão apresentados na Figura 10. O tratamento com PLN levou ao aumento da expressão de mRNA de genes de

ciclo celular (*CDKN1A*), apoptose (*BAK1* e *BBC3*), sinalização de danos no DNA (*MDM2*), estresse oxidativo (*GSR* e *SOD1*), estresse de retículo endoplasmático (*ERN1* e *HSPA14*) e, metabolismo de xenobióticos (*CYP1A2* e *CYP3A4*); além disso, houve redução da expressão de mRNA de *CCNA2* (ciclo celular).

Figura 10. Expressão gênica relativa avaliada após 12 horas de tratamento (PLN 20 μ M) pelo

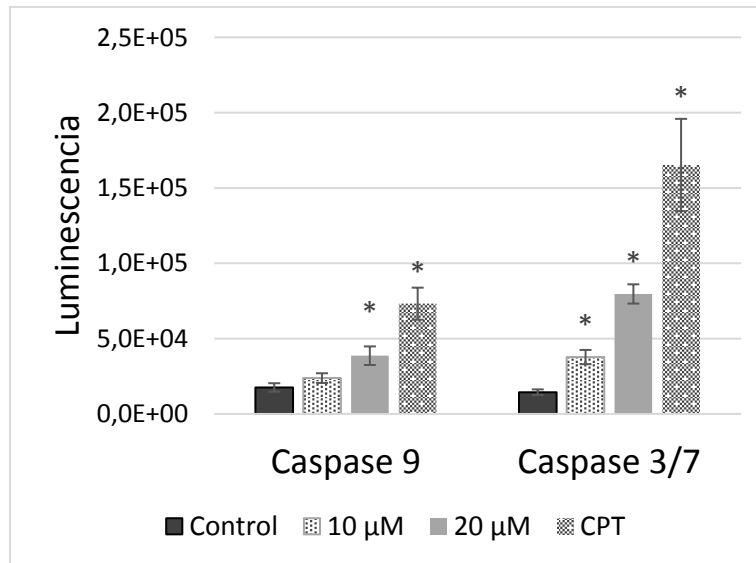


ensaio de RT-qPCR.

* $p \leq 0,05$ indica diferença estatisticamente significativa e expressão ≤ 0.5 ou ≥ 2 em relação ao controle (considerado como 1 para todos os genes).

Na análise de caspases ativas, houve aumento significativo de 2,2 vezes da caspase 9 na maior concentração testada (20 μM), e para as caspases 3/7 houve aumento significativo de 2,6 e 5,5 vezes mais nas concentrações de 10 e 20 μM em relação ao controle (Figura 11).

Figura 11. Análise de caspases 9 e 3/7 ativas.



CPT: Controle positivo utilizando camptotecina 1 μM . * indica diferença estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) em relação ao controle (0 μM).

5 Discussão

A piperlongumina já é conhecida devido a sua propriedade antiproliferativa, ansiolítica, antifúngica, entre outras [20, 35], destacando-se principalmente seu potencial de induzir o estresse oxidativo e o surgimento de danos genotóxicos. Neste estudo, foi possível evidenciar as propriedades citotóxicas e genotóxicas da PLN e identificar sua modulação na atividade transcricional de genes-chave envolvidos nas vias de proliferação, morte, danos ao DNA, estresse oxidativo e de enzimas de metabolismo de xenobióticos.

A citotoxicidade da PLN na HepG2/C3A foi identificada em concentrações $\geq 20 \mu\text{M}$. Jin et al. (2014) encontraram que a PLN nas linhagens tumorais de mama MCF7 e BT474 reduziu significativamente a viabilidade celular em concentrações $\geq 4 \mu\text{M}$, e a viabilidade da linhagem não tumoral MCF10A esteve reduzida apenas em concentrações $\geq 14 \mu\text{M}$ [22]. No estudo de [36] que utilizou diversas linhagens de câncer de cabeça e pescoço, verificou citotoxicidade da PLN em concentrações entre 2,5 e 5 μM após 24 horas de tratamento. Na

linhagem U937 (linfoma histiocítico de pulmão) a PLN induziu redução significativa da viabilidade apenas na concentração de 20 μM pelo ensaio do MTT após 24 horas de tratamento [37]. Utilizando este mesmo ensaio, observou-se redução da viabilidade de linhagens de células de câncer de estômago (MKN45 e AGS) em concentrações $\geq 20 \mu\text{M}$ após 24 horas de tratamento. O estudo de Han et al. [14] avaliou a citotoxicidade da PLN em duas linhagens de Linfoma de Burkitt pelo ensaio do MTS e observou IC50 de 2,8 e 8,5 μM . Apesar de uma variável citotoxicidade da PLN nas diferentes linhagens citadas, ainda assim pode-se considerar que existe um limiar similar de toxicidade para esta droga, e as diferenças são provavelmente decorridas das diferentes sensibilidades entre as linhagens e os diferentes ensaios. Além disso, alguns estudos verificaram menor citotoxicidade da PLN em células não tumorais primárias ou em linhagens não tumorais quando comparadas às linhagens tumorais [16, 27, 30].

A partir da citotoxicidade observada na linhagem HepG2/C3A nós realizamos outros ensaios afim de compreender se a redução na viabilidade poderia estar associada a redução na proliferação e/ou à indução de morte celular. Nossos resultados mostraram que a redução na viabilidade dos tratamentos com PLN está relacionada a redução da proliferação celular devido a parada das células nas fases G2 e mitose e, também pela indução de morte celular por apoptose. A parada em mitose observada pelo surgimento das células em rosetas e o aumento de G2/M identificada pela análise de citometria de fluxo, sugerem bloqueio do ciclo celular também em G2, uma vez que a magnitude das porcentagens de células na análise das rosetas ser inferior as porcentagens de G2/M observadas na citometria. A fusão monoastral ocorre quando ao invés da formação do fuso mitótico bipolar, há um arranjo central de microtúbulos cercados por cromossomos [38], sendo que este efeito provocado pela PLN é descrito pela primeira neste trabalho.

Outras drogas, como o monastrol [39], os derivados de hemisterlina [40], a S-trityl-L-cysteine [41], e pterocarpanos [42], induzem ao surgimento do fuso monoastral e são estudados quanto ao seu potencial efeito antitumoral. Normalmente, estas substâncias atuam inibindo proteínas motoras (cinesinas) do fuso mitótico [43]. O padrão morfológico confirma os dados gerados na citometria pois é possível observar que o aumento das células paradas em mitose está reduzindo conforme há aumento da concentração da droga, e o aumento de células apoptóticas também ocorre de modo dose-dependente.

Na expressão de mRNA de genes envolvidos no controle de ciclo celular e de apoptose encontramos redução da expressão de *CCNA2* que se correlaciona com a parada do ciclo celular nas fases de G2/M, uma vez que este codifica a ciclina A2, responsável pelas

transições entre as fases G1 e síntese, e G2 e mitose. As ciclinas são proteínas que se associam às quinases dependentes de ciclina (CDK) e seus complexos atuam induzindo à progressão do ciclo celular. Foi detectado também aumento da expressão de transcritos de *CDKN1A*, o codificador da proteína p21; esta proteína possui sua transcrição controlada pela proteína P53 (fator de transcrição). A função de p21 pode estar relacionada a parada do ciclo em G1 e S (através da inibição dos complexos ciclina E/CDK2 ou ciclina A/CDK2) ou em G2 através da repressão de transcricional de EMI1 na presença de danos no DNA [44]. Isso confirma a parada de ciclo observada neste estudo, que além de ocorrer na mitose, também ocorreu em G2.

A análise dos genes da regulação da apoptose demonstrou aumento na expressão de mRNA de *BAK1* e *BBC3*. As proteínas produzidas por esses genes fazem parte da *família de proteínas do Bcl-2* presentes nas mitocôndrias e controlam a permeabilidade mitocondrial. Uma vez que a permeabilidade fica aumentada e ocorre o extravasamento do conteúdo mitocondrial para o citosol, temos então a ativação das caspases iniciadoras, e subsequentemente das caspases efetoras da apoptose como consequência. A atividade transcricional dos genes que codificam caspases não foi alterada após o tratamento com PLN na HepG2/C3A, porém, o ensaio de atividade das caspases 3/7 e 9 demonstrou que houve aumento com o tratamento com PLN. Isso ocorre porque estas proteínas estão normalmente presentes no interior da célula, e em situações de necessidade, sua ativação ocorre de maneira rápida dando início as suas funções na apoptose [10]. Neste estudo, também observamos redução no potencial mitocondrial dos tratamentos que receberam PLN, correlacionando-se com a indução de apoptose iniciada por alterações mitocondriais.

Na avaliação 3-D (esferoides), verificamos nesse estudo que as mesmas concentrações utilizadas nos ensaios de monocamada, também produziram efeitos antiproliferativos, sendo que apenas nas concentrações $\geq 20 \mu\text{M}$ foi demonstrado redução significativa do volume do esferoide.

A indução de apoptose por PLN está relacionada a indução de estresse de retículo endoplasmático (RE), uma vez que foi observado aumento da atividade transcricional de *ERN1* e *HSPA14*. Estes genes codificam proteínas presentes no RE que atuam como sensores de proteínas malformadas, sendo que o primeiro também atua como fator de transcrição de genes de resposta ao estresse de retículo, e já o segundo, atua modulando a atividade de ERN1 para prevenir a indução de apoptose devido ao estresse reticular. Diversos estudos também descrevem a indução de apoptose pelo estresse de RE através da sinalização da proteína PUMA [45-47]. Esta é codificada pelo gene *BBC3* que também esteve com sua expressão de

mRNA aumentada neste estudo. O aumento da expressão *HSPA14* também já foi encontrado na indução da formação do fuso monoastral através da inibição da cinesina Eg5 em células de mieloma múltiplo [48] e pode em nosso estudo também estar correlacionado com a formação do fuso monoastral observado nos tratamentos com PLN.

Assim, é possível que a PLN atue por diversos mecanismos de injúria e de sinalização intracelular, uma vez que também induziu danos genotóxicos e aumento de EROs. O ensaio do cometa demonstrou efeito genotóxico desta droga e é correlacionado com o aumento observado na expressão de mRNA de *MDM2*; a proteína MDM2 atua regulando a função de P53, e durante a sinalização de danos no DNA, é fosforilado por ATM e ATR [49]. Uma vez ativado, MDM2 pode atuar degradando CDC25C, e este último quando inibido causa a parada do ciclo celular em G2/M [50], sendo a formação de fuso monoastral, um dos padrões de parada de ciclo que podem surgir [51].

A indução de danos pela PLN através do estresse oxidativo já foi descrita [20, 31], entretanto, o aumento encontrado na HepG2/C3A dos transcritos de *GSR* e *SOD1* ainda não havia sido descrita para tratamentos com PLN. O GSR codifica a enzima glutationa redutase; esta atua como antioxidante através da sua função de regeneração de uma outra enzima (glutationa oxidase) que se encontra oxidada pela ação de EROs. Já o *SOD1*, codifica uma metaloenzima que transforma o radical superóxido em peróxido de hidrogênio para permitir que outras enzimas o degradem em água e gás oxigênio. O aumento destes transcritos demonstra que a célula está respondendo à elevação de EROs não somente pela utilização de suas enzimas antioxidantes armazenadas no interior da célula, mas também modulando sua atividade transcricional para obter uma resposta mais eficaz. Isso por que o estresse oxidativo pode induzir ao surgimento de diversas alterações nocivas às células [52], como algumas detectados neste estudo (danos no DNA e o estresse de retículo endoplasmático).

As modificações observadas na expressão das enzimas de metabolismo hepático se destacam por nos trazer importantes parâmetros toxicológicos a serem considerados quando se propõe o desenvolvimento de um novo medicamento. A atividade das enzimas do citocromo P450 estão presentes na maioria dos tecidos humanos, sendo que sua maior atividade se encontra no fígado, estômago, pulmões e rins. Estas enzimas atuam oxidando moléculas endógenas ou exógenas; podem atuar na degradação de xenobióticos, ou até mesmo na ativação dos mesmos em substâncias tóxicas, e também contribuem para o metabolismo oxidativo de substâncias endógenas, como hormônios e citocinas. O grande polimorfismo existente destas enzimas nas populações humanas, traz diferentes perfis de biodisponibilidade e farmacocinética entre os indivíduos [53, 54].

Neste estudo, foi identificado aumento significativo da expressão dos transcritos de *CYP1A2* e *CYP3A4*. O aumento da expressão destas enzimas está relacionado ao aumento da demanda de oxidação devido a presença de um substrato da enzima. Essa interação aumentada entre enzima/substrato pode reduzir a ligação, e conseqüentemente, a oxidação, de outros substratos. Portanto, essa ação inibitória, pode aumentar a disponibilidade de outras drogas, podendo, por exemplo, aumentar os efeitos destas outras substâncias. As enzimas *CYP1A2* e *CYP3A4* estão entre as principais envolvidas no metabolismo de xenobióticos (cerca de 15% e 50%, respectivamente). Dois estudos identificaram a ação PLN em *CYP1A2* e *3A4* através da ação inibitória da PLN sobre o *pool* microsomal humano [55, 56]. Isso pode sugerir que a ação inibitória da PLN sobre estas duas enzimas, estimula o aumento da expressão de mRNA das mesmas de modo a suprir as necessidades da célula [57, 58].

6 Conclusão

Neste estudo, foi possível observar os efeitos danosos da piperlongumina na linhagem HepG2/C3A, sendo alguns efeitos morfológicos e moleculares ainda não descritos. A piperlongumina age induzindo a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e, em resposta ao estresse oxidativo, foi observado aumento da expressão dos genes *GSH* e *SOD1*. Assim, é possível inferir que os danos genotóxicos e o estresse de retículo endoplasmático (RE) ocorram devido a ação de EROs sobre o DNA e o RE, apresentando modulação da transcrição dos genes *MDM2*, *ERN1* e *HSPA14*.

Também foi possível identificar que a PLN induz da expressão de genes codificantes de proteínas do citocromo P450 (*CYP1A2* e *CYP3A4*).

Este estudo evidencia que a piperlongumina induziu a parada do ciclo celular em G2 e mitose (fuso monoastral), sendo que este efeito parece estar relacionado ao aumento de *MDM2*. Também encontramos dados inéditos sobre a modulação da apoptose via aumento transcricional de pró-apoptóticos *BAK1* e *BBC3*. Além disso, o tratamento com PLN também inibiu o crescimento da cultura 3D (esferoides). Portanto, os dados gerados demonstram o potencial da piperlongumina em ser utilizada como medicamento antiproliferativo.

Agradecimentos

Agradecemos as agências de fomento CNPq, CAPES, Fundação Araucária e ao FINEP, pelos investimentos concedidos que permitiram o desenvolvimento deste projeto.

