

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**RODRIGO MACHADO PEREIRA**

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS ALCALÓIDES PIPERIDÍNICOS (-)-  
CASSINA E (-)-ESPECTALINA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA  
HEPATOCELULAR HUMANO - HEPG2**

ALFENAS - MG

2016

**RODRIGO MACHADO PEREIRA**

**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS ALCALÓIDES PIPERIDÍNICOS (-)-  
CASSINA E (-)-ESPECTALINA SOBRE CÉLULAS DE CARCINOMA  
HEPATOCELULAR HUMANO - HEPG2**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Fisiopatologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa Ionta

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jaqueline Carvalho de Oliveira

ALFENAS - MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Pereira, Rodrigo Machado

Atividade antiproliferativa dos alcalóides piperidínicos  
(-)-cassina e (-)-espectralina sobre células de carcinoma  
hepatocelular humano – HepG2 / Rodrigo Machado Pereira --  
Alfenas/MG, 2016.

90 f.

Orientadora: Marisa Ionta.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Carcinoma Hepatocelular. 2. Ciclo Celular. 3. Alcaloides.  
4. Senna (Planta). I. Ionta, Marisa. II. Título.

CDD-616.994

RODRIGO MACHADO PEREIRA

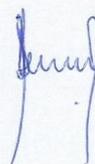
**ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DOS ALCALÓIDES  
PIPERIDÍNICOS (-)-CASSINA E (-)-ESPECTALINA SOBRE CÉLULAS  
DE CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO - HEPG2**

A Banca examinadora abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Fisiopatologia.

Aprovado em 22 de janeiro de 2016.

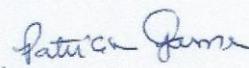
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa Ionta  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



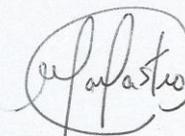
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Patrícia Gama  
Instituição: Universidade de São Paulo

Assinatura:



Prof. Dr. Angel Maurício Castro Gamero  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura:



Aos meus pais, **Rubens Xavier Pereira** e **Brasilina Machado Pereira**, por terem me concedido o dom da vida, pela infinita dedicação e confiança em mim. Ao meu irmão, **Robson Machado Pereira**, meus familiares, amigos e professores, pelo imenso apoio e incentivo, que me conduziram a alcançar este objetivo.

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter possibilitado que tudo isso tenha sido realizado. Além de me prover a vida, guardou-me de todo mal, derramou em mim suas bênçãos e concedeu-me inúmeras graças ao longo desta caminhada. Ao Seu Nome, todo louvor, honra e glória para sempre!

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marisa Ionta**, minha orientadora, por ter me acolhido, confiado em mim e provido toda orientação no desenvolvimento deste trabalho. Em todos os momentos, pude contar com sua imensa atenção, paciência, dedicação, disponibilidade e incentivo. A qual tenho como exemplo, e espero levar um pouco de si por toda minha vida.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Jaqueline Carvalho de Oliveira**, minha co-orientadora, que colaborou grandiosamente neste trabalho. A qual tenho profundo respeito e admiração, pelos seus conhecimentos e sua postura profissional. Se mostrou imensuravelmente prestativa e atenciosa, principalmente nos momentos de maior dificuldade.

À **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Rodrigues dos Anjos Mendonça** e a **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fiorita Gonzales Lopes Mundim**, minhas professoras da graduação em Ciências Biológicas na Universidade do Vale do Sapucaí. Foram minhas principais incentivadoras para o seguimento de carreira acadêmica pelo amor à pesquisa. A elas tenho profundo respeito e gratidão, e devo muito por estar aqui hoje.

À mestre **Simone da Silva Lamartine Hanemann**, eterna colega, agradeço por sua amizade em todos os momentos, bons e ruins. Sempre me proveu todo apoio, desde seus ensinamentos técnicos até seus aconselhamentos pessoais. Fico lisonjeado de ter dividido a mesma bancada.

À **Leilane Sales**, pela amizade e coleguismo em todos os momentos, principalmente por ter compartilhado comigo as dificuldades enfrentadas durante o mestrado, principalmente nos seminários das disciplinas e nos prazos acirrados de entrega dos relatórios.

Ao **Guilherme Ferreira**, por todo apoio prestado a este trabalho, realizou a triagem dos compostos nas diversas linhagens celulares. Além de ter compartilhado seus conhecimentos técnicos e sua experiência, agradeço pelo companheirismo em diversos momentos.

Ao **Marco Aurélio Banionis**, pelo apoio em diversos experimentos, principalmente na realização da curva de crescimento celular. Além disso, sempre se mostrou incansável nos momentos de ajuda e discussão.

Aos alunos de iniciação científica, **André Calliari**, **Graciana Yokota** e **Marcos Coronado**, por toda a contribuição técnica e prontidão a prestar todo auxílio necessário.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia Animal Integrativa, **Évila Salles**, **Renato Horvatt**, **Pablo Chagas**, **Glícia Zambroti**, **Graziela Sousa**, **Rafael Fernandes**, **Márcio Hideki**, **Wesley Fonseca**, **Délcio Junior**, **Marcio Tadeu**,

**Fernando Felicioni, Elisandra Nascimento e Rebeca Gonçalves**, pela amizade, companheirismo, e todo conhecimento compartilhado.

Aos funcionários do Laboratório de Biologia Animal Integrativa, **Isabel Passos, Neuza Marques, Paulo Alvarenga, Fernando Ponciano e Andrea Mendonça**, pelo auxílio na manutenção deste e dos demais trabalhos realizados em nosso laboratório.

Ao **Programa de Pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde**, representado por seu coordenador, o **Prof. Dr. Valdemar Antônio Paffaro Júnior**, por promover esta etapa de desenvolvimento acadêmico, pessoal e profissional.

Aos **Professores do Departamento de Biologia Celular, Tecidual e do Desenvolvimento**, os quais vários puderam prover conhecimento, e contribuíram de maneira direto ou indireta para minha formação e desenvolvimento acadêmico, como a **Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ester Siqueira Caixeta, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andréa Mollica Paffaro, Prof. Dr. Rômulo Novaes** e o **Prof. Dr. Angel Roberto Barchuck**.

Aos professores, **Prof. Dr. Angel Maurício, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sílvia Leitão e Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Roselli Sincioni**, que de maneira análoga também contribuíram de maneira indireta para o desenvolvimento deste trabalho, além de me prestaram aconselhamentos científicos.

Ao **Prof. Dr. Cláudio Viegas** do Departamento de Química e seus colaboradores da **UNESP (Araraquara - SP)**, por terem gentilmente nos cedido a mistura alcaloides, que foi avaliada neste estudo.

À **Universidade Federal de Alfenas** pelo suporte físico na promoção do projeto, e principalmente por ter viabilizado de realização do mestrado.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, por ter provido a bolsa de mestrado, além de demais apoios financeiros.

Aos órgãos de fomento, **CNPq, FAPEMIG e FINEP** pelo apoio prestado na compra de materiais e reagentes.

## RESUMO

O câncer tem sido apontado como um dos problemas mais críticos encontrados no sistema público de saúde em todo o mundo, além de ser um dos maiores desafios para a medicina deste século. O carcinoma hepatocelular é a segunda maior causa de morte por câncer em todo o mundo e o quinto mais incidente. Infelizmente, a maioria dos pacientes são diagnosticados em estágio avançado, quando as opções de tratamento são apenas paliativas. Dessa forma, torna-se relevante a busca por novas opções terapêuticas mais efetivas para o carcinoma hepatocelular. Neste contexto, as plantas representam uma importante fonte de descoberta de novos compostos com propriedades farmacológicas, incluindo agentes antineoplásicos. O presente trabalho objetivou investigar o potencial antitumoral *in vitro* dos alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina, os quais são derivados de *Senna spectabilis*. A viabilidade celular foi determinada por diferentes métodos colorimétricos (MTS e rezasurina) e pelo ensaio de exclusão em azul de tripano. Ensaio clonogênico foi realizado para avaliar a formação de colônias, enquanto a cinética de progressão do ciclo celular foi determinada por citometria de fluxo. O padrão de organização de elementos do citoesqueleto bem como a frequência de mitoses foram analisadas por imunofluorescência. O perfil de expressão foi determinado por qRT-PCR (ciclina D1) e *Western blotting* (Histona H3 fosforilada, ERK fosforilada e ERK total). Os resultados mostraram que a mistura de alcaloides reduz significativamente a viabilidade celular, contudo o efeito foi dependente da concentração utilizada. A redução na proliferação celular foi decorrente do bloqueio do ciclo celular preferencialmente na transição G1/S. Os eventos moleculares responsáveis pela regulação negativa do ciclo celular, pelo menos em parte, estão relacionados à capacidade dos alcaloides de inibir expressão de ciclina D1 e ativação de ERK, uma proteína da via de MAPKs. Além disso, os alcaloides também foram efetivos em alterar o padrão de organização normal dos filamentos de actina e microtubulos. Portanto, conclui-se que os alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina apresentam atividade antitumoral promissora contra células de carcinoma hepatocelular e sua estrutura química deve ser considerada para futuros estudos anticâncer *in vivo*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carcinoma hepatocelular. Bloqueio de ciclo celular. (-)-cassina. (-)-espectralina. Alcaloides piperidínicos. *Senna spectabilis*.

## ABSTRACT

Cancer is one of the most critical problems of public health in the world and one of the main challenges for medicine in this century. The hepatocellular carcinoma is the second cause of cancer death and the fifth most incident. Unfortunately, most patients are diagnosed at advanced stage, when the treatment options are palliative. Consequently, the search for novel therapeutic options for hepatocellular carcinoma becomes imperative. In the context, the plants represent an important source for discovery of novel compounds with pharmacological potential including antineoplastic agents. Herein, we aimed to investigate in vitro antitumor potential of an alkaloid mixture derived from *Senna spectabilis*, (-)-cassine and (-)-spectaline. Cell viability was measured by different colorimetric methods (MTS and rezasurin assay) and trypan blue exclusion. Clonogenic formation assay were promoted in order to evaluate colony formation inspection, while cell cycle progression was determined by flow cytometry. Cytoskeleton elements and mitosis frequency were analyzed by immunofluorescence. Gene expression was determined by immunoblot (ERK1, p-ERK and p-histone H3) and qRT-PCR (Cyclin D1). Alkaloid mixture significantly reduced cell viability of cancer cells in a concentration-dependent manner. Cell proliferation reduction occurred by cell cycle arrest mainly in G1/S transition. We demonstrated that antiproliferative potential of the alkaloids is due to, at least in part, down-regulation of cyclin D1 and ERK inactivation, which is a MAPK pathway protein. Alkaloids also drastically altered F-actin and microtubules distribution pattern. (-)-cassine and (-)-spectaline alkaloids have a promise antitumor activity against hepatoma cells and may be considered for further anticancer in vivo studies.

**KEYWORDS:** Hepatocellular carcinoma. Cell cycle arrest. (-)-cassine. (-)-spectaline. Piperidine alkaloids. *Senna spectabilis*.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\Delta\Delta\text{CT}$	- <i>Delta delta cycle threshold method</i>
$\mu\text{g/mL}$	- Microgramas por mililitro
$\mu\text{M}$	- Micromolar
4E-BP1	- <i>4E-binding protein 1</i>
4T1	- Linhagem de carcinoma mamário murino
Akt	- Proteína quinase Serina/Treonina específica
ANOVA	- Análise de Variância
Apaf-1	- <i>Apoptotic protease activating factor 1</i>
ATF	- <i>Activating Transcription Factor</i>
ATM	- <i>Ataxia Telangiectasia Mutated serine-protein kinase</i>
ATR	- <i>Ataxia Telangiectasia and Rad3 related protein</i>
Bad	- <i>Bcl-2-associated death promoter</i>
Bak	- <i>Bcl-2 homologous antagonist/Killer</i>
Bax	- <i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCA	- <i>Bicinchoninic Acid</i>
Bcl-2	- <i>B- cell lymphoma 2</i>
BCLC	- <i>Barcelona Clínic Liver Cancer</i>
Bcl-W	- Proteína antiapoptótica da família bcl-2
Bcl-xL	- <i>B-cell lymphoma-extra large</i>
Bfl-1	- Proteína antiapoptótica da família bcl-2
Bid	- <i>BH3-interacting domain agonist</i>
Bik	- <i>Bcl-2-interacting killer</i>
Bim	- <i>B-cell lymphoma 2-interacting mediator of cell death</i>
CCND1	- Gene de ciclina D1
Cdc25c	- <i>Cell Division Cycle 25 homolog A</i>
Cdk	- <i>Cyclin Dependent Kinase</i>
CDKN1A	- <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A</i>
CDKN2A	- <i>Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A</i>

CHC - Carcinoma Hepatocelular  
cDNA - DNA complementar  
*c-fos* - Fator de transcrição da família *Fos*  
Chk - *Checkpoint kinase*  
CI<sub>50</sub> - Concentração inibitória média  
CIP - Família de inibidores de CdKs  
CK1 - Casein kinase 1  
*c-myc* - Fator de transcrição *Myc*  
COX-2 - Ciclo oxigenase 2  
CREB - *cAMP response element-binding protein*  
DAPI - *4',6-diamidino-2-phenylindole*  
DEPC - *Di-etil pirocarbonate*  
DISC - *Death-Inducing Signaling Complex*  
DMEM - *Dulbecco Modified Eagle Medium*  
DMSO - Dimetilsulfóxido  
DNA - Ácido desoxirribonucleico  
dNTP - Desoxinucleotídeos  
DR5 - *Death Receptor 5*  
DTT - 1,4-Ditiotreitol  
E2F - Família de fatores de transcrição  
ECL - *Enhanced chemiluminescent*  
EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*  
EGF - *Epidermal Growth Factor*  
EGFR - *Epidermal Growth Factor Receptor*  
*ErbB1* - Erythroblastosis oncogene B like 1  
ERK - *Extracellular Signal-Regulated Kinases*  
FAK - *Focal Adhesion Kinase*  
Fas - Proteínas de superfície envolvidas na ativação da apoptose  
GADD - *Growth Arrest and DNA-Damage-inducible protein*

Gli1 - *Glioblastoma protein 1*  
GSH - *Gluthatione*  
GSK - *Glycogen synthase kinase*  
Ham - Nutriente de Ham  
HBx - Proteína viral da hepatite B  
HEPES - *(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*  
HepG2 - Linhagem de carcinoma hepatocelular humano  
HER - *Human Epidermal Growth Factor Receptor*  
HGFR - *Hepatocyte Growth Factor Receptor*  
HIF-1 - *Hypoxia-inducible factor 1*  
Hrk - *Activator of Apoptosis Harakiri*  
Hs578T - Linhagem de carcinossarcoma mamário  
hTERT - *Human Telomerase Reverse Transcriptase*  
IARC - *International Agency of Research on Cancer*  
IGFR - *Insulin-like Growth Factor*  
IgG - Imunoglobulina G  
INK4a - Família de inibidores de CdKs  
J774 - Linhagem de macrófagos murinos  
JAK - *Janus Kinase*  
KB - Linhagem de carcinoma epidermóide oral humano  
KCl - Cloreto de potássio  
KIP - Família de inibidores de CdKs  
LRP - *Lipoprotein Receptor-related Protein 1*  
MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinase*  
MCF7 - Linhagem de adenocarcinoma mamário  
Mcl-1 - *Myeloid Cell Leukemia 1*  
MEC - Matriz Extracelular  
MEK - *Mitogen-activated protein kinase kinase*  
MgCl<sub>2</sub> - Cloreto de magnésio  
MK2 - *MAP kinase-activated protein kinase 2*

MKP	- <i>Mitogen-activated protein kinase dual-specificity phosphatase</i>
mg/mL	- Miligramas por mililitro
mL	- Mililitro
mm	- Milímetros
mM	- Milimolar
MMP	- <i>Matrix metalloproteinase</i>
mTOR	- <i>Mammalian target of rapamycin</i>
MTS	- <i>Dimetiltiazolil carboximetoxifenil sulfofenil tetrazólio</i>
NADPH	- <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NAT	- <i>N-terminal acetyltransferase</i>
NF- $\kappa$ B	- <i>Nuclear Factor Kappa B</i>
NO <sup>•</sup>	- Óxido Nítrico
Noxa	- Proteína BH3 apenas da família Bcl-2
p16	- Proteína de 16KDa
p21	- Proteína de 21 KDa
p38	- Proteína de 38KDa
p53	- Proteína de 53KDa
p70S6K	- Quinase da proteína ribossomal S6
PAAF	- Punção Aspirativa por Agulha Fina
PBSA	- <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	- <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PDGF	- <i>Platelet Derivated Growth Factor</i>
PDGFR	- <i>Platelet Derivated Growth Factor Receptor</i>
pH	- <i>Potencial Hidrogeniônico</i>
PI3K	- <i>Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase</i>
PIDD	- <i>p53-Inducible Death-Domain-containing protein</i>
PIP2/PIP3	- <i>Phosphatidylinositol phosphate</i>
PKC	- <i>Protein Kinase C</i>
PreS2	- Proteína do vírus da hepatite B
PTCH1	- <i>Protein Pached Homolog 1 gene</i>

*PTEN* - *Phosphatase and Tensin homolog gene*  
*PUMA* - *P53 upregulated modulator of apoptosis*  
*PVDF* - *Polyvinylidene fluoride*  
*RNA* - *Ácido Ribonucleico*  
*RT* - *Transcrição Reversa*  
*qRT-* - *Quantitative Reverse Transcription PCR*  
*RAF* - *Serina-treonina quinase*  
*Ras* - *Rat sarcoma oncoprotein*  
*Rb* - *Retinoblastoma gene*  
*RIPA* - *Radio-Immunoprecipitation Assay*  
*ROS* - *Reactive Oxygen Species*  
*RSK* - *Ribosomal S6 Kinase*  
*RT-PCR* - *Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction*  
*Ser10* - *Serine 10*  
*SFB* - *Soro Fetal Bovino*  
*Shh* - *Sonic Hedgehog gene*  
*STAT* - *Signal Transducer and Activator of Transcription protein*  
*TBS* - *Tris-buffer saline*  
*TNF-R1* - *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*  
*TOP I* - *Topoisomerase Protein I*  
*TOPII* - *Topoisomerase Protein II*  
*TP* - *Terapia Paliativa*  
*TP53* - *Tumor protein p53 gene*  
*Tris-HCl* - *Tampão Tris (hidrometil) aminometano e ácido clorídrico*  
*TRITC* - *Tetrametil-rodamina*  
*TTBS* - *Tris-buffer saline and tween 20*  
*Tyr204* - *Tyrosine 204*  
*U138MG* - *Linhagem de glioblastoma*  
*U251MG* - *Linhagem de glioblastoma*  
*U/μL* - *Unidades Internacionais por microlitro*

u-PA - *Urokinase-type Plasminogen Activator*

VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*

VEGFR - *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor*

VHB - Vírus da Hepatite B

VHC - Vírus da Hepatite C

Wnt - Protooncoproteína

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alvos terapêuticos no tratamento do CHC.....	32
Tabela 2 - Sequência de bases dos <i>primers</i> utilizados no PCR em tempo real.....	46
Tabela 3 - Valores de $CI_{50}$ e seletividade dos alcaloides nas linhagens HepG2 e CCD-1059Sk.....	49

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processo de hepatocarcinogênese.....	25
Figura 2 - Ciclo celular e complexos ciclinas-CdKs.....	26
Figura 3 - Vias de sinalização frequentemente ativadas do CHC.....	29
Figura 4 - Estadiamento do CHC.....	31
Figura 5 - Alvos moleculares da atividade antitumoral de alguns alcaloides.....	34
Figura 6 - Características morfológicas da espécie <i>Senna spectabilis</i> .....	36
Figura 7 - Estrutura molecular dos alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina.....	37
Figura 8 – Ensaio de MTS em linhagens tumorais.....	48
Figura 9 – Ensaio de rezasurina em linhagem HepG2.....	50
Figura 10 - Ensaio de exclusão em azul de tripano.....	51
Figura 11 - Microscopia de contraste de fase.....	53
Figura 12 – Imunofluorescência de elementos do citoesqueleto.....	54
Figura 13 – Frequência de mitoses.....	56
Figura 14 – Ensaio de capacidade clonogênica.....	57
Figura 15 – Análise de progressão do ciclo celular por citometria de fluxo.....	59
Figura 16 - Populações celulares em diferentes fases do ciclo celular.....	60
Figura 17 – Frequência de células positivas para histona H3 fosforilada.....	62
Figura 18 - PCR em tempo real demonstra a expressão de ciclina D1.....	63
Figura 19 - <i>Western blotting</i> de p-ERK e p-histona H3.....	64

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
2.1	EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS DO CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	20
2.2	HEPATOCARCINOGENESE.....	22
2.3	MECANISMOS REGULATÓRIOS DA PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	25
2.4	TRATAMENTO E ALVOS TERAPÊUTICOS DO CARCINOMA HEPATOCELULAR.....	30
2.5	POTENCIAL DE PRODUTOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DE ANTITUMORAIS.....	32
2.6	PRINCIPAIS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE <i>SENNA SPECTABILIS</i> : (-)- CASSINA E (-)-ESPECTALINA.....	35
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>38</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>39</b>
4.1	LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	39
4.2	ESQUEMA GERAL DE TRATAMENTO.....	40
4.3	ENSAIO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL.....	40
<b>4.3.1</b>	<b>MTS</b> .....	<b>41</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Resazurina</b> .....	<b>41</b>
4.5	ENSAIO DE EXCLUSÃO EM AZUL DE TRIPANO.....	42
4.6	ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGENICA.....	43
4.7	ANÁLISE DE PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR.....	43
4.8	IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	43
4.9	<i>WESTERN BLOTTING</i> (IMUNOBLOT).....	44
4.10	RT-QPCR.....	46
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>70</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>90</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A incidência de câncer em todo o mundo é extremamente alarmante segundo os dados apresentados pela Organização Mundial de Saúde (2012). No gênero masculino, o carcinoma hepatocelular (CHC) representa o quinto tipo de tumor mais incidente e o segundo de maior mortalidade. É também caracterizado por seu prognóstico ruim, uma vez que, geralmente, o diagnóstico é realizado em um estágio avançado da doença (BRUIX; SHERMAN, 2011).

O processo de hepatocarcinogênese é complexo e envolve várias etapas, acompanhadas por alterações genéticas e epigenéticas. Em geral duas categorias gênicas são alteradas durante o processo de transformação maligna, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (WANG; DING, 2014). Além disso, é frequente observar alterações em vias de sinalização que regulam sobrevivência, proliferação, diferenciação e apoptose, as quais incluem Ras/Raf/MEK/ERK (MAPK ou *mitogen-activated protein kinases*), PIK3/Akt/mTOR e Wnt/ $\beta$ -catenina (ISHIZAKI; 2004; TANAKA; ARII, 2012; VILLANUEVA et al., 2007). Dessa forma, o entendimento dos eventos moleculares relacionados ao processo de carcinogênese pode contribuir para identificação de novos alvos terapêuticos (BERTINO et al., 2014).

Poucos medicamentos foram aprovados para o tratamento do CHC em estágio avançado. Atualmente, o Sorafenib (BAY43-9006) é o único agente aprovado para tratamento sistêmico da doença. Este composto inibe as vias do VEGF e das MAPK por atuar em diferentes componentes das referidas vias. Contudo, o aumento na sobrevida dos pacientes é ainda limitado (SHEN et al., 2013; ZHU et al., 2011).

Diante do contexto, a identificação de novos compostos com atividade antitumoral é relevante para melhorar as propostas terapêuticas para o CHC. As plantas representam fontes importantes para a identificação de compostos com propriedades farmacológicas, uma vez que apresentam uma série de metabólitos secundários, muitos dos quais com potencial antitumoral (CRAGG e NEWMAN, 2013).

