

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA
SAÚDE**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Avaliação da atividade citotóxica e indução de apoptose em
linhagem de câncer colorretal tratada com piplartina

FERNANDA DA SILVA MACHADO

Caxias do Sul

2016

FERNANDA DA SILVA MACHADO

Avaliação da atividade citotóxica e indução de apoptose em linhagem de câncer colorretal tratada com piplartina

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana
Roesch Ely

Caxias do Sul

2016

M149a Machado, Fernanda da Silva

Avaliação da atividade citotóxica e indução de apoptose em linhagem de câncer colorretal tratada com piplartina / Fernanda da Silva Machado. – 2016.

78 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2016.

Orientação: Mariana Roesch Ely.

1. Piplartina. 2. Piperaceae. 3. Câncer colorretal. 4. Citotoxicidade.
I. Ely, Mariana Roesch, orient. II. Título.

FERNANDA DA SILVA MACHADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E INDUÇÃO DE
APOPTOSE EM LINHAGEM DE CÂNCER COLORRETAL
TRATADA COM PIPLARTINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestra em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Mariana Roesch Ely

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 16 DE DEZEMBRO DE 2016.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Roesch Ely

Profa. Dra. Miriana da Silva Machado

Profa. Dra. Jaqueline Nascimento Picada

Prof. Dr. Sidnei Moura e Silva

*Dedico este trabalho a meus pais, Dailor e Maribel,
a minha irmã Diele, e ao meu namorado Cristian,
fontes inesgotáveis de estímulo e carinho
em todas as etapas desta busca pelo conhecimento.*

AGRADECIMENTOS

Ao final desse trabalho, gostaria de agradecer:

À minha orientadora, Profa. Dra. Mariana Roesch Ely, obrigada pelos ensinamentos, por me aceitar em seu laboratório e possibilitar o desenvolvimento desse projeto.

Ao Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques pelos conhecimentos adquiridos e pelo apoio constante ao nosso laboratório;

Ao Prof. Massuo Jorge Kato, da Universidade de São Paulo, pela amostra de piplartina;

Ao Prof. Sidnei Moura, pelo auxílio com a análise química;

Ao Prof. César Aguzzolli, por disponibilizar ao nosso laboratório a análise de microscopia eletrônica;

Ao Prof Sérgio Echeverrigaray e ao colega Fernando Joel Scariot, pela disponibilidade e auxílio dispensados nas análises de citometria de fluxo;

À minha coordenadora Neuza Macedo, pela flexibilização da minha rotina de trabalho no Laboratório do Círculo, permitindo que eu não deixasse de atuar nas análises clínicas para me tornar mestre;

Aos colegas do Laboratório de Gênomica, Proteômica e Reparo de DNA, pelo apoio, pela ajuda, troca de conhecimentos e amizade;

À minha família, em especial meus pais Dailor e Maribel, por serem exemplos de amor, luta e humildade. Obrigada pelo incentivo e pelo carinho, vocês significam muito e foram muito importantes durante estes dois anos da minha vida. À minha irmã Diele, pela alegria, amor e companheirismo.

Ao meu namorado Cristian, obrigada pelo amor, incentivo e pela paciência. Obrigada por estar sempre ao meu lado!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE TABELAS	9
LISTA DE ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	13
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 Câncer	17
2.1.1 Câncer colorretal	18
2.2 Morte celular	20
2.3 Estudos citotóxicos com linhagem HCT 116 proficientes e deficientes	24
2.4 Piplartina	26
2.4.1 Atividades biológicas	27
2.4.2 Atividade citotóxica	28
2.4.3. Efeito mutagênico	32
3. OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos específicos	34
4. RESULTADOS	35
4.1 CAPÍTULO 1	36
5. DISCUSSÃO	64
6. CONCLUSÕES	70
7.PERSPECTIVAS	71
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morte celular	22
Figura 2. Estrutura da pipartina	26
Figura 3. <i>Piper tuberculatum</i>	27