REFERÊNCIAS

- [1] B. Weir, X. Zhao, M. Meyerson, Somatic alterations in the human cancer genome, *Cancer Cell* 6(5) (2004) 433-8.
- [2] L. Ouyang, Z. Shi, S. Zhao, F.T. Wang, T.T. Zhou, B. Liu, J.K. Bao, Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis, *Cell Prolif* 45(6) (2012) 487-98.
- [3] B.A. Weaver, D.W. Cleveland, Decoding the links between mitosis, cancer, and chemotherapy: The mitotic checkpoint, adaptation, and cell death, *Cancer Cell* 8(1) (2005) 7-12.
- [4] H. McArthur, An overview of HER-targeted therapy with lapatinib in breast cancer, *Adv Ther* 26(3) (2009) 263-71.
- [5] S.M. Crafton, R. Salani, Beyond Chemotherapy: An Overview and Review of Targeted Therapy in Cervical Cancer, *Clin Ther* 38(3) (2016) 449-58.
- [6] V.V. Padma, An overview of targeted cancer therapy, *Biomedicine (Taipei)* 5(4) (2015) 19.
- [7] D.J. Muilenburg, J.M. Coates, S. Virudachalam, R.J. Bold, Targeting Bcl-2-mediated cell death as a novel therapy in pancreatic cancer, *J Surg Res* 163(2) (2010) 276-81.
- [8] A. Strasser, S. Cory, J.M. Adams, Deciphering the rules of programmed cell death to improve therapy of cancer and other diseases, *EMBO J* 30(18) (2011) 3667-83.
- [9] L. Nonnenmacher, S. Hasslacher, J. Zimmermann, G. Karpel-Massler, K. La Ferla-Bruhl, S.E. Barry, T. Burster, M.D. Siegelin, O. Bruhl, M.E. Halatsch, K.M. Debatin, M.A. Westhoff, Cell Death Induction in Cancer Therapy - Past, Present, and Future, *Crit Rev Oncog* 21(3-4) (2016) 253-267.
- [10] R.P. Rastogi, Richa, R.P. Sinha, Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity, *EXCLI Journal* 8 (2009) 155-181
- [11] M.A. Savitskaya, G.E. Onishchenko, Mechanisms of Apoptosis, *Biochemistry (Mosc)* 80(11) (2015) 1393-405.
- [12] G. Marino, C. Lopez-Otin, Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology, *Cell Mol Life Sci* 61(12) (2004) 1439-54.

- [13] L. Yu, Y. Chen, S.A. Tooze, Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms, *Autophagy* 14(2) (2018) 207-215.
- [14] S.S. Han, D.J. Son, H. Yun, N.L. Kamberos, S. Janz, Piperlongumine inhibits proliferation and survival of Burkitt lymphoma in vitro, *Leuk Res* 37(2) (2013) 146-54.
- [15] S.S. Han, V.S. Tompkins, D.J. Son, N.L. Kamberos, L.L. Stunz, A. Halwani, G.A. Bishop, S. Janz, Piperlongumine inhibits LMP1/MYC-dependent mouse B-lymphoma cells, *Biochem Biophys Res Commun* 436(4) (2013) 660-5.
- [16] J.M. Liu, F. Pan, L. Li, Q.R. Liu, Y. Chen, X.X. Xiong, K. Cheng, S.B. Yu, Z. Shi, A.C. Yu, X.Q. Chen, Piperlongumine selectively kills glioblastoma multiforme cells via reactive oxygen species accumulation dependent JNK and p38 activation, *Biochem Biophys Res Commun* 437(1) (2013) 87-93.
- [17] Q.R. Liu, J.M. Liu, Y. Chen, X.Q. Xie, X.X. Xiong, X.Y. Qiu, F. Pan, D. Liu, S.B. Yu, X.Q. Chen, Piperlongumine inhibits migration of glioblastoma cells via activation of ROS-dependent p38 and JNK signaling pathways, *Oxid Med Cell Longev* 2014 (2014) 653732.
- [18] H. Randhawa, K. Kibble, H. Zeng, M.P. Moyer, K.M. Reindl, Activation of ERK signaling and induction of colon cancer cell death by piperlongumine, *Toxicol In Vitro* 27(6) (2013) 1626-33.
- [19] Y. Zou, D. Zhao, C. Yan, Y. Ji, J. Liu, J. Xu, Y. Lai, J. Tian, Y. Zhang, Z. Huang, Novel Ligustrazine-Based Analogs of Piperlongumine Potently Suppress Proliferation and Metastasis of Colorectal Cancer Cells in Vitro and in Vivo, *J Med Chem* 61(5) (2018) 1821-1832.
- [20] H. Dhillon, S. Chikara, K.M. Reindl, Piperlongumine induces pancreatic cancer cell death by enhancing reactive oxygen species and DNA damage, *Toxicol Rep* 1 (2014) 309-318.
- [21] S. Ginzburg, K.V. Golovine, P.B. Makhov, R.G. Uzzo, A. Kutikov, V.M. Kolenko, Piperlongumine inhibits NF-kappaB activity and attenuates aggressive growth characteristics of prostate cancer cells, *Prostate* 74(2) (2014) 177-86.
- [22] H.O. Jin, Y.H. Lee, J.A. Park, H.N. Lee, J.H. Kim, J.Y. Kim, B. Kim, S.E. Hong, H.A. Kim, E.K. Kim, W.C. Noh, J.I. Kim, Y.H. Chang, S.I. Hong, Y.J. Hong, I.C. Park, J.K. Lee, Piperlongumine induces cell death through ROS-mediated CHOP activation and potentiates TRAIL-induced cell death in breast cancer cells, *J Cancer Res Clin Oncol* 140(12) (2014) 2039-46.

- [23] P. Makhov, K. Golovine, E. Teper, A. Kutikov, R. Mehrazin, A. Corcoran, A. Tulin, R.G. Uzzo, V.M. Kolenko, Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signalling and mediates cancer cell death, *Br J Cancer* 110(4) (2014) 899-907.
- [24] S. Shrivastava, P. Kulkarni, D. Thummuri, M.K. Jeengar, V.G. Naidu, M. Alvala, G.B. Reddy, S. Ramakrishna, Piperlongumine, an alkaloid causes inhibition of PI3 K/Akt/mTOR signaling axis to induce caspase-dependent apoptosis in human triple-negative breast cancer cells, *Apoptosis* 19(7) (2014) 1148-64.
- [25] U. Bharadwaj, T.K. Eckols, M. Kolosov, M.M. Kasembeli, A. Adam, D. Torres, X. Zhang, L.E. Dobrolecki, W. Wei, M.T. Lewis, B. Dave, J.C. Chang, M.D. Landis, C.J. Creighton, M.A. Mancini, D.J. Tweardy, Drug-repositioning screening identified piperlongumine as a direct STAT3 inhibitor with potent activity against breast cancer, *Oncogene* 34(11) (2015) 1341-53.
- [26] K. Golovine, P. Makhov, S. Naito, H. Raiyani, J. Tomaszewski, R. Mehrazin, A. Tulin, A. Kutikov, R.G. Uzzo, V.M. Kolenko, Piperlongumine and its analogs down-regulate expression of c-Met in renal cell carcinoma, *Cancer Biol Ther* 16(5) (2015) 743-9.
- [27] J.L. Roh, E.H. Kim, J.Y. Park, J.W. Kim, M. Kwon, B.H. Lee, Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer, *Oncotarget* 5(19) (2014) 9227-38.
- [28] J.S. Seok, C.H. Jeong, M.C. Petriello, H.G. Seo, H. Yoo, K. Hong, S.G. Han, Piperlongumine decreases cell proliferation and the expression of cell cycle-associated proteins by inhibiting Akt pathway in human lung cancer cells, *Food Chem Toxicol* 111 (2018) 9-18.
- [29] K.V. Golovine, P.B. Makhov, E. Teper, A. Kutikov, D. Canter, R.G. Uzzo, V.M. Kolenko, Piperlongumine induces rapid depletion of the androgen receptor in human prostate cancer cells, *Prostate* 73(1) (2013) 23-30.
- [30] Y. Chen, J.M. Liu, X.X. Xiong, X.Y. Qiu, F. Pan, D. Liu, S.J. Lan, S. Jin, S.B. Yu, X.Q. Chen, Piperlongumine selectively kills hepatocellular carcinoma cells and preferentially inhibits their invasion via ROS-ER-MAPKs-CHOP, *Oncotarget* 6(8) (2015) 6406-21.
- [31] X.X. Xiong, J.M. Liu, X.Y. Qiu, F. Pan, S.B. Yu, X.Q. Chen, Piperlongumine induces apoptotic and autophagic death of the primary myeloid leukemia cells from patients via activation of ROS-p38/JNK pathways, *Acta Pharmacol Sin* 36(3) (2015) 362-74.
- [32] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods* 65(1-2) (1983) 55-63.

- [33] A.R. Collins, A.A. Oscoz, G. Brunborg, I. Gaivao, L. Giovannelli, M. Kruszewski, C.C. Smith, R. Stetina, The comet assay: topical issues, *Mutagenesis* 23(3) (2008) 143-51.
- [34] B.I. Biazi, T.A. Zanetti, A. Baranoski, A.C. Corveloni, M.S. Mantovani, Cis-Nerolidol Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells through Extensive CYP2C19 and CYP1A2 Oxidation, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 121(4) (2017) 334-341.
- [35] D.P. Bezerra, C. Pessoa, M.O. de Moraes, N. Saker-Neto, E.R. Silveira, L.V. Costa-Lotufu, Overview of the therapeutic potential of pipartine (piperlongumine), *Eur J Pharm Sci* 48(3) (2013) 453-63.
- [36] (!!! INVALID CITATION !!! Roh et al. [27]).
- [37] H. Wang, Y. Wang, H. Gao, B. Wang, L. Dou, Y. Li, Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in leukemic cells through targeting the PI3K/Akt/mTOR and p38 signaling pathways, *Oncol Lett* 15(2) (2018) 1423-1428.
- [38] T.U. Mayer, T.M. Kapoor, S.J. Haggarty, R.W. King, S.L. Schreiber, T.J. Mitchison, Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen, *Science* 286(5441) (1999) 971-4.
- [39] J.C. Cochran, J.E. Gatial, 3rd, T.M. Kapoor, S.P. Gilbert, Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5, *J Biol Chem* 280(13) (2005) 12658-67.
- [40] L.C. Hsu, D.E. Durrant, C.C. Huang, N.W. Chi, R. Baruchello, R. Rondanin, C. Rullo, P. Marchetti, G. Grisolia, D. Simoni, R.M. Lee, Development of hemiasterlin derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization and synergize with a stilbene tubulin inhibitor, *Invest New Drugs* 30(4) (2012) 1379-88.
- [41] M. Shimizu, H. Ishii, N. Ogo, Y. Unno, K. Matsuno, J. Sawada, Y. Akiyama, A. Asai, S-trityl-L-cysteine derivative induces caspase-independent cell death in K562 human chronic myeloid leukemia cell line, *Cancer Lett* 298(1) (2010) 99-106.
- [42] G.C. Militao, M.P. Prado, C. Pessoa, M.O. de Moraes, E.R. Silveira, M.A. Lima, P.A. Veloso, L.V. Costa-Lotufu, G.M. Machado-Santelli, Pterocarpanes induce tumor cell death through persistent mitotic arrest during prometaphase, *Biochimie* 104 (2014) 147-55.
- [43] C. Balakumar, M. Ramesh, C.L. Tham, S.P. Khathi, F. Kozielski, C. Srinivasulu, G.A. Hampannavar, N. Sayyad, M.E. Soliman, R. Karpoomath, Ligand- and structure-based in silico studies to identify kinesin spindle protein (KSP) inhibitors as potential anticancer agents, *J Biomol Struct Dyn* (2017) 1-18.

- [44] J. Lee, J.A. Kim, V. Barbier, A. Fotedar, R. Fotedar, DNA damage triggers p21WAF1-dependent Emi1 down-regulation that maintains G2 arrest, *Mol Biol Cell* 20(7) (2009) 1891-902.
- [45] C. Reimertz, D. Kogel, A. Rami, T. Chittenden, J.H. Prehn, Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein Bbc3/PUMA and activation of the mitochondrial apoptosis pathway, *J Cell Biol* 162(4) (2003) 587-97.
- [46] J. Li, B. Lee, A.S. Lee, Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53, *J Biol Chem* 281(11) (2006) 7260-70.
- [47] C. Xu, B. Bailly-Maitre, J.C. Reed, Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions, *J Clin Invest* 115(10) (2005) 2656-64.
- [48] M. Liu, R. Aneja, C. Liu, L. Sun, J. Gao, H. Wang, J. Dong, V. Sarli, A. Giannis, H.C. Joshi, J. Zhou, Inhibition of the mitotic kinesin Eg5 up-regulates Hsp70 through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway in multiple myeloma cells., *The Journal of Biological Chemistry* 281(26) (2006) 8.
- [49] Q. Cheng, J. Chen, Mechanism of p53 stabilization by ATM after DNA damage, *Cell Cycle* 9(3) (2010) 472-8.
- [50] L.E. Giono, L. Resnick-Silverman, L.A. Carvajal, S. St Clair, J.J. Manfredi, Mdm2 promotes Cdc25C protein degradation and delays cell cycle progression through the G2/M phase, *Oncogene* 36(49) (2017) 6762-6773.
- [51] M. Cazales, R. Boutros, M.C. Brezak, S. Chaumeron, G. Prevost, B. Ducommun, Pharmacologic inhibition of CDC25 phosphatases impairs interphase microtubule dynamics and mitotic spindle assembly, *Mol Cancer Ther* 6(1) (2007) 318-25.
- [52] A.K. Hauck, D.A. Bernlohr, Oxidative stress and lipotoxicity, *J Lipid Res* 57(11) (2016) 1976-1986.
- [53] M.S. Denison, J.P. Whitlock, Jr., Xenobiotic-inducible transcription of cytochrome P450 genes, *J Biol Chem* 270(31) (1995) 18175-8.
- [54] F.P. Guengerich, Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity, *Chem Res Toxicol* 14(6) (2001) 611-50.

- [55] F. de Lima Moreira, M.D. Habenschus, T. Barth, L.M. Marques, A.C. Pilon, V. da Silva Bolzani, R. Vessecchi, N.P. Lopes, A.R. de Oliveira, Metabolic profile and safety of piperlongumine, *Sci Rep* 6 (2016) 33646.
- [56] M. Song, J.Y. Hwang, M.Y. Lee, J.G. Jee, Y.M. Lee, J.S. Bae, J.A. Kim, S.H. Lee, S. Lee, In vitro inhibitory effect of piperlonguminine isolated from *Piper longum* on human cytochrome P450 1A2, *Arch Pharm Res* 37(8) (2014) 1063-8.
- [57] M.S. Faber, A. Jetter, U. Fuhr, Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when?, *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97(3) (2005) 125-34.
- [58] N.J. Plant, G.G. Gibson, Evaluation of the toxicological relevance of CYP3A4 induction, *Curr Opin Drug Discov Devel* 6(1) (2003) 50-6.