A *Senna spectabilis*, uma árvore endêmica da América do Sul e da África, comumente encontrada no Brasil, contém uma vasta quantidade de entidades

químicas como flavonoides, antraquinonas, xantinas, triterpenos e alcaloides. Dessa forma, constitui uma fonte promissora para a identificação de compostos com atividade farmacológica (BUM *et al.*, 2010; LORENZI, 1998; NSONDE-NTANDOU *et al.*, 2005; PIVATTO *et al.*, 2005). Estudos mostram que os alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina, presentes nesta espécie, têm atividade citotóxica sobre *Leishmania major*, *Plasmodium falciparum* e linhagens mutantes de *Sacharomyces cerevisiae* RS322Y e RS321N (BOLZANI *et al.*, 1995; DE ALBUQUERQUE MELO *et al.*, 2014; SHRIPONG *et al.*, 2003). Assim sendo, o presente estudo objetivou a análise do potencial antitumoral da mistura de(-)-cassina e (-)-espectralina na proporção 6:4, respectivamente, sobre células da linhagem HepG2, as quais são derivadas de carcinoma hepatocelular humano.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em primeiro momento, serão abordados os dados epidemiológicos e aspectos clínicos do carcinoma hepatocelular, tanto quanto o processo de hepatocarcinogênese e os mecanismos regulatórios do ciclo celular.

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA E ASPECTOS CLÍNICOS DO CARCINOMA HEPATOCELULAR

Segundo a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IACR, 2014), foram registrados 14,1 milhões novos casos de câncer no mundo em 2012. No mesmo período, aproximadamente 32,6 milhões de pessoas apresentavam a doença com prevalência de cinco anos, e 8,2 milhões morreram. Os países menos desenvolvidos são responsáveis por 65% (5,3 milhões) do total de mortes registradas no mundo. Estes valores foram mais significativos para homens do que para mulheres, sendo a diferença ao redor de 25%. Dentre os tumores mais incidentes no sexo masculino está o carcinoma hepatocelular (CHC), estimado ser o segundo de maior mortalidade em todo mundo, e o quinto mais incidente para o gênero masculino.

Segundo Gomes et al. (2013), o CHC corresponde à 70-85% das neoplasias hepáticas, os demais tumores encontrados no fígado são do tipo colangiocarcinoma (10-15%), além de outros pouco comuns (5%), como angiossarcoma, o hemangiopericitoma e o linfoma. Em geral, os fatores de risco para o CHC incluem principalmente as infecções pelos vírus das hepatites B e C, além do consumo excessivo de álcool, ingestão de aflatoxinas e causas predisponíveis de esteatose hepática. Alguns destes fatores podem, porventura, convergirem levando à maior predisposição do CHC (GOMES et al., 2013; MARTIN; HERCEG, 2012).

Casos de hepatite virais aumentam significativamente o desenvolvimento de CHC (EL-SERAG, 2012; MITTAL; EL-SERAG, 2013; TAKANO et al., 1995). As infecções por VHB (vírus da hepatite B) são frequentes em regiões africanas (OTT et al., 2012) e asiáticas (EL-SERAG, 2012). Em 2010, foi demonstrado a prevalência de infecções pelo VHC (vírus da hepatite C) no Oriente Médio, África e demais

regiões asiáticas (LAVANCHY, 2011). Estas regiões apresentam os maiores índices de incidência de CHC (WHO, 2012). El-Serag (2012) aponta que as hepatites virais podem levar a um quadro cirrótico e de inflamação crônica. Martin e Herceg (2012) afirmam que este último é um fator importante no desenvolvimento do CHC. A ativação de NF- $\kappa$ B e JAK/STAT promove alteração no padrão de expressão de genes reguladores do crescimento, proliferação e sobrevivência celular por diferentes mecanismos, os quais incluem eventos epigenéticos (ARAVALLI; CRESSMAN; STEER, 2013).

De acordo com Mittal e El-Serag (2013), o desenvolvimento de cirrose hepática é a principal causa do desenvolvimento de CHC em pacientes que fazem o consumo crônico de álcool. Em geral, estes pacientes são conduzidos pela doença hepática alcoólica (O'SHEA et al., 2009). Alterações estruturais e funcionais da transformação cirrótica induzida pelo etanol levam a um ambiente favorável ao desenvolvimento da doença (MITTAL; EL-SERAG, 2013; STICKEL, 2015).

Aflatoxinas, especialmente aflatoxina B1, também representam um grande fator de risco para grupos populacionais específicos, como crianças e indivíduos portadores de hepatite viral, considerando que estes compostos induzem aberrações cromossômicas e alterações na síntese de DNA (MAGNUSSEN; PARSEN, 2013).

Outros grupos populacionais também apresentam maior propensão à doença, dentre esses se encontram os pacientes obesos e portadores de *diabetes mellitus* tipo 2 (CALDWELL et al. 2004). Em geral estes podem desenvolver a síndrome metabólica, pela resistência à insulina, hiperlipidemia, hipertensão e a doença hepática gordurosa não alcoólica (SIEGEL et al., 2009). Esta última também contribui no desenvolvimento de CHC em fígados não-cirróticos (BAFFY; BRUNT; CALDWELL, 2012). Em geral os pacientes evoluem para um quadro inicial de esteatose, e subsequentemente à esteato-hepatite. Em ambos os quadros pode ocorrer uma evolução para a neoplasia maligna (SIEGEL et al., 2009).

Uma vez que os fatores predisponentes do CHC são bem conhecidos, o diagnóstico pode ser priorizado a determinados grupos de pacientes, como os portadores de cirrose hepática. Segundo a abordagem desenvolvida pela Associação Européia de Estudos do Fígado, pacientes com cirrose são submetidos a um programa de vigilância (LLOVET; FUSTER; BRUIX, 2004). A sintomatologia clássica é caracterizada por dores abdominais e perda de peso, outrora existam casos assintomáticos. Neste caso, a pesquisa por imagem pode representar um

fator relevante, como ultrassonografia e ressonância magnética. Além disso, pode-se lançar mão de marcadores tumorais, como a  $\alpha$ -fetoproteína sérica, que apesar de apresentarem baixa especificidade, valores acima de 500ng/mL no soro de pacientes são sugestivos de malignidade, e valores acima de 1000ng/mL são indicativos de neoplasia maligna (ALMEIDA, 2007; BEFELER; BISCEGLIE, 2002).

O diagnóstico clínico-patológico é de suma importância, sendo feito por punção aspirativo por agulha fina (PAAF) e biópsia cirúrgica (BEFELER; BISCEGLIE, 2002; MANE et al., 2015). Após o diagnóstico da doença, é realizada uma investigação para avaliar o seu estadiamento. Segundo Bruix e Sherman (2011), tem sido amplamente aceito o sistema empregado pela Clínica de Cancer de Fígado de Barcelona (BCLC) para realizar esse procedimento (Figura 1). Os pacientes com carcinoma *in situ*, que apresentam tumor menor que 2 centímetros de diâmetro, são incluídos no primeiro grupo (estágio 0), e são passíveis de ressecção cirúrgica. Os estágios A-C, compreendem os indivíduos que apresentam, desde pequenos nódulos até a invasão portal, e são direcionados a tratamentos mais agressivos; sendo que apenas o estágio A é passível de cura. O estágio D é considerado terminal, e, portanto, comporta apenas o tratamento sintomático (LLOVET; FUSTER; BRUIX, 2004).

Em geral, o prognóstico do CHC é ruim, considerando que 95% dos pacientes vem a óbito. O CHC é o segundo tipo de câncer com maior índice de mortalidade em todo o mundo. Cerca de 746.000 mortes ocorreram em 2012 em decorrência da doença, o que corresponde a 9,1% das mortes por neoplasia maligna (WHO, 2012).

## 2.2 HEPATOCARCINOGENESE

O processo de hepatocarcinogênese é complexo e envolve várias etapas, sendo acompanhado tanto por alterações genéticas quanto epigenéticas. Em geral duas categorias gênicas são alteradas durante o processo de transformação maligna, os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (WANG; DING, 2014). Segundo Shiraha, Yamamoto e Namba (2013), no CHC as alterações em oncogenes são menos frequentes em relação aos genes supressores de tumor.

Os proto-oncogenes representam as cópias normais dos oncogenes e estão associados à regulação positiva do ciclo celular. Dentre os oncogenes alterados no CHC se destacam o gene *c-myc*, localizado no cromossomo 8q, e os genes que codificam os membros da família Ras (SHIRAHA; YAMAMOTO; NAMBA, 2013). Em geral, os níveis de expressão de *c-myc* estão aumentados em CHC (YUEN et al., 2001).

Ao contrário dos proto-oncogenes, os genes supressores de tumor codificam proteínas que inibem direta ou indiretamente a progressão do ciclo celular. O gene supressor de tumor *TP53* (p53) encontra-se comumente mutado em CHC (SHIRAHA; YAMAMOTO; NAMBA, 2013). A proteína p53 é ativada em resposta a danos causados no DNA e estimula a transcrição de genes críticos relacionados ao bloqueio do ciclo celular e/ou apoptose (*CDKN1A/p21*, *14-3-3 $\sigma$* , *GADD45 $\alpha$* , *PUMA*, *BAX* e *BAK*). Assim sendo, o gene *TP53* é denominado "guardião do genoma" (FETT-CONTE; SALLES, 2002; REINHARDT; SCHUMACHER, 2012). Mutações no gene que codifica a proteína de retinoblastoma (Rb) também foram detectadas em alguns casos de CHC. Rb é responsável por sequestrar membros da família de fatores de transcrição E2F, os quais atuam estimulando a transcrição de genes importantes para a progressão do ciclo celular na transição G1/S (SEKI et al., 1995; SHIRAHA; YAMAMOTO; NAMBA, 2013). O gene que codifica para p16 (*CDKN2A*), um membro da família INK4a (inibidor de quinase dependente de ciclina 4), também é um supressor tumoral que impede a progressão do ciclo celular G1/S por inibir a atividade de Cdk4/6, uma proteína quinase que regula a progressão do ciclo celular em G1. A inativação de *CDKN2A*, devido a eventos de hipermetilação, tem sido observada em fígados cirróticos (YU et al., 2003). O gene *PTEN* (*Phosphatase and tensin* homolog) também tem sido frequentemente inativado na maioria dos casos de CHC. A proteína PTEN atua como um regulador negativo da via de sobrevivência mediada por PI3K/Akt (HU et al., 2003).

Alguns genes são comumente expressos durante o processo de desenvolvimento do fígado, uma vez que promovem a ativação de vias de sinalização que culminam em respostas de proliferação e diferenciação celular. Alguns destes mesmos genes são ativados no CHC, como é o caso da  $\beta$ -catenina (MIYOSHI et al., 1998). A via de sinalização de *Hedgehog* também é ativada em algumas neoplasias, incluindo o CHC, pela alteração da expressão dos genes *Shh*

(*Sonic Hedgehog*), *PTCH1* (*Protein Patched Homolog*) e *Gli1*(*Glioma-associated oncogene homolog*) (HUANG et al., 2006).

Alguns fatores de crescimento e seus receptores apresentam alterações no padrão de expressão no CHC. Os receptores de fatores angiogênicos/crescimento como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e, especialmente, o fator de crescimento epidermal (EGF) são relevantes para o crescimento e progressão tumoral (TANAKA; ARII, 2012; VILLANUEVA et al., 2007). Em mamíferos, a família de receptores para fator de crescimento epidermal (EGF) é constituída por 4 membros: ErbB1 ou HER-1 (EGFR), ErbB2/HER-2, ErbB3/HER-3 e ErbB4/HER-4. Estes são receptores de superfície que apresentam atividade tirosino-quinase e representam alvos terapêuticos importantes para o tratamento do CHC (SCHLESSINGER, 2002).

A integração do DNA viral (VHB) é crítica no processo de transformação dos hepatócitos (SHIRAHARA; YAMAMOTO; NAMBA, 2013) e compromete a integridade de genes importantes na regulação da proliferação, diferenciação e senescência. Dentre eles estão os genes que codificam para c-myc, ciclina A, receptor de Ácido Retinóico  $\beta$  e subunidade catalítica da telomerase (hTERT). As proteínas virais X (HBx) e *PreS2* também podem modular cascatas de sinalização importantes para regular proliferação e morte celular incluindo RAF/MEK/ERK (LUPBERGER; HILDT, 2007). Goosens e Hoshida (2015) relatam que apesar do VHC não ser integrado no genoma da célula hospedeira, é efetivo na ativação de vias moleculares oncogênicas.

Todos os fatores de lesão hepática que levam a um quadro de inflamação crônica contribuem para a formação do CHC, como VHB, VHC e síndromes metabólicas. As vias ativadas durante a inflamação levam a formação de espécies reativas de oxigênio, como o óxido nítrico ( $\text{NO}^-$ ), que podem induzir lesões no DNA, levando a ativação de p53, além de contribuírem para a aquisição de alterações em protooncogenes e genes supressores de tumor, incluindo *TP53* (FENG et al., 2012). Conforme citado anteriormente, a ativação das vias pró-inflamatórias, como NF- $\kappa$ B e JAK/STAT representa um evento crítico no processo de transformação maligna (MARTIN; HERCEG, 2012).

Alterações epigenéticas têm sido relatadas no CHC, as quais incluem hipermetilação da região promotora do gene que codifica para caderina E

(ARZUMANYAN et al., 2012), reduzindo seus níveis de expressão. Esse evento é importante para a definição do comportamento metastático em células tumorais.

A figura 1 mostra os aspectos gerais relacionados ao processo de hepatocarcinogênese.

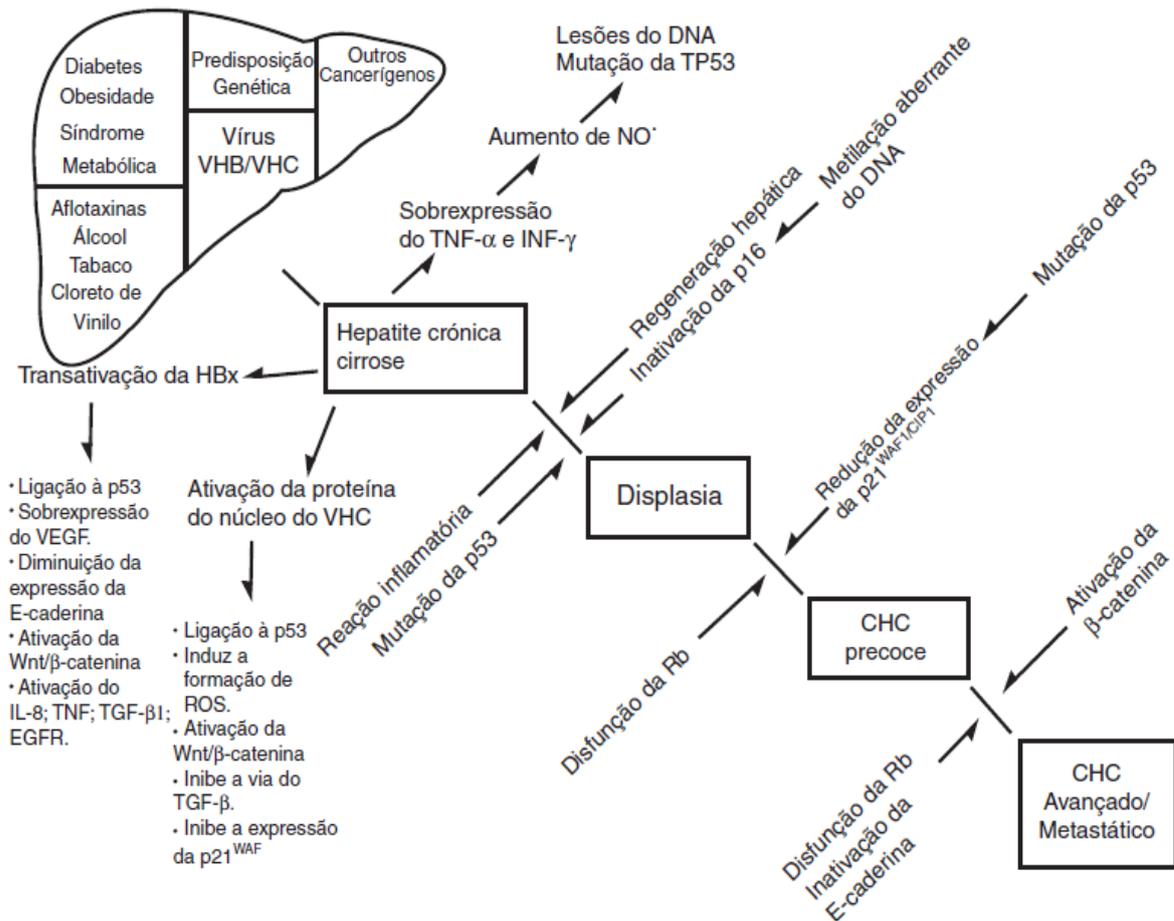


Figura 1 – Aspectos gerais relacionados ao processo de hepatocarcinogênese.  
Fonte: GOMES et al. (2013, p.516)

### 2.3 MECANISMOS REGULATÓRIOS DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

A regulação do ciclo celular é complexa e envolve uma série de mecanismos regulatórios que estimulam ou inibem a proliferação celular. A compreensão dos mecanismos básicos relacionados ao controle do ciclo celular representa um aspecto importante para o desenvolvimento de novas drogas com atividade

antineoplásica, bem como para a identificação de novos alvos terapêuticos. As Cdk's (quinases dependentes de ciclina) são enzimas que estimulam a progressão do ciclo e, são ativadas, quando complexadas às ciclinas. Diferentes complexos Cdk-ciclinas se formam ao longo do ciclo celular sendo responsáveis pela progressão do ciclo. A progressão pela fase G<sub>1</sub> e transição G<sub>1</sub>/S ocorre pelo aumento na expressão das ciclinas D e E e, conseqüentemente ativação dos complexos ciclina D-Cdk4/6 e ciclina E-Cdk2. Subseqüentemente, ocorre aumento na expressão das ciclinas A e B, com ativação dos complexos ciclina A-Cdk2/Cdk1 e ciclina B-Cdk1 para a progressão pelas fases S-G<sub>2</sub> e transição G<sub>2</sub>/M, respectivamente (SHERR, 1994). A figura 2 mostra os complexos ciclina-Cdk's envolvidos com a regulação de cada fase do ciclo celular (VERMEULEN; BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

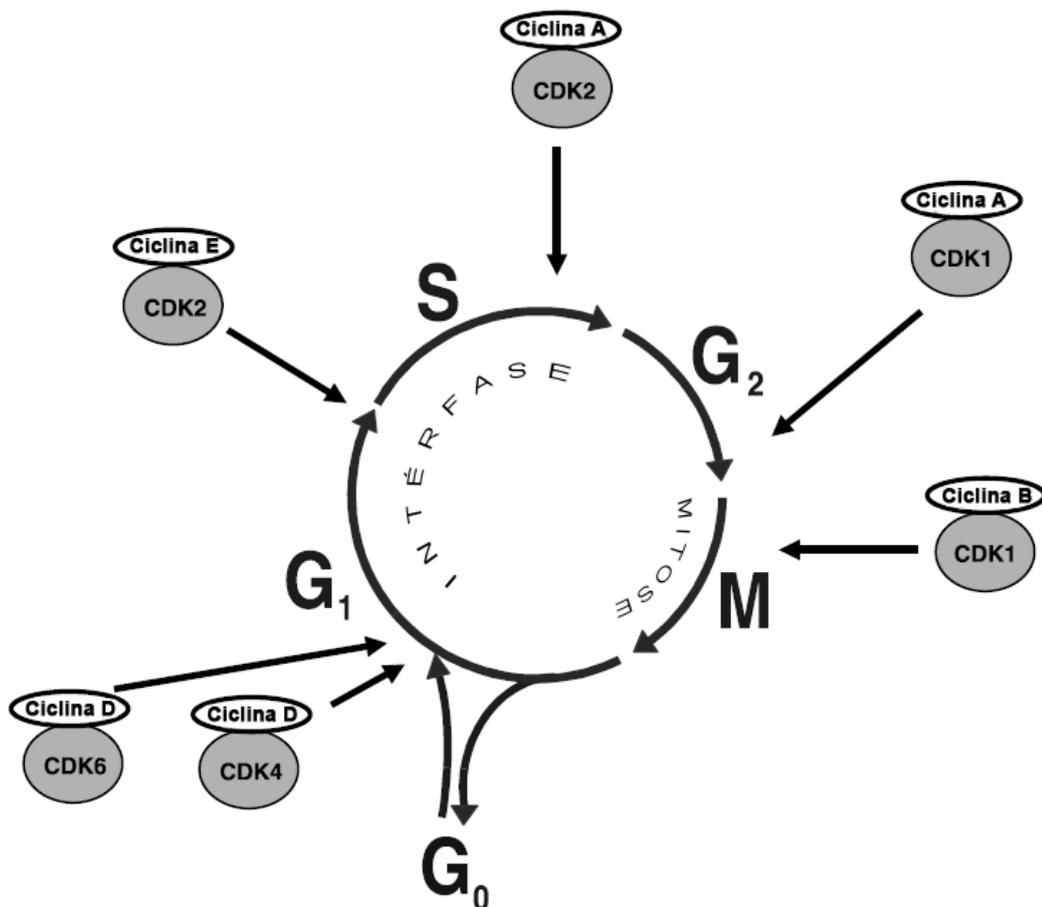


Figura 2 - Representação esquemática do ciclo celular e dos complexos ciclinas-Cdk's responsáveis pela regulação positiva do ciclo celular.

Fonte: VERMEULEN, BOCKSTAELE & BERNEMAN (2003, p. 132)

A transição G1/S representa um ponto crítico do ciclo celular, pois a passagem pelo ponto de restrição no final de G1 define de forma irreversível a continuidade do ciclo que culmina no processo de divisão celular. Os principais reguladores positivos da transição G1/S são as ciclinas D (D1, D2 e D3) e E. Alterações dos mecanismos regulatórios que atuam na transição G1/S são comumente observadas em células tumorais (SHERR, 1994).

Fatores de crescimento, como EGF (Fator de Crescimento Epidérmico), VEGF (Fator de Crescimento Vascular Endotelial) e PDGF (Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas) estimulam a transição G1/S ativando vias de sinalização importantes que culminam na expressão e ativação de moléculas relacionadas à progressão do ciclo celular. Os fatores de crescimento estimulam a proliferação ativando receptores de superfície tirosina quinases, EGFR (Receptor de EGF), VEGFR (Receptor de VEGF), PDGFR (Receptor de PDGF), que, uma vez ativados, são responsáveis por ativar diferentes cascatas de sinalização como RAF/MEK/ERK e PI3K/Akt/mTOR (GOUSTIN et al., 1986).

As vias de sinalização de proteino-quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) estão relacionadas com regulação de crescimento, proliferação, diferenciação, migração e apoptose. Dentre elas, a via RAF/MEK/ERK tem sido amplamente estudada, pois se apresenta desregulada em aproximadamente um terço das neoplasias malignas, inclusive no CHC (DHILLON et al., 2007; LIU et al., 2006). Os receptores dos fatores de crescimento vascular endotelial (VEGFR) e os derivados de plaquetas (PDGFR) promovem a ativação de Ras, e conseqüentemente, fosforilação em cascata das proteínas RAF, MEK e ERK, que levam a expressão de fatores de transcrição, como o *c-myc*, e finalmente a expressão de ciclina D (DHILLON et al., 2007). Segundo Yuen et al. (2001), a expressão exacerbada de *c-myc* contribui ao crescimento celular descontrolado do CHC.

De acordo com Joo et al. (2001), a superexpressão de ciclina D1 é observada em casos de CHC bem diferenciados. Os complexos ciclinaD/Cdk (ciclina D/Cdk4 ou ciclina D/Cdk6) promovem a hiperfosforilação da proteína Rb, e conseqüentemente sua inativação. Uma vez que pRb é sequestrante do fator de transcrição E2F, este processo induz a expressão de genes críticos para o início da fase S (WEINBERG, 1995).