Capítulo I

Fig 1. Piperlongumine chemical characterization. (A) Full HRMS mass spectrum from PPLGM, showing molecular ion $[M + H]^+$ m/z 318.1356, adducts $[M + Na]^+$ and $[M + K]^+$, dimer $[2M + Na]^+$ and trimmers adducts of sodium $[3M + Na]^{2+}$ and potassium $[3M + K]^{2+}$. (B) The tandem mass MS-MS for the ion m/z 318.1356. (C) Comparison between the experimental and theoretical for the molecular ion $[M + H]^+$ with formula $C_{17}H_{20}NO_5$	56
Fig 2. Cell viability after PPLGM exposure in wild-type and deficient HCT 116 cell lines and non-tumor Hek-293 cell line. Cells were treated with different concentrations of PPLGM for 24 h and viability was measured by MTT assay. Mean \pm SD are from 3 independent experiments.....	57
Fig 3. Effects of PPLGM on colony formation in wild-type and mutant HCT 116 cells. (A) Images photographed from stained colonies. (B) Colonies counted and plotted as percentage of the control number of colonies.....	58
Fig 4. Morphologically changes in HCT 116 wild-type after 24h exposure to PPLGM. Cells were fixed and stained with Giemsa (A-F) and analyzed by scanning electron microscopy (G-L). Treated cells showed rounded morphology, membrane shrinkage, nuclear condensation and apoptotic bodies (K).....	59

Fig 5. Typical morphological changes in HCT 116 cells after PPLGM treatment stained with AO/EB. The images were taken under fluorescence microscopy at 400X. V: viable cells; AB: apoptotic bodies; MB: membrane blebbing; LA: late apoptosis; N: necrotic cell..... 60

Fig 6. Flow cytometry data after Annexin V/Propidium Iodide staining. HCT 116 cells were incubated for 24 h in the presence of 6 and 12 μ M piperlongumine, or vehicle (DMSO). Cells were then harvested by trypsinization, and stained with Annexin V/PI for analysis by flow cytometry. Annexin-V only staining early apoptotic events (bottom right quadrant) whereas dual Annexin V and PI staining indicated the late phase of apoptosis (top right quadrant). Dots in the each quadrant represent the cell population containing the information on the status of cell viability, representing percentage of cells in each quadrant..... 61

Fig 7. Flow cytometric analysis of cell cycle parameters. HCT 116 cells were incubated for 24 h in the presence of 6 and 12 μ M piperlongumine, or vehicle (DMSO). Cells were then harvested by trypsinization, fixed, and stained with propidium iodide for analysis by flow cytometry. Each histogram indicates the percent of cells in G1 (blue fraction), S (yellow fraction), and G2/M (green fraction) phases of the cell cycle. Figures were selected as representative data from three independent experiments... 62

Fig 8. DNA interaction assays. (A) Plasmidial DNA cleavage by PPLGM. Graphic representation of percentual plasmidial DNA FI (supercoiled - intact DNA) and FII (open circular - single strand break) forms after addition of PPLGM (0-30 μ M). Agarose gel bands are represented from both FI and FII forms. (B) Circular Dichroism Assay, with the CD spectra of different PPLGM concentrations represented in the graph

by wavelength absorption of polarized light. Lines represent the 9.95 to 95.24 μM doses
of PPLGM..... 63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resposta da linhagem HCT 116 selvagem e deficiente frente a diferentes compostos 23

Tabela 2. Atividade citotóxica da piplartina em linhagens tumorais (adaptada de Bezerra *et al.* 2013) 28

Capítulo I

Table 1. IC50 values obtained after 24 h exposure to PPLGM from different HCT 116 cell lines and non-tumor Hek-293. 42

Table II. IC50 values obtained after clonogenic assay 44

LISTA DE ABREVIATURAS

5-FU	5-Fluorouracil
BE	Brometo de etídeo
DC	Dicroísmo circular
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC _{50%}	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LA	Laranja de Acridina
LD	Dicroísmo linear
MS	Espectrometria de massas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PPLGM	Piplartina
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino

RESUMO

A piplartina ou piperlongumina (PPLGM) é uma amida isolada de plantas do gênero *Piper*, da qual se obtêm as pimentas. As plantas desse gênero encontram-se distribuídas pelo mundo inteiro e têm sido utilizadas medicinalmente em diferentes culturas há muitos anos. A piplartina é o composto isolado desta espécie que mais se destaca, mostrando diferentes atividades biológicas e promissoras propriedades anticancerígenas. A resistência adquirida ao tratamento convencional é muito comum no câncer colorretal, na maioria dos casos devido à perda de função nas vias de apoptose e proteínas relacionadas ao ciclo celular.