Material Suplementar

Tabela S1. Iniciadores utilizados na PCR em tempo real

Gene	Foward 5' → 3'	Reverse 5' → 3'
<i>ABL1</i>	CGAAGGGAGGGTGTACCATTAC	CGTTGAATGATGATGAACCAACTC
<i>ATF6</i>	CTGGAAAAGTCTGAGCGTGGGA	CAAATAGATGGGTAGATGATGA
<i>BAK1</i>	CAAGATTGCCACCAGCCTGTTTGA	ATGCAGTGCAGCATGAAGTCG
<i>BAX</i>	TTTCTGACGGCAACTTCAACTGGG	TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT
<i>BBC3</i>	GTAAGATACTGTATATGCGCTG	TTTTCCACTGTTCCAATCTG
<i>BCL2</i>	GATTGTGGCCTTCTTTGAG	GTTCCACAAAGGCATCC
<i>BCLXL</i>	TGGGCTCACTCTTCAGTCGAAAT	ATGTAGTGGTCTCCTGGTGGCAA
<i>CASP3</i>	AACTGGACAGTAACATGGAG	TTGCTGGCAAAGTAGAAAAG
<i>CASP7</i>	AAGCCATGGAGAAGAAAATG	CCTGAATGAAGAAGAGTTTGG
<i>CASP8</i>	CTACAGGGTCATGCTCTATC	ATTTGGAGATTTCTCTTGC
<i>CASP9</i>	CTCTACTTTCCAGGTTT	TTTCACCGAAACAGCATT
<i>CAT</i>	CATCGCCACATGAATGGATA	CCAAGTGGGATGAGAGGGTA
<i>CCNA2</i>	GACCCTGCATTTGGCTGTG	ACAACTCTGCTACTTCTGG
<i>CCNB1</i>	AGAGCATCTAAGATTGGAGAG	CCATGTCATAGTCCAACATAG
<i>CCNB2</i>	ATTTTTACAGTTTCAGCCAG	ATCTCCTCATACTTGAAGC
<i>CDK1</i>	ATGAGGTAGTAACACTCTGG	CCTATACTCCAAATGTCAACTG
<i>CDKN1A</i>	CAGCATGACAGATTTCTACC	CAGGGTATGTACATGAGGAG
<i>CHK1</i>	GGTGAATATAGTCTGCTATGTTGACA	TTGGATAAACAGGGAAAGTGAACAC
<i>CHK2</i>	CCCAAGGCTCCTCCTCACA	AGTGAGAGGACTGGCTGGAGTT
<i>CYP1A2</i>	CACTATCAGGACTTTGACAAG	AGGTTGACAATCTTCTCCTG
<i>CYP2C19</i>	CATGGATATGAAGTGGTGAAG	TCCATTGCTGAAAACGATTC
<i>CYP2D6</i>	CCTATGAGCTTTGTGCTG	TTTGGAAGTACCACATTGC
<i>CYP3A4</i>	AGTCTTTCCATTCTCATCC	TGCTTTTGTGTATCTTCGAG
<i>EIF2AK3</i>	CAAACCAGAGGTATTTGGGAAT	GAAAGGAACTGTTTCCATGCTT
<i>ERN1</i>	ACGGACGTCAAGTTTGATCC	TTGGTAGACGCAGACAGTGG
<i>GADD45A</i>	TCAGCGCACGATCACTGT C	CCAGCAGGCACAACACCAC
<i>GAPDH</i>	GAAGGTGAAGGTCTGGAGTC	GGAAGATGGTGTATGGGATTT
<i>GPX1</i>	CTCCCTTACAGTGCTTGTTCG	CGATGTCAATGGTCTGGAAG
<i>GSR</i>	TTCCAGAATACCAACGTCAAAGG	GTTTTCGGCCAGCAGCTATTG
<i>H2AFX</i>	AATCCAAGCACCTAGATACC	CAGAATTCAGTTCAGAAGC

<i>HNH4A</i>	AGTACATCCCAGCTTTCTG	AATGTAGTCATTGCCTAGGAG
<i>HSPA14</i>	CCAGCTGTTGTTGCTTACTCA	CTGCCCAGGATCTGCTTTAC
<i>HSPA5</i>	GTGGAATGACCCGTCTGTG	TGCCACCTCCAATATCAAC
<i>MDM2</i>	CCTTAGCTGACTATTGGAAATG	TGTTGAGTTTTCCAGTTTGG
<i>MTOR</i>	GGAGGAGAAATTTGATCAGG	GGGCAACAAATTAAGGATTG
<i>MYC</i>	TGAGGAGGAACAAGAAGATG	ATCCAGACTCTGACCTTTTG
<i>RPL13A</i>	CCTGGAGGAGAAGAGGAAAGAGA	TTGAGGACCTCTGTGTATTTGTCAA
<i>SOD1</i>	CTAGCGACTTATGGCGAC	GAATGTTTATTGGGCGATC
<i>TNF</i>	AGGCAGTCAGATCATCTTC	TTATCTCTCAGCTCCACG
<i>TP53</i>	TACCACCATCCACTACAAC	GACAGGCACAAACACGCAC
<i>TRAF2</i>	GCCCCAAGTTCCCCTTAAC	GAATCTGCAAGGGACTCGAC

ARTIGO 2

Manuscrito publicado na revista *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*.

V. 121, n.4, p.334-341, out/2017. doi: 10.1111/bcpt.12772

Cis-Nerolidol Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma Cells through Extensive CYP2C19 and CYP1A2 Oxidation

Bruna Isabela Biazi, Thalita Alves Zanetti, Adrivanio Baranoski, Amanda Cristina Corveloni and Mário Sérgio Mantovani

Laboratory of Toxicological Genetics, Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina – UEL, Londrina, Paraná, Brazil

(Received 24 January 2017; Accepted 21 February 2017)

Abstract: Of late, many studies are attempting to find new molecules with anticancer properties, especially those with the capability to inhibit cell growth. The aim of this work was to evaluate nerolidol, a plant-based compound, as its cytotoxicity, genotoxicity, antiproliferative and apoptotic induction, cell cycle, mitochondrial membrane potential and RT-qPCR of transcripts related to those pathways in the human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2/C3A). Only cis-nerolidol (C-NER) demonstrated cytotoxicity (100–250 μ M) activity and was selected to conduct the following experiments. C-NER did not show genotoxic activity, but altered the mitochondrial membrane potential, reduced cell proliferation by arresting cell cycle in G1 phase and induced cell death. RT-qPCR showed that C-NER down-regulated genes related to apoptosis (*BAK1*, *BAX*, *CAPN1*, *CASP8*, *CASP9*, *PARP1* and *TP53*), cell cycle (*CCND1*, *CCNE1*, *CDK1* and *CDK2*), xenobiotic metabolism (*CYP2D6* and *CYP3A4*) and paraptosis (IGF1R receptor). Up-regulation was seen in case of genes related to cell survival (*BBC3* and *MYC*) and reticulum stress protein response (*EIF2AK3* and *ERN1*) and xenobiotic metabolism (*CYP1A2* and *CYP2C19*). We deduced that the antiproliferative activity of C-NER is attributable to its modulation of the cyclins and cyclin-dependent kinases as these proteins are necessary for G1/S phase transition. *EIF2AK3*, *ERN1*, *CYP2C19* and *CYP1A2* up-regulation suggests that endoplasmic reticulum stress was induced owing to the increased activity of cytochrome P450 enzymes. Caspase-independent cell death was also observed, indicating that another type of cell death, paraptosis, was triggered. Our results indicate that C-NER has considerable potential in anticancer therapy because it modulates important molecular targets of cell survival and proliferation.

Naturally occurring compounds are an important resource for studies investigating potential therapeutic drugs. In particular, the need for developing new drugs with anticancer potential has led to increased attempts in finding natural molecules with antiproliferative capabilities. Several phytochemicals that confer anticancer effects have been reported, including those that target NF- κ B (alantolactone and xanthohumol), caspases (goniothalamin, corosolic acid and pyranocycloartobioxanthone), AP-1 (curcumin, quercitrin and parthenolide), cell cycle proteins (rhodoxanthin and capsaicin) and reactive oxygen species (eugenol, gallic acid and piperlongumine) [1]. In this context, nerolidol – a compound found in many plant species – has attracted considerable attention in various research fields owing to its anti-inflammatory [2], antileishmanial [3] and antifungal [4,5] activities. Nerolidol is a sesquiterpene ($C_{15}H_{26}O$) and occurs in the form of two isomers – cis-nerolidol (C-NER) and trans-nerolidol (T-NER) [6].

The cell cycle is one of the most important processes responsible for normal physiological functioning. In cancer, irregularities in cell division or death may lead to abnormal cell growth, ultimately causing tumour formation. The cell cycle is tightly regulated by control mechanisms, labelled cell

cycle checkpoints, which mediate the G1/S, S and G2/M phase transitions. These checkpoints prevent perturbations that may interrupt the cell cycle and involve proteins such as cyclin-dependent kinases (CDKs) and cyclins [7–9].

Molecular biology tools such as cell culture have considerably advanced discovery of compounds with anticancer properties and have helped clarify the molecular mechanisms of action of these compounds. Cell cycle-control genes and their products such as cyclins and CDKs – in addition to those involved in unfolded protein response such as *ERN1* and *HSPA5* – are important drug targets that are studied in assessing the biological activity of anticancer compounds. The cell line used in this work, HepG2/C3A, is a human hepatocellular carcinoma cell line, which is widely used in genotoxicity studies because it expresses proteins related to xenobiotic metabolism [10,11], which is an important parameter for studying drug toxicity.

Accumulating lines of evidence have recently indicated that targeting cell signalling pathways may be promising in developing potential therapeutic drugs. These signalling pathways involve cell cycle, unfolded protein response, xenobiotic metabolism and cell death and may play crucial roles in cancer chemoprevention. Some natural compounds of plant origin, such as curcumin, resveratrol, paclitaxel and quercetin, can induce cell death and are considered potential therapeutic agents to neutralize the effects of carcinogens [12].

Programmed cell death generally occurs through apoptosis, which is actively executed by specific proteases and caspases,

Author for correspondence: Bruna Isabela Biazi, Laboratory of Toxicological Genetics, Department of General Biology, Biological Sciences Center, State University of Londrina - UEL. Celso Garcia Cid Highway, Pr 445 Km 380, 86.057-970, Londrina, Paraná, Brazil (e-mail brunaibiazi@gmail.com).

while coagulative necrosis is a type of accidental cell death caused by ischaemia or infarction. Newer evidence indicates that programmed cell death can occur independent of or in the absence of caspase activation. Alternative models of programmed cell death (PCD) have therefore been proposed, including autophagy, paraptosis, mitotic catastrophe and the descriptive model of apoptosis-like and necrosis-like cell death [13].

Safe and toxic exposure levels of naturally occurring compounds with anticancer effects need to be ascertained before they are used in cancer therapy. Few compounds show well-known toxicity profiles, and drug candidates include several distinct chemical classes as determined using *in vitro* toxicology methods [14]. Compounds that target detrimental physiological effects of cell cycle arrest, endoplasmic reticulum stress, aberrant drug metabolism and hampered cell death in cancer cells, rather than their individual gene or protein components, have significant potential in cancer treatments [15].

Understanding the mechanism of action of natural plant products in inducing cell death in cancer cells is essential for searching lead molecules in the field of cancer chemoprevention. We used parameters such as cytotoxicity, cell death and proliferation, and xenobiotic metabolism in morphological and molecular evaluation of anticancer properties of nerolidol, in addition to elucidating its mechanism of action in the human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2/C3A).

Material and Methods

Chemical agents. C-NER, T-NER and a mix of both (M-NER) were purchased from Sigma-Aldrich (cat. no. 72180, 18143 and H59605) and were diluted in ultrapure water.

Cell culture. HepG2/C3A cells, free of mycoplasma, were obtained from the Rio de Janeiro Cell Bank. The cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco) with pyruvate and L-glutamine (Catalogue No. 11995-081), supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Gibco) and 0.1% penicillin–streptomycin (Gibco). The cells were maintained in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37°C. In these conditions, the duration of cell cycle is approximately 24 hr. The cells were cultured for 24 hr after being plated for stabilization for all experiments. The proper number of cells to be used in the experiments was determined using the xCELLigence real-time cell analysis system. The cell number and media volume were adjusted according to the volume of the flasks used. All assays were performed in three biological replicates.

Cytotoxicity analysis. MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay (cat. no. M-6494, Invitrogen) was used to evaluate the cytotoxicity of C-NER, T-NER and M-NER at concentrations of 0, 100, 150, 200 and 250 µM. The MTT assay assesses the viability and the metabolic state of the cells [16]. MTT is metabolized by dehydrogenase and reductase enzymes, and the product (formazan) is quantified colorimetrically. The cells (25 × 10³) were seeded in 96-well culture plates for 24 hr of treatment. Then, the culture media were removed and 100 µL of culture medium without FBS but with 0.5 mg/mL of MTT was added. After 4 hr of incubation, the culture medium was removed, and formazan crystals adhering to the bottoms of the wells were diluted in 100 µL of dimethyl sulphoxide for checking the absorbance at 540 nm. Cell survival ratio was estimated by dividing the treatment absorbance

value by the control (0 µM treatment) absorbance value and multiplying by 100.

Real-time cell index profiling. This assay was used to determine the cell survival index by using the xCELLigence real-time cell analysis single-plate instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) for a 96-hr treatment of C-NER. In 96-well plates, 25 × 10³ cells were seeded and the cell index was monitored every 30 min. by using eight replicates per treatment. Because only C-NER demonstrated cytotoxicity in the MTT assay, only C-NER was used from this point at concentrations of 0, 25, 50, 100, 150, 175, 200, 250, 275, 300 and 350 µM.

Estimation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_{mit}$) using rhodamine 123. Rhodamine 123 is a fluorescent dye used to measure mitochondrial membrane potential, which accumulates inside healthy mitochondria depending on its electrical activity [17]. In total, 617 × 10³ cells/well were seeded in six-well plates. After 24 hr of treatment with 0, 50, 100, 200, 250 and 275 µM of C-NER, 2 µL of rhodamine 123 (1 mg/mL) was added to each well, and the plates were incubated for 30 min. Then, the cells were harvested and centrifuged at 644 g for 5 min. and were resuspended in 800 µL of PBS. For flow cytometry, 5000 cells were analysed with a red filter to measure mean fluorescence of the cells.