Os receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR) estão superexpressos no CHC (BUCKLEY et al., 2008). Do mesmo modo que os

receptores do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFR) também são superexpressos em linhagens de CHC, principalmente pela proteína HBx do VHB (KIM; PARK; LEE, 1996). Ambos os receptores descritos estão envolvidos com a ativação da via PI3K/Akt/mTOR. Este processo ocorre mediante à fosforilação do fosfolípido de membrana difosfatidil-inositol (PIP2) em trifosfatidil-inositol (PIP3), que por sua vez, promove o recrutamento da proteína quinase Akt para membrana, e consequentemente a ativação de mTOR. Esta serina-treonina quinase fosforila p70S6K e 4E-BP1, que regulam a transcrição de outros genes, os quais incluem *c-myc* e *CCND1* (ciclina D1). A inibição desta via ocorre pela atividade do gene supressor de tumor *PTEN* (*phosphatase and tensin* homolog), que desfosforila PIP3. Deleções de *PTEN* tem sido frequentemente observado em CHC (ZHOU; LUI; YEO, 2011)

A via Wnt/ $\beta$ -catenina também é alterada em células de CHC. Esta é ativada pela ligação da proteína Wnt aos receptores de superfície celular Frizzled e os correceptores LRP5 e LRP6. Tal evento leva ao recrutamento de proteínas específicas (Axina, CK1, GSK3, e Dishevelled) na porção citosólica da membrana. Dessa forma, o complexo de destruição da  $\beta$ -catenina é dissociado e esta migra para o núcleo, ativando a transcrição de genes-alvo, os quais incluem *c-myc* e *CCND1* (LEE; KIM; WANDS, 2006; KIM; KIM; JHO, 2013). Aspectos gerais relacionados as vias de sinalização PI3K/Akt/mTOR, RAF/MEK/ERK e Wnt/ $\beta$ -catenina são apresentadas resumidamente na figura 3.

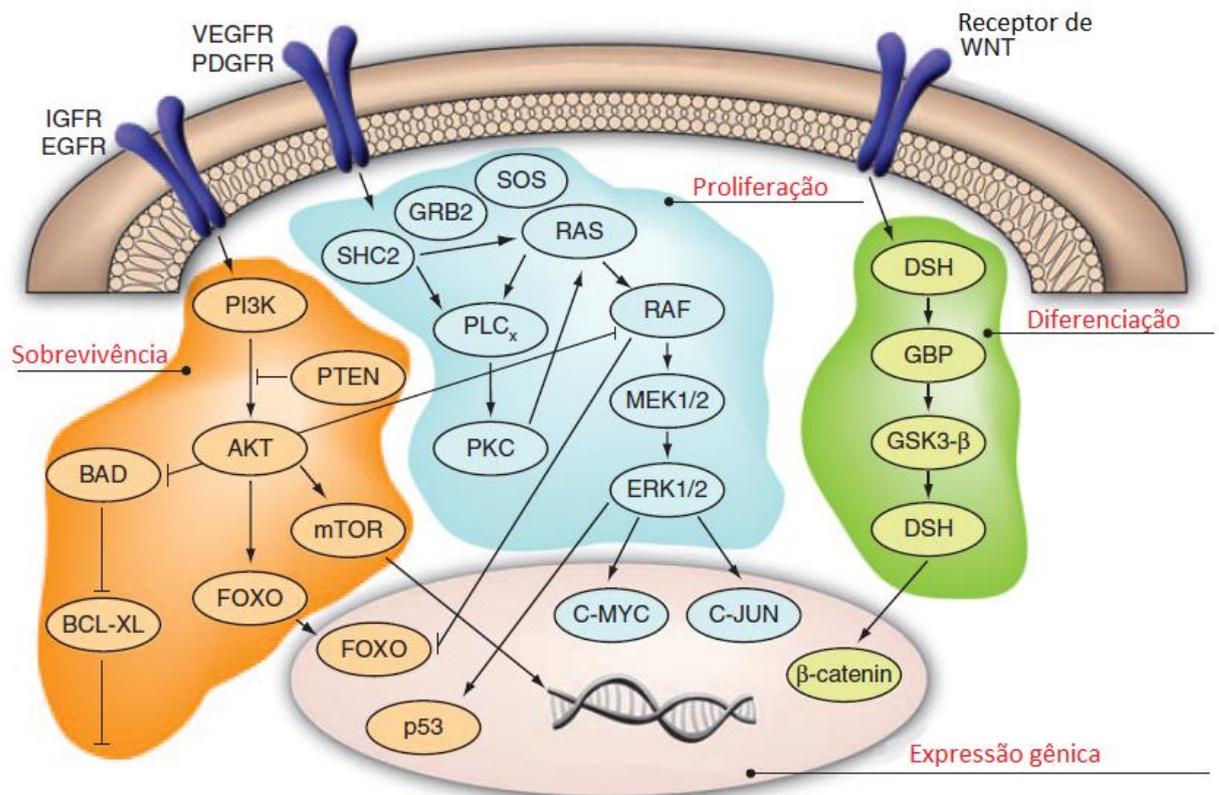


Figura 3 - Vias de sinalização frequentemente ativadas em CHC.  
 Fonte: WHITTAKER, MARAIS E ZHU (2010, p. 4992)

A proteína p53 é uma importante reguladora do ciclo celular e vários tipos de tumores apresentam inativação de p53. Nagao et al. (1995) demonstraram que casos CHC menos diferenciados apresentam acúmulo nuclear desta proteína em relação às células normais. Danos ao DNA podem promover sua ativação (via ATR/CHK1, ATM/CHK2 e ATM/ATR/p38/MK2) e, conseqüentemente, a expressão de fatores que bloqueiam o ciclo celular (KASTAN; CANMAN; LEONARD, 1995), como por exemplo, a p21, uma proteína da família CIP/KIP que constitui um dos membros dos inibidores de complexos ciclina-CdK (HARPER et al., 1993; XIONG et al., 1993; WALDMAN, KINZLER; VOGELSTEIN, 1995).

## 2.4 TRATAMENTO E ALVOS TERAPÊUTICOS DO CARCINOMA HEPATOCELULAR

O tratamento de pacientes portadores de CHC varia de acordo com o estadiamento da doença, considerando os parâmetros propostos pelo BCLC (Figura 4). Pacientes em estágio inicial são encaminhados a procedimentos cirúrgicos, dissecação e transplante hepático, quanto à terapia por injeção percutânea de etanol e radioterapia. Por outro lado, pacientes em estágio intermediário e avançado, são submetidos à embolização e administração de drogas antineoplásicas (BRUIX; LLOVET, 2002).

A quimioembolização trans-arterial é o tratamento mais utilizado para pacientes portadores de CHC multifocal em espera de cirurgia. Este processo consiste na injeção de quimioterápicos seguido de um agente embolizante na artéria hepática (BOLONDI et al., 2003). Algumas drogas têm sido relatadas como potenciais agentes de quimioterapia como epirrubicina, doxorubicina e cisplatina (BLUIX; LLOVET, 2002).

Para o tratamento sistêmico, o Sorafenib (BAY43-9006) é amplamente indicado ao CHC em estágio avançado. Este composto inibe as vias de sinalização mediadas por VEGF e MAPKs (RAF/MEK/ERK) atuando em diferentes proteínas da cascata de sinalização. Contudo, o aumento na sobrevida dos pacientes ainda é limitado frente ao tratamento com Sorafenib. De acordo com Llovet et al. (2008), pacientes portadores de CHC avançado sobrevivem por cerca de 7,9 meses, embora os tratados com Sorafenib apresentam sobrevida pouco superior, de 10,7 meses apenas. Assim sendo, novos ensaios clínicos estão sendo desenvolvidos para avaliar a efetividade de outros agentes quimioterápicos para o tratamento de CHC (SHEN et al., 2013; ZHU et al., 2011).



Diversos alvos moleculares têm sido identificados para a terapia do CHC, especialmente proteínas envolvidas nas cascatas de sinalização que regulam proliferação, sobrevivência, morte e capacidade invasão (Tabela 1).

Considerando o aumento no número de casos de CHC nos últimos anos e os altos índices de mortalidade da doença, torna-se relevante identificar compostos que possam melhorar as propostas terapêuticas para o CHC (CHARI, 2007)

Tabela 1 - Alvos terapêuticos no tratamento do C.H.C.

<b>Mecanismos</b>	<b>Alvos</b>	<b>Agentes (Exemplos)</b>
Fatores de crescimento e seus receptores	EGFR	Anticorpos monoclonais (Cetuximab)
		Inibidores tirosino-quinases (Gefitinibe)
	IGF-1R	Inibidores moleculares pequenos (ARQ 197)
	VEGF	Anticorpos monoclonais (Bevacizumab)
	VEGFR	Inibidores tirosino quinases (Sorafenib e outros)
Via MAPK	PDGFR	Inibidores tirosino quinases (Sorafenib e outros)
	HGFR	Inibidores tirosino-quinases (XL184)
	Ras	Inibidores de farnesil transferases (Tipifanib)
	Raf	Inibidores Raf quinase (Sorafenib)
	MEK	AZD6244
Via PI3K/Akt/mTOR	PI3K	<i>Wortmannin</i> , PI-103, LY294002
	Akt	MK2206, Alquil-fosfolípídeo perifosina
	mTOR	Rapamicina, <i>everolimus</i> , <i>temsirolimus</i>
Via Wnt/ $\beta$ -catenina	Wnt	Anticorpos monoclonais (anti-Wnt1 e anti-Wnt2)
	$\beta$ -catenina	Pequenos inibidores moleculares (ICG-001)
Ciclo celular	CdKs	Flavopiridol
Apoptose	Bcl-2	Inibidores moleculares pequenos (ABT-737)

Fonte: ZHOU; LUI; YEO (2011, p.1151)

## 2.5 POTENCIAL DE PRODUTOS NATURAIS NO DESENVOLVIMENTO DE ANTITUMORAIS

Muitos compostos químicos utilizados na medicina atualmente são de origem natural. Além disso, deve-se considerar que a maioria das substâncias sintéticas foi

criada a partir de modelos estruturais derivados de produtos naturais. É válido ressaltar que 80% dos medicamentos são de origem natural ou foram inspiradas em compostos naturais (HARVEY, 2008).

Desde a antiguidade as plantas apresentam inúmeras finalidades, inclusive na medicina tradicional. Atualmente, o uso medicinal de plantas acontece em países em desenvolvimento bem como nos países desenvolvidos. Dentre as propriedades farmacológicas atribuídas às plantas medicinais estão atividade antimicrobiana, antitumoral, antidiabética, antiaterosclerótica, imunomodulatória, renoprotetora e hepatoprotetora (RAFIEIAN-KOPAEI, 2012). As plantas representam fontes importantes de pesquisa na identificação de compostos com propriedades farmacológicas porque produzem uma série de metabólitos secundários, muitos dos quais apresentam atividade antitumoral (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Os alcaloides, caracteristicamente, apresentam estruturas cíclicas com um átomo de nitrogênio, que frequentemente está localizado na estrutura heterocíclica. Apesar de serem tóxicos, tem sido descrito na literatura que alguns destes (berberina, evodiamina, matrina, tetrandrina, sanguinarina e piperina) apresentam promissora atividade antitumoral (Figura 5). A propriedade antitumoral dos alcaloides tem sido relacionada a diferentes processos biológicos, os quais incluem a capacidade de induzir bloqueio no ciclo celular associado a processos de diferenciação e morte celular. Além disso, tem sido relatado que podem atuar como quimiopreventivos, antimetastáticos e antiangiogênicos (LU et al., 2012).

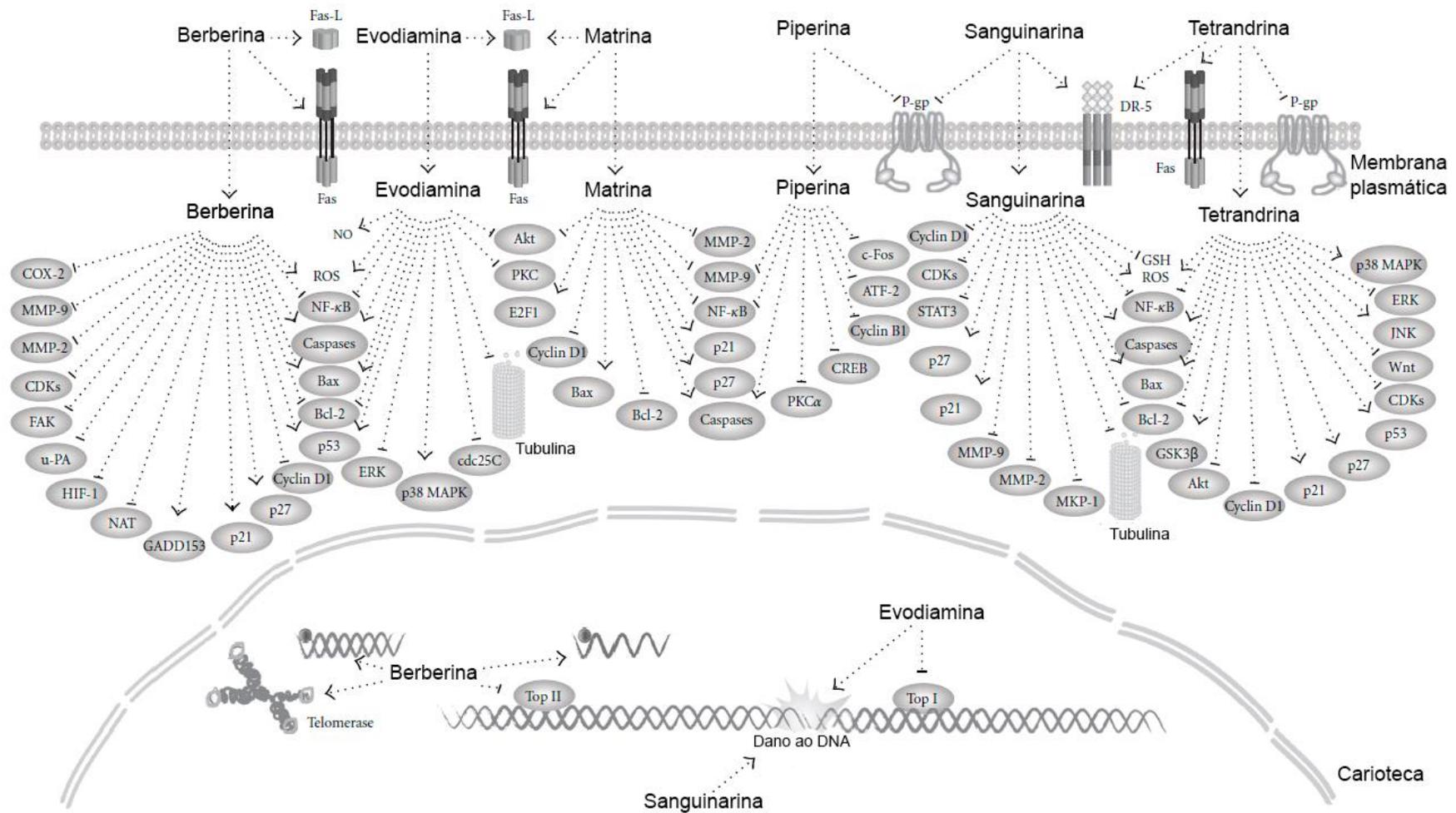


Figura 5 - Alvos moleculares da atividade antitumoral de alguns alcaloides.  
 Fonte: LU et al. (2012, p. 6)

## 2.6 PRINCIPAIS ALCALOIDES PIPERIDÍNICOS DE *SENNA SPECTABILIS*: (-)-CASSINA E (-)-ESPECTALINA

O gênero *Senna* é um dos maiores da família Fabaceae, compreendendo cerca de 600 espécies, sendo que a maioria delas é utilizada na medicina tradicional. Atualmente, o gênero *Cassia* foi incluído na família Fabaceae. *Senna spectabilis* (sin. *Cassia excelsa* var. *Acutifolia*, *Cassia carnavalia*, *Cassia spectabilis*) (Figura 6) é uma árvore endêmica da América do Sul e da África, comumente encontrada no Brasil, Colômbia, Angola, Burúndi, Camarões, Quênia e África do Sul (BUM *et al.*, 2010; LORENZI, 1998; NSONDE-NTANDOU *et al.*, 2005; PIVATTO *et al.*, 2005).

*S. spectabilis* contém uma vasta quantidade de compostos químicos, os quais incluem flavonoides, antraquinonas, xantinas, triterpenos e alcaloides. Dessa forma, constitui uma fonte promissora para a identificação de compostos com atividade farmacológica. Em geral, esta espécie se destaca pela vasta diversidade de alcaloides piperidínicos isolados, muitos dos quais são compartilhados por outras espécies do gênero *Senna*, como cassina e carnavalina (PIVATTO *et al.*, 2005; VIEGAS JR. *et al.*, 2006). Alcaloides isolados a partir das flores desta espécie (N,O-diacetilcassina, óxido de 5-hidroxi-2-metil-6-(11'-oxododecil)-piridina e 3(R)-benzoiloxi-2(R)-metil-6(R)-(11'-oxododecil)-piperidina) possuem atividade citotóxica na linhagem de carcinoma epidermoide oral KB (SRIPHONG *et al.*, 2003).

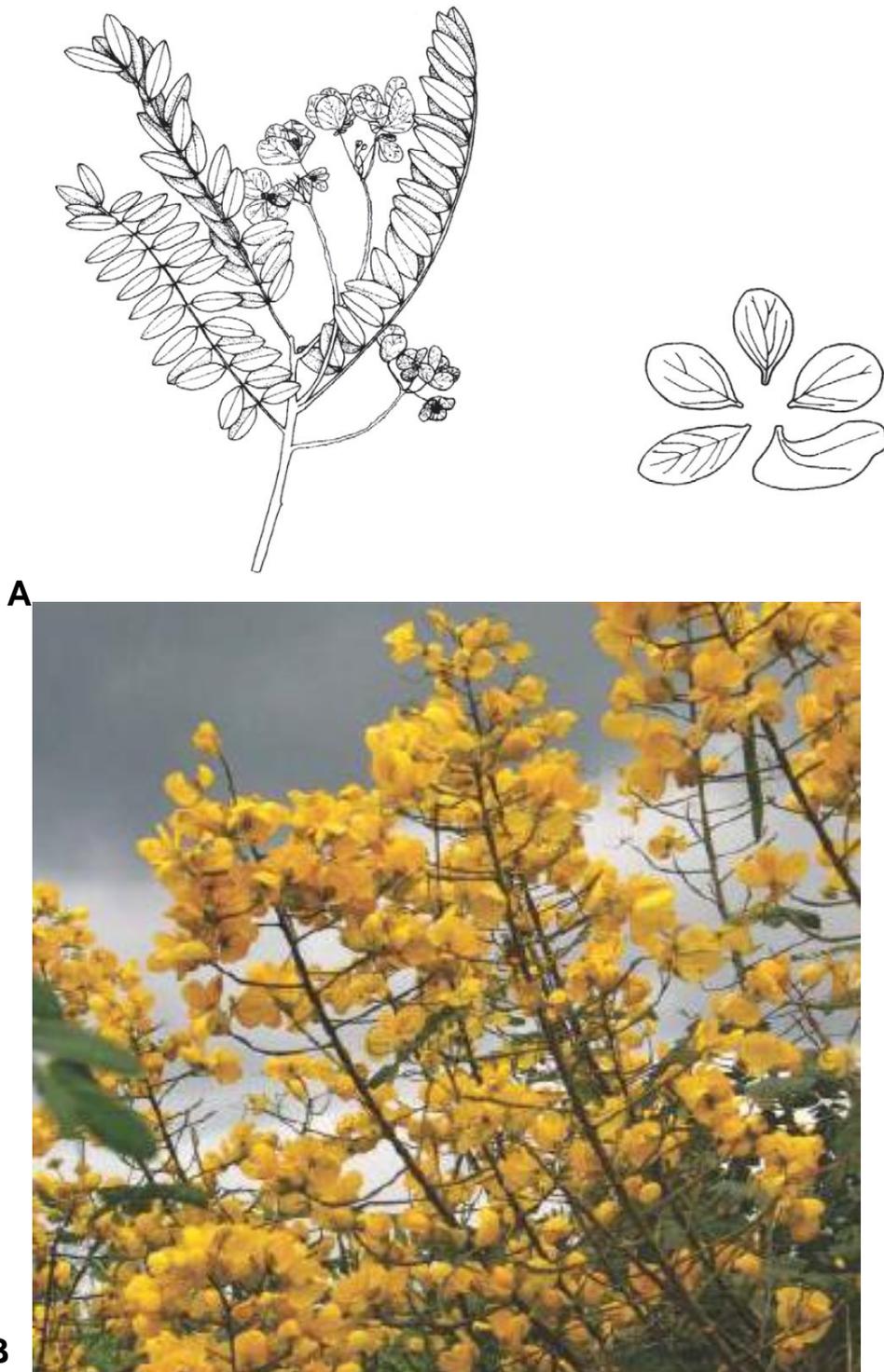


Figura 6 - Características morfológicas da espécie *Senna spectabilis*.

A- Desenho esquemático do ramo com flores e frutos.

B- Fotografia do ramo com flores

Fonte: CASTRO; CAVALCANTE (2010, p.28); RODRIGUES et al. (2005, p.15)

As substâncias (-)-cassina e (-)-espectralina são alcaloides piperidínicos extraídos das flores de *S. spectabilis* (PIVATTO et al., 2010) e classificados como alcaloides piperidínicos 2,6-dissubstituídos (Figura 7), segundo Schneider (1996). Uma vez que são pertencentes a este grupo, caracterizam-se por seu anel heterocíclico saturado. No mesmo grupo, se encontra a nicotina, e outros com alta toxicidade (GREEN et al., 2012).

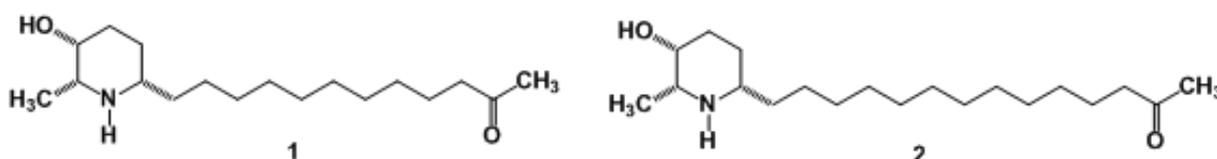


Figura 7 - Estrutura molecular dos alcaloides piperidínicos cassina e espectralina.

1 - (-)-cassina

2 - (-)-espectralina

Fonte: VIEGAS JÚNIOR et al. (2006, p. 1283)

A cassina foi isolada de *S. excelsa* por Highet (1964) como um composto cristalino, com grupos funcionais hidroxila, amina secundária e metil-cetona. Uma vez determinada sua estrutura molecular, sua síntese é proposta por Makabe, Kong e Hirota (2003). Ensaio apontaram atividade antibacteriana (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*) e antimicótica (*Aspergillus niger* e *Candida albicans*) (SANSORES-PERAZA, 2000)

A espectralina foi extraída pela primeira vez por Christofodis, Welter e Jadot (1977) de *C. spectabilis* (sin. *S. spectabilis*). É farmacologicamente caracterizada por seus efeitos no sistema nervoso central como analgésico (LEXANDRE-MOREIRA et al., 2003) e agente colinérgico (CASTRO et al., 2006). Além disso, Bolzani et al. (1995) mostraram que este composto exerce atividade citotóxica sobre cepas de levedura *Saccharomyces cerevisiae* RS 322YK RS 321N, que apresentam deficiência na atividade de reparo do DNA (DE ALBUQUERQUE MELO et al., 2014). Contudo, nenhum estudo anterior avaliou o potencial antineoplásico dos alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina.

## 2 OBJETIVOS

A seguir, serão abordados o objetivo geral e os objetivos específicos deste estudo.

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi analisar o potencial antiproliferativo da mistura de alcaloides [– (-) cassina e – (-) espectralina], derivados de *Senna spectabilis*, sobre células derivadas de carcinoma hepatocelular humano (HepG2).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos dos alcaloides sobre:

- a) Viabilidade e comportamento proliferativo de células de hepatocarcinoma humano (HepG2);
- b) A capacidade de expansão clonal das células;
- c) A progressão do ciclo celular;
- d) Os mecanismos regulatórios da transição G1/S;
- e) A organização do citoesqueleto (microfilamentos e microtúbulos).