Sendo assim, buscou-se avaliar a capacidade da piplartina de induzir a morte celular na linhagem celular de carcinoma colorretal HCT 116. As células de HCT 116 selvagem e deficientes para as proteínas Bax, p21 e p53 foram tratadas com diferentes concentrações de piplartina, bem como a linhagem celular não tumoral Hek-293. Observou-se uma redução importante na viabilidade celular das células HCT 116, independentemente do estado de Bax, p21 e p53. As alterações morfológicas características de apoptose foram evidenciadas por coloração de Giemsa, microscopia eletrônica de varredura e coloração de laranja de acridina e brometo de etídeo. Para confirmar a indução de apoptose, foi realizado o ensaio de Anexina-V/PI, que evidenciou um aumento no percentual de células apoptóticas após o tratamento com piplartina, com o aumento da concentração relacionado ao aumento de células em apoptose tardia e pequeno aumento no número de células necróticas. A análise do ciclo celular mostrou alteração na distribuição tanto na linhagem selvagem quanto nas deficientes após o tratamento com a piplartina. Neste ensaio, o resultado mais expressivo foi o aumento de células na fase Sub-G0/G1, o que está relacionado à

diminuição do conteúdo de DNA devido à fragmentação e indução de apoptose. Para avaliar a interação da piplartina com o DNA foram realizados ensaios com DNA plasmidial. Nesses ensaios, não foi observada interação direta da piplartina com o DNA, evidenciando sua ação indireta sobre o mesmo, que pode estar associado ao aumento de espécies reativas de oxigênio. Os dados aqui apresentados sugerem que PPLGM trata-se de uma molécula promissora na terapia de câncer colorretal.

Palavras-chave: piplartina, apoptose, antitumoral, câncer colorretal, HCT 116

ABSTRACT

Piplartine or piperlongumine is an amide isolated from plants of the genus *Piper*, from which the peppers is obtained. Plants of this genus are distributed all over the world, and have been used medicinally in different cultures for many years. From the isolated compounds found in these species, piperlongumine is the most outstanding, showing different biological activities and promising anticancer properties. Acquired resistance to conventional treatment is very common in colorectal cancer, in most cases due to loss of function in apoptotic metabolism and cell cycle protein regulation.

Therefore, we sought to evaluate the ability of piperlongumine to induce cell death in HCT 116 colorectal carcinoma cell line. HCT 116 wild-type and lines deficient in Bax, p21 and p53 were treated with different concentrations of piperlongumine, as well as the non-tumor cell line Hek-293. A significant reduction in the cell viability of HCT 116 cells was observed, independent from Bax, p21 and p53 status. The morphological alterations from apoptosis were evidenced by Giemsa staining, scanning electron microscopy and acridine orange and ethidium bromide staining. To confirm apoptosis induction, Annexin-PI assay was performed, which evidentiates an increasing percentage of apoptotic cells after PPLGM treatment, with increasing concentrations related with higher percentage of late apoptosis stage and small increase of necrotic cells number. Cell cycle analysis showed altered distribution in both proficient and deficient cells after PPLGM treatment. In this assay, the most expressive result was the increase of Sub-G0/G1 cells phase, which is related to decrease DNA content due to fragmentation and apoptosis induction. To evaluate direct interaction of PPLGM with DNA, plasmidial DNA assays were performed. In this trials, there were no direct interaction of PPLGM with DNA observed, evidencing the indirect action of PPLGM

through the increase of reactive oxygen species. The data presented here suggest that PPLGM should be a promising molecule in colorectal cancer therapy.