Comet assay. Comet assay [18,19] was used to analyse the potential of C-NER in damaging genetic material. In total, 617 × 10³ cells were seeded in each well in a six-well plate. After 3 hr of treatment with C-NER at concentrations of 0, 100 and 150 µM, the cells were trypsinized, centrifuged at 644 g for 5 min. and resuspended in 50 µL of culture medium. Then, the cells were diluted in 0.5% low-melting point agarose and distributed on pre-gelatinized slides with common agarose. The cells were lysed (2.25 M NaCl, 90 mM EDTA, 9 mM Tris-HCl, 10% dimethyl sulphoxide and 1% Triton X-100) for 60 min. at 4°C and were then exposed to alkaline conditions (electrophoresis buffer: 1 mM EDTA [Titriplex] and 0.3 N NaOH) for 20 min. Electrophoresis was performed at 25 V and 300 mA for 20 min. at pH 13. Subsequently, the slides were neutralized (Tris buffer; pH 7.5 adjusted with 0.4 N HCl), fixed with absolute ethanol (PA) and stored at 4°C. The analysis was performed with 100 µL of a solution containing ethidium bromide (2 µg/mL) to stain the DNA. Micrographs were obtained using the EVOS[®] Microscope FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher) at a magnification of 200×. For comet assay, images were analysed using the CometScore[®] program to evaluate the parameters of *comet length* and *tail length*.

Cell cycle analysis. In total, 617 × 10³ cells/well were seeded in six-well plates. After 12 and 24 hr of treatment with C-NER concentrations of 0, 150 and 250 µM, the cells were harvested, centrifuged at 644 g for 5 min. and resuspended in 100 µL of PBS. Next, 0.1 mg RNase A (cat no. 12091-021, Thermo Fisher Scientific) was added, and the cells were incubated at 37°C for 30 min. Subsequently, lysis and labelling of DNA were completed using 100 µL of HFS solution (50 µg/L propidium iodide, 0.1% sodium citrate, 0.1% Triton X-100), and the resultant product was incubated on ice for 30 min. and protected from light. The fluorescence of propidium iodide was estimated with Guava EasyCyte (Merck Millipore) flow cytometer analysing 5000 cells/treatment. The DNA content was estimated and the percentage of cells in different phases of cell cycle (G1, S and G2/M) was estimated according to the fluorescence intensity.

Apoptosis assay. Flow cytometry (Guava EasyCyte, Merck Millipore) was performed to verify whether the C-NER treatments induced apoptosis in the cells. In six-well plates, 617 × 10³ cells/well were

seeded. After 12 and 24 hr of treatment, the cells were trypsinized, centrifuged at 644 g for 5 min. and resuspended in 100 μ L of PBS. Next, the cells were labelled using BD Pharmingen Annexin V PE Apoptosis Detection Kit (cat. no. 550914; BD Biosciences) according to the manufacturer's recommendations. The cells were considered viable when not labelled with annexin and 7-AAD (7-Aminoactinomycin D). The cells labelled with annexin but not with 7-AAD were considered to be undergoing early apoptosis; the cells labelled with annexin and 7-AAD were considered to be undergoing late apoptosis; and those labelled only with 7-AAD were considered necrotic.

RT-qPCR. RT-qPCR was performed to examine changes in gene expression patterns. Table S1 contains a list of primers used to amplify genes involved in the cell cycle (*CCND1*, *CCNE1*, *CDK1*, *CDK2*, *CDKN1A* and *TP53*), endoplasmic reticulum stress (*ERN1*, *EIF2AK3* and *HSPA5*), apoptosis (*BAK1*, *BAX*, *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9* and *PARP1*), xenobiotic metabolism (*CYP1A2*, *CYP2C19*, *CYP2D6* and *CYP3A4*), cell survival (*MYC* and *BBC3*) and paraptosis marker (*IGF1R*). In total, 617×10^3 cells/well were seeded in six-well plates. Total RNA was extracted using RNeasy Kit (cat. no. 74106; Qiagen) after exposure (6 and 12 hr) to C-NER treatments (0, 150 and 250 μ M concentrations). The samples were quantified using a spectrophotometer. RNA purity was estimated based on the ratio of absorbance at 260 nm/280 nm, and only samples with a ratio between 1.8 and 2.1 were used for further experiments. RNA integrity was assessed using denaturing agarose gel electrophoresis (1% agarose). cDNA synthesis was performed with 500 ng of total RNA in a final reaction volume of 20 μ L. Each reaction included 10% enzyme buffer (200 mM Tris-HCl [pH 8.4] and 500 mM KCl), 1.5 mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs, 80 pmol oligo dT₁₂₋₁₈, 100 pmol random primers, 10 units of SuperScript III, and 2 units of RNase Out (all components from Invitrogen Life Technologies). Initially, a mixture consisting only RNA, oligo dT₁₂₋₁₈, random primers and dNTPs was used for a pre-incubation step of 10 min. at 65°C in a T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad), followed by heat shock at -20°C. A second mixture containing the remaining constituents was prepared and added to the initial mixture, yielding a total reaction volume of 20 μ L. The reaction mixture was then used for the following thermocycling program: 37°C for 50 min. and 70°C for 15 min., with a lid temperature of 105°C. cDNA synthesis reactions were performed in triplicate, and the products were mixed to form a single sample. The cDNA was quantified and diluted to a concentration of 50 ng/ μ L for use in qPCR.

The real-time reaction was performed with the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). The SsoAdvanced™ SYBR® Green Supermix Kit (cat. no. 172-5260, Bio-Rad) was used at a final volume of 11 μ L with oligonucleotide primers (5 pmol each) and cDNA template (250 ng). The cycling was performed under the following conditions: 95°C for 5 min. and 45 cycles of 95°C/15 sec., 60°C/20 sec. and 72°C/20 sec. *RPL13A* was used as a reference gene.

Statistical analysis. Each assay was performed in three replicates. Statistical analysis was performed with analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post-test. RT-qPCR data were analysed using the REST program, and a significant difference was considered when relative gene expression level was ≤ 0.5 or ≥ 2 . Efficiency of the reactions was calculated using the program LinRegPCR. For all tests, the differences were considered statistically significant at a *p*-value of ≤ 0.05 .

Results

The MTT assay showed that neither T-NER on its own nor when mixed with C-NER conferred any cytotoxic effect at the

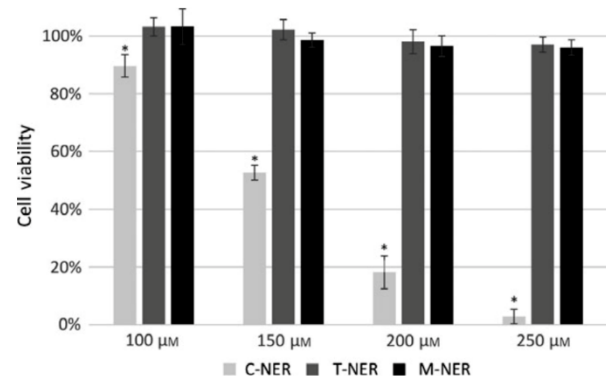


Fig. 1. Cell viability obtained by MTT Assay. Control is considered with 100% of survival. $R^2 = 0.9549$. *Statistically significant when compared to control ($p \leq 0.05$) by ANOVA and Dunnett's test.

tested concentrations. By contrast, C-NER on its own reduced cell viability from 89% to 3% in a dose-dependent manner, at concentrations of 100–250 μ M (fig. 1). Therefore, C-NER was selected for further experiments.

Real-time cell analysis showed that C-NER altered cell survival curve in a dose-dependent manner in comparison with the control treatment (fig. 2). C-NER concentrations of 25–100 μ M produced a response similar to that of the control; however, the cell index decreased after 60 hr of treatment. C-NER concentration of 150–200 μ M showed a significant initial decrease in cell index, followed by a significant increase when compared with the control; this effect is likely attributable to the morphological changes caused by C-NER considering this assay produced a cell index measurement based on the electric impedance of the cells. C-NER concentration of 250–350 μ M showed reduced cell index immediately after the initial hours.

Mitochondrial membrane potential was also altered by C-NER treatment, increasing at 50 μ M and decreasing at 200–275 μ M (fig. 3).

Comet assay did not show any difference in C-NER treatment when compared with control for all analysed parameters (fig. 4). However, cell count was reduced for C-NER concentration of 150 and 250 μ M when compared with control, 12 and 24 hr after treatments (fig. 5).

Cell cycle analysis showed that C-NER treatment caused G1 arrest in HepG2/C3A cells after 12 hr of treatment, but only at a concentration of 150 μ M. After 24 hr of treatment, there was an increase in the number of cells with G1 arrest at 150 and 250 μ M of concentration, with the percentages of G1 cells at 48.97% for the control group, and 60.32% and 60.46% for those treated with 150 and 250 μ M C-NER (fig. 6).

Apoptosis analysis by flow cytometry showed that C-NER induced significant cell death only at a concentration of 250 μ M (table 1). After 12 hr of treatment, C-NER treatment increased the percentage of cells undergoing early apoptosis (19.47%) and necrosis (2.39%) when compared with control (11.54 and 0.61%, respectively). After 24 hr of exposure, there was a significant increase in cells undergoing early

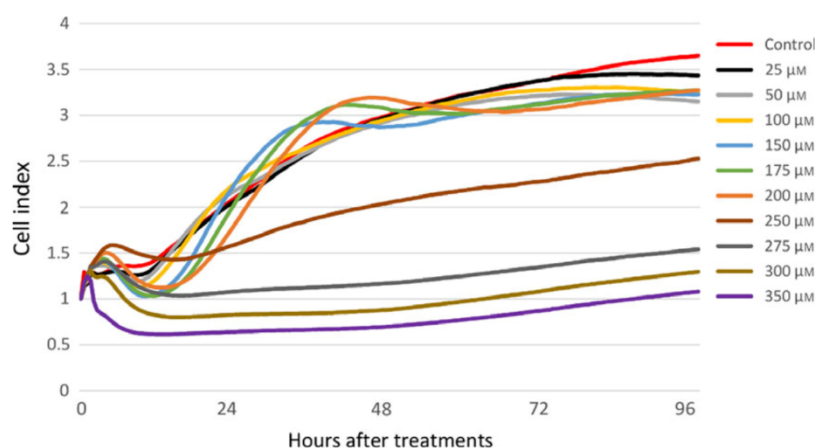


Fig. 2. Real-time cell index profiling of HepG2/C3A cells treated with C-NER concentrations ranging 25–350 μM for 96 hr.

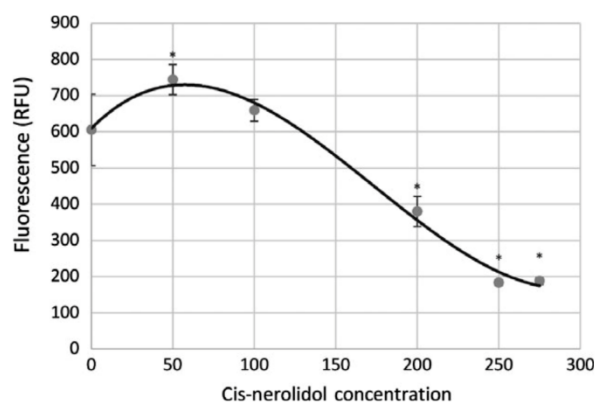


Fig. 3. Mitochondrial electric potential based on Rhodamine 123 specific fluorescent dye. $R^2 = 0.9922$. *Statistically significant when compared to control ($p \leq 0.05$) by ANOVA and Dunnett's test.

(12.07%) and late apoptosis (5.39%) and necrosis (7.45%) when compared with control (4.95, 2.56 and 0.52%, respectively).

Figure 7 shows gene expression analysis by RT-qPCR. In general, the response was bigger for higher dose and time treatment of C-NER. Most of the significantly altered transcripts (Table S2) were down-regulated (*BAK1*, *BAX*, *CASP8*,

CASP9, *CCND1*, *CCNE1*, *CDK1*, *CDK2*, *CYP2D6*, *CYP3A4*, *IGF1R*, *PARP1* and *TP53*), but a few were significantly up-regulated (*BBC3*, *CYP1A2*, *CYP2C19*, *EIF2AK3*, *ERN1* and *MYC*).

Discussion

Although many biological activities of nerolidol have been demonstrated [2,3,20], it is still necessary to keep testing the compound in response to a considerable need to study new drugs with antiproliferative properties. Our results showed that C-NER possesses higher cytotoxic potential than do T-NER and M-NER. Ambroz and Bousova [21] showed that T-NER at a concentration of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ or more (4488–2244 μM) reduces cell viability after 96 hr of treatment in Caco-2 cells. T-NER at a concentration of 10–100 μM is cytotoxic to HepG2 cells after 24 and 48 hr of treatment (10–100 μM), affecting mitochondrial and cellular energetics [20]. We did not observe T-NER cytotoxicity at those concentrations, probably because we evaluated only at 24 hr of treatment and differences in physiological characteristics of the tested cell lines.

We identified the antiproliferative potential of C-NER and suggest that this effect was caused by its ability to inhibit cell growth at G1 phase and induce cell death. G1 phase proteins

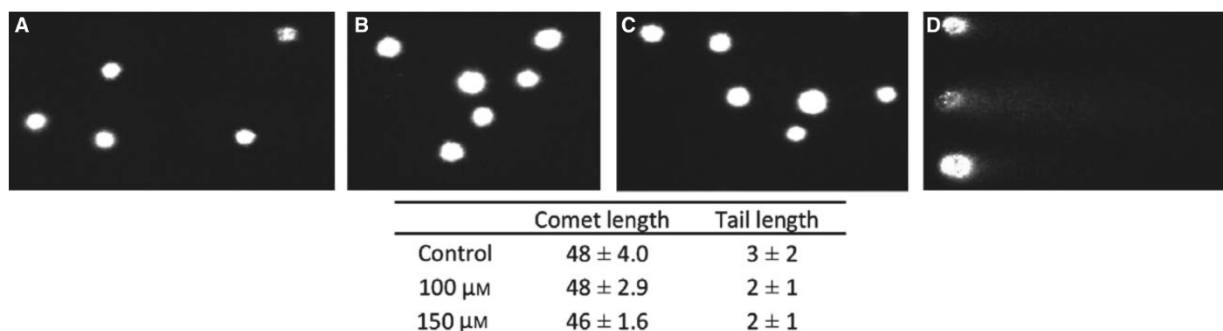


Fig. 4. Genotoxicity of cis-nerolidol from comet assay. Table represents comet length and tail length. Cis-Nerolidol did not show genotoxic activity in any parameters obtained on CometScore © program (data not shown). (A) Control cells; (B) cis-nerolidol 100 μM ; (C) cis-nerolidol 150 μM ; (D) Hydrogen peroxide 300 μM (positive control).