## 4 METODOLOGIA

Serão abordados os procedimentos metodológicos de ensaios in vitro para os objetivos propostos.

### 4.1 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTIVO

No presente estudo foram utilizadas para uma varredura inicial as seguintes linhagens celulares pré-estabelecidas de neoplasias malignas humanas: HepG2 (carcinoma hepatocelular), A549 (adenocarcinoma pulmonar), MCF7 (adenocarcinoma mamário), Hs578T (carcinossarcoma mamário), U251MG e U138MG (glioblastoma). Foi incluída no estudo uma linhagem celular não-tumoral derivada de fibroblastos humanos (CD-1059Sk).

As linhagens HepG2, MCF-7, A549 e CCD-1059Sk foram adquiridas via banco células do Rio de Janeiro; as linhagens U251 MG e U138 MG foram gentilmente cedidas pela profa. Jaqueline Carvalho de Oliveira do Instituto de Ciências da Natureza, UNIFAL-MG e a linhagem Hs578T foi cedida pela profa. Glaucia Maria Machado-Santelli, do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo (ICB-USP, São Paulo-SP).

A linhagem HepG2, selecionada como modelo experimental deste estudo foi originalmente isolada de biópsias realizadas por lobectomia estendida do fígado de um paciente caucasiano, 15 anos, gênero masculino (KNOWLES & ADEN, US4393133, 1983). Atualmente, são disponibilizadas pela ATCC (*American Type Culture Collection*, Maryland, Estados Unidos), sob código HB 8065 e pelo Banco de Células do Rio de Janeiro (0291).

Para cultura foi utilizado o Meio Mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) com mistura de nutrientes F-12 Ham (1:1), acrescido de L-glutamina e HEPES (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos). A solução foi suplementada com 0,12% de bicarbonato de sódio (m/v) e 10% de soro fetal bovino (v/v) (Cultilab, SP, Brasil). As células foram cultivadas em garrafas de cultura em poliestireno, área de 25 cm<sup>2</sup> e superfície apropriada para o crescimento de células aderidas (Sarstedt,

Nümbrecht, Alemanha), com 5mL de meio de cultivo. Foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e submetidas ao subcultivo e aos delineamentos experimentais, uma vez que apresentassem 75 - 85% de confluência.

## 4.2 ESQUEMA GERAL DE TRATAMENTO

Amostras da mistura dos alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina, respectivamente na proporção 7:3, foram cedidas pelo prof. Dr. Claudio Viegas Junior do Laboratório de Pesquisa em Química Medicinal, do Instituto de Química da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG, Alfenas-MG), tendo sido originalmente isoladas pelo grupo da profa. Dra. Vanderlan da Silva Bolzani do Instituto de Química da Universidade Estadual de São Paulo (UNESP, Araraquara - SP). Uma solução-estoque da mistura de alcaloides foi preparada em dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) na concentração de 20mg/mL e alíquotas foram mantidas a -20° C. No momento de uso, a solução foi descongelada, mantidas em banho a 37°C por 5 minutos, agitada em velocidade máxima em vórtex por 1 minuto e diluídas no meio de cultura. Uma vez que diferentes concentrações foram propostas para o tratamento, procedeu-se a diluição seriada considerando a abordagem experimental. As células foram coletadas por digestão enzimática (tripsina-EDTA 0,05%) e semeadas em diferentes densidades dependendo do tipo do teste empregado. Os tratamentos foram realizados 24h após o plaqueamento e DMSO foi utilizado como controle, não excedendo 0,01% v/v. O período de tratamento estipulado foi de 24, 48 ou 72 horas, dependendo da abordagem experimental.

## 4.3 ENSAIO DE ATIVIDADE MITOCONDRIAL

Foram realizados dois ensaios de atividade mitocondrial: MTS e Rezasurina.

### 4.3.1.MTS

As células foram semeadas em placas de 96 poços em diferentes densidades:  $2 \times 10^4$  células/poço (HepG2),  $1 \times 10^4$  (Hs578T, MCF7, U251MG e U138MG) e  $5 \times 10^3$  (A549 e CCD-1059Sk). Diferentes concentrações foram utilizadas (5 - 80  $\mu\text{g/mL}$ ) da mistura de alcaloides por 48 horas e os experimentos foram conduzidos em quadruplicata. As amostras foram submetidas a reação colorimétrica de MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximethoxyphenil)-2-(4-sulfophenil)-2H-tetrazólio) por 4 horas antes do término do tratamento.

A reação foi realizada com o kit *CellTiter aqueous non-radioactive cell proliferation assay* (Promega, Wisconsin, Estados Unidos). Este ensaio é baseado na conversão enzimática do sal tetrazólio em formazano por oxi-redutases NADPH dependentes. Este, por sua vez, apresenta absorvância máxima no comprimento de onda de 490nm. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas. A taxa de absorvância é diretamente proporcional ao número de células viáveis. Os valores obtidos nas amostras tratadas foram comparados aos das amostras que não foram expostas ao composto estudado (controle). Além dos experimentos serem conduzidos em quadruplicatas, os resultados obtidos na 1ª série experimental foram confirmados em duas novas séries subsequentes. O valor da concentração inibitória ( $\text{CI}_{50}$ ) foi calculado pelo GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

Para avaliação da seletividade dos tratamentos sobre células tumorais, foram determinados os índices de seletividade (IS) pela razão entre os valores de  $\text{CI}_{50}$  nas linhagens de células derivadas de tumores e os valores obtidos para fibroblastos normais derivados de pele humana (CCD-1059Sk).

### 4.3.2 Resazurina

As células da linhagem HepG2 foram semeadas em placas de 96 poços (inoculo  $2 \times 10^4$ ). Após tratamento de 48h com a mistura de alcaloides em diferentes concentrações (5 - 40  $\mu\text{g/mL}$ ) o meio de cultura foi substituído por meio fresco

contendo 10% da solução de rezasurina e após 4h a leitura foi realizada em espectrofotômetro de microplacas a 540nm com referência de 630nm.

A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) é reduzida a resorufina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona) por atividade enzimática mitocondrial. Os valores de absorbância obtidos foram subtraídos da média de absorbância do branco. Os valores obtidos nas amostras tratadas foram comparados aos das amostras que não foram expostas aos compostos estudados (controle). Além dos experimentos serem conduzidos em quadruplicatas, os resultados obtidos na 1ª série experimental foram confirmados em duas novas séries subsequentes. O valor da concentração inibitória ( $CI_{50}$ ) foi calculado usando GraphPad Prism® (GraphPad Software, Inc., San Diego, Califórnia, Estados Unidos).

#### 4.5 ENSAIO DE EXCLUSÃO EM AZUL DE TRIPANO

As células da linhagem HepG2 foram semeadas e tratadas em placas de 35mm de diâmetro (inoculo  $2 \times 10^5$ ). As concentrações utilizadas da mistura de alcaloides foram 20 e 40 $\mu$ g/mL, além do controle (DMSO). Os experimentos foram conduzidos em triplicatas e os períodos de tratamento estabelecidos foram 24, 48 e 72 horas. O aspecto morfológico das culturas, visto por microscopia de contraste de fase, foi registrado em fotomicrografias antes do processamento das amostras para o teste de exclusão.

As células foram submetidas a digestão enzimática e, após inativação da tripsina, foi adicionada à suspensão celular azul de tripano 0,4% (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) na proporção de 1:1. Células viáveis (não-coradas) e inviáveis (coradas) foram contadas em câmara de Neubauer espelhada (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Alemanha) em microscópio invertido de contraste de fase. A partir dos valores obtidos para concentração de células nos diferentes períodos de tratamento, foi obtida a curva de crescimento das células para os grupos tratados e controle.

#### 4.6 ENSAIO DE CAPACIDADE CLONOGÊNICA

Para determinação do potencial de formação de colônias em culturas de HepG2 tratadas realizou-se o ensaio de capacidade clonogênica.  $1 \times 10^4$  células foram semeadas em placas de 35mm, e após a adesão, tratadas com a mistura de alcalóides nas concentrações de 20 e 40 $\mu$ g/mL, além do controle (DMSO). Após 24h de tratamento, o meio foi substituído por meio fresco (DMEM + 10% SFB). A cultura foi mantida nestas condições por 15 dias. Após este período, as células foram coradas com cristal violeta para evidenciar as colônias formadas. Foram contabilizadas colônias que continham mais de 50 células. Para tanto, foi utilizado estereo-microscópio sob aumento de 20x.

#### 4.7 ANÁLISE DE PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR

As células foram semeadas em placas de 35mm de diâmetro (inoculo de  $2 \times 10^5$  células), e o tratamento foi proposto sob concentrações de 0, 20 e 40 $\mu$ g/mL por 24 e 48 horas. As células foram coletadas por digestão enzimática e transferidas para tubos Falcon. O precipitado celular foi obtido por centrifugação (5 minutos a 1000 rpm) e na sequência as células foram fixadas com etanol a 4°C (75% em PBSA) por 30 minutos. Após nova centrifugação, as células foram coradas por 20 minutos em uma solução contendo PBSA, RNAase (10 mg/mL) e Iodeto de Propídio (30 mg/mL). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo Guava Mini EasyCyte (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha) utilizando o software GuavaSoft 2.7 (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha).

#### 4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Foram obtidas preparações citológicas evidenciando elementos da citoesqueleto (microfilamentos e microtúbulos), e células em divisão usando um

marcador específico para mitose (histona H3 fosforilada na Ser10). Para tanto, as células foram semeadas ( $2 \times 10^5$  células) em placas de 35mm de diâmetro contendo lamínulas estéreis. As amostras foram tratadas com os alcaloides em diferentes concentrações (0 - 40  $\mu\text{g/mL}$ ). O período de tratamento foi, respectivamente, de 24h e 48h para as análises de frequência de mitoses e citoesqueleto.

Ao término do tratamento, as células foram fixadas em 3,7% de formaldeído por 30 minutos, e tratadas com Triton X-100 (0,5%) por 10 minutos. Na sequência, as amostras foram incubadas com anticorpos primários: anti-fosfo-histona H3 (Ser10, 1:50, Santa-Cruz Biotechnology, Texas, Estados Unidos) ou anti-tubulina (1:100, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) a 4°C pernoite. No dia seguinte, após lavagens em PBSA, as amostras foram incubadas com anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo ou anti-IgG de coelho, 1:100, Sigma) conjugado a fluoresceína por 2 horas. Para análise de F-actina, as amostras foram coradas com faloidina conjugada a TRITC (Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos). Os núcleos foram corados com DAPI (4',6-Diamidino-2'-Fenilindol diidrocloreto, Sigma-Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) ou Iodeto de Propídio por 30 minutos. As lâminas foram montadas com glicerol 90% em PBSA e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon). Para a determinação da população celular em mitose 1000 células, coradas com DAPI, foram contadas por lâmina e os dados foram apresentados como a média de triplicatas  $\pm$  desvio padrão (Figura 8A). O mesmo procedimento foi realizado para as amostras imunomarcadas para histona H3 fosforiladas (Figura 8B). Neste último, as células positivas foram contabilizadas diferenciando-se as fases da mitose.

#### 4.10 WESTERN BLOTTING (IMUNOBLLOT)

As células foram semeadas em placas de 100mm (inóculo de  $5 \times 10^6$ ) e tratadas com a mistura de alcaloides por 24 horas, nas concentrações de 0, 10, 20 e 40  $\mu\text{g/mL}$ . Em seguida, foram homogeneizadas em tampão RIPA (NaCl 150mM, NP-40 1,0 %, ácido deoxicolato de sódio 1% em Tris-HCL 50 mM, pH= 7,5) contendo inibidores de proteases (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) e fosfatases (Ortovanadato de sódio 1mM). Após centrifugação a 12000g por 10 minutos o

sobrenadante foi coletado e alíquotas foram armazenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . A quantificação de proteínas foi realizada pelo método de BCA (*Bicinchoninic Acid*) com o kit Thermo Scientific™ Pierce™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos).

As amostras foram diluídas em tampão de amostra 4x (Tris 0,5 M – pH=6,8, glicerol, SDS 10%, bromofenol blue 1% e betamercaptoetanol 1% em água MiliQ) e desnaturadas por 5 minutos ( $100^{\circ}\text{C}$ ). O fracionamento das proteínas (30  $\mu\text{g}$ ) foi realizado em minigel de poliacrilamida 12% (2,5 horas a 100V).

As proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (Amersham, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos) por 2 horas a 200mA em tampão (Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e metanol a 20% em água destilada). A membrana foi corada em solução de Ponceau 0,5% por 3 minutos para verificar a eficiência do processo de transferência. Em seguida, foi lavada 3 vezes em TBS (*Tris-buffered saline*) a 0,02 M (10 minutos cada lavagem). O bloqueio foi realizado com TBS a 0,02 M contendo leite desnatado em pó Molico® (Nestlé, São Paulo, Brasil) a 5% e tween 20 (Sigma Aldrich, Califórnia, Estados Unidos) a 0,05% por 1 hora à temperatura ambiente sob agitação.

Os anticorpos primários anti-histona H3 fosforilada (Ser10)-R (1:200 Santa-Cruz Biotechnologies, sc-8656-R), ant-ERK1 (K-23) (1:200 Santa-Cruz Biotechnologies, sc-94), anti-ERK fosforilada Tyr204 (E-4) (1:200 Santa-Cruz Biotechnologies, sc-7383) e anti- $\alpha$ -Tubulina (1:1000 Sigma Aldrich LTDA, Brasil) foram diluídos em solução de bloqueio e a membrana foi incubada com os anticorpos, durante a noite, a  $4^{\circ}\text{C}$  sob agitação. Após sucessivas lavagens com TBS e T-TBS (Tween20-TBS), a membrana foi incubada com anticorpos secundários anti-IgG de camundongo ou de coelho (1:1000, Amersham, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos) conjugados a peroxidase e bandas imunorreativas foram detectadas por quimioluminescência (ECL®, Amersham, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos) conforme especificações do fabricante. Os resultados foram registrados em filmes radiográficos (*Hyperfilm Amersham*, GE HealthCare, Buckinghamshire, Estados Unidos). A quantificação das bandas foi realizada usando o programa de domínio público (ImageJ, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA).

#### 4.11 RT-QPCR

As células foram semeadas e tratadas, a 20µg/mL por 24 horas, em placas de 35mm. Após este período, procedeu-se a extração de RNA com o reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, Estados Unidos). A porção de RNA foi purificada com clorofórmio e álcool isopropílico (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil) e posteriormente estocada a -80°C em água DEPC. Antes do uso, a quantidade e qualidade das amostras foram aferidas em espectrofotômetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, Estados Unidos).

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada em termociclador Veriti® 96-Well (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, Estados Unidos) com 500ng de amostra de RNA com o kit SuperScript® III (Transcriptase Reversa 200U/µL, Tampão First-Strand [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>] e DTT 100 mM, Invitrogen®, Estados Unidos), oligodesoxinucleotídeos Random Hexamers (50 µM, Invitrogen®, Estados Unidos) e dNTP *mix* (10mM, Invitrogen®, Estados Unidos).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada em meio contendo 4,5µL de cDNA diluído 20 vezes, 5,0µL de *SybrGreen PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos), contendo Sybr Green, tampão, dNTPs, Amplitaq Gold, MgCl<sub>2</sub> e ROX como referência passiva, e 0,5 µL de primers (10µM). A amplificação e quantificação foram realizadas no sistema de PCR em tempo real ABI 7500 (Applied Biosystems, Califórnia, Estados Unidos). As sequências dos *primers* (IDT, *Integrated DNA Technologies*) utilizados para o gene de interesse (*CCND1*) e o controle endógeno (*GAPDH*) são demonstradas na tabela 2. Amostras sem o cDNA foram preparadas para a calibração.

Tabela 2 – Sequência de bases dos *primers* utilizados na PCR em tempo real. Sintetizadas por IDT (*Integrated DNA Technologies*)

Gene	Sequência <i>sense</i>	TA	Sequência <i>nonsense</i>	TA	Referência
<i>GAPDH</i>	5'AGATCCCTCCA AAATCAAGTGG3'	54,8°C	5'GGCAGAGATG ATGACCCTTTT3'	55,0 °C	Valente et al. (2009)
<i>CCND1</i>	5'GGCACCCAG CACAATGAAG3'	58,8 °C	5'CCGTCCATG CGGAAGATC3'	55,9 °C	Dieudonne et al. (2006)

TA: Temperatura de anelamento a 50mM NaCl

Fonte: Do Autor.

O experimento foi executado em triplicata (três amostras por grupos em três experimentos independentes), sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não exceda meio ciclo ( $d < 0,5$ ). Foi utilizado o método de quantificação relativa, o qual sinaliza a mudança de expressão do gene alvo em relação a uma amostra de calibrador, que nesse caso foi o grupo controle. Os valores foram obtidos pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , sendo Ct o ciclo em que o nível de fluorescência alcançou o limiar pré-estabelecido (*threshold*).

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos em triplicatas técnicas e biológicas foram apresentados como a média  $\pm$  o desvio padrão. Para avaliação estatística dos dados obtidos pela determinação de células positivas para histona H3 fosforilada e qRT-PCR foi utilizado o Teste *t student*. Os resultados obtidos pelas demais abordagens metodológicas foram avaliados pelo teste ANOVA *one-way* e o pós-teste de Tukey. Todos foram realizados pelo aplicativo GraphPad Prism® (GraphPad Software Inc., Califórnia, Estados Unidos).

## 5 RESULTADOS

A mistura de alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina foi efetiva em reduzir a viabilidade de 6 linhagens celulares derivadas de tumores humanos, após 48h de tratamento (Figura 8), sendo que a capacidade de inibição foi dependente da concentração utilizada. A partir desse estudo inicial, a linhagem HepG2 foi selecionada para os experimentos subsequentes que objetivaram avaliar os eventos biológicos relacionados à capacidade dos alcaloides em reduzir a viabilidade celular.

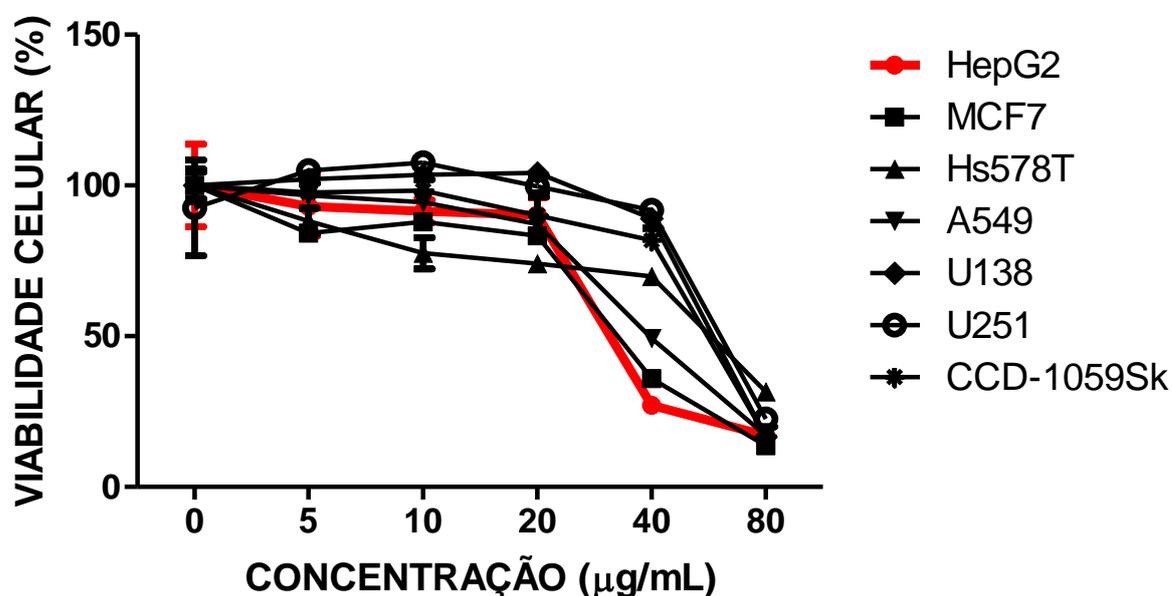


Figura 8 – Viabilidade celular determinada por MTS após 48 horas de tratamento com a mistura de alcaloides. Em vermelho foi destacada a curva dose-resposta da linhagem HepG2, a qual foi selecionada como modelo de estudo para investigações subsequentes.

Fonte: Do autor.

A concentração necessária para inibir 50% do crescimento ( $CI_{50}$ ) foi de  $26,45 \pm 1,73 \mu\text{g/mL}$ . Este valor foi comparado ao  $CI_{50}$  obtido de uma linhagem pré-estabelecida não tumoral de fibroblastos humanos, CCD-1059Sk, a fim de obter o índice de seletividade dos alcaloides (Tabela 3). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo. Os resultados apontaram que o índice de seletividade foi maior para a mistura de alcaloides em comparação à doxorubicina.

Tabela 3 – Valores de  $CI_{50}$  e índices de seletividade determinados a partir dos ensaios de viabilidade realizados em células tumorais e células normais.

Tratamento	Linhagens tumorais	$CI_{50}$	CCD-1059Sk **( $CI_{50}$ )	Índice de Seletividade
Alcalóides	HepG2	26,45 ± 1,73 µg/mL	55,62 ± 1,69 µg/mL	2,10
	MCF7	33,52 ± 2,12 µg/mL	55,62 ± 1,69 µg/mL	1,66
	Hs578T	54,33 ± 0,98 µg/mL	55,62 ± 1,69 µg/mL	1,02
	A549	40,52 ± 2,43 µg/mL	55,62 ± 1,69 µg/mL	1,37
	U138	59,31 ± 5,40 µg/mL	55,62 ± 1,69 µg/mL	0,94
	U251	63,55 ± 5,28 µg/mL	55,62 ± 1,69 µg/mL	0,87
Doxorrubicina*	HepG2	0.56 ± 0.02 µg/mL	0.96 ± 0.01 µg/mL	1,71

\*Doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. \*\* células CCD-1059Sk são fibroblastos derivados de pele normal. O índice de seletividade foi determinado a partir da razão entre o  $CI_{50}$  observado para célula normal e tumoral, como descrito em materiais e métodos.

Fonte: Do autor

Na sequência, ensaios adicionais ao MTS foram realizados para confirmar a capacidade dos alcaloides em reduzir a viabilidade em culturas de HepG2. Para isto, a viabilidade foi avaliada por ensaio colorimétrico que se baseia no mesmo princípio do MTS, ou seja, permite a determinação da atividade de enzimas mitocondriais, entretanto utilizada a resazurina como substrato para a conversão enzimática. Os resultados foram semelhantes aos previamente observados pelo MTS e a  $CI_{50}$  foi de 24,14 ± 0,94 µg/mL (Figura 9).

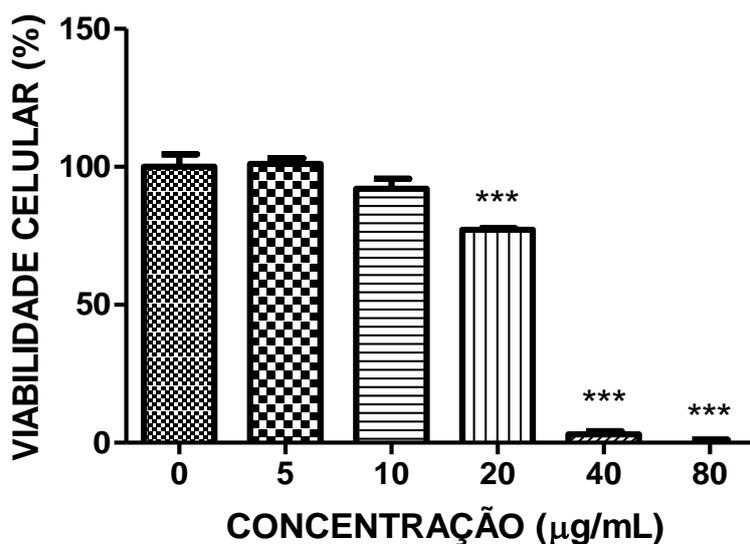


Figura 9 – Viabilidade celular determinada pelo ensaio de resazurina em linhagem HepG2, após 48 de tratamento com os alcaloides.  $CI_{50}$ :  $24,14 \pm 0,94 \mu\text{g/mL}$ . (\*\*\*)  $p < 0,001$  de acordo com ANOVA *one-way* e o pós-teste de Tukey

Fonte: Do autor.