Key words: piperlongumine, apoptosis, antitumoral, colorectal cancer, HCT 116

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços no campo da oncologia, o número de novos casos de tumores vem crescendo anualmente. No que se refere à terapia antitumoral, altas taxas de toxicidade e pouca seletividade têm sido reportadas. A falta de seletividade, os efeitos colaterais e a resistência encontrada em alguns tipos de tumores reforçam a necessidade do descobrimento de novos medicamentos. Nas últimas décadas, avanços nas pesquisas sobre o câncer tem proporcionado um maior entendimento da biologia e genética de seu desenvolvimento. Além disso, diversos pesquisadores têm focado seus estudos na identificação de compostos naturais capazes de conter a proliferação de células malignas e promover baixa citotoxicidade contra células não neoplásicas. Esses compostos naturais tem demonstrado potencial efeito antitumoral através da modulação de vias de sinalização de apoptose.

A piplartina (ou piperlongumina) é um composto obtido a partir das plantas do gênero *Piper*, que tem demonstrado atividade antitumoral promissora. Sua atividade citotóxica já foi descrita para diferentes linhagens de células de câncer. Dependendo do tipo de célula e da concentração utilizada, estudos mostraram que a piplartina é capaz de induzir diferentes tipos de morte celular, como apoptose, necrose e autofagia. Sua ação seletiva sobre células tumorais parece estar relacionada ao aumento de espécies reativas de oxigênio intracelular.

Até o presente, a literatura tem focado em estudos que avaliam a atividade citotóxica em células tumorais após exposição à piplartina. Efeitos em diferentes cascatas moleculares têm sido investigados quanto aos mecanismos de ação que desencadeiam estes eventos, porém ainda não se estabeleceu um consenso de como estes mecanismos moleculares se processam e se relacionam. Em busca de um melhor

entendimento dos efeitos que a piplartina promove no metabolismo celular, o presente estudo buscou avaliar células tumorais de câncer colorretal proficientes e deficientes em vias metabólicas relacionadas à sinalização de morte e ciclo celular. Neste contexto, foi investigada a atividade citotóxica e possíveis alterações de vias metabólicas relacionadas a apoptose e ciclo celular em células de câncer colorretal, proficiente (HCT 116) e deficientes em genes relacionados a essas vias (HCT 116 p53^{-/-}, HCT 116 p21^{-/-}, HCT 116 Bax^{-/-}) e não tumorais (Hek-293) expostas à piplartina.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

Câncer é o nome dado a um grupo de doenças que apresenta em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo (INCA, 2015). Ele é uma das doenças mais temidas na sociedade, devido a sua imagem associada à mortalidade e dor.

A estimativa do último GLOBOCAN, realizado em 2012, apontou 14,1 milhões de novos casos de câncer espalhados pelo mundo, sendo 65% em países em desenvolvimento (Ferlay *et al.* 2013). Para a mortalidade, foram previstos 8,2 milhões de casos relacionados à doença. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano 2030, espera-se 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes devido à patologia e 75 milhões de pessoas vivas convivendo com a doença. No Brasil, as estimativas para o biênio 2016-2017 apontam 600 mil novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes serão cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral para os homens; e os cânceres de mama, intestino, colo de útero, pulmão e estômago para as mulheres (INCA, 2015).

O câncer ocorre devido a processos como exposição a agentes mutagênicos endógenos e exógenos, comprometimento da fidelidade das DNA polimerases e falha nos mecanismos de reparo de dano de DNA (Alexandrov, 2015). Diversos agentes infecciosos também são considerados causas de câncer, como a bactéria *Helicobacter pylori*, o papilomavírus humano, os vírus da hepatite B e C, vírus Epstein-Barr, vírus da imunodeficiência humana (HIV) além de diferentes vírus do herpes humano (Parkin, 2006).

Como características, as células de câncer possuem sinalização proliferativa constante, evasão de genes supressores de crescimento, resistência à morte celular, indução de angiogênese, imortalidade replicativa e capacidade de invasão e metástase (Hanahan & Weinberg, 2011). A proliferação, sobrevivência e morte celular são controladas por diversos mecanismos complexos cuja perda da capacidade de regulação dos sinais leva ao descontrole da proliferação, contribuindo para a tumorigênese (Mester & Redeuilh, 2008).