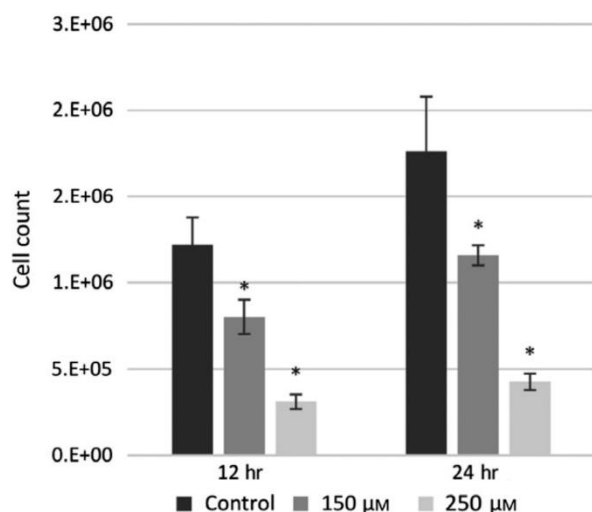


Fig. 5. Cell count obtained after 12 and 24 hr of cis-nerolidol treatment. *Statistically significant when compared to control ($p \leq 0.05$) by ANOVA and Dunnett's test.

such as CDK1, CDK2, CCND1 and CCNE1 were transcriptionally reduced, and their absence may have caused the cell cycle disturbance. This highlights the potential of C-NER to be used as an antiproliferative drug, and to be further studied for use in cancer therapy [22–24].

TP53 encodes the tumour suppressor protein p53, which regulates cell cycle via transcriptional activation of several genes, including *CDKN1A* – a CDK inhibitor [25,26]. We observed a

significant reduction in *TP53* expression after treatment with 250-µM C-NER after 12 hr; however, *CDKN1A* expression remained unchanged, suggesting that the cell cycle disruption observed in the present study was not modulated by this gene. Another cell cycle and proliferation regulator, *PARP1*, showed decreased expression induced by C-NER at both concentrations and all the times tested. *PARP1* encodes a chromatin-associated enzyme that is overexpressed in many cancers, suggesting that C-NER may be an important target-specific drug to be used in treating those types of diseases [27,28].

At high doses (equal or greater than 250 mg/kg of body-weight), nerolidol induces genotoxic damage in the peripheral blood cells after 4 and 24 hr of treatment in male Swiss mice, in addition to their liver after 24 hr of treatment, along with mutagenic activity in bone marrow cells after 24 hr [29]. However, our comet assay results show that the cytotoxicity of C-NER seems not to be related to its genotoxicity but to mitochondrial and endoplasmic reticulum (ER) stress by the altering mitochondrial membrane potential and up-regulating *ERN1* and *EIF2AK3*.

ERN1 encodes an ER-resident transmembrane sensor, which identifies misfolded proteins in order for them to be degraded, and a transcript factor for genes involved in ER stress signalling (*UPR* genes). *EIF2AK3* also encodes a misfolding protein stress sensor in ER, which inhibits translational activity to minimize ER stress [30]. ER stress has been already reported to cause G1 phase arrest [31,32] as identified in our present study.

Our data show that most of the genes showed altered expression after 12 hr of C-NER treatment, although a few

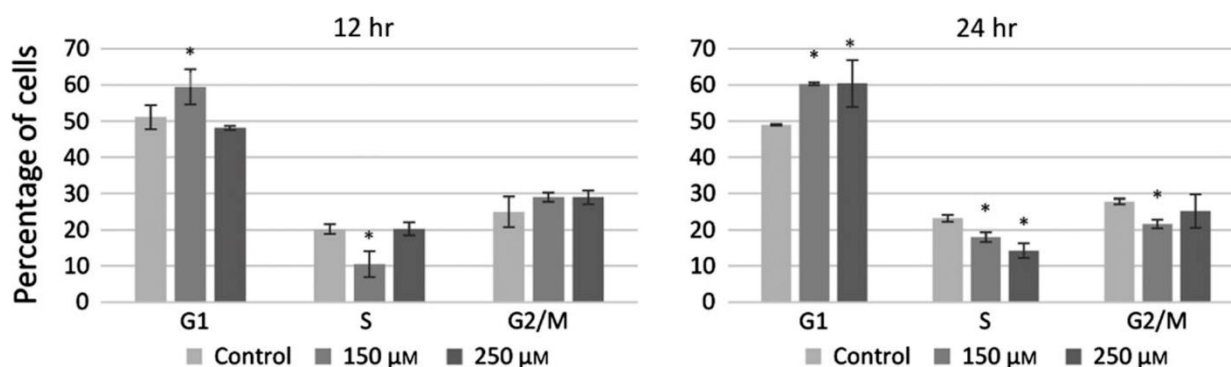


Fig. 6. Distribution of cell cycle phases, G1, S and G2/M (in percentage) at 12- and 24-hr treatment by flow cytometry. *Statistically significant when compared to control ($p \leq 0.05$) by ANOVA and Dunnett's test.

Table 1.

Apoptosis analysis of C-NER by flow cytometry using annexin V PE and 7-AAD.

	12 hr				24 hr			
	Viable cells	Early apoptosis	Late apoptosis	Necrosis	Viable cells	Early apoptosis	Late apoptosis	Necrosis
Control	86.37 ± 3.2	11.54 ± 2.9	1.49 ± 0.6	0.61 ± 0.3	91.97 ± 0.9	4.95 ± 1.0	2.56 ± 0.6	0.52 ± 0.3
150 µM	82.33 ± 0.2	14.42 ± 0.4	2.13 ± 0.1	1.13 ± 0.2	90.05 ± 1.5	6.32 ± 1.0	3.31 ± 0.5	0.32 ± 0.1
250 µM	76.55 ± 3.5*	19.47 ± 3.2*	1.59 ± 0.2	2.39 ± 0.1*	75.09 ± 2.8*	12.07 ± 1.7*	5.39 ± 0.7*	7.45 ± 1.5*

*Statistically significant when compared to control ($p \leq 0.05$) by ANOVA and Dunnett's test.

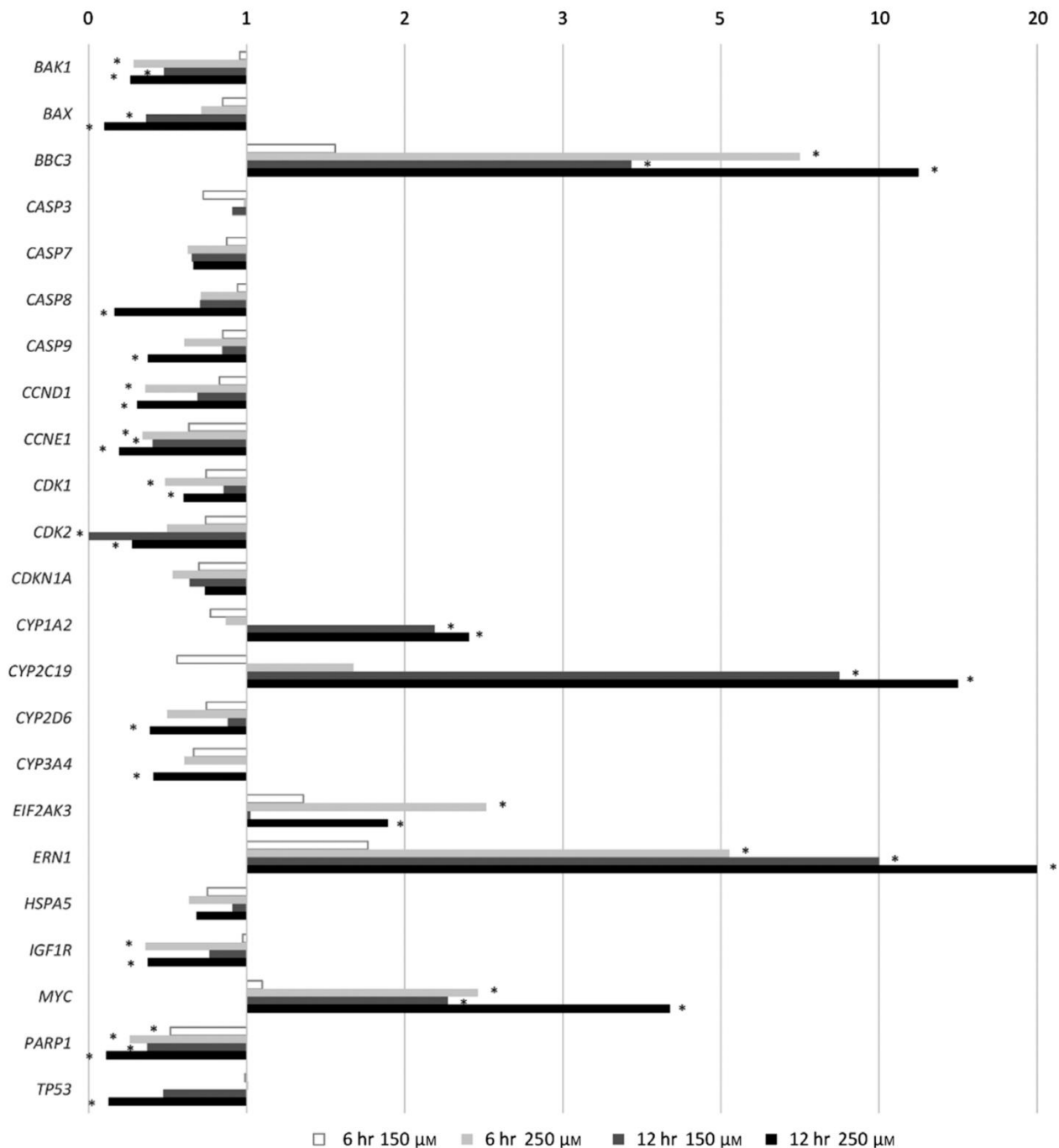


Fig. 7. Genes Relative expression from RT-qPCR. Statistical analysis was calculated by REST 2009 software; *Significant statistical difference ($p \leq 0.05$) and ratio ≤ 0.5 or ≥ 2 .

genes were already affected at 6 hr. Key genes involved in G1 arrest (*CCND1* and *CDK1*), ER stress (*ERN1* and *EIF2AK3*) and cell survival (*BAK1*, *BBC3*, *MYC*, and *PARP1*) were transcriptionally modulated right after 6 hr of C-NER treatment. This suggests that the molecular and morphological changes identified in our study may be correlated to those key genes.

MYC encodes an important transcription factor that regulates expression of many genes, including cyclin D (*CCND1*)

during G0 to S transition [33]. Although the absence of *MYC* causes G1 arrest, we observed an up-regulation of *MYC*, which appears to be related to ER stress and cell death signalling as discussed below. *MYC* up-regulation is associated with *EIF2S1* expression [34], which encodes a protein that is required in ER stress signalling via *EIF2AK3* [30,35], which was also up-regulated in response to C-NER.

Apoptosis assay showed an increase in annexin/7-AAD binding only at C-NER concentration of 250 µM, but

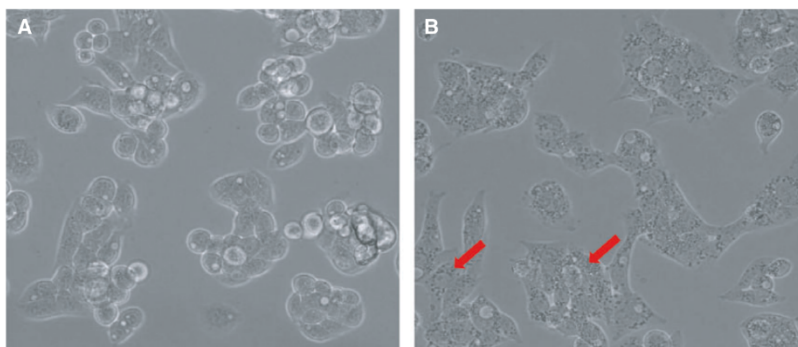


Fig. 8. Photomicrograph (400 \times) of C3A cell culture in control (A) and C-NER 250 μ M (B) after 24 hr of treatment. The formed agglomerates are indicated by the red arrows. Photomicrographs were obtained using EVOS[®] Microscope FL Auto Cell Imaging System (Thermo Fisher).

reduction in the percentage of living cells was not observed at the same magnitude after MTT and cell count assays. This suggests the involvement of another type of cell death at C-NER concentrations of 150 and 250 μ M.

Initiators of apoptosis, caspases 8 and 9, were transcriptionally reduced, but effector caspases 3 and 7 remained intact. Expression of pro-apoptotic genes, *BAK1* and *BAX*, was also reduced. This shows that programmed cell death was induced by C-NER in a caspase-independent manner, considering that it was not followed by an increase in caspases transcripts. Sperandio and de Belle [36] describe paraptosis – an alternative mode of programmed cell death independent of caspases, which is followed by swelling of mitochondria and endoplasmic reticulum. Paraptosis, the swelling of vesicles, and, consequently, cellular swelling may explain the increase in cell index observed after the initial hours of C-NER treatment in our proliferation assay. Cell survival index is determined not only by cell number, but also by cell morphology, and fig. 8 shows the appearance of cytoplasmic agglomerates after 250 μ M C-NER treatment. Phosphatidylserine bound by annexin observed in 250 μ M treatment can be related to the fact that phosphatidylserine externalization may occur in paraptosis [37] and detected by this label.

Insulin-like growth factor 1 receptor (*IGF1R*) has been described to induce paraptosis mediated by *CASP9* [36]; however, we identified reduced *IGF1R* gene transcripts for the highest C-NER concentration at both analysed times, and reduced *CASP9* transcripts for higher C-NER concentration after 12 hr of treatment.

Puma, a pro-apoptotic protein coded by *BBC3*, is related to caspase-independent cell death [38,39] and was increased after C-NER treatment after 6 and 12 hr, corroborating the caspase-independent cell death.

Gene expression analysis by qPCR detected an increase in cytochrome P450 transcripts of *CYP2C19* and *CYP1A2*, suggesting that C-NER underwent chemical modifications by these enzymes. Drug metabolism is directly related to its toxicity because it gives information about its pharmacological properties. Chemical modifications made in drug metabolism can reduce or increase compound toxicity depending on a

range of factors such as individual polymorphisms and drug half-life [40]. Cytochrome P450 enzymes are present in ER membrane, and it is reported that extensive metabolism of toxic drugs can induce ER stress [41–43].