Considerando que os valores de  $CI_{50}$  determinados pelos dois métodos colorimétricos ficaram próximos à concentração de  $25 \mu\text{g/mL}$ , os ensaios experimentais subsequentes foram feitos utilizando apenas concentrações de 10, 20 e  $40 \mu\text{g/mL}$ .

É fato que os ensaios colorimétricos são amplamente empregados na determinação da viabilidade celular, pois são métodos rápidos e facilmente executáveis. Além disso, os dados obtidos são frequentemente reproduzidos. Entretanto, esses métodos não permitem avaliar se a redução na viabilidade está preferencialmente associada à inibição da proliferação celular ou a indução de morte. No presente trabalho, o ensaio de Azul de tripano foi utilizado para avaliar a frequência de células viáveis e não viáveis na população, após tratamento com os alcaloides por 24h, 48h e 72h. Os dados mostraram redução da viabilidade celular em culturas tratadas por 24 h com  $40 \mu\text{g/mL}$  por 48 h e 72 h com 20 e  $40 \mu\text{g/mL}$  dos alcaloides. A viabilidade celular foi reduzida em 96,04% e 99,13% nos períodos de 48h e 72h, respectivamente, quando comparado ao controle (Figura 10).

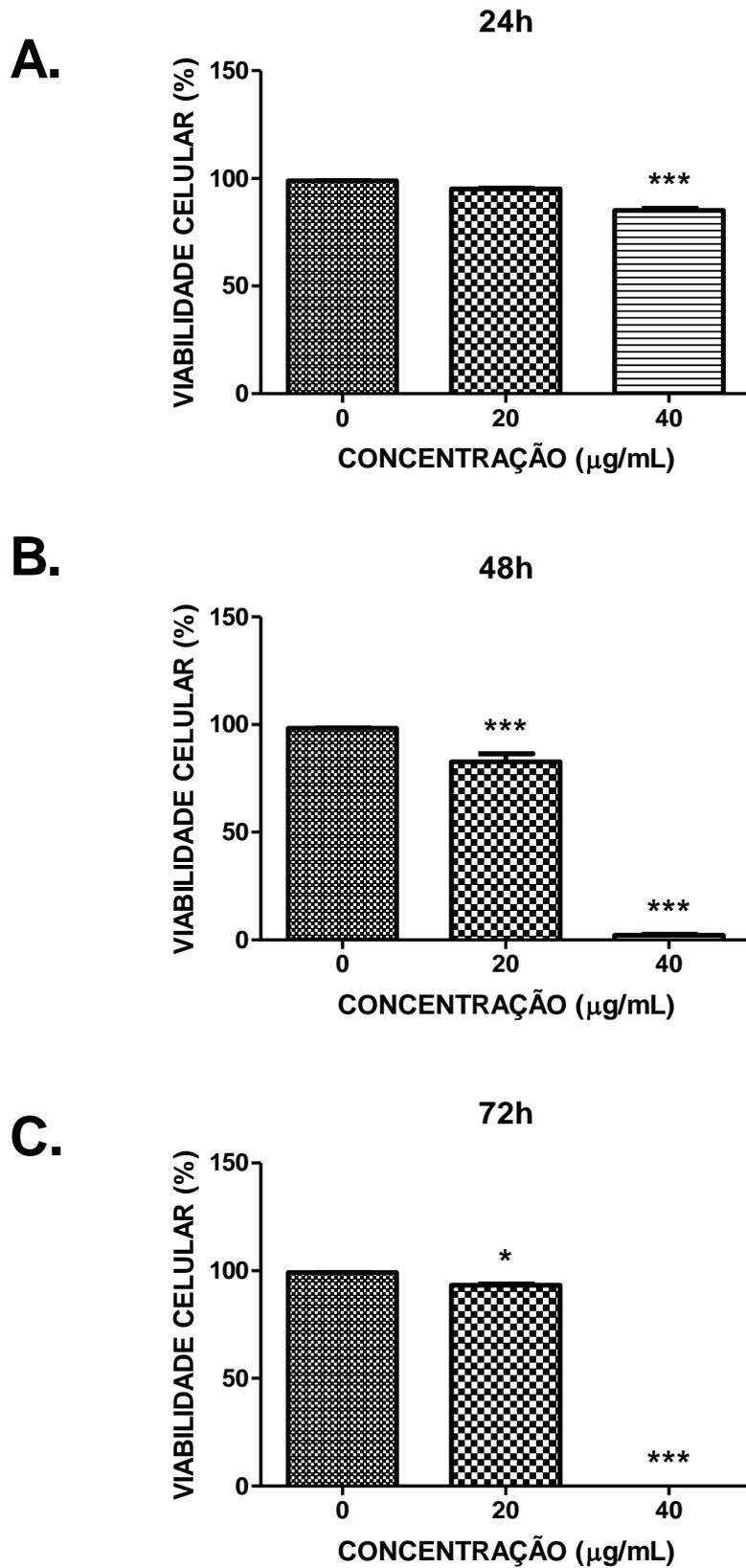


Figura 10 – Viabilidade celular determinada por ensaio de exclusão em azul de tripano após 24, 48 e 72 horas de tratamento com os alcaloides. Teste ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey.  
 (\*)  $p < 0,05$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$

Fonte: Do autor.

O aspecto morfológico das células em cultura foi acompanhado por microscopia de contraste de fase e pode ser observado na figura 11. As imagens obtidas 24h e 48h após o tratamento com os alcaloides mostram claramente que o aspecto morfológico, característico das células HepG2, foi alterado drasticamente quando os alcaloides foram usados na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ , em ambos os tempos. Por outro lado, foi observado apenas redução na densidade dos aglomerados celulares quando concentrações menores foram utilizadas (10  $\mu\text{g/mL}$  e 20  $\mu\text{g/mL}$ ) em comparação à cultura controle. Os dados, portanto, corroboram os resultados de viabilidade celular obtidos previamente.

Considerando as alterações morfológicas observadas por microscopia de contraste de fase, foram realizadas preparações citológicas para a observação de elementos do citoesqueleto (microfilamentos e microtúbulos). As imagens obtidas por microscopia de fluorescência também evidenciaram alterações morfológicas (Figura 12). Nas células tratadas com os alcaloides por 48h, o padrão normal de distribuição da rede de filamentos de actina e microtúbulos foi alterado nas concentrações de 20  $\mu\text{g/mL}$  e 40  $\mu\text{g/mL}$ , entretanto esta última concentração alterou drasticamente a organização dos microfilamentos e microtúbulos. Não foram observadas alterações morfológicas marcantes em culturas tratados pelo período de 24 horas (dados não mostrados).

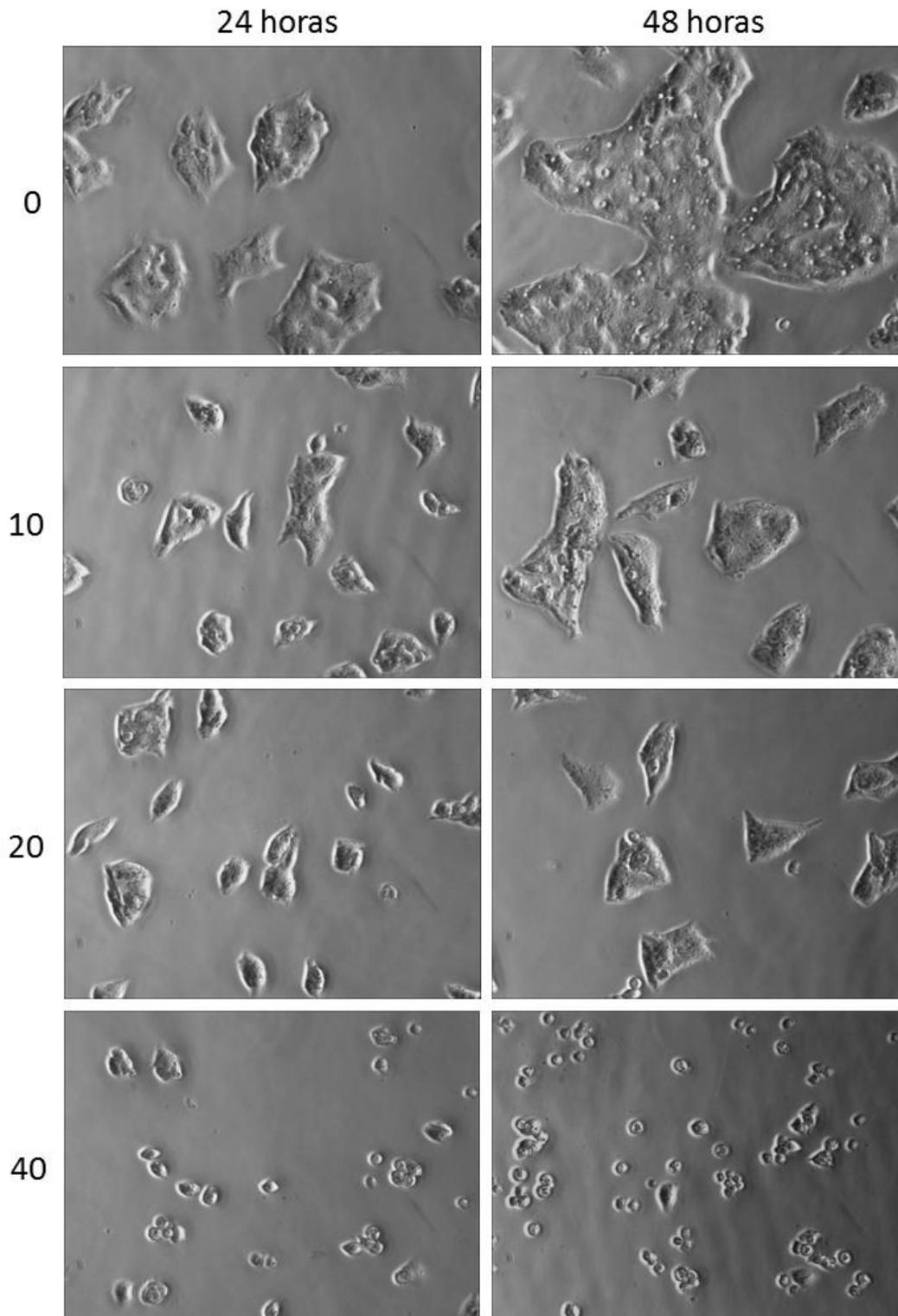


Figura 11 – Imagens representativas obtidas por microscopia de contraste de fase após 24 e 48 horas de tratamento com os alcaloides em diferentes concentrações. É possível observar redução dos aglomerados celulares em culturas tratadas com 10 e 20  $\mu\text{g/mL}$ , bem como drástica alteração do aspecto morfológico das células em culturas tratadas com 40  $\mu\text{g/mL}$ . Aumento de 100x.

Fonte: Do autor.

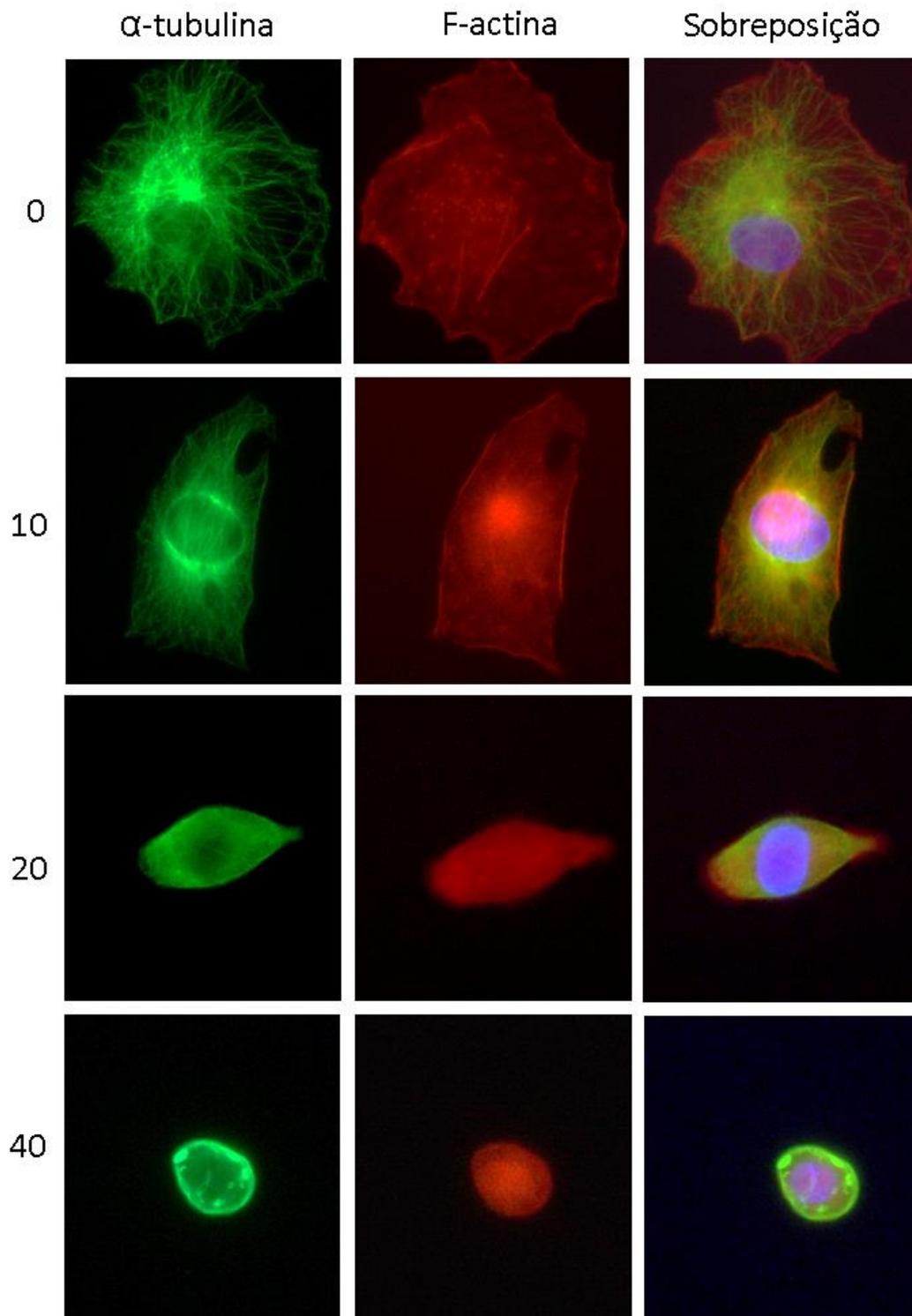


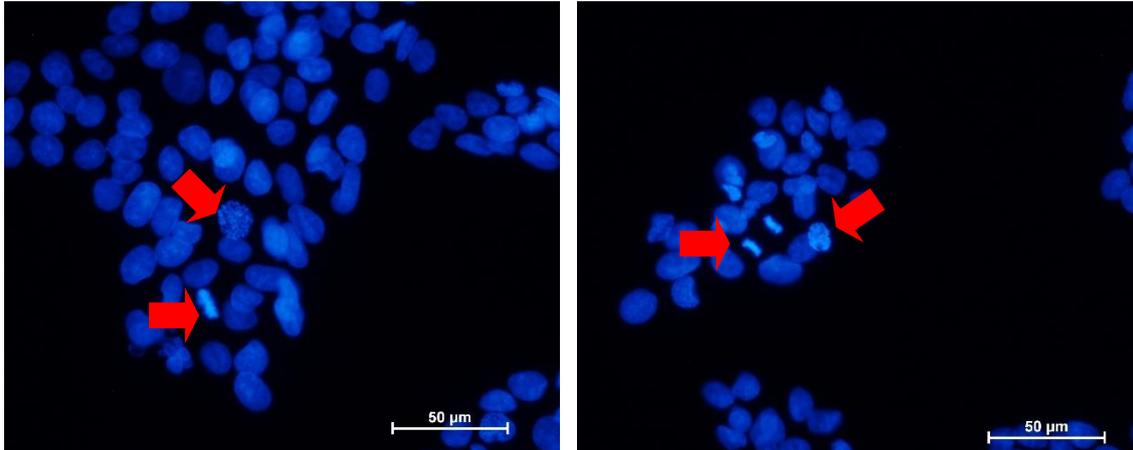
Figura 12 – Imagens fluorescentes evidenciando microfilamentos (TRITC) e microtúbulos (FITC) em células HepG2 tratadas por 48h com os alcaloides nas concentrações de 10, 20 e 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . As imagens mostram que o padrão normal de distribuição de filamentos de actina e microtúbulos foi alterado em consequência do tratamento. Aumento de 400x.

Fonte: Do autor.

Na sequência, foi realizada uma série experimental para determinar o comportamento proliferativo da linhagem HepG2 considerando os períodos de 24h, 48h e 72h de tratamento. De acordo com os resultados, o número de células é menor nas culturas tratadas em relação ao grupo controle. Vale ressaltar que o número de células é significativamente menor nas culturas tratadas com 40 µg/mL em relação as tratadas com 20 µg/mL em todos os tempos estudados. Esta abordagem experimental também permitiu observar que não houve aumento considerável no número de células nas culturas tratadas em relação ao inoculo inicial em todos os períodos estudados. Os resultados indicam, portanto, que os alcaloides apresentam atividade antiproliferativa sobre células da linhagem HepG2.

A frequência de mitoses foi determinada em preparações citológicas fluorescentes marcadas com DAPI. Houve significativa redução na frequência de figuras mitóticas nas culturas tratadas por 24 horas em relação às culturas controle. A frequência de mitoses nas culturas controle foi de 1,05% ± 0,23, outrora as culturas tratadas com 20 µg/mL e 40 µg/mL apresentaram índices de 0,5% ± 0,10 e 0,16% ± 0,34, respectivamente (Figura 13).

A



B

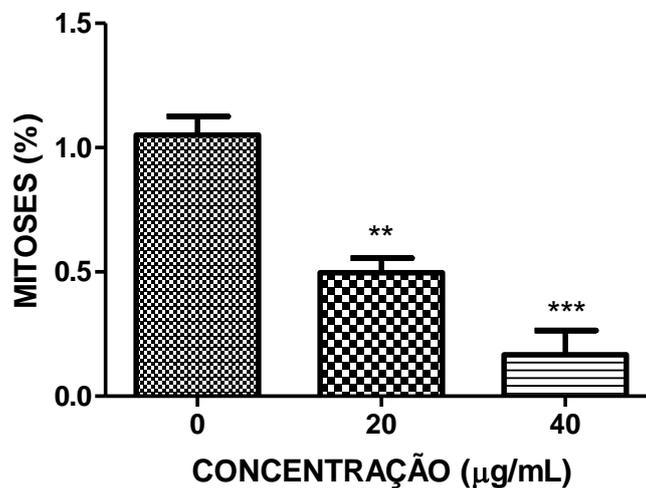


Figura 13 – Frequência de mitoses determinadas a partir de preparações citológicas coradas com DAPI. A análise de culturas tratadas por 24 horas aponta redução significativa na frequência de mitoses em culturas tratadas(\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$  de acordo com ANOVA *one-way* e o pós-teste de Tukey.

Fonte: Do autor.

Foram realizados ensaios de capacidade clonogênica para avaliar a influência dos alcaloides em inibir proliferação por períodos prolongados. Os resultados mostraram significativa redução do número de colônias nos grupos tratados em relação ao controle. O número de colônias contadas em culturas tratadas com 20 µg/mL foi aproximadamente a metade em relação ao número de colônias encontradas nas culturas controle. Nenhuma colônia foi observada quando os alcaloides foram usados na concentração de 40 µg/mL (Figura 14).

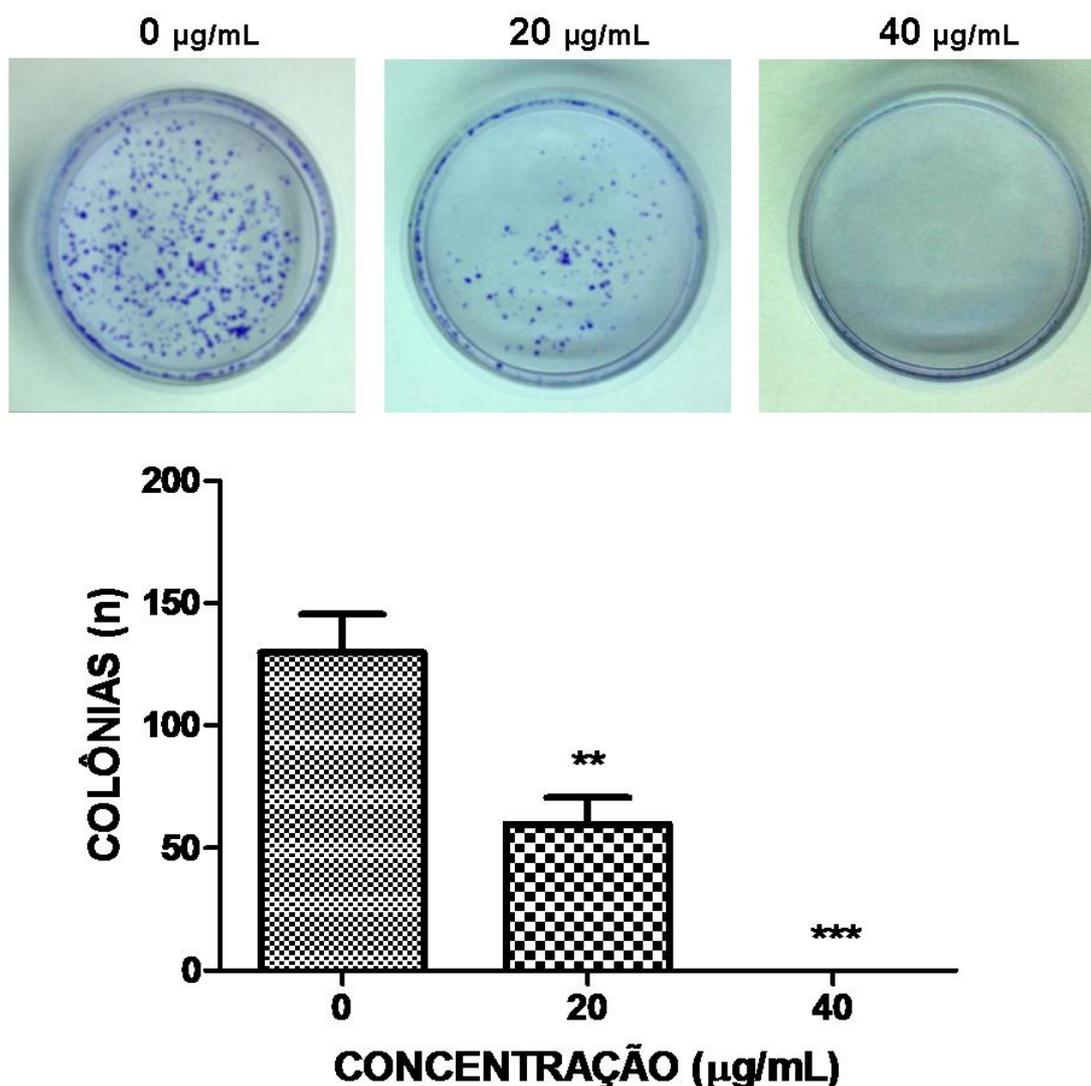


Figura 14 – Ensaio de capacidade clonogênica. Na porção superior, placas de cultura exibindo o padrão de colônias formadas, as quais foram coradas pelo cristal violeta. Abaixo, o gráfico representando a análise quantitativa do ensaio. Os valores foram obtidos em triplicatas (três amostras de três experimentos independentes). A capacidade em formar colônias foi significativamente reduzida em culturas tratadas por 24 horas com os alcaloides de acordo com ANOVA *one-way* e Tukey. (\*\*)  $p < 0,01$  e (\*\*\*)  $p < 0,001$

Fonte: Do autor.