A prevenção do câncer está profundamente relacionada à proteína supressora tumoral p53. A p53 regula a resposta ao estresse genotóxico através do controle de diversos genes que codificam proteínas envolvidas no ciclo celular (p21 e Cip1), reparo de dano de DNA e apoptose (por exemplo, Bax e Bcl-2) (Ravizza *et al.* 2004). Ao promover a parada do ciclo celular na fase G1, o chamado ponto de checagem da integridade do material genético, a proteína p53 impede a passagem da célula para a fase S, inibindo sua proliferação. Células que não codificam essa proteína continuam dividindo-se e replicando o DNA, sem pausa para o reparo de lesões no DNA (Haupt & Haupt 2006). O gene dessa proteína é o mais frequentemente mutado em todos os tipos de câncer humano. A frequência de mutações do gene p53 varia dependendo do tipo de tumor, mas em média, 55% dos tumores apresentam uma alteração no locus p53 (Reed & Quelle, 2015).

2.1.1 Câncer colorretal

Chama-se de câncer colorretal os tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto. Fatores como o envelhecimento da população, tabagismo, baixa atividade física e obesidade colaboraram para o aumento dos casos

deste tipo de câncer, que atualmente responde por 10% da mortalidade relacionada ao câncer nos países ocidentais (Kuipers *et al.* 2015). De acordo com os dados do último GLOBOCAN, o câncer colorretal é o terceiro mais comum em homens e segundo mais comum em mulheres no mundo todo, sendo que 55% dos casos ocorrem em regiões mais desenvolvidas. No Brasil, segundo dados do INCA, a estimativa para o ano de 2016 é de 34.280 novos casos, sendo 16.660 em homens e 17.620 em mulheres.

O câncer colorretal surge como resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas em células epiteliais glandulares. Essas alterações transformam o epitélio normal em tumores benignos (adenomas e pólipos) que podem evoluir para carcinoma invasivo e, eventualmente, metastático (Grady *et al.* 2014). O câncer colorretal é uma doença complexa, que apresenta forte heterogeneidade. A perda da integridade genômica facilita o acúmulo de múltiplas mutações durante o seu desenvolvimento. Alterações como instabilidade cromossômica, instabilidade de microssatélite, metilação aberrante de DNA e defeitos nos mecanismos de reparo de dano de DNA apresentam papel importante no câncer colorretal (De Rosa *et al.* 2015). A coexistência de diferentes células cancerosas no mesmo tumor pode colaborar para a resistência ao tratamento, como no caso de subclones com mutações no gene KRAS. Essas mutações tornam a proteína Ras permanentemente ativa, enviando sinais para crescimento e diferenciação celular, o que ocasiona resistência ao anticorpo anti-receptor de fator de crescimento epidérmico (Cetuximab) (Aparicio & Caldas, 2013).

A cirurgia laparoscópica é o tratamento mais indicado em casos iniciais de câncer colorretal, porém muitos pacientes são diagnosticados em estágios avançados da doença. Nesses casos, e quando houver a presença de metástase, realiza-se a cirurgia de ressecção, com necessidade de radioterapia e quimioterapia adjuvante e paliativa (Papamichael *et al.* 2015; De Rosa *et al.* 2015). No entanto, mesmo com novas opções

de tratamento, as taxas de cura e sobrevivência a longo prazo não tem mostrado alterações (Kuipers, 2015).

2.2 Morte celular

Morte celular é um grupo de complexos processos que podem ocorrer de diferentes formas, como uma resposta geral do sistema celular a um estresse ao qual a célula não foi capaz de se adaptar (Stevens *et al.* 2011). O tipo de morte celular é dependente do *status* celular (estabilidade genômica), da interação entre os fatores que induzem a morte celular e da disponibilidade de proteínas, organelas e demais fatores necessários para o determinado tipo de morte (Stevens *et al.* 2013). Em alguns casos, o mesmo tipo de estímulo pode levar a diferentes caminhos, dependendo de sua dose. Pequenas doses de radiação, calor, hipóxia e algumas drogas anticâncer podem levar à apoptose, enquanto altas doses levarão à necrose (Elmore, 2007).

A apoptose, também chamada de morte celular programada, é essencial para o crescimento e desenvolvimento humano, assim como para a manutenção da homeostase tecidual (Waerzeggers *et al.* 2011). Alterações na sua coordenação estão implicadas na tumorigênese e no desenvolvimento de resistência ao tratamento contra o câncer.