Here, we propose that C-NER is extensively oxidized by *CYP2C19* and *CYP1A2* enzymes present in the ER, causing ER stress. The misfolding proteins formed in a stressed ER flagged the transcriptional activation of ER stress sensors ERN1 and *EIF2AK3*, which trigger cell cycle disruption and death. As the other forms of nerolidol did not induce any cytotoxicity, it is clear that C-NER is responsible for the antiproliferative properties we observed. Further pre-clinical studies must be performed to confirm C-NER's antiproliferative activity in other biological models in order to verify its anticancer properties, especially using *in vivo* techniques and in non-tumour cells to predict its side effects.

References

- 1 Kumar M, Kaur V, Kumar S, Kaur S. Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer. *Cytotechnology* 2016;**68**:531–63.
- 2 Fonseca DV, Salgado PR, de Carvalho FL, Salvadori MG, Penha AR, Leite FC, *et al.* Nerolidol exhibits antinociceptive and anti-inflammatory activity: involvement of the GABAergic system and proinflammatory cytokines. *Fundam Clin Pharmacol* 2016;**30**:14–22.
- 3 Arruda DC, D'Alexandri FL, Katzin AM, Uliana SR. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;**49**:1679–87.
- 4 Lee SJ, Han JI, Lee GS, Park MJ, Choi IG, Na KJ, *et al.* Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporium gypseum* in a guinea pig model. *Biol Pharm Bull* 2007;**30**:184–8.
- 5 Krist S, Banovac D, Tabanca N, Wedge DE, Gochev VK, Wanner J, *et al.* Antimicrobial activity of nerolidol and its derivatives against airborne microbes and further biological activities. *Nat Prod Commun* 2015;**10**:143–8.
- 6 Chan WK, Tan LT, Chan KG, Lee LH, Goh BH. Nerolidol: a sesquiterpene alcohol with multi-faceted pharmacological and biological activities. *Molecules* 2016;**21**:pii: E529.
- 7 MacLachlan TK, Sang N, Giordano A. Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk inhibitors: implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1995;**5**:127–56.
- 8 Donzelli M, Draetta GF. Regulating mammalian checkpoints through Cdc25 inactivation. *EMBO Rep* 2003;**4**:671–7.

- 9 Peters JM. The anaphase-promoting complex: proteolysis in mitosis and beyond. *Mol Cell* 2002;**9**:931–43.
- 10 Zhang J, Abdallah MA, Williams TD, Harrad S, Chipman JK, Viant MR. Gene expression and metabolic responses of HepG2/C3A cells exposed to flame retardants and dust extracts at concentrations relevant to indoor environmental exposures. *Chemosphere* 2016;**144**:1996–2003.
- 11 van Wenum M, Adam AA, Hakvoort TB, Hendriks EJ, Shevchenko V, van Gulik TM, *et al.* Selecting cells for bioartificial liver devices and the importance of a 3D culture environment: a functional comparison between the HepaRG and C3A cell lines. *Int J Biol Sci* 2016;**12**:964–78.
- 12 Ouyang L, Luo Y, Tian M, Zhang SY, Lu R, Wang JH, *et al.* Plant natural products: from traditional compounds to new emerging drugs in cancer therapy. *Cell Prolif* 2014;**47**:506–15.
- 13 Broker LE, Kruyt FA, Giaccone G. Cell death independent of caspases: a review. *Clin Cancer Res* 2005;**11**:3155–62.
- 14 Carere A, Stammati A, Zucco F. In vitro toxicology methods: impact on regulation from technical and scientific advancements. *Toxicol Lett* 2002;**127**:153–60.
- 15 Xie T, Song S, Li S, Ouyang L, Xia L, Huang J. Review of natural product databases. *Cell Prolif* 2015;**48**:398–404.
- 16 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983;**65**:55–63.
- 17 Darzynkiewicz Z, Traganos F, Staiano-Coico L, Kapuscinski J, Melamed MR. Interaction of rhodamine 123 with living cells studied by flow cytometry. *Cancer Res* 1982;**42**:799–806.
- 18 Collins AR. The comet assay. Principles, applications, and limitations. *Methods Mol Biol* 2002;**203**:163–77.
- 19 Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G, Gaivao I, Giovannelli L, Kruszewski M, *et al.* The comet assay: topical issues. *Mutagenesis* 2008;**23**:143–51.
- 20 Ferreira FM, Palmeira CM, Oliveira MM, Santos D, Simoes AM, Rocha SM, *et al.* Nerolidol effects on mitochondrial and cellular energetics. *Toxicol In Vitro* 2012;**26**:189–96.
- 21 Ambroz M, Bousova I, Skarka A, Hanusova V, Kralova V, Matouskova P, *et al.* The Influence of sesquiterpenes from *myrica rubra* on the antiproliferative and pro-oxidative effects of doxorubicin and its accumulation in cancer cells. *Molecules* 2015;**20**:15343–58.
- 22 Wachter J, Neureiter D, Alinger B, Pichler M, Fuereder J, Oberdanner C, *et al.* Influence of five potential anticancer drugs on wnt pathway and cell survival in human biliary tract cancer cells. *Int J Biol Sci* 2012;**8**:15–29.
- 23 Roskoski R Jr. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacol Res* 2016;**107**:249–75.
- 24 Mariaule G, Belmont P. Cyclin-dependent kinase inhibitors as marketed anticancer drugs: where are we now? A short survey *Molecules* 2014;**19**:14366–82.
- 25 el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, *et al.* WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993;**75**:817–25.
- 26 Zilfou JT, Lowe SW. Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009;**1**:a001883.
- 27 Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer* 2010;**10**:293–301.
- 28 Singh SS, Sarma JA, Narasu L, Dayam R, Xu S, Neamati N. A review on PARP1 inhibitors: pharmacophore modeling, virtual and biological screening studies to identify novel PARP1 inhibitors. *Curr Top Med Chem* 2014;**14**:2020–30.
- 29 Piculo F, Guiraldeli Macedo C, de Andrade SF, Luis Maistro E. In vivo genotoxicity assessment of nerolidol. *J Appl Toxicol* 2011;**31**:633–9.
- 30 Gardner BM, Pincus D, Gotthardt K, Gallagher CM, Walter P. Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2013;**5**:a013169.
- 31 Han C, Jin L, Mei Y, Wu M. Endoplasmic reticulum stress inhibits cell cycle progression via induction of p27 in melanoma cells. *Cell Signal* 2013;**25**:144–9.
- 32 Zhang LL, Xu YL, Tang ZH, Xu XH, Chen X, Li T, *et al.* Effects of alisol B 23-acetate on ovarian cancer cells: G1 phase cell cycle arrest, apoptosis, migration and invasion inhibition. *Phytomedicine* 2016;**23**:800–9.
- 33 Obaya AJ, Mateyak MK, Sedivy JM. Mysterious liaisons: the relationship between c-Myc and the cell cycle. *Oncogene* 1999;**18**:2934–41.
- 34 Rosenwald IB, Rhoads DB, Callanan LD, Isselbacher KJ, Schmidt EV. Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eIF-4E and eIF-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;**90**:6175–8.
- 35 Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, *et al.* Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell* 2001;**7**:1165–76.
- 36 Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;**97**:14376–81.
- 37 Wang Y, Li X, Wang L, Ding P, Zhang Y, Han W, *et al.* An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. *J Cell Sci* 2004;**117**:1525–32.
- 38 Ambroise G, Portier A, Roders N, Arnoult D, Vazquez A. Subcellular localization of PUMA regulates its pro-apoptotic activity in Burkitt's lymphoma B cells. *Oncotarget* 2015;**6**:38181–94.
- 39 Wang YF, Jiang CC, Kiejda KA, Gillespie S, Zhang XD, Hersey P. Apoptosis induction in human melanoma cells by inhibition of MEK is caspase-independent and mediated by the Bcl-2 family members PUMA, Bim, and Mcl-1. *Clin Cancer Res* 2007;**13**:4934–42.
- 40 Guengerich FP. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* 2001;**14**:611–50.
- 41 Abdelmegeed MA, Ha SK, Choi Y, Akbar M, Song BJ. Role of CYP2E1 in mitochondrial dysfunction and hepatic tissue injury in alcoholic and non-alcoholic diseases. *Curr Mol Pharmacol* 2015; [Epub ahead of print].
- 42 Cribb AE, Peyrou M, Muruganandan S, Schneider L. The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity. *Drug Metab Rev* 2005;**37**:405–42.
- 43 Foufelle F, Fromenty B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect* 2016;**4**:e00211.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

Table S1. Primers used in real time PCR reactions.

Table S2. Relative gene expression obtained by RT-qPCR.

CONCLUSÃO

Os estudos mostram que a PLN e o C-NER são drogas citotóxicas capazes que atuar inibindo a proliferação e induzindo a morte celular.

Como consequência dos danos celulares, o C-NER induz a parada de ciclo celular em G1 que esteve associada a redução na expressão de genes de ciclo celular (*CCND1*, *CCNE1*, *CDK1* e *CDK2*). Atribui-se os efeitos citotóxicos do C-NER a indução de estresse de retículo endoplasmático (ERE), observado através do aumento da expressão de mRNAs de *ERN1* e *EIF2AK3*. Foi possível observar a formação de granulações citoplasmáticas, características de morte celular por paraptose e do ERE. A paraptose parece estar associada ao aumento da expressão de *BBC3*.

A PLN atua por diversos mecanismo de danos, através do aumento de EROs, danos no DNA e ERE (aumento na expressão de *HSPA14* e *ERN1*). A redução na proliferação ocorreu devido a interrupção do ciclo celular nas fases G2 e mitose que esteve associada a modulação de genes de ciclo celular (redução de *CCNA2* e aumento de *CDKN1A*). Também foi observado indução de morte celular por apoptose, aumento da expressão de genes pró-apoptóticos *BAK1* e *BBC3* e, aumento de caspases ativas.

Foi identificado mudanças no perfil transcricional de genes codificantes das enzimas do citocromo P450, dados estes que trazem informações relevantes sobre a metabolização destas drogas.

Os resultados mostram que a PLN e o C-NER são drogas que apresentam grande potencial de se tornarem medicamentos antiproliferativos, e trazem importantes pontos específicos de ação molecular destas drogas que podem auxiliar na aplicabilidade destas na quimioterapia.

REFERÊNCIAS

ADIWIDJAJA, J.; MCLACHLAN, A. J.; BODDY, A. V. Curcumin as a clinically-promising anti-cancer agent: pharmacokinetics and drug interactions. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v. 13, n. 9, p. 953-972, Sep 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. 2013. Disponível em: <
<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2492465/Guia+para+a+Condu%C3%A7%C3%A3o+de+Estudos+N%C3%A3o+Cl%C3%ADnicos+de+Toxicologia+e+Seguran%C3%A7a+Farmacol%C3%B3gica+Necess%C3%A1rios+ao+Desenvolvimento+de+Medicamentos+-+Vers%C3%A3o+2/a8cad67c-14c8-4722-bf0f-058a3a284f75> >. Acesso em: 30/12/2018.

AGNIHOTRI, V. K.; THAPPA, R. K.; MEENA, B.; KAPAHI, B. K.; SAXENA, R. K.; QAZI, G. N.; AGARWAL, S. G. Essential oil composition of aerial parts of *Angelica glauca* growing wild in North-West Himalaya (India). **Phytochemistry**, v. 65, n. 16, p. 2411-3, Aug 2004.

AMBROZ, M.; BOUSOVA, I.; SKARKA, A.; HANUSOVA, V.; KRALOVA, V.; MATOUSKOVA, P.; SZOTAKOVA, B.; SKALOVA, L. The Influence of Sesquiterpenes from *Myrica rubra* on the Antiproliferative and Pro-Oxidative Effects of Doxorubicin and Its Accumulation in Cancer Cells. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 15343-58, 2015.

AMBROZ, M.; MATOUSKOVA, P.; SKARKA, A.; ZAJDLOVA, M.; ZAKOVA, K.; SKALOVA, L. The Effects of Selected Sesquiterpenes from *Myrica rubra* Essential Oil on the Efficacy of Doxorubicin in Sensitive and Resistant Cancer Cell Lines. **Molecules**, v. 22, n. 6, Jun 20 2017.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 5, p. 1679-87, May 2005.

BABBAR, N. An introduction to alkaloids and their applications in pharmaceutical chemistry. **The Pharma Innovation Journal**, v. 4, n. 10, p. 74-75, 2015.

BAILEY, M. H.; TOKHEIM, C.; PORTA-PARDO, E.; SENGUPTA, S.; BERTRAND, D.; WEERASINGHE, A.; COLAPRICO, A.; WENDL, M. C.; KIM, J.; REARDON, B.; NG, P. K.; JEONG, K. J.; CAO, S.; WANG, Z.; GAO, J.; GAO, Q.; WANG, F.; LIU, E. M.; MULARONI, L.; RUBIO-PEREZ, C.; NAGARAJAN, N.; CORTES-CIRIANO, I.; ZHOU, D. C.; LIANG, W. W.; HESS, J. M.; YELLAPANTULA, V. D.; TAMBORERO, D.; GONZALEZ-PEREZ, A.; SUPHAVILAI, C.; KO, J. Y.; KHURANA, E.; PARK, P. J.; VAN ALLEN, E. M.; LIANG, H.; GROUP, M. C. W.; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N.; LAWRENCE, M. S.; GODZIK, A.; LOPEZ-BIGAS, N.; STUART, J.; WHEELER, D.; GETZ, G.; CHEN, K.; LAZAR, A. J.; MILLS, G. B.; KARCHIN, R.; DING, L. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. **Cell**, v. 173, n. 2, p. 371-385 e18, Apr 5 2018.

BARBIERI, R.; COPPO, E.; MARCHESE, A.; DAGLIA, M.; SOBARZO-SANCHEZ, E.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Phytochemicals for human disease: An update on plant-derived compounds antibacterial activity. **Microbiol Res**, v. 196, p. 44-68, Mar 2017.

BARROS, M. P.; RODRIGO, M. J.; ZACARIAS, L. Dietary Carotenoid Roles in Redox Homeostasis and Human Health. **J Agric Food Chem**, v. 66, n. 23, p. 5733-5740, Jun 13 2018.

BENNETT, M. R. Mechanisms of p53-induced apoptosis. **Biochem Pharmacol**, v. 58, n. 7, p. 1089-95, Oct 1 1999.

BERNARD, C. B.; KRISHANMURTY, H. G.; CHAURET, D.; DURST, T.; PHILOGENE, B. J.; SANCHEZ-VINDAS, P.; HASBUN, C.; POVEDA, L.; SAN ROMAN, L.; ARNASON, J. T. Insecticidal defenses of Piperaceae from the neotropics. **J Chem Ecol**, v. 21, n. 6, p. 801-14, Jun 1995.