Os dados obtidos até o momento mostram que os alcaloides estudados apresentam proeminente atividade antiproliferativa sobre as células HepG2, quando utilizados na concentração de 20 e 40 µg/mL. Assim sendo, foram realizados ensaios para avaliar a influência desses alcaloides na progressão do ciclo celular, após 24h e 48h de tratamento. De acordo com os dados de quantificação de DNA por citometria de fluxo, nos grupos tratados por 24 horas houve aumento da

população celular na fase G0/G1 (Controle: 51,88%±3,43; 20 µg/mL: 58,22%±2,67 e 40 µg/mL: 60,43%±4,18) e redução do número de células na fase S (Controle: 18,62%±4,32; 20 µg/mL: 14,08%±9,92 e 40 µg/mL: 7,78%±2,12). Houve aumento da população Sub-G1 (Controle: 0,17%±0,11; 20 µg/mL: 0,25%±0,10 e 40 µg/mL: 2,30%±0,36) no grupo tratado com 40 µg/mL pelo período de 24 horas. Por outro lado, não foram observadas alterações significativas das populações G0/G1 e S, em 48 horas (Controle: 32,77%±1,96; 20 µg/mL: 29,52%±0,99; 40 µg/mL: 27,72%±0,05), contudo houve aumento da população Sub-G1 (Controle: 0,63%±0,21; 20 µg/mL: 0,65%±0,96; 40 µg/mL: 5,3%±1,00) (Figuras 15 e 16).

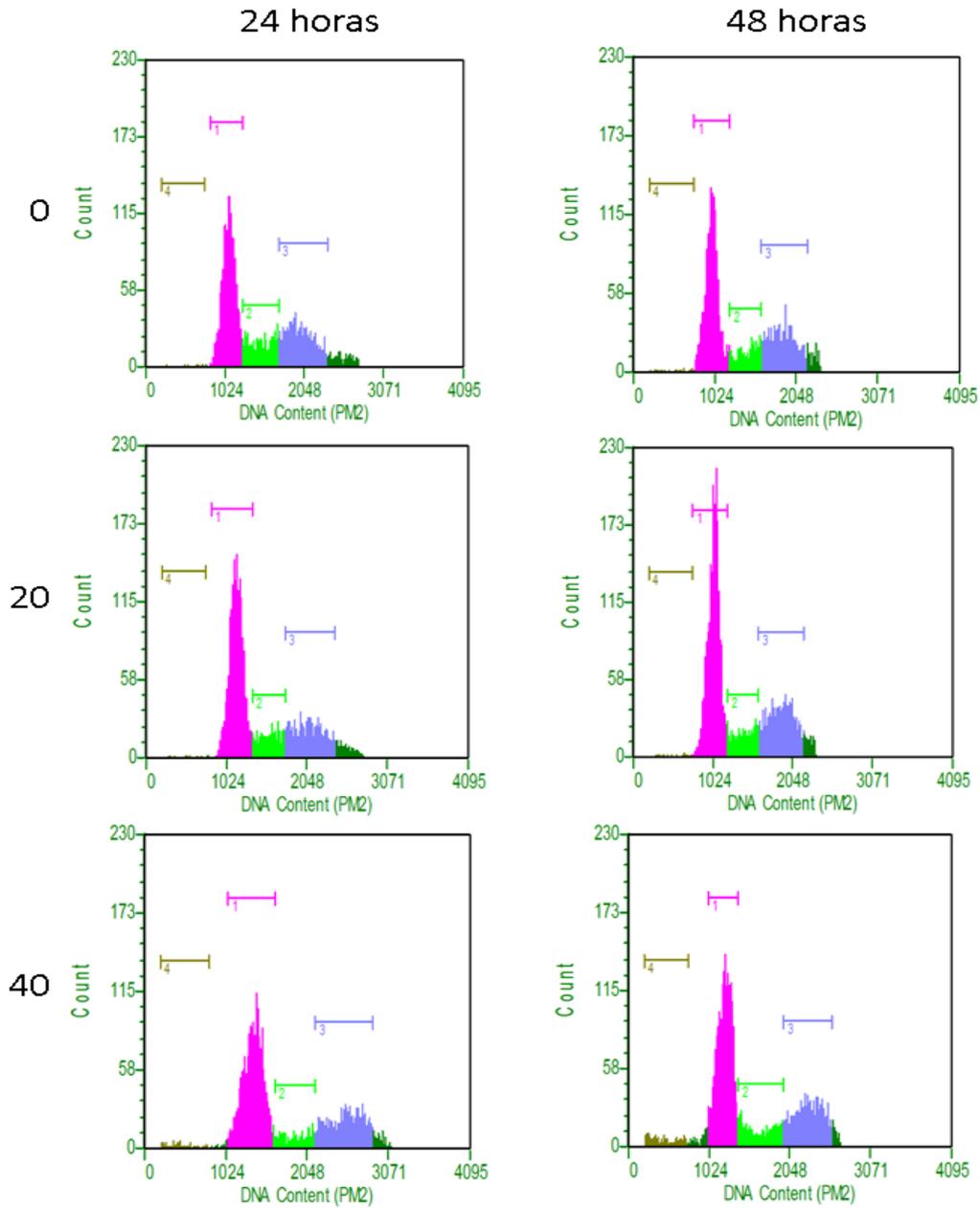


Figura 15 – Histogramas obtidos por citometria de fluxo mostrando a distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular. 1-G0/G1, 2-S, 3-G2/M, 4-Sub-G1.

Fonte: Do autor.

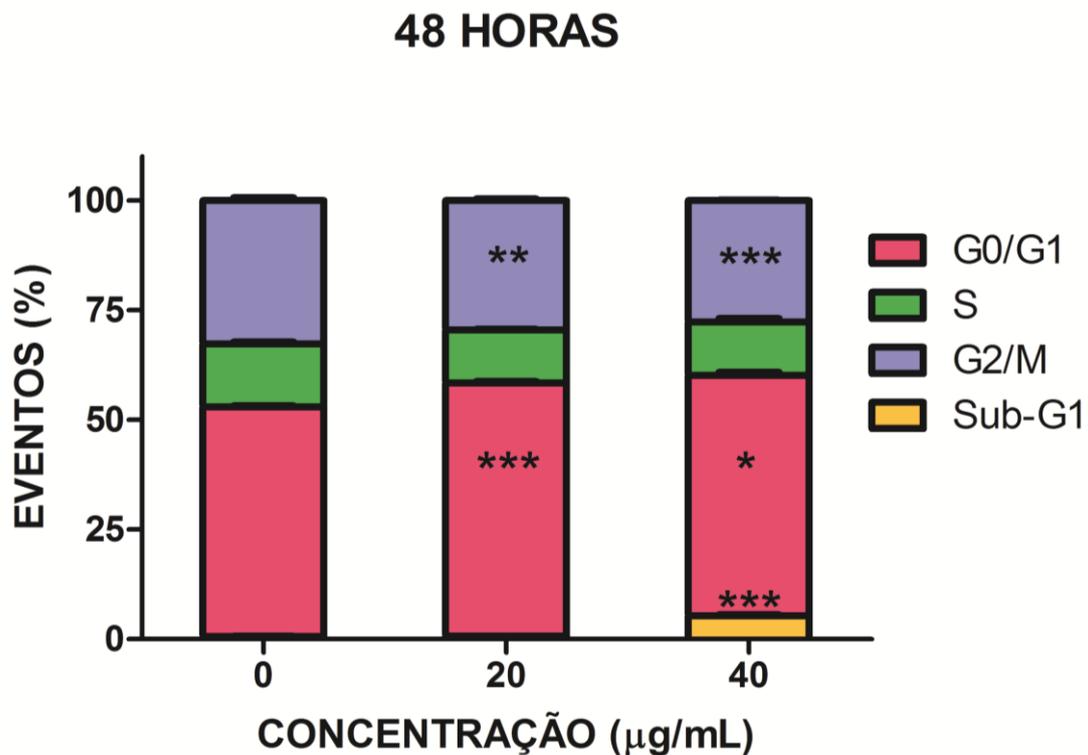
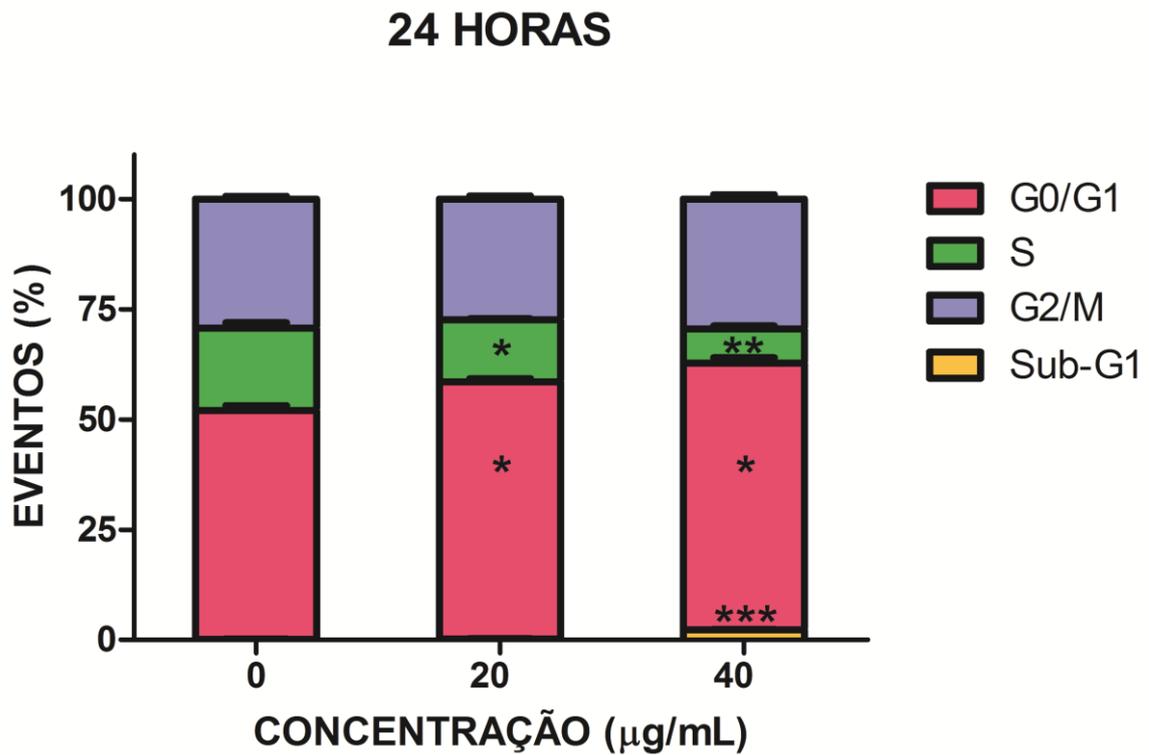


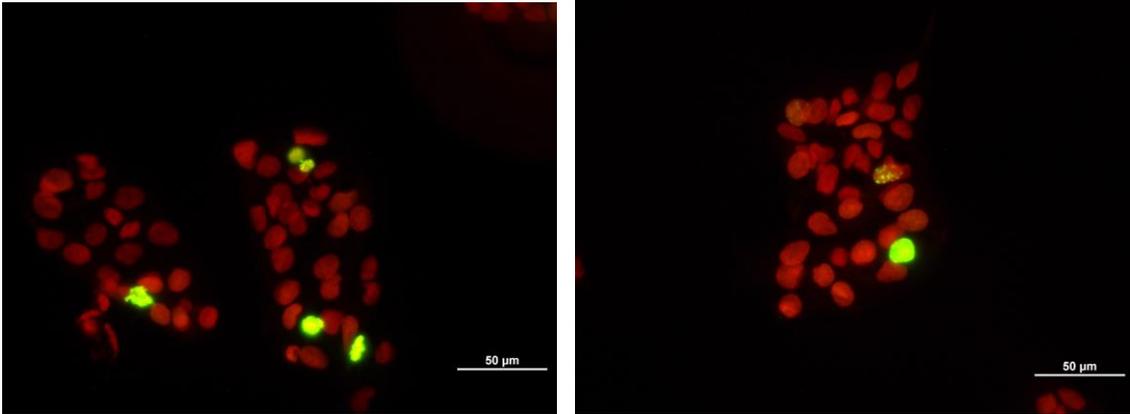
Figura 16 – Perfil de distribuição das populações celulares nas diferentes fases do ciclo celular em culturas tratadas por 24h e 48h. A análise foi realizada a partir dos dados obtidos por citometria de fluxo. O aumento da população celular na fase G1 com concomitante diminuição na frequência de células na fase S são eventos indicativos de bloqueio do ciclo celular na transição G1/S .

(\*)  $p < 0,01$ , (\*\*)  $p < 0,001$  e (\*\*\*)  $p < 0,0001$  de acordo com ANOVA *one-way* e pós-teste de Tukey..

Fonte: Do autor.

Os dados de citometria mostraram que houve diminuição significativa da população G2/M em amostras tratadas com alcaloides por 48h, evento que não foi observado com 24h. É possível que a população G2/M observada após 24h de tratamento estivesse enriquecida com células na fase G2. Para demonstrar esse aspecto, um marcador específico de mitose, a histona H3 fosforilada foi utilizada para determinar a frequência de células na fase M com 24h de tratamento (Figuras 17, 19A e 19C). De fato, os resultados mostraram que há significativa redução da frequência de mitose em culturas tratadas por 24h com 20  $\mu\text{g/mL}$  em relação ao grupo controle.

A



B

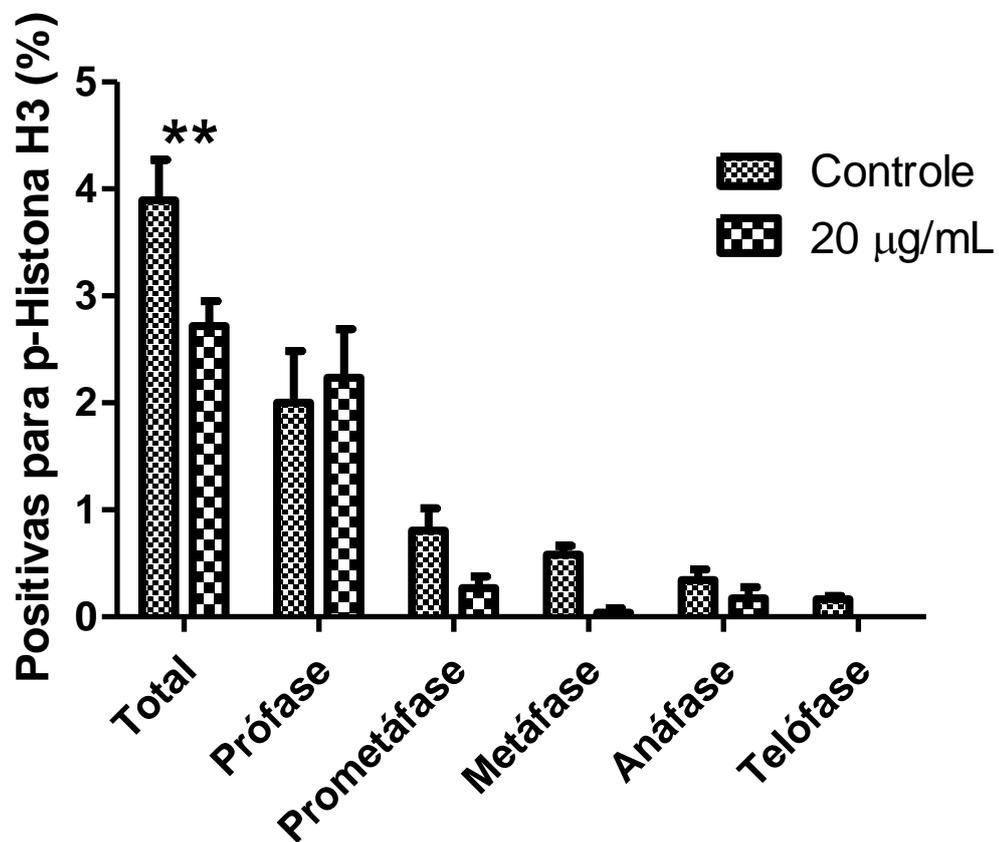


Figura 17 – Frequência de células positivas para histona H3 fosforilada determinada a partir de preparações citológicas fluorescentes (A). Células HepG2 foram tratadas por 24h com os alcaloides na concentração de 20 µg/mL. Foram contabilizadas células em diferentes fases da mitose (B). A análise estatística pelo teste T *Student* aponta redução significativa no número total de células positivas.  
(\*\*)  $p < 0,01$ .

Fonte: Do autor.

Considerando o significativo aumento na população G0/G1 observado nas culturas tratadas em relação às culturas controles, foi investigado o perfil de expressão de ciclina D1, em nível de RNA mensageiro, bem como o perfil de ativação de ERK. Os resultados de qRT-PCR mostraram que os alcaloides foram efetivos em reduzir os níveis de expressão de ciclina D1 após 24h de tratamento (Figura 18).

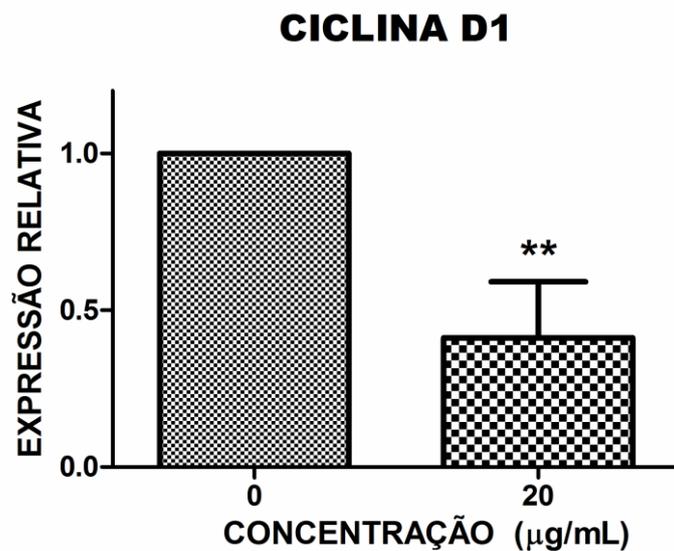


Figura 18 – Expressão relativa de ciclina D1 em células HepG2, após 24h de tratamento com a mistura de alcaloides a 20µg/mL, determinada por q-RT-PCR. Significância determinada pelo teste *t student*. (\*\*)  $p < 0,01$

Fonte: Do autor.

Curiosamente, os ensaios de *immunoblot* evidenciaram drástica redução no perfil de fosforilação de ERK (Tyr 204) após 24h de tratamento (Figuras 19 A e B), indicando que os alcaloides inibiram a atividade dessa proteoquinase, a qual é crítica para a progressão do ciclo em G1.

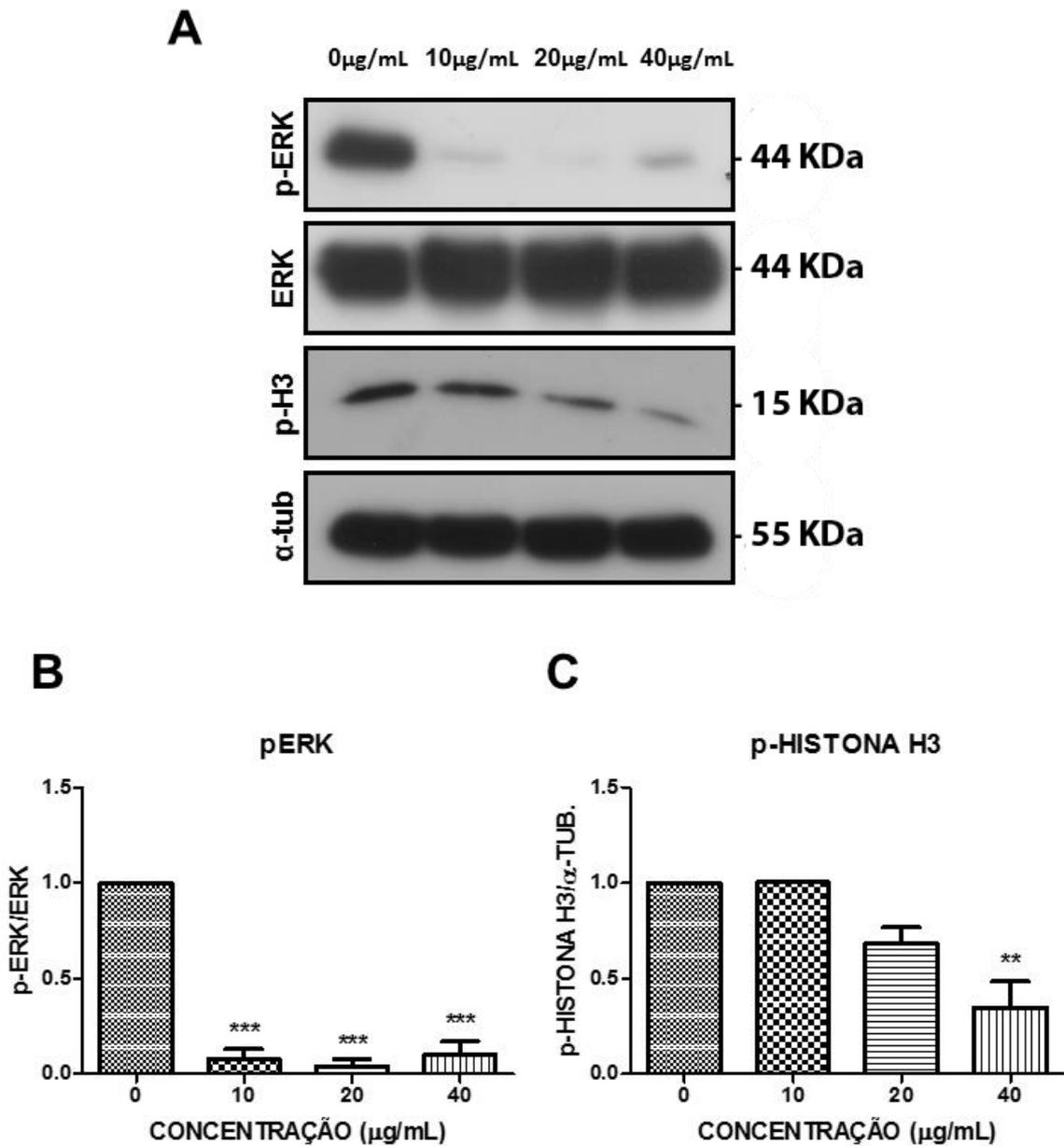


Figura 19 – Perfil de expressão de ERK, p-ERK (Tyr204) e p-histona H3 (Ser10) determinado por *imunoblot*. α-tubulina foi utilizada para controle de carregamento. Quantificação das bandas imunorreativas foi realizada pelo software de domínio público *ImageJ*.

A - Perfil de expressão demonstrado por bandas imunorreativas.

B - Expressão relativa de ERK fosforilada.

C – Expressão relativa de histona H3 fosforilada.

(\*\*)  $p < 0,0035$  e (\*\*\*)  $p < 0,0001$ .

Fonte: Do autor.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo foi demonstrado que a mistura (7:3) dos alcaloides (-)-cassina e (-)-espectralina foi efetiva em reduzir a viabilidade de células derivadas de tumores humanos, incluindo o CHC. Ao selecionar a linhagem HepG2 como modelo de estudo foi possível demonstrar que a redução na viabilidade foi decorrente principalmente da atividade antiproliferativa dos compostos testados. Até o momento, não existem dados que mostrem a influência dos alcaloides piperidínicos (-)-cassina e (-)-espectralina sobre o comportamento proliferativo de células tumorais. Entretanto, existem estudos que mostram atividade citotóxica desses alcaloides sobre promastigostas de *Leishmania major* (DE ALBUQUERQUE MELO et al., 2014) e *Plasmodium falciparum* (PIVATO et al., 2014). Também foi demonstrado que a cassina apresenta atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*; bem como atividade antifúngica para *Candida albicans* e *Aspergillus niger* (SANSORES-PERAZA, 2000). Foi demonstrado ainda que a espectralina é efetiva em reduzir a viabilidade de forma seletiva em leveduras *Sacharomyces cerevisiae* mutantes RS 322YK e RS 321N (BOLZANI; GUNATILAKA; KINGSTON, 1995; VIEGAS JR. et al., 2004).