Por ocorrer de uma maneira regulada, a apoptose está associada a um padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares que incluem: formação de prolongamentos citoplasmáticos (*blebs*); encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas; fragmentação da membrana nuclear; condensação da cromatina; despolarização da membrana mitocondrial; externalização da fosfatidilserina na membrana citoplasmática; englobamento de fragmentos nucleares e formação de corpos apoptóticos (Wyllie *et al.* 1980; Melo *et al.* 2000; Curtin *et al.* 2002; Kroemer, 2010).

Os corpos apoptóticos são posteriormente reconhecidos e removidos por células fagocíticas, sem que ocorra uma resposta inflamatória no local.

A apoptose ocorre através de dois mecanismos bem caracterizados, que apresentam em comum a ativação das cascatas de caspases (Figura 1). As caspases são proteases presentes na célula como pró-enzimas inativas, sendo ativadas por clivagem proteolítica. Dentro deste grupo, encontram-se as caspases iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) responsáveis pela ativação das caspases executoras (caspases 3, 6 e 7), que então clivam proteínas vitais e do citoesqueleto, e também ativam enzimas responsáveis pela degradação do DNA (Wong, 2011). A ativação da caspase 3 é o ponto para o qual as duas vias apoptóticas convergem.

O mecanismo de apoptose pela via extrínseca é desencadeado pela interação entre um ligante externo com receptores de morte localizados na membrana celular (como os receptores de fator de necrose tumoral - TNFR). Esses receptores apresentam um domínio intracelular capaz de recrutar proteínas citoplasmáticas que se associam à pró-caspase 8 ou pró-caspase 10, formando o complexo de sinalização indutor da morte (DISC). O DISC é responsável pela ativação das pró-caspases e, conseqüentemente, da caspase 3, iniciando a cascata pró-apoptótica (Millmouno *et al.* 2014; Baig *et al.* 2016).

A apoptose por via intrínseca inicia-se no interior da célula, sendo desencadeada por sinais como dano irreparável ao DNA, hipóxia, excesso de cálcio no citosol e estresse oxidativo severo (Wong, 2011). As proteínas da família Bcl-2, com atividade pró e anti-apoptóticas, regulam essa via através do controle da permeabilização da membrana mitocondrial externa. Como resposta ao dano, proteínas como BAD, BID, BIM, NOXA, BIK ativam as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak, que se oligomerizam para formar poros na membrana mitocondrial. Como consequência, ocorre a dissipação do potencial transmembrana, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio,

parada da síntese de ATP e liberação da proteína citocromo c no citosol. O citocromo c liga-se à proteína APAF1, formando o complexo chamado apoptossomo, que cliva a pró-caspase 9, iniciando a cascata de caspases. Ao mesmo tempo, as proteínas AIF (fator de indução de apoptose) e endonuclease G (endo-G), deslocam-se para o núcleo celular e fragmentam o DNA em oligonucleossomos múltiplos de 180 e 200 pares de bases (Galuzzi *et al.* 2012). As proteínas anti-apoptóticas da família Bcl-2 (como Bcl-2, Bcl-XL e Bcl-w) bloqueiam a morte celular ao prevenir a ativação de Bax e Bak e o aumento da sua expressão tem sido encontrado em diferentes tipos de câncer (Brunelle & Letai, 2009).