BHARADWAJ, U.; ECKOLS, T. K.; KOLOSOV, M.; KASEMBELI, M. M.; ADAM, A.; TORRES, D.; ZHANG, X.; DOBROLECKI, L. E.; WEI, W.; LEWIS, M. T.; DAVE, B.; CHANG, J. C.; LANDIS, M. D.; CREIGHTON, C. J.; MANCINI, M. A.; TWEARDY, D. J. Drug-repositioning screening identified piperlongumine as a direct STAT3 inhibitor with potent activity against breast cancer. **Oncogene**, v. 34, n. 11, p. 1341-53, Mar 12 2015.

BIALIK, S.; DASARI, S. K.; KIMCHI, A. Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death. **J Cell Sci**, v. 131, n. 18, Sep 20 2018.

BORIS, R.; ELENA, T.; ERICH, S.; WALTER, J.; GERHARD, B.; LEOPOLD, J. Cytotoxic Properties of Selected Sesquiterpene Alcohols on Human Cervix Carcinoma Cell Lines. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 14, n. 3, p. 316-319, 2011.

BROKER, L. E.; KRUYT, F. A.; GIACCONE, G. Cell death independent of caspases: a review. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 9, p. 3155-62, May 01 2005.

CABRAL, R. S. C.; ALVES, C. C. F.; BATISTA, H. R. F.; SOUSA, W. C.; ABRAHAO, I. S.; CROTTI, A. E. M.; SANTIAGO, M. B.; MARTINS, C. H. G.; MIRANDA, M. L. D. Chemical composition of essential oils from different parts of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand and their in vitro antibacterial activity. **Nat Prod Res**, p. 1-6, Nov 30 2018.

CAO, H. X.; ZHU, K. X.; FAN, J. G.; QIAO, L. Garlic-derived allyl sulfides in cancer therapy. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 14, n. 6, p. 793-9, 2014.

CEOLE, L. F.; CARDOSO, M. D. G.; SOARES, M. J. Nerolidol, the main constituent of *Piper aduncum* essential oil, has anti-*Leishmania braziliensis* activity. **Parasitology**, v. 144, n. 9, p. 1179-1190, Aug 2017.

CHAN, W. K.; TAN, L. T.; CHAN, K. G.; LEE, L. H.; GOH, B. H. Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

CHANOCK, S. J. The paradox of mutations and cancer. **Science**, v. 362, n. 6417, p. 893-894, Nov 23 2018.

CHATTERJEE, A.; DUTTA, C. P. Alkaloids of Piper longum Linn. I. Structure and synthesis of piperlongumine and piperlonguminine. **Tetrahedron**, v. 23, n. 4, p. 1769-81, Apr 1967.

CHEN, M.; HE, M.; SONG, Y.; CHEN, L.; XIAO, P.; WAN, X.; DAI, F.; SHEN, P. The cytoprotective role of gemcitabine-induced autophagy associated with apoptosis inhibition in triple-negative MDA-MB-231 breast cancer cells. **Int J Mol Med**, v. 34, n. 1, p. 276-82, Jul 2014.

DANAILA, L.; POPESCU, I.; PAIS, V.; RIGA, D.; RIGA, S.; PAIS, E. Apoptosis, paraptosis, necrosis, and cell regeneration in posttraumatic cerebral arteries. **Chirurgia (Bucur)**, v. 108, n. 3, p. 319-24, May-Jun 2013.

DEMAIN, A. L.; VAISHNAV, P. Natural products for cancer chemotherapy. **Microb Biotechnol**, v. 4, n. 6, p. 687-99, Nov 2011.

DHAWAN, V.; JAIN, S. Garlic supplementation prevents oxidative DNA damage in essential hypertension. **Mol Cell Biochem**, v. 275, n. 1-2, p. 85-94, Jul 2005.

DHILLON, H.; CHIKARA, S.; REINDL, K. M. Piperlongumine induces pancreatic cancer cell death by enhancing reactive oxygen species and DNA damage. **Toxicol Rep**, v. 1, p. 309-318, 2014.

DUAN, C.; ZHANG, B.; DENG, C.; CAO, Y.; ZHOU, F.; WU, L.; CHEN, M.; SHEN, S.; XU, G.; ZHANG, S.; DUAN, G.; YAN, H.; ZOU, X. Piperlongumine induces gastric cancer cell apoptosis and G2/M cell cycle arrest both in vitro and in vivo. **Tumour Biol**, v. 37, n. 8, p. 10793-804, Aug 2016.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. **Bioanálise**, v. IV, n. 2, 2007.

FRESENIUS KABI. RABINEFIL®: sulfato de vimblastina. 2015. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=6305562015&pIdAnexo=2744670>. Acesso em: 13/12/2018.

GAGAT, M.; HALAS-WISNIEWSKA, M.; ZIELINSKA, W.; IZDEBSKA, M.; GRZANKA, D.; GRZANKA, A. The effect of piperlongumine on endothelial and lung adenocarcinoma cells with regulated expression of profilin-1. **Onco Targets Ther**, v. 11, p. 8275-8292, 2018.

GERL, R.; VAUX, D. L. Apoptosis in the development and treatment of cancer. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 2, p. 263-70, Feb 2005.

GIBSON, L. F.; FORTNEY, J.; MAGRO, G.; ERICSON, S. G.; LYNCH, J. P.; LANDRETH, K. S. Regulation of BAX and BCL-2 expression in breast cancer cells by chemotherapy. **Breast Cancer Res Treat**, v. 55, n. 2, p. 107-17, May 1999.

GINZBURG, S.; GOLOVINE, K. V.; MAKHOV, P. B.; UZZO, R. G.; KUTIKOV, A.; KOLENKO, V. M. Piperlongumine inhibits NF-kappaB activity and attenuates aggressive growth characteristics of prostate cancer cells. **Prostate**, v. 74, n. 2, p. 177-86, Feb 2014.
GOLOVINE, K. V.; MAKHOV, P. B.; TEPER, E.; KUTIKOV, A.; CANTER, D.; UZZO, R.

G.; KOLENKO, V. M. Piperlongumine induces rapid depletion of the androgen receptor in human prostate cancer cells. **Prostate**, v. 73, n. 1, p. 23-30, Jan 2013.

GONG, L. H.; CHEN, X. X.; WANG, H.; JIANG, Q. W.; PAN, S. S.; QIU, J. G.; MEI, X. L.; XUE, Y. Q.; QIN, W. M.; ZHENG, F. Y.; SHI, Z.; YAN, X. J. Piperlongumine induces apoptosis and synergizes with cisplatin or paclitaxel in human ovarian cancer cells. **Oxid Med Cell Longev**, v. 2014, p. 906804, 2014.

GOODALL, M. L.; FITZWALTER, B. E.; ZAHEDI, S.; WU, M.; RODRIGUEZ, D.; MULCAHY-LEVY, J. M.; GREEN, D. R.; MORGAN, M.; CRAMER, S. D.; THORBURN, A. The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis. **Dev Cell**, v. 37, n. 4, p. 337-349, May 23 2016.

GUO, S.; LONG, M.; LI, X.; ZHU, S.; ZHANG, M.; YANG, Z. Curcumin activates autophagy and attenuates oxidative damage in EA.hy926 cells via the Akt/mTOR pathway. **Mol Med Rep**, v. 13, n. 3, p. 2187-93, Mar 2016.

HANUSOVA, V.; CALTOVA, K.; SVOBODOVA, H.; AMBROZ, M.; SKARKA, A.; MURINOVA, N.; KRALOVA, V.; TOMSIK, P.; SKALOVA, L. The effects of beta-caryophyllene oxide and trans-nerolidol on the efficacy of doxorubicin in breast cancer cells and breast tumor-bearing mice. **Biomed Pharmacother**, v. 95, p. 828-836, Nov 2017.

HUANG, M.; SHEN, A.; DING, J.; GENG, M. Molecularly targeted cancer therapy: some lessons from the past decade. **Trends Pharmacol Sci**, v. 35, n. 1, p. 41-50, Jan 2014.

JANA, N.; BRETISLAV, G.; PAVEL, S.; PAVLA, U. Potential of the Flavonoid Quercetin to Prevent and Treat Cancer - Current Status of Research. **Klin Onkol**, v. 31, n. 3, p. 184-190, Spring 2018.

JIN, H. O.; LEE, Y. H.; PARK, J. A.; LEE, H. N.; KIM, J. H.; KIM, J. Y.; KIM, B.; HONG, S. E.; KIM, H. A.; KIM, E. K.; NOH, W. C.; KIM, J. I.; CHANG, Y. H.; HONG, S. I.; HONG, Y. J.; PARK, I. C.; LEE, J. K. Piperlongumine induces cell death through ROS-mediated CHOP activation and potentiates TRAIL-induced cell death in breast cancer cells. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 140, n. 12, p. 2039-46, Dec 2014.

KACZMAREK, A.; VANDENABEELE, P.; KRYSKO, D. V. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. **Immunity**, v. 38, n. 2, p. 209-23, Feb 21 2013.

KANG, Q.; YAN, S. Piperlongumine reverses doxorubicin resistance through the PI3K/Akt signaling pathway in K562/A02 human leukemia cells. **Exp Ther Med**, v. 9, n. 4, p. 1345-1350, Apr 2015.

KARKI, K.; HEDRICK, E.; KASIAPPAN, R.; JIN, U. H.; SAFE, S. Piperlongumine Induces Reactive Oxygen Species (ROS)-Dependent Downregulation of Specificity Protein Transcription Factors. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 10, n. 8, p. 467-477, Aug 2017.

KLIONSKY, D. J.; CREGG, J. M.; DUNN, W. A., JR.; EMR, S. D.; SAKAI, Y.; SANDOVAL, I. V.; SIBIRNY, A.; SUBRAMANI, S.; THUMM, M.; VEENHUIS, M.; OHSUMI, Y. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. **Dev Cell**, v. 5, n. 4,

p. 539-45, Oct 2003.

KONTOS, C. K.; CHRISTODOULOU, M. I.; SCORILAS, A. Apoptosis-related BCL2-family members: Key players in chemotherapy. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 14, n. 3, p. 353-74, Mar 2014.

KUMAR, M.; KAUR, V.; KUMAR, S.; KAUR, S. Phytoconstituents as apoptosis inducing agents: strategy to combat cancer. **Cytotechnology**, v. 68, n. 4, p. 531-63, Aug 2016.

LEE, D.; KIM, I. Y.; SAHA, S.; CHOI, K. S. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. **Pharmacol Ther**, v. 162, p. 120-33, Jun 2016.

LEE, W.; YOO, H.; KIM, J. A.; LEE, S.; JEE, J. G.; LEE, M. Y.; LEE, Y. M.; BAE, J. S. Barrier protective effects of piperlonguminine in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. **Food Chem Toxicol**, v. 58, p. 149-57, Aug 2013.

LEWIS, K. M.; BHARADWAJ, U.; ECKOLS, T. K.; KOLOSOV, M.; KASEMBELI, M. M.; FRIDLEY, C.; SILLER, R.; TWEARDY, D. J. Small-molecule targeting of signal transducer and activator of transcription (STAT) 3 to treat non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 90, n. 2, p. 182-90, Nov 2015.

LI, J.; WANG, S. W.; ZHANG, D. S.; SUN, Y.; ZHU, C. Y.; FEI, Q.; HU, J.; ZHANG, C.; SUN, Y. M. FTY720-induced enhancement of autophagy protects cells from FTY720 cytotoxicity in colorectal cancer. **Oncol Rep**, v. 35, n. 5, p. 2833-42, May 2016.

LIN, D.; XIAO, M.; ZHAO, J.; LI, Z.; XING, B.; LI, X.; KONG, M.; LI, L.; ZHANG, Q.; LIU, Y.; CHEN, H.; QIN, W.; WU, H.; CHEN, S. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, Oct 15 2016.

LIU, D.; QIU, X. Y.; WU, X.; HU, D. X.; LI, C. Y.; YU, S. B.; PAN, F.; CHEN, X. Q. Piperlongumine suppresses bladder cancer invasion via inhibiting epithelial mesenchymal transition and F-actin reorganization. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 494, n. 1-2, p. 165-172, Dec 9 2017.

LIU, J. M.; PAN, F.; LI, L.; LIU, Q. R.; CHEN, Y.; XIONG, X. X.; CHENG, K.; YU, S. B.; SHI, Z.; YU, A. C.; CHEN, X. Q. Piperlongumine selectively kills glioblastoma multiforme cells via reactive oxygen species accumulation dependent JNK and p38 activation. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 437, n. 1, p. 87-93, Jul 19 2013.

MAKHOV, P.; GOLOVINE, K.; TEPER, E.; KUTIKOV, A.; MEHRAZIN, R.; CORCORAN, A.; TULIN, A.; UZZO, R. G.; KOLENKO, V. M. Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signalling and mediates cancer cell death. **Br J Cancer**, v. 110, n. 4, p. 899-907, Feb 18 2014.

MARINO, G.; LOPEZ-OTIN, C. Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. **Cell Mol Life Sci**, v. 61, n. 12, p. 1439-54, Jun 2004.

MGBEAHURUIKE, E. E.; FYHRQUIST, P.; VUORELA, H.; JULKUNEN-TIITTO, R.;

HOLM, Y. Alkaloid-Rich Crude Extracts, Fractions and Piperamide Alkaloids of Piper guineense Possess Promising Antibacterial Effects. **Antibiotics (Basel)**, v. 7, n. 4, Nov 9 2018.

MIN, J. Y.; MIN, K. B. Serum lycopene, lutein and zeaxanthin, and the risk of Alzheimer's disease mortality in older adults. **Dement Geriatr Cogn Disord**, v. 37, n. 3-4, p. 246-56, 2014.

MOHAMMAD, J.; DHILLON, H.; CHIKARA, S.; MAMIDI, S.; SREEDASYAM, A.; CHITTEM, K.; ORR, M.; WILKINSON, J. C.; REINDL, K. M. Piperlongumine potentiates the effects of gemcitabine in in vitro and in vivo human pancreatic cancer models. **Oncotarget**, v. 9, n. 12, p. 10457-10469, Feb 13 2018.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. PubChem Compound Database; CID=5284507. 2005. Disponível em: <
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5284507> >. Acesso em: 14/12/2018.

NEDUNGADI, D.; BINOY, A.; PANDURANGAN, N.; PAL, S.; NAIR, B. G.; MISHRA, N. 6-Shogaol induces caspase-independent paraptosis in cancer cells via proteasomal inhibition. **Exp Cell Res**, v. 364, n. 2, p. 243-251, Mar 15 2018.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod**, v. 75, n. 3, p. 311-35, Mar 23 2012.

OUYANG, L.; SHI, Z.; ZHAO, S.; WANG, F. T.; ZHOU, T. T.; LIU, B.; BAO, J. K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell Prolif**, v. 45, n. 6, p. 487-98, Dec 2012.