A  $CI_{50}$  dos alcaloides sobre as células da linhagem HepG2 foi ao redor de 25  $\mu\text{g/mL}$ , um valor próximo ao determinado por De Albuquerque Melo et al. (2014) em estudos sobre a atividade leishmanicida desses alcaloides ( $CI_{50} = 24.9 \pm 1.4 \text{ g/mL}$ ). Vale ressaltar que aqueles autores testaram esses mesmos compostos em macrófagos derivados de murinos (linhagem J774) e não observaram redução na viabilidade, pelo menos, até a concentração de 30,4  $\mu\text{g/mL}$ . Nossos resultados demonstraram valores de  $CI_{50}$  duas vezes maiores para fibroblastos humanos (CD-1059Sk) em relação as células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Sendo assim, é possível inferir que a mistura de alcaloides é menos citotóxica para as células normais em relação às tumorais.

Estudos mostram que outros alcaloides piperidínicos, como piperina ( $CI_{50} = 3 \mu\text{g/mL}$ ) e pipermetistina ( $CI_{50} = 14,35 \mu\text{g/mL}$  a  $28,73 \mu\text{g/mL}$ ) são efetivos em reduzir a viabilidade de células HepG2 (NARUKAR; DRAGULL; TANG, 2004; ZENG; WANG; XING, 2012). Estes mesmos alcaloides também foram citotóxicos contra as linhagens 4T1 (carcinoma de mama derivado de camundongo) e MCF-7 (DO et al.,

2013; LI-HUA et al., 2012;). Portanto, considerando os resultados obtidos no presente estudo e os dados já reportados na literatura, os alcaloides piperidínicos são entidades químicas que apresentam promissora atividade antitumoral.

Com o objetivo de melhor entender a influência dos alcaloides sobre a viabilidade de células HepG2, ensaios adicionais aos ensaios colorimétricos (MTS e rezasurina) foram realizados. O ensaio de exclusão por azul de tripano constitui uma abordagem metodológica que, ao contrário dos métodos colorimétricos descritos anteriormente, permitem a distinção de células viáveis e não viáveis. Esse aspecto é extremamente relevante considerando que a redução na viabilidade celular pode ser decorrente tanto de inibição na capacidade de proliferação como na indução de morte (AL-NASIRY et al., 2007; DARZYKIEWICZ et al., 1997; HERMAN et al., 1988; MANJO; JORIS, 1995; MARLICH; MARKOVIC; WINDER, 1997; McGOWAN et al., 2011; O'TOOLE et al., 2003; PATEL; TUCKERMAN; DONG 2005; WANG; HENNING; HERBER, 2010). Os resultados mostraram que houve morte celular em culturas tratadas com os alcaloides na concentração de 40 µg/mL por períodos igual ou superior a 48h, entretanto o tipo de morte celular associado à atividade citotóxica dos alcaloides será futuramente investigado.

Nas mesmas condições em que foram observados aumento na frequência de morte celular, foi possível identificar, por microscopia de contraste de fase, células com aspecto morfológico alterado. As células tornaram-se esféricas e perderam, em grande parte, o contato célula-célula e célula-substrato. A pipermetistina y induz alterações morfológicas similares às observadas neste estudo, onde 80-90% das células HepG2, tratadas a 100µM (28,73 µg/mL), se desprenderam do substrato após 36 horas de tratamento (NARUKAR, DRAGULL; TANG, 2004). Considerando que os filamentos de actina estão relacionados com a determinação da forma celular, bem como aos processos de adesão celular, preparações citológicas marcadas para F-actina foram realizadas. Em células tratadas com 20 µg/mL e 40 µg/mL, a marcação para os filamentos de actina foi difusa sugerindo que houve drástica desorganização desses filamentos.

Na sequência o padrão de organização dos microtúbulos foi investigado considerando sua íntima associação com os microfilamentos em diferentes processos biológicos (KORB et al., 2004; YAMAGUCHI; CONDEELIS, 2007). Os dados obtidos em relação aos microtúbulos foram semelhantes aos observados para os microfilamentos, ou seja, os alcaloides usados na concentração de 40 µg/mL

induz completa desorganização dos microtúbulos, embora alterações menos drásticas no padrão normal de distribuição desses elementos do citoesqueleto tenham sido também observadas em células tratadas com 20 µg/mL.

No presente estudo, não foram realizadas abordagens experimentais para avaliar se os elementos do citoesqueleto são alvos diretos ou indiretos dos alcaloides estudados, entretanto, compostos que interferem na polimerização de microtúbulos e microfilamentos são promissores agentes antitumorais (KORB et al., 2004; YAMAGUCHI; CONDEELIS, 2007), uma vez que a dinâmica de polimerização dos microtúbulos é essencial para a segregação normal das cromátides irmãs durante o processo de divisão celular e a instabilidade dinâmica dos microfilamentos é essencial para os processos citocinese, migração e invasão (NUNBERG; KITZING; GROSSE, 2011). Vale ressaltar que o taxol e os alcaloides da *Vinca sp.*, agentes anti-neoplásicos amplamente utilizados, atuam interferindo na dinâmica de polimerização dos microtúbulos (JORDAN; THROWER; WILSON, 1991). Não existem relatos na literatura que descrevam a atividade de alcaloides piperidínicos sobre os filamentos de actina e/ou microtúbulos, porém estudos mostram que a evodiamina e a sanguinarina, alcaloides não-piperidínicos, foram efetivos em alterar a instabilidade dinâmica dos microtúbulos (HUANG et al., 2005; LOPUS; PANDA, 2006). Em relação aos microfilamentos, não existem dados reportando a atividade de alcaloides sobre esse elemento do citoesqueleto. Assim sendo, os que foram obtidos no presente estudo são promissores e sugerem que os alcaloides podem afetar a capacidade de migração em células HepG2, de modo que esse parâmetro será futuramente investigado.

Ao avaliar o comportamento proliferativo de células HepG2 frente aos alcaloides ao longo de 72h, foi evidenciado que a densidade celular nas culturas tratadas por 24h, 48h e 72h foi semelhante ao inóculo inicial. Esses dados indicam importante atividade antiproliferativa dos alcaloides sobre as células HepG2. Esse aspecto foi também demonstrado pela determinação na frequência de mitoses, que foi significativamente reduzida em culturas tratadas por 24h. Estes dados foram inicialmente obtidos pela contagem de figuras mitóticas em preparações citológicas coradas por DAPI, mas posteriormente foram confirmados por imunofluorescência e *immunoblot* usando a histona H3 fosforilada no resíduo de serina 10, um marcador específico de mitose (DIMITROV, 2001). A alta frequência de mitoses é comumente observada em tumores malignos, e tratamentos direcionados reduzem a proliferação

anormal de células transformadas. Dessa forma, compostos capazes de reduzir os eventos mitóticos representam promissores agentes terapêuticos (CHAN; KO; LI, 2012).

Na sequência, o ensaio clonogênico foi realizado para avaliar a capacidade dos alcaloides em inibir proliferação por períodos prolongados (FRANKEN et al., 2006). Considerando que a capacidade de colonização em órgãos distantes da formação do tumor primário é um fator relevante do processo de metástase (FIDLER, 2003), a avaliação da capacidade clonogênica *in vitro* é relevante na triagem de novos compostos com atividade antitumoral (DAI et al., 2015; HU et al., 2016; SHI et al., 2015). No presente estudo foi demonstrado que os alcaloides reduziram significativamente a capacidade de formação de colônias pelas células HepG2. Levando-se em conta que estes compostos também inibem o crescimento populacional das células em cultura e reduzem a frequência de divisão celular, foi consistentemente demonstrado a atividade antiproliferativa desses alcaloides (CHAN; KOH; LI, 2012).

A análise de progressão do ciclo celular mostrou que, em resposta ao tratamento, houve aumento da população celular na fase G1, com concomitante redução na frequência de células na fase S. Os dados indicam, portanto, um boqueio da transição G1/S. O mesmo efeito foi observado em células de câncer de próstata humano e osteossarcoma tratadas com piperina (OUYANG et al., 2013; ZHANG et al., 2015). Considerando que a transição G1/S é crítica para a definição do comportamento proliferativo (SHERR, 1996), moléculas que inibem essa transição representam promissores agentes antitumorais (ORTEGA; MALUMBRES; BARBACID, 2002).

A análise de citometria de fluxo também apontou aumento da população sub-G1 em culturas tratadas com os alcaloides a 40 µg/mL. Dados similares foram encontrados por Li-hua et al. (2012) quando trataram a linhagem 4T1 com piperina (em concentrações entre 39,95 e 79,89 µg/mL). Yoo et al. (2002) relataram o aumento da população de células HepG2 em Sub-G1 quando tratadas com o alcaloide tetrandrina a 14,95 µg/mL. O aumento da população Sub-G1 é um indicativo de citotoxicidade, considerando que essa população é constituída por células mortas que apresentam conteúdo de DNA inferior a 2C, provavelmente devido a sua fragmentação (QUIAN et al., 1995; VERMES; HAANEN; REUTELINGSPERGER, 2000). Considerando que tal citotoxicidade pode estar

relacionada a diferentes processos de morte celular, novos ensaios devem ser realizados para avaliar o tipo de morte induzida pelos alcaloides.

Ao concatenar os resultados obtidos por diferentes abordagens metodológicas, foi possível verificar que o tratamento com os alcaloides na concentração de 20 µg/mL foi efetivo em inibir proliferação de células HepG2 sendo esse evento devido, pelo menos em parte, ao bloqueio do ciclo na transição G1/S. Dessa forma, tais condições experimentais foram reproduzidas na sequência para determinar os níveis de expressão de ciclina D1 que, em geral, apresentam-se elevados em células de CHC (JOO et al., 2001; RESNITZKY; REED, 1995). Os resultados mostraram que os alcaloides efetivamente reduzem os níveis de RNA mensageiro para ciclina D1 em células HepG2 tratadas em comparação ao grupo controle. O bloqueio em G1/S observado previamente está relacionado, pelo menos em parte, com a redução dos níveis de expressão de ciclina D1.

Tem sido descrito na literatura que durante o processo de hepatocarcinogênese, há uma super ativação na via RAF/MEK/ERK com consequente aumento na expressão de ciclina D (HWANG et al., 2004) e, dessa forma, o perfil de ativação de ERK também foi investigado. Os dados mostraram que os alcaloides reduziram significativamente o perfil de fosforilação ERK (Tyr204) em amostras tratadas quando comparadas ao grupo controle. Portanto, deve-se considerar que o bloqueio na transição G1/S induzido pelos alcaloides seja decorrente da inativação da via MAPKs e redução no perfil de expressão de ciclina D. No carcinoma hepatocelular, a desregulação da via de sinalização de ERK também tem sido associada à capacidade de invasão e metástase (HWANG et al., 2011). A piperina também reduz os níveis de fosforilação de ERK via PKC $\alpha$  induzida por acetato de miristato forbol (HWANG et al., 2011). Interessantemente, o Sorafenib, medicamento de escolha para o tratamento de CHC em estágio avançado, também reduz a fosforilação de ERK de maneira concentração-dependente em células HepG2 (LIU et al., 2006).

Os dados obtidos neste estudo demonstram que esses alcaloides apresentam proeminente atividade antiproliferativa em células de carcinoma hepatocelular humano da linhagem HepG2. Portanto, torna-se possível inferir que o padrão estrutural de alcaloides piperidínicos 2,3,6-trissubstituídos, como a (-)-cassina e (-)-espectralina, pode ser um protótipo inovador para o desenvolvimento de novos compostos que sejam candidatos à terapêutica do câncer.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente trabalho mostraram que a mistura de alcaloides piperidínicos (-)-cassina e (-)-espectralina tem promissora atividade antitumoral sobre células derivadas de carcinoma hepatocelular.

Quando usados na concentração de 20 µg/mL, os alcaloides apresentam preferencialmente atividade antiproliferativa, ao passo que, são citotóxicos quando utilizados na concentração de 40 µg/mL por períodos igual ou superior a 48h.

A atividade antiproliferativa está relacionada a capacidade dos alcaloides em bloquear o ciclo celular na transição G1/S. Este mecanismo ocorre, pelo menos em parte, pela inibição de ERK e, subsequentemente, redução dos níveis de expressão de ciclina D1.

Os alcaloides também induziram alteração do padrão de distribuição de microfilamentos e microtúbulos, entretanto, abordagens experimentais não foram realizadas para avaliar se os referidos elementos do citoesqueleto representam alvos diretos dos alcaloides testados.

## REFERÊNCIAS

ABOU-ALFA, G. K. et al. Doxorubicin Plus Sorafenib vs Doxorubicin Alone in Patients With Advanced Hepatocellular Carcinoma. **JAMA**, v. 304, n. 19, p. 2154-2160, 2010.

ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. et al. Antinociceptive profile of (-)-spectaline: a piperidine alkaloid from *Cassia leptophylla*. **Planta medica**, v. 69, n. 9, p. 795-799, 2003.

AL-NASIRY, S. et al. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. **Human reproduction**, v. 22, n. 5, p. 1304-1309, 2007.

ANAND, P. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. **Pharmaceutical research**, v. 25, n. 9, p. 2097-2116, 2008.

ARAVALLI, R. N.; CRESSMAN, E. N. K.; STEER, C. J. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma: an update. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 2, p. 227-247, 2013.

ARZUMANYAN, A. et al. Epigenetic repression of E-cadherin expression by hepatitis B virus x antigen in liver cancer. **Oncogene**, v. 31, n. 5, p. 563-572, 2012.

BAI, A. H. C.; CHENG, A. S. L. Alliance of epigenetic forces for the activation of oncogenic Wnt/ $\beta$ -catenin signalling. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 28, n. 3, p. 383-385, 2013.

BAFFY, G.; BRUNT, E. M.; CALDWELL, S. H. Hepatocellular carcinoma in non-alcoholic fatty liver disease: an emerging menace. **Journal of hepatology**, v. 56, n. 6, p. 1384-1391, 2012.

BALLIF, B. A.; BLENIS, J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. **Cell growth and differentiation**, v. 12, n. 8, p. 397-408, 2001.

BARCELLOS-HOFF, M. H.; LYDEN, D.; WANG, T. C. The evolution of the cancer niche during multistage carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 7, p. 511-518, 2013.

BARRETT, K. L. et al. Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 49, n. 7, p. 821-832, 2001.

BEFELER, A. S.; DI BISCEGLIE, A. M. Hepatocellular carcinoma: diagnosis and treatment. **Gastroenterology**, v. 122, n. 6, p. 1609-1619, 2002.

BERRIDGE, M. V.; HERST, P. M.; TAN, A. S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, p. 127-152, 2005.

BIELAS, J. H. et al. Human cancers express a mutator phenotype. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 48, p. 18238-18242, 2006.

BOLONDI, L. et al. Liver transplantation for HCC. Treatment options on the waiting list. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 17, n. 2, p. 145-150, 2003.

Bolzani, V. S., Gunatilaka, A. A. L., Kingston, D. G. I., Bioactive and other piperidine alkaloids from *Cassia leptophylla*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 21, p. 5929–5934, 1995

BRUIX, J.; LLOVET, J. M. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. **Hepatology**, v. 35, n. 3, p. 519-524, 2002.

BRUIX, J & SHERMAN, M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. **Hepatology**, v. 53, n. 3, p. 1020-1022, 2011

BUCKLEY, A. F. et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in conventional hepatocellular carcinoma. **American journal of clinical pathology**, v. 129, n. 2, p. 245-251, 2008.

BUM, E. N. et al. Anticonvulsant and sedative activity of leaves of *Senna spectabilis* in mice. **Int. J. Pharmacology**, v.6, n. 2, p. 123–128. 2010

CALDWELL, S. H. et al. Obesity and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 127, n. 5, p. S97-S103, 2004.

CAMPISI, J. et al. Cell-cycle control of c-myc but not c-ras expression is lost following chemical transformation. **Cell**, v. 36, n. 2, p. 241-247, 1984.

CAMBELL, J. S. et al. Platelet-derived growth factor C induces liver fibrosis, steatosis, and hepatocellular carcinoma. **PNAS**. v. 102, n. 9, p. 3389-3394, 2005.

CASTRO, A. S.; CAVALCANTE, A. M. B. Flores da caatinga. **Campina Grande: Instituto Nacional do Semiárido (INSA)**, 2010. Disponível em: <<http://www.insa.gov.br/~webdir/salomao/livros/flores.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2015

CASTRO, N. G. et al. CNS-selective noncompetitive cholinesterase inhibitors derived from the natural piperidine alkaloid (-)-spectaline. **European journal of pharmacology**, v. 580, n. 3, p. 339-349, 2008.

CHAMBARD, J. et al. ERK implication in cell cycle regulation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1299-1310, 2007.

CHAN, K. S.; KOH, C. G.; LI, H. Y. Mitosis-targeted anti-cancer therapies: where they stand. **Cell death & disease**, v. 3, n. 10, p. e411, 2012.

CHARI, R. V. J. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. **Accounts of chemical research**, v. 41, n. 1, p. 98-107, 2007.

CHEN, C. et al. Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. **Journal of American Medical Association**. v. 295, n. 1, p. 65-73, 2006

CHEN, J. et al. Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9. **Hepatology Research**, v. 39, n. 2, p. 177-186, 2009.

CHIBA, T. et al. Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. **Hepatology**, v. 44, n. 1, p. 240-251, 2006.

CHRISTOFIDIS, I.; WELTER, A.; JADOT, J. Spectaline and iso-6 cassine, two new piperidin 3-ol alkaloids from the leaves of *Cassia spectabilis*. **Tetrahedron**, v. 33, n. 9, p. 977-979, 1977.

CLEVERS, H. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling in Development and Disease. **Cell**. v. 127, p. 469-480, 2006

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair. **Molecular Biotechnology**. v. 26, n. 3, 2004.

COQUERET, O. New roles for p21 and p27 cell-cycle inhibitors: a function for each cell compartment?. **Trends in cell biology**, v. 13, n. 2, p. 65-70, 2003.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethno-Pharmacology**. v. 100, n.1-2, p. 72-79, 2005

CRAGG G. M.; NEWMAN D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects**. v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

DAI, X. et al. Ascochlorin, an isoprenoid antibiotic inhibits growth and invasion of hepatocellular carcinoma by targeting STAT3 signaling cascade through the induction of PIAS3. **Molecular oncology**, v. 9, n. 4, p. 818-833, 2015.

DANG, H. T.; BUDHU, A.; WANG, X. W. The origin of cancer stem cells. **Journal of hepatology**, v. 60, n. 6, p. 1304-1305, 2014.

DARZYNKIEWICZ, Z. et al. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). **Cytometry**, v. 27, n. 1, p. 1-20, 1997.

DATTA, S. R.; BRUNET, A.; GREENBERG, M. E. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes & development**, v. 13, n. 22, p. 2905-2927, 1999.

DE ALBUQUERQUE MELO, G. M. et al. Leishmanicidal activity of the crude extract, fractions and major piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis*. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 277-281, 2014.

DE ALMEIDA, J. R. C. et al. Marcadores tumorais: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 305-316, 2007.

DENG, X. et al. The anti-tumor effects of alkaloids from the seeds of *Strychnos nux-vomica* on HepG2 cells and its possible mechanism. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 106, p. 179-186, 2006.

DHILLON, A. S. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279-3290, 2007.

DO, M. T. et al. Antitumor efficacy of piperine in the treatment of human HER2-overexpressing breast cancer cells. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2591-2599, 2013.

DIEUDONNE, Marie-Noelle et al. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF7 breast cancer cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 345, n. 1, p. 271-279, 2006.

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

EL-SERAG, H. B.; RUDOLPH, K. L. Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis. **Gastroenterology**. v.132, n. 7, p. 2557–2576, 2007.

EL-SERAG, H. B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 142, n. 6, p. 1264-1273, 2012.

EVAN, G. I.; VOUSDEN, K. H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 342-348, 2001.

FARAZI, P. A.; DEPINHO, R. A. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. **Nature Reviews**. v. 6, p. 674-687, 2006.

FEITELSON, M. A.; SUN, B.; TUFAN, N. L. S. et al. Genetic mechanisms of hepatocarcinogenesis. **Oncogene**. v. 21, n. 16, p. 2593-2604, 2002

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature**. v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007

FENG, G. Conflicting roles of molecules in hepatocarcinogenesis: paradigm or paradox. **Cancer cell**, v. 21, n. 2, p. 150-154, 2012.

FETT-CONTE, A. C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 24, n. 2, p. 85-89, 2002.

FORNER, A. et al. Current Strategy for Staging and Treatment: The BCLC Update and Future Prospects. **Seminars in Liver Disease**, v. 30, n. 1, p. 61-74, 2010.

FRANKE, T. F. et al. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. **Oncogene**, v. 22, n. 56, p. 8983-8998, 2003.

FRANKEN, N. AP et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

GIUNCHEDI, P. et al. Transarterial chemoembolization of hepatocellular carcinoma-agents and drugs: an overview. Part 2 **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 6, pp. 799–810, 2013.

GOMES, M. A. et al. Carcinoma hepatocelular: epidemiologia, biologia, diagnóstico e terapias. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 59, n. 5, p. 514-524, 2013.

GOOSSENS, N.; HOSHIDA, Y. Hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma. **Clinical and molecular hepatology**, v. 21, n. 2, p. 105-114, 2015.

GOUSTIN, A. S. et al. Growth factors and cancer. **Cancer Research**, v. 46, n. 3, p. 1015-1029, 1986.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306-313, 2012

GREEN, B. T. et al. Piperidine alkaloids: human and food animal teratogens. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 6, p. 2049-2055, 2012.

GREENBLATT, M. S. et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer research**, v. 54, n. 18, p. 4855-4878, 1994.

GUIMARÃES, R. M. et al. Tendência para o câncer de fígado e vias biliares na Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 6, n. 1, p. 29-34, 2015.

HAMID, R. et al. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicology in vitro**, v. 18, n. 5, p. 703-710, 2004.

HANS, F.; DIMITROV, S. Histone H3 phosphorylation and cell division. **Oncogene**, v. 20, p. 3021-3027, 2001

HARPER, J. W. et al. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 805-816, 1993.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 19, p. 894-901, 2008.

HERMAN, B. et al. Irreversible injury in anoxic hepatocytes precipitated by an abrupt increase in plasma membrane permeability. **The FASEB Journal**, v. 2, n. 2, p. 146-151, 1988.

HIGHET, R. J. Alkaloids of Cassia Species. I. Cassine1. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 471-474, 1964.

HU, T. et al. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 8, p. 1929-1940, 2003.

HU, T. et al. Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo. **Oncology reports**, v. 35, n. 1, p. 43-49, 2016.

HUANG, D. et al. Induction of mitotic arrest and apoptosis in human prostate cancer pc-3 cells by evodiamine. **The Journal of urology**, v. 173, n. 1, p. 256-261, 2005.

HUANG, S. et al. Activation of the hedgehog pathway in human hepatocellular carcinomas. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 7, p. 1334-1340, 2006.

HUANG, X.; HOLLINGER, F. B. Occult hepatitis B virus infection and hepatocellular carcinoma: a systematic review. **Journal of viral hepatitis**, v. 21, n. 3, p. 153-162, 2014.

HUSSIAN, S. P. et al. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. **Oncogene**. v. 26, p. 2166-2176, 2007.

HSIANG, Y et al.. Camptothecin Induces Protein-linked DNA Breaks via Mammalian DNA Topoisomerase I. **The Journal of Biological Chemistry**. v.260, n.25, p. 14837-14878, 1985.

HWANG, Y. H. et al. Over-expression of c-raf-1 proto-oncogene in liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. **Hepatology research**, v. 29, n. 2, p. 113-121, 2004.

HWANG, Y. P. et al. Supression of phorbol-12-myristate-13-acetate-induced tumor cell invasion by piperine via the inhibition of PKC $\alpha$ /ERK1/2-dependent matrix. **Toxicology Letters**. v.203, p.9-19, 2011

INTERNATIONAL AGENCY FOR CANCER RESEARCH. **Globocan 2012 – Estimated cancer incidence, mortality and prevalence in 2012**. Disponível em: <[http://globocan.iarc.fr/Pages/fact\\_sheets\\_cancer.aspx](http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx)> Acesso em: 01 ago. 2014

ISHIZAKI, Y. et al. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of  $\beta$ -catenin, axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas. **International journal of oncology**, v. 24, n. 5, p. 1077-1083, 2004.

ITO, Y. et al. Expression and clinical significance of erb-B receptor family in hepatocellular carcinoma. **British Journal of Cancer**. v. 84, n.10, p1377–1383, 2001

JANSSEN, A.; MEDEMA, R. H. Mitosis as an anti-cancer target. **Oncogene**, v. 30, n. 25, p. 2799-2809, 2011.

JOO, M. et al. Cyclin D1 overexpression in hepatocellular carcinoma. **Liver**, v. 21, n. 2, p. 89-95, 2001.

JORDAN, M. A.; THROWER, D.; WILSON, L. Mechanism of Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids. **Cancer Research**. v. 51, p.2212-2222, 1991.

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

KIM, S.; PARK, J.; LEE, Y. I. Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus X gene product. **Cancer research**, v. 56, n. 16, p. 3831-3836, 1996.

KOJIMA, H.; YOKOSUKA, O.; IMAZEKI, F.; SAISHO, H.; OMATA, M. Telomerase Activity and Telomere Length in Hepatocellular Carcinoma and Chronic Liver Disease. **Gastroenterology**. v. 112, n. 2, p. 493-500, 1997

KNOWLES, B. B.; ADEN, D. P. **Human CHC derived cell line, process for preparation thereof, and uses therefor**. U.S. Patent n. 4,393,133, 12 jul. 1983.

KORB, T. et al. Integrity of actin fibers and microtubules influences metastatic tumor cell adhesion. **Experimental cell research**, v. 299, n. 1, p. 236-247, 2004.

KURZ, D. J. et al. Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. **Journal of Cell Science**. v. 117, n. 11, p. 2417-2426, may. 2004.

LEE, T. K.; LAU, T. C.; NG, I. O. Doxorubicin induced apoptosis and chemosensitivity in CHC cell lines. **Cancer Chem. Pharm.** v. 49, n.1, p. 78-86, jan. 2002

LEE, J. et al. Classification and prediction of survival in hepatocellular carcinoma by gene expression profiling. **Hepatology**, v. 40, n. 3, p. 667-676, 2004.

LEE, H. C. et al. Wnt/Frizzled signaling in hepatocellular carcinoma. **Frontiers in Biosciences**, v. 11, n. 5, p. 1901-1915, 2006.

LÉVY, L. et al. Genetic alterations and oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 963, n. 1, p. 21-36, 2002.

LI-HUA, L. A. I. et al. Piperine supresses tumor growth and metastasis in vitro and in vivo in a 4T1 murine breast cancer model. **Acta Pharmacologica Sinica**. v.33, p. 523-530, 2012

LIU, L. et al. Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5. **Cancer Research**. v.66, n.24, p.11851-11858, 2006

LLOVET, J. M.; BRUIX, J. Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma. **Hepatology**. v. 48, n. 4, p. 1312-1327, 2008.

LLOVET, J. M.; FUSTER, J.; BRUIX, J. The Barcelona approach: diagnosis, staging, and treatment of hepatocellular carcinoma. **Liver transplantation**, v. 10, n. S2, p. S115-S120, 2004.

LLOVET, J. M.; RICCI, S.; MAZZAFERRO V. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 4, p. 378–390, 2008.

LOEB, L. A.; LOEB, K. R.; ANDERSON, J. P. Multiple mutations and cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 3, p. 776-781, 2003.

LOPEZ, P. M.; VILLANUEVA, A.; LLOVET, J. M. Systematic review: evidence-based management of hepatocellular carcinoma—an updated analysis of randomized controlled trials. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**. v. 23, n. 11, pp. 1535–1547, 2006.

LOPUS, M.; PANDA, D. The benzophenanthridine alkaloid sanguinarine perturbs microtubule assembly dynamics through tubulin binding. **FEBS Journal**, v. 273, n. 10, p. 2139-2150, 2006.

LU, J. et al. *Alkaloids isolated from Natural Herbs as the anticancer Agents*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2012. Jul 2012.

LUKAS, J. et al. Retinoblastoma-protein-dependent cell-cycle inhibition by the tumour suppressor p16. **Nature**. v. 375, p. 503-506, 1995.

LUPBERGER, J.; HILDT, E. Hepatitis B virus-induced oncogenesis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 74, 2007.

MACLEAN-FLETCHER, S.; POLLARD, T. D. Mechanism of action of cytochalasin B on actin. **Cell**, v. 20, n. 2, p. 329-341, 1980.

MAGNUSSEN, A.; PARSI, M. A. Aflatoxins, hepatocellular carcinoma and public health. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 19, n. 10, p. 1508, 2013.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **The American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 3, 1995.

MAKABE, H.; KONG, L. K.; HIROTA, M. Total Synthesis of (-)-Cassine. **Organic letters**, v. 5, n. 1, p. 27-29, 2003.

MALICH, G.; MARKOVIC, B.; WINDER, C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. **Toxicology**, v. 124, n. 3, p. 179-192, 1997.

MANE, A. et al. Role of image guided fine needle aspiration cytology in cases of hepatic mass lesions. **International J. of Healthcare and Biomedical Research**, v. 3, n. 03, p. 149-155, 2015.

MARROGI, A. J. et al. Oxidative stress and p53 mutations in the carcinogenesis of iron overload-associated hepatocellular carcinoma. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 21, nov. 2001.

MARTIN, M.; HERCEG, Z. From hepatitis to hepatocellular carcinoma: a proposed model for cross-talk between inflammation and epigenetic mechanisms. **Genome Med**, v. 4, n. 8, 2012.

MCCUBREY, J. A. et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 8, p. 1263-1284, 2007.

MCGOWAN, E. M. et al. Evaluation of cell cycle arrest in estrogen responsive MCF-7 breast cancer cells: pitfalls of the MTS assay. **PLoS One**, v. 6, n. 6, p. e20623, 2011.

MEBRATU, Y.; TESFAIGZI, Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer?. **Cell cycle**, v. 8, n. 8, p. 1168-1175, 2009.

MESRI, E. A.; FEITELSON, M. A.; MUNGER, K. Human viral oncogenesis: a cancer hallmarks analysis. **Cell host & microbe**, v. 15, n. 3, p. 266-282, 2014.

MITTAL, S.; EL-SERAG, H. B. Epidemiology of HCC: Consider the Population. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 47, p. S2, 2013.

MIYOSHI, Y. et al. Activation of the  $\beta$ -catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. **Cancer research**, v. 58, n. 12, p. 2524-2527, 1998.

MOLL, U. M.; ZAIKA, A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53. **FEBS letters**, v. 493, n. 2, p. 65-69, 2001.

MOON, W. S. et al. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma?. **Modern pathology**, v. 16, n. 6, p. 552-557, 2003.

MORI, T. et al. Decreased expression and frequent allelic inactivation of the RUNX3 gene at 1p36 in human hepatocellular carcinoma. **Liver International**, v. 25, n. 2, p. 380-388, 2005.

NAGAO, K. et al. Risk of Hepatocellular Carcinoma Across a Biological Gradient of Serum Hepatitis B Virus DNA Level. **Gastroenterology**. v. 34, p. 83-87, 1999.

NAGAO, T. et al. Immunohistochemical detection of aberrant p53 expression in hepatocellular carcinoma: correlation with cell proliferative activity indices, including mitotic index and MIB-1 immunostaining. **Human pathology**, v. 26, n. 3, p. 326-333, 1995.

NERURKAR, V. P. In vitro Toxicity of Kava Alkaloid, Pipermethystine, in HepG2 Cells Compared to Kavalactones. **Toxicological Sciences**. v. 79, p.106-111, 2004

NISHIDA, N. et al. Amplification and overexpression of the cyclin D1 gene in aggressive human hepatocellular carcinoma. **Cancer research**, v. 54, n. 12, p. 3107-3110, 1994.

NSONDE-NTANDOU, G. F. et al. Enquête ethnobotanique: screening chimique et efficacité thérapeutique de quelques plantes utilisées contre le paludisme en médecine traditionnelle à Brazzaville et al. **Phytotherapie**. v. 3, p. 13–18, 2005

NÜRNBERG, A.; KITZING, T.; GROSSE, R. Nucleating actin for invasion. **Nature reviews Cancer**, v. 11, n. 3, p. 177-187, 2011.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

ODA, T. et al. p53 gene mutation spectrum in hepatocellular carcinoma. **Cancer research**, v. 52, n. 22, p. 6358-6364, 1992.

ORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil**. 2 ed.; Nova Odessa: Plantarum. p.151-167, 1998.

ORTEGA, S.; MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1602, n. 1, p. 73-87, 2002.

O'SHEA, R. S.; DASARATHY, S.; MCCULLOUGH, A. J. Alcoholic liver disease. **Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 307-328, 2010.

OSNA, N.; CLEMENS, D. L.; DONORRUE, T. M. Ethanol Metabolism Alters Interferon Gamma Signaling in Recombinant HepG2 Cells. **Hepatology**, v. 42, n. 5, p. 1109-1117, nov. 2005

O'TOOLE, S. A. et al. The MTS assay as an indicator of chemosensitivity/resistance in malignant gynaecological tumours. **Cancer detection and prevention**, v. 27, n. 1, p. 47-54, 2003.

OTT, J. J. et al. Global epidemiology of hepatitis B virus infection: new estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity. **Vaccine**, v. 30, n. 12, p. 2212-2219, 2012.

OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.

OUYANG, D. et al. Piperine inhibits the proliferation of human prostate cancer cells via induction of cell cycle arrest and autophagy. **Food and Chemical Toxicology**, v. 60, p. 424-430, 2013.

OZTURK, M. et al. p53 mutation in hepatocellular carcinoma after aflatoxin exposure. **Lancet**. v. 338: p.1356-1359, 1991

PAGE, A. J. et al. Hepatocellular carcinoma: diagnosis, management, and prognosis. **Surgical oncology clinics of North America**, v. 23, n. 2, p. 289-311, 2014.

PAGLIACCI, M. C. et al. Genistein inhibits tumour cell growth in vitro but enhances mitochondrial reduction of tetrazolium salts: a further pitfall in the use of the MTT assay for evaluating cell growth and survival. **European journal of cancer**, v. 29, n. 11, p. 1573-1577, 1993.

PANG, R. W. et al. Biology of hepatocellular carcinoma. **Ann Surg Oncol**. v. 15, p. 962–71, 2008

PARADIS, V. Histopathology of hepatocellular carcinoma. In: **Multidisciplinary Treatment of Hepatocellular Carcinoma**. Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 21-32.

PATEL, M. I.; TUCKERMAN, R.; DONG, Q. A pitfall of the 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5 (3-carboxymethoxyphenol)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium (MTS) assay due to evaporation in wells on the edge of a 96 well plate. **Biotechnology letters**, v. 27, n. 11, p. 805-808, 2005.

PESTELL, R. G. New roles of cyclin D1. **The American journal of pathology**, v. 183, n. 1, p. 3-9, 2013.

PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, v. 72, n. S3, p. 962-970, 1993.

PIVATTO, M. Espectrometria de massas aplicada aos estudos de biossíntese de alcalóides de *Senna spectabilis*. 2010.

PIVATTO, M. et al. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Screening of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* (Fabaceae) extracts: fast identification of new constituents and co-metabolites. **J. Braz. Chem. Soc.** v. 16, n. 6b, p. 1431–1438, 2005

PIVATTO, M. et al. Antimalarial activity of piperidine alkaloids from *Senna spectabilis* and semisynthetic derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 10, p. 1900-1906, 2014.

PRIGENT, C.; DIMITROV, S. Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?. **Journal of cell science**, v. 116, n. 18, p. 3677-3685, 2003.

QIAN, L. et al. Saikosaponin A-induced cell death of a human CHC cell line (HUH-7): The significance of the "sub-G1 peak" in a DNA histogram. **Pathology International**, v. 45, n. 3, p. 207-214, 1995.

QIN, X. et al. Effects of matrine on HepG2 cell proliferation and expression of tumor relevant proteins in vitro. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 3, p. 275-281, 2010.

RAFIEIAN-KOPAEI, M. Medicinal plants and the human needs. **J Biol**, v. 35, p. 635-9, 2011.

REINHARDT, H. C.; SCHUMACHER, B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 3, p. 128-136, 2012.

RESNITZKY, D.; REED, S. I. Different roles for cyclins D1 and E in regulation of the G1-to-S transition. **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 7, p. 3463-3469, 1995.

ROBERTS, L.; GORES, G. J. Hepatocellular Carcinoma: Molecular Pathways and New Therapeutic Targets. **Seminars in Liver Disease**. v. 25, n. 2, p. 212-225, 2005

RODRIGUES, R. S. et al. The genus *Senna* (Leguminosae, Caesalpinioideae) in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 1, p. 1-16, 2005.

SAXENA, N. K. et al. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 6, p. 2497–2507, 2007.

SAHAI, E. Mechanisms of cancer cell invasion. **Current opinion in genetics & development**, v. 15, n. 1, p. 87-96, 2005.

SANSORES-PERAZA, P. et al. Cassine, an antimicrobial alkaloid from *Sennaracemosa*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 6, p. 690-692, 2000.

SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 294-297, 2004.

SCHLESSINGER, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. **Cell**. v. 110, n. 22, p.669–72, 2002

SCHNEIDER, M. J. Chapter Two Pyridine and piperidine alkaloids: An update. **Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives**, v. 10, p. 155-299, 1996.

SEKI, S. et al. Expression of the retinoblastoma gene product in human hepatocellular carcinoma. **Human pathology**, v. 26, n. 4, p. 366-374, 1995.

SHERR, C. J. G1 phase progression: cycling on cue. **Cell**, v. 79, n. 4, p. 551-555, 1994.

SHI, Y. et al. Polyphyllin I induced-apoptosis is enhanced by inhibition of autophagy in human hepatocellular carcinoma cells. **Phytomedicine**, v. 22, n. 13, p. 1139-1149, 2015.

SHIRAHA, H.; YAMAMOTO, K.; NAMBA, M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). **International journal of oncology**, v. 42, n. 4, p. 1133-1138, 2013.

SIEGEL, A. B.; ZHU, A. X. Metabolic syndrome and hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v. 115, n. 24, p. 5651-5661, 2009.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2015. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5-29, 2015.

SIMILE, M. M. et al. Down-regulation of c-myc and Cyclin D1 genes by antisense oligodeoxy nucleotides inhibits the expression of E2F1 and in vitro growth of HepG2 and Morris 5123 liver cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 3, p. 333-341, 2004.

STEHN, J. R. et al. A novel class of anticancer compounds targets the actin cytoskeleton in tumor cells. **Cancer research**, v. 73, n. 16, p. 5169-5182, 2013.

STICKEL, F. Alcoholic cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In: **Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer**. Springer International Publishing, 2015. p. 113-130.

TABOR, E. Tumor suppressor genes, growth factor genes, and oncogenes in hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma. **Journal of Medical Virology**, v.42, n. 4. p.357-365, 1994.

TAKASHI, M. et al. Bcl-2 prevents doxorubicin-induced apoptosis of human liver cancer cells. **Hepatology Research**. v.25, p. 192-201, 2003

TAKANO, S. et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B and C: a prospective study of 251 patients. **Hepatology**, v. 21, n. 3, p. 650-655, 1995.

THORGEIRSON, S. S.; GRISHAM, J. W. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Nature Genetics**. v. 31, n.4, p. 339-346, ago. 2002

TOYOSHIMA, H.; HUNTER, T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. **cell**, v. 78, n. 1, p. 67-74, 1994.

TU, S. Origin of Cancer. In: **Origin of Cancers**. Springer US, 2010. p. 33-42.

UEDA, Y. et al. Protein Kinase C  $\delta$  Activates the MEK-ERK pathway in a manner independent of Ras and Dependent of Raf. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 271, n.38, p. 23512-23519. 1996

VALENTE, V. et al. Selection of suitable housekeeping genes for expression analysis in glioblastoma using quantitative RT-PCR. **BMC molecular biology**, v. 10, n. 1, p. 17, 2009.

VASEVA, A. V. et al. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. **Cell**, v. 149, n. 7, p. 1536-1548, 2012.

VERMES, I.; HAANEN, C.; REUTELINGSPERGER, C. Flow cytometry of apoptotic cell death. **Journal of immunological methods**, v. 243, n. 1, p. 167-190, 2000.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

VERRILLS, N. M. et al. Proteome analysis of Vinca Alkaloid Response and Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia Reveals Novel Cytoskeletal alterations. **The Journal of Biological Chemistry**. v.278, n.46, p.45082-45093, 2003.

VIEGAS JUNIOR, C. et al. Further Bioactive Piperidine Alkaloids from the Flowers and Green Fruits of *Cassia spectabilis*. **Journal of natural products**, v. 67, n. 5, p. 908-910, 2004.

VIEGAS JUNIOR, C. et al. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279-1286, 2006.

VILLANUEVA, A. et al. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. **Seminars in Liver Disease**, v. 27, n. 1, p. 55–76, 2007.

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 314-322, 2011.

WALDMAN, T.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. **Cancer research**, v. 55, n. 22, p. 5187-5190, 1995.

WANG, P.; HENNING, S. M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. **PloS one**, v. 5, n. 4, p. e10202, 2010.

WANTAE, K.; MINSEONG, K.; EEK-HOON, J. Wnt/beta-catenin signalling: from plasma membrane to nucleus. **Biochemical Journal**, v. 450, n. 1, p. 9-21, 2013.

WEIHRAUCH, M. et al. High prevalence of K-ras-2 mutations in hepatocellular carcinomas in workers exposed to vinyl chloride. **International archives of occupational and environmental health**, v. 74, n. 6, p. 405-410, 2001.

WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323-330, 1995.

WHITTAKER, S.; MARAIS, R.; ZHU, A. X. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. **Oncogene**, v. 29, n. 36, p. 4989–5005, 2010.

XIONG, Y. et al. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. **Nature**, v. 366, n. 6456, p. 701-704, 1993.

YAMAGUCHI, H.; CONDEELIS, J. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1773, n. 5, p. 642-652, 2007.

YANG, J. et al. Evodiamine inhibits STAT3 signaling by inducing phosphatase shatterproof 1 in hepatocellular carcinoma cells. **Cancer letters**, v. 328, n. 2, p. 243-251, 2013.

YEWALE, C. et al. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer: a review of trends and strategies. **Biomaterials**, v. 34, n. 34, p. 8690-8707, 2013.

YOO, S. et al. Inhibition of proliferation and induction of apoptosis by tetrandrine in HepG2 cells. **Journal of Ethnopharmacology**. v.81, p.225-229, 2005.

YUEN, M. et al. Expression of c-myc, c-fos and c-jun in hepatocellular carcinoma. **Cancer**, v.91, n.1, p.106-112, 2001.

ZHENG, B.; WANG, X.; MA, T. Inhibitory effect of piperine on human HepG2 hepatocarcinoma cell in vitro. **Chinese Journal of Laboratory Diagnosis**, v. 2, p. 011, 2012.

**ANEXO**

ANEXO A – Artigo Científico Publicado na Íntegra



## Alkaloids derived from flowers of *Senna spectabilis*, (–)-cassine and (–)-spectaline, have antiproliferative activity on HepG2 cells for inducing cell cycle arrest in G1/S transition through ERK inactivation and downregulation of cyclin D1 expression



Rodrigo Machado Pereira<sup>a</sup>, Guilherme Álvaro Ferreira-Silva<sup>a</sup>, Marcos Pivatto<sup>b</sup>, Luciana de Ávila Santos<sup>c</sup>, Vanderlan da Silva Bolzani<sup>c</sup>, Daniela Aparecida Chagas de Paula<sup>d</sup>, Jaqueline Carvalho de Oliveira<sup>e</sup>, Cláudio Viegas Júnior<sup>f</sup>, Marisa Ionta<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, zip code 37130-000 Alfenas, MG, Brazil

<sup>b</sup> Nucleus of Research in Natural Products (NuPPeN), Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Avenida João Naves de Ávila, 2121, zip code 38408-144 Uberlândia, MG, Brazil

<sup>c</sup> Institute of Chemistry, State University of São Paulo, Rua Francisco Degni s/n, zip code 14801-970 Araraquara, SP, Brazil

<sup>d</sup> Laboratory of Phytochemistry and Medicinal Chemistry (LFQM), Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, zip code 37130-000 Alfenas, MG, Brazil

<sup>e</sup> Institute of Natural Science, Federal University of Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, zip code 37130-000 Alfenas, MG, Brazil

<sup>f</sup> Laboratory of Research on Medicinal Chemistry (PeQuiM), Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, Av. Jovino Fernandes Sales, 2600, zip code 37130-000 Alfenas, MG, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 September 2015

Received in revised form 17 November 2015

Accepted 22 November 2015

Available online 23 November 2015

#### Keywords:

Hepatocellular carcinoma

Cell cycle arrest

(–)-Cassine

(–)-Spectaline

Piperidine alkaloids

*Senna spectabilis*

### ABSTRACT

Cancer is one of the most critical problems of public health in the world and one of the main challenges for medicine in this century. Unfortunately, most patients are diagnosed at advanced stage, when the treatment options are palliative. Consequently, the search for novel therapeutic options is imperative. In the context, the plants represent an important source for discovering of novel compounds with pharmacological potential including antineoplastic agents. Herein, we aimed to investigate *in vitro* antiproliferative and cytotoxic potentials of an alkaloid mixture derived from *Senna spectabilis*, (–)-cassine (**1**) and (–)-spectaline (**2**). These alkaloids reduced cell viability in a concentration-dependent manner of six tumor cell lines. From initial screening, HepG2 cells were selected for further investigations. We show that alkaloids **1/2** have an important antiproliferative activity on HepG2 cells due to their ability in inducing cell cycle arrest in G1/S transition. This effect was associated to ERK inactivation and down-regulation of cyclin D1 expression. In addition, we evidenced a disruption of the microfilaments and microtubules in a consequence of the treatment. Taken together, the data showed by the first time that alkaloids **1/2** strongly inhibit cell proliferation of hepatocellular carcinoma cells. Therefore, they represent promise antitumor compounds against liver cancer and should be considered for further anticancer *in vivo* studies.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Cancer is one of the most critical problems of public health in the world and one of the main challenges for medicine in this century. According to GLOBOCAN 2012, an estimated million new cancer cases and 8.2 million deaths occurred in 2012 worldwide. Incidence rates for all cancers combined in economically developed countries are nearly twice as high as in economically developing countries in both males and females (Torre et al., 2012).

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the second most common cause of death from cancer worldwide (Bum et al., 2010) and, unfortunately, many cases are still diagnosed at advanced stages when treatment

options are only palliative (Lorenzi, 1998). Excessive alcohol consumption and Hepatitis B and C virus are important risk factors for HCC (Nsonde-Ntandou et al., 2005; Pivatto et al., 2005). Actually, therapeutic approaches for HCC at advanced stage include the use of multikinase inhibitors (Bruix et al., 2012); however, clinical trials have evidenced just a modest survival benefit. Accordingly, it is relevant to identify new compounds with promise antitumor activity against HCC.

Plants represent a promise source for discovery of new prototypes with pharmacological potential, because contain a wide spectrum of bioactive secondary metabolites (Viegas et al., 2006). *Senna* is one of the biggest genus of the Fabaceae family, comprising about 600 species, many of them widely used in Traditional Medicine. *Senna spectabilis* (sin. *Cassia excelsa* var. *Acutifolia*, *Cassia carnavale*, *Cassia spectabilis*) is an endemic tree of South America and Africa, very common in Brazil and Colombia (Bolzani et al., 1995; Jothy et al., 2012; Silva et al., 2010;

\* Corresponding author.

E-mail address: [marisaionta@gmail.com](mailto:marisaionta@gmail.com) (M. Ionta).