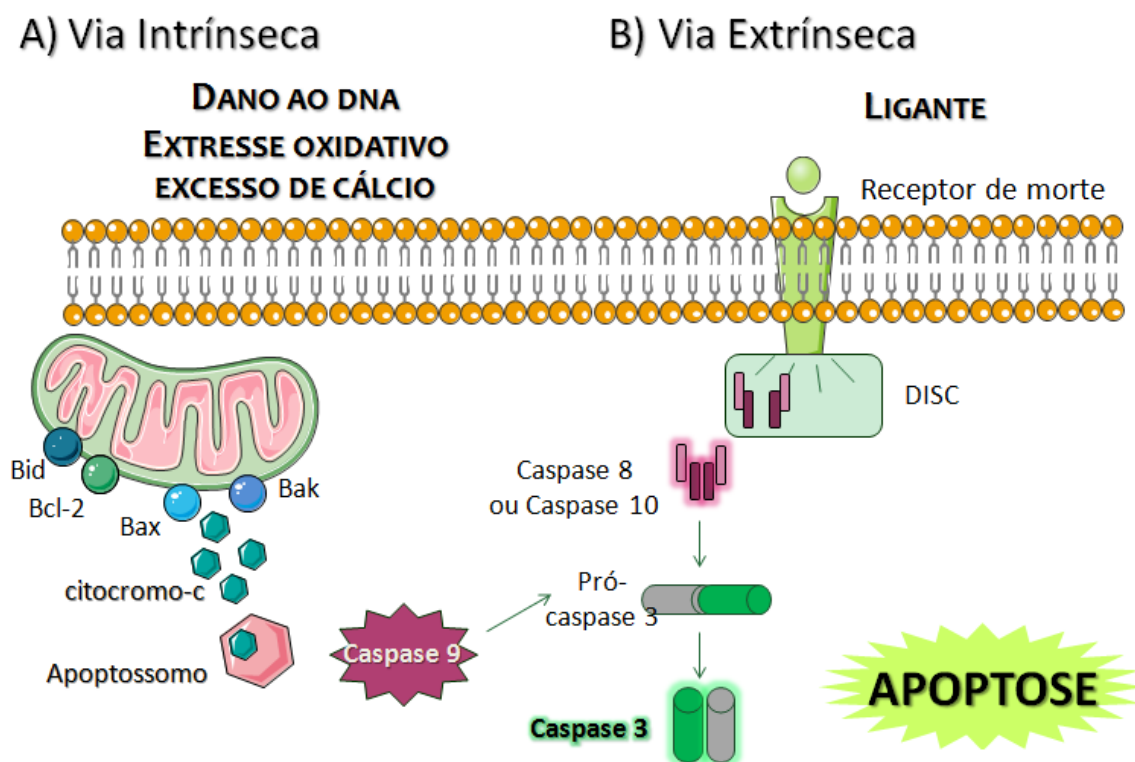


Figura 1: Vias intrínseca e extrínseca da apoptose.

Quando uma célula estiver incapacitada de morrer por apoptose (como por exemplo, quando houver baixos níveis de ATP), ela poderá sofrer um processo diferente

de morte conhecido como necrose. Esse tipo de morte celular está relacionado a causas acidentais como traumatismo, substâncias tóxicas e afecções vasculares. Durante muito tempo, a necrose foi considerada um mecanismo descontrolado ou acidental, porém sabe-se que ela também pode ocorrer de uma maneira regulada. A necrose regulada ocorre em resposta a diferentes fatores, especialmente quando o sistema das caspases está comprometido, e depende da ativação das proteínas quinases de interação com receptor RIPK1 ou RIPK3 (Galluzzi *et al.* 2012; Stevens *et al.* 2013).

As características morfológicas deste mecanismo incluem inchaço celular, disfunção (com inchaço e ruptura) da mitocôndria, ruptura da membrana celular, extravasamento do conteúdo citoplasmático para o meio extracelular e, como consequência, frequentemente está relacionada à resposta inflamatória (Jain *et al.* 2013).

O controle do ciclo celular também está relacionado à morte celular e à tumorigênese. Neste processo, destaca-se a proteína p21, uma inibidora de quinase dependente de ciclina que atua no controle do ciclo celular, inibindo a proliferação através da indução da parada do ciclo. Esta proteína desempenha um papel importante na prevenção do desenvolvimento de tumores. Através da ação sobre as quinases CDK1 e CDK2, a p21 inibe a transição da fase G1 para S e G2 para M, respectivamente. Ao ligar-se à proteína PCNA, inibe a síntese de DNA, modulando mecanismos de reparo de DNA (Abbas & Dutta, 2009).

A p21 também modula a apoptose, tendo em vista que um ciclo celular ativo é necessário para detectar agentes genotóxicos e desencadear a morte celular programada. Quando na presença de estímulos como privação de fatores de crescimento e aumento da expressão de p53, a p21 se liga a proteínas pró-apoptóticas como pró-caspase 3 e caspases 8 e 10, inibindo diretamente sua expressão. Entretanto, estudos sugerem que a p21 também possa promover a apoptose, por mecanismos dependentes e independentes

de p53, através da ativação da proteína Bax, ativação de membros da família de fator de necrose tumoral ou efeitos sobre o reparo de DNA. Porém, esses estudos mostram apenas que a apoptose ocorreu com o aumento da expressão de p21, sem determinar se ela é necessária para indução da apoptose (Abbas & Dutta, 2009).

2.3. Estudos de citotoxicidade com linhagem HCT 116 proficientes e deficientes em vias de apoptose e ciclo celular

Com a finalidade de avaliar os mecanismos envolvidos na ação antitumoral de diferentes drogas, tem-se utilizado o estudo de seus efeitos em linhagens proficientes e deficientes para genes relacionados à apoptose e ao controle do ciclo celular.

Na tabela 1, estão representados estudos com a linhagem de câncer colorretal HCT 116 selvagem (wt) e deficiente para os genes Bax (Bax -/-), p21 (p21 -/-) e p53 (p53 -/-) após exposição a diferentes extratos, compostos isolados e quimioterápicos.

Tabela 1. Resposta de HCT 116 selvagem e deficiente frente a diferentes compostos

Substância	Linhagem	Resposta	Referência
Ginseng americano	HCT 116 wt HCT 116 p21 -/-	Maior efeito antiproliferativo em HCT 116 p21 -/-	King & Murphy, 2010
Camptotecina e cisplatina	HCT 116 wt HCT 116 Bax -/-	Maior resistência ao tratamento em HCT 116 Bax -/-	Wang <i>et al.</i> 2012
Sulindaco	HCT 116 wt HCT 116 Bax -/-	Maior resistência ao tratamento em HCT 116 Bax -/-	Ravi & Bedi, 2002
5-Fluorouracil	HCT 116 wt HCT 116 Bax -/-	Maior resistência ao tratamento em HCT 116 Bax -/-	Zhang <i>et al.</i> 2000

n-Butirato	HCT 116 wt HCT 116 p21 -/- HCT 116 p53 -/-	Aumento de apoptose em HCT 116 p21 -/-	Mahyar-Roemer & Roemer, 2001
Etoposídeo		Aumento de apoptose em HCT 116 p53 -/- e p21 -/-	
Colcemida		Resistência à apoptose em HCT 116 p53 -/- e aumento de apoptose em HCT 116 p21-/-	
Cisplatina		Resistência a apoptose em HCT 116 p53 -/- e aumento de apoptose em HCT 116 p21-/-	
Resveratrol		Aumento apoptose em HCT 116 p21 -/-	
Camptotecina	HCT 116 wt HCT 116 Bax -/- HCT 116 p21 -/- HCT 116 p53 -/-	Baixa dose induz parada de ciclo celular e senescência em HCT 116 e apoptose em HCT 116 p21 -/- e p53 -/- Alta dose induz apoptose em HCT 116 p21 -/- e p53 -/-	Han <i>et al.</i> 2002
Doxorrubicina		Linhagens deficientes mais resistentes ao tratamento do que a selvagem	Ravizza <i>et al.</i> 2004
Bortezomibe		Sensibilidade igual para HCT 116 wt e p53 -/-, aumentada em HCT 116 p21 -/- e diminuída em HCT 116 Bax -/-	Yu <i>et al.</i> 2003
Noscapina	Atividade antiproliferativa e apoptótica diminuída em HCT 116 p21 -/- e p53 -/-	Aneja <i>et al.</i> 2007	
Polimetoxiflavonas (isoladas de casca de laranja)	Indução de apoptose e parada de ciclo celular mais pronunciada na linhagem selvagem	Qiu <i>et al.</i> 2011	

2.4 Piplartina

A pipartina é um alcaloide/amida (figura 2) obtido a partir das plantas do gênero *Piper*, pertencente à família Piperaceae, que se encontra distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo inteiro. As plantas deste gênero possuem valor econômico, pois de seus frutos se obtém as pimentas, como pimenta do reino (*Piper nigrum*), pimenta longa (*Piper longum* L.), pimenta-d'arda (*Piper tuberculatum* L.) e pimenta do fruto ganchoso (*Piper arborescens* Roxb.) (Parmar *