PALOZZA, P.; PARRONE, N.; SIMONE, R. E.; CATALANO, A. Lycopene in atherosclerosis prevention: an integrated scheme of the potential mechanisms of action from cell culture studies. **Arch Biochem Biophys**, v. 504, n. 1, p. 26-33, Dec 1 2010.

PANDA, D.; JORDAN, M. A.; CHU, K. C.; WILSON, L. Differential Effects of Vinblastine on Polymerization and Dynamics at Opposite Microtubule Ends. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 29807-29812, 1996.

PARDO, R.; LO RE, A.; ARCHANGE, C.; ROPOLO, A.; PAPADEMETRIO, D. L.; GONZALEZ, C. D.; ALVAREZ, E. M.; IOVANNA, J. L.; VACCARO, M. I. Gemcitabine induces the VMP1-mediated autophagy pathway to promote apoptotic death in human pancreatic cancer cells. **Pancreatol**, v. 10, n. 1, p. 19-26, 2010.

PARK, D.; JEONG, H.; LEE, M. N.; KOH, A.; KWON, O.; YANG, Y. R.; NOH, J.; SUH, P. G.; PARK, H.; RYU, S. H. Resveratrol induces autophagy by directly inhibiting mTOR through ATP competition. **Sci Rep**, v. 6, p. 21772, Feb 23 2016.

RASTOGI, R. P.; RICHA; SINHA, R. P. Apoptosis: Molecular mechanisms and pathogenicity. **EXCLI Journal**, v. 8, p. 155-181 2009.

REDDY, P. S.; JAMIL, K.; MADHUSUDHAN, P.; ANJANI, G.; DAS, B. Antibacterial Activity of Isolates from Piper longum and Taxus baccata. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n.

3, p. 236-238, 2008.

REDONDO-BLANCO, S.; FERNANDEZ, J.; GUTIERREZ-DEL-RIO, I.; VILLAR, C. J.; LOMBO, F. New Insights toward Colorectal Cancer Chemotherapy Using Natural Bioactive Compounds. **Front Pharmacol**, v. 8, p. 109, 2017.

ROH, J. L.; KIM, E. H.; PARK, J. Y.; KIM, J. W.; KWON, M.; LEE, B. H. Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer. **Oncotarget**, v. 5, n. 19, p. 9227-38, Oct 15 2014.

ROPOLO, A.; BAGNES, C. I.; MOLEJON, M. I.; LO RE, A.; BOGGIO, V.; GONZALEZ, C. D.; VACCARO, M. I. Chemotherapy and autophagy-mediated cell death in pancreatic cancer cells. **Pancreatology**, v. 12, n. 1, p. 1-7, Jan-Feb 2012.

RYABCHENKO, B.; TULUPOVÁ, E.; SCHMIDT, E.; WLCEK, K.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L. Investigation of Anticancer and Antiviral Properties of Selected Aroma Samples. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 7, p. 1085-1088, 2008.

SAITO, A. Y.; MARIN RODRIGUEZ, A. A.; MENCHACA VEGA, D. S.; SUSSMANN, R. A. C.; KIMURA, E. A.; KATZIN, A. M. Antimalarial activity of the terpene nerolidol. **Int J Antimicrob Agents**, v. 48, n. 6, p. 641-646, Dec 2016.

SAMADDER, P.; BITTMAN, R.; BYUN, H. S.; ARTHUR, G. A glycosylated antitumor ether lipid kills cells via paraptosis-like cell death. **Biochem Cell Biol**, v. 87, n. 2, p. 401-14, Apr 2009.

SAVITSKAYA, M. A.; ONISHCHENKO, G. E. Mechanisms of Apoptosis. **Biochemistry (Mosc)**, v. 80, n. 11, p. 1393-405, Nov 2015.

SEKI, T.; HOSONO, T. Prevention of Cardiovascular Diseases by Garlic-Derived Sulfur Compounds. **J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)**, v. 61 Suppl, p. S83-5, 2015.

SEKI, T.; HOSONO, T.; HOSONO-FUKAO, T.; INADA, K.; TANAKA, R.; OGIHARA, J.; ARIGA, T. Anticancer effects of diallyl trisulfide derived from garlic. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 17 Suppl 1, p. 249-52, 2008.

SHRIVASTAVA, S.; KULKARNI, P.; THUMMURI, D.; JEENGAR, M. K.; NAIDU, V. G.; ALVALA, M.; REDDDY, G. B.; RAMAKRISHNA, S. Piperlongumine, an alkaloid causes inhibition of PI3 K/Akt/mTOR signaling axis to induce caspase-dependent apoptosis in human triple-negative breast cancer cells. **Apoptosis**, v. 19, n. 7, p. 1148-64, Jul 2014.

SILVA, M. P.; DE OLIVEIRA, R. N.; MENGARDA, A. C.; ROQUINI, D. B.; ALLEGRETTI, S. M.; SALVADORI, M. C.; TEIXEIRA, F. S.; DE SOUSA, D. P.; PINTO, P. L. S.; DA SILVA FILHO, A. A.; DE MORAES, J. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. **Int J Antimicrob Agents**, v. 50, n. 3, p. 467-472, Sep 2017. SILVA, M. P.; OLIVEIRA, G. L.; DE CARVALHO, R. B.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; PINTO, P. L.; DE MORAES, J. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 3793-803, Mar 24 2014.

SIMÕES, C. M. D. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. D.; MENTZ,

L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Editora da UFRGS, 1999.

SONG, X.; GAO, T.; LEI, Q.; ZHANG, L.; YAO, Y.; XIONG, J. Piperlongumine Induces Apoptosis in Human Melanoma Cells Via Reactive Oxygen Species Mediated Mitochondria Disruption. **Nutr Cancer**, v. 70, n. 3, p. 502-511, Apr 2018.

SPERANDIO, S.; DE BELLE, I.; BREDESEN, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 26, p. 14376-81, Dec 19 2000.

SUMAN, S.; SHUKLA, Y. Diallyl Sulfide and Its Role in Chronic Diseases Prevention. **Adv Exp Med Biol**, v. 929, p. 127-144, 2016.

SUN, L.; WANG, X. A new kind of cell suicide: mechanisms and functions of programmed necrosis. **Trends Biochem Sci**, v. 39, n. 12, p. 587-93, Dec 2014.

SUN, Y.; PENG, Z. L. Programmed cell death and cancer. **Postgrad Med J**, v. 85, n. 1001, p. 134-40, Mar 2009.

SYLVESTRE, M.; PICHETTE, A.; LAVOIE, S.; LONGTIN, A.; LEGAULT, J. Composition and cytotoxic activity of the leaf essential oil of *Comptonia peregrina* (L.) Coulter. **Phytother Res**, v. 21, n. 6, p. 536-40, Jun 2007.

THONGSOM, S.; SUGINTA, W.; LEE, K. J.; CHOE, H.; TALABNIN, C. Piperlongumine induces G2/M phase arrest and apoptosis in cholangiocarcinoma cells through the ROS-JNK-ERK signaling pathway. **Apoptosis**, v. 22, n. 11, p. 1473-1484, Nov 2017.

TORRES-RAMIREZ, N.; ESCOBAR, M. L.; VAZQUEZ-NIN, G. H.; ORTIZ, R.; ECHEVERRIA, O. M. Paraptosis-like cell death in Wistar rat granulosa cells. **Dev Growth Differ**, v. 58, n. 8, p. 651-663, Oct 2016.

TRISTAO, V. R.; GONCALVES, P. F.; DALBONI, M. A.; BATISTA, M. C.; DURAO MDE, S., JR.; MONTE, J. C. Nec-1 protects against nonapoptotic cell death in cisplatin-induced kidney injury. **Ren Fail**, v. 34, n. 3, p. 373-7, 2012.

TRISTAO, V. R.; PESSOA, E. A.; NAKAMICHI, R.; REIS, L. A.; BATISTA, M. C.; DURAO JUNIOR MDE, S.; MONTE, J. C. Synergistic effect of apoptosis and necroptosis inhibitors in cisplatin-induced nephrotoxicity. **Apoptosis**, v. 21, n. 1, p. 51-9, Jan 2016.

U.S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Guidance for Industry: S2(R1) Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human Use. 2012. Disponível em: < <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm074931.pdf> >. Acesso em: 30/12/2018.

VAN ACKER, S. A.; VAN DEN BERG, D. J.; TROMP, M. N.; GRIFFIOEN, D. H.; VAN BENNEKOM, W. P.; VAN DER VIJGH, W. J.; BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radic Biol Med**, v. 20, n. 3, p. 331-42, 1996.

VIEGAS JR, C.; BOLZANIL, V. D. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WANG, F.; MAO, Y.; YOU, Q.; HUA, D.; CAI, D. Piperlongumine induces apoptosis and autophagy in human lung cancer cells through inhibition of PI3K/Akt/mTOR pathway. **Int J Immunopathol Pharmacol**, v. 28, n. 3, p. 362-73, Sep 2015.

WANG, Y.; LI, X.; WANG, L.; DING, P.; ZHANG, Y.; HAN, W.; MA, D. An alternative form of paraptosis-like cell death, triggered by TAJ/TROY and enhanced by PDCD5 overexpression. **J Cell Sci**, v. 117, n. Pt 8, p. 1525-32, Mar 15 2004.

WANG, Y.; YU, J.; CUI, R.; LIN, J.; DING, X. Curcumin in Treating Breast Cancer: A Review. **J Lab Autom**, v. 21, n. 6, p. 723-731, Dec 2016.

XIE, X.; ZHAO, Y.; MA, C. Y.; XU, X. M.; ZHANG, Y. Q.; WANG, C. G.; JIN, J.; SHEN, X.; GAO, J. L.; LI, N.; SUN, Z. J.; DONG, D. L. Dimethyl fumarate induces necroptosis in colon cancer cells through GSH depletion/ROS increase/MAPKs activation pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 15, p. 3929-43, 2015.

XIONG, X. X.; LIU, J. M.; QIU, X. Y.; PAN, F.; YU, S. B.; CHEN, X. Q. Piperlongumine induces apoptotic and autophagic death of the primary myeloid leukemia cells from patients via activation of ROS-p38/JNK pathways. **Acta Pharmacol Sin**, v. 36, n. 3, p. 362-74, Mar 2015.

XU, Y.; MA, H.; SHAO, J.; WU, J.; ZHOU, L.; ZHANG, Z.; WANG, Y.; HUANG, Z.; REN, J.; LIU, S.; CHEN, X.; HAN, J. A Role for Tubular Necroptosis in Cisplatin-Induced AKI. **J Am Soc Nephrol**, v. 26, n. 11, p. 2647-58, Nov 2015.

XUE, J.; LI, R.; ZHAO, X.; MA, C.; LV, X.; LIU, L.; LIU, P. Morusin induces paraptosis-like cell death through mitochondrial calcium overload and dysfunction in epithelial ovarian cancer. **Chem Biol Interact**, v. 283, p. 59-74, Mar 1 2018.

YAN, C.; OH, J. S.; YOO, S. H.; LEE, J. S.; YOON, Y. G.; OH, Y. J.; JANG, M. S.; LEE, S. Y.; YANG, J.; LEE, S. H.; KIM, H. Y.; YOO, Y. H. The targeted inhibition of mitochondrial Hsp90 overcomes the apoptosis resistance conferred by Bcl-2 in Hep3B cells via necroptosis. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 266, n. 1, p. 9-18, Jan 1 2013.

YI, L.; SU, Q. Molecular mechanisms for the anti-cancer effects of diallyl disulfide. **Food Chem Toxicol**, v. 57, p. 362-70, Jul 2013.

YU, L.; CHEN, Y.; TOOZE, S. A. Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. **Autophagy**, v. 14, n. 2, p. 207-215, 2018.

YU, M.; YAN, W.; BEIGHT, C. Lutein and Zeaxanthin Isomers Protect against Light-Induced Retinopathy via Decreasing Oxidative and Endoplasmic Reticulum Stress in BALB/cJ Mice. **Nutrients**, v. 10, n. 7, Jun 28 2018.

YUMNAM, S.; HONG, G. E.; RAHA, S.; SARALAMMA, V. V.; LEE, H. J.; LEE, W. S.; KIM, E. H.; KIM, G. S. Mitochondrial Dysfunction and Ca(2+) Overload Contributes to Hesperidin Induced Paraptosis in Hepatoblastoma Cells, HepG2. **J Cell Physiol**, v. 231, n. 6, p. 1261-8, Jun 2016.

ZHANG, A.; LI, J. Crocetin shifts autophagic cell survival to death of breast cancer cells in chemotherapy. **Tumour Biol**, v. 39, n. 3, p. 1010428317694536, Mar 2017.

ZHANG, L. L.; XU, Y. L.; TANG, Z. H.; XU, X. H.; CHEN, X.; LI, T.; DING, C. Y.; HUANG, M. Q.; CHEN, X. P.; WANG, Y. T.; YUAN, X. F.; LU, J. J. Effects of alisol B 23-acetate on ovarian cancer cells: G1 phase cell cycle arrest, apoptosis, migration and invasion inhibition. **Phytomedicine**, v. 23, n. 8, p. 800-9, Jul 15 2016.

ZHANG, Y.; MA, H.; WU, Y.; WU, Z.; YAO, Z.; ZHANG, W.; ZHUANG, C.; MIAO, Z. Novel non-trimethoxyphenyl piperlongumine derivatives selectively kill cancer cells. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 27, n. 11, p. 2308-2312, Jun 1 2017.

ZHOU, Y.; HUANG, F.; YANG, Y.; WANG, P.; ZHANG, Z.; TANG, Y.; SHEN, Y.; WANG, K. Paraptosis-Inducing Nanomedicine Overcomes Cancer Drug Resistance for a Potent Cancer Therapy. **Small**, v. 14, n. 7, Feb 2018.

ZHU, Y.; BU, S. Curcumin Induces Autophagy, Apoptosis, and Cell Cycle Arrest in Human Pancreatic Cancer Cells. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2017, p. 5787218, 2017.

ZOU, Y.; YAN, C.; ZHANG, H.; XU, J.; ZHANG, D.; HUANG, Z.; ZHANG, Y. Synthesis and evaluation of N-heteroaromatic ring-based analogs of piperlongumine as potent anticancer agents. **Eur J Med Chem**, v. 138, p. 313-319, Sep 29 2017.

ZOU, Y.; ZHAO, D.; YAN, C.; JI, Y.; LIU, J.; XU, J.; LAI, Y.; TIAN, J.; ZHANG, Y.; HUANG, Z. Novel Ligustrazine-Based Analogs of Piperlongumine Potently Suppress Proliferation and Metastasis of Colorectal Cancer Cells in Vitro and in Vivo. **J Med Chem**, v. 61, n. 5, p. 1821-1832, Mar 8 2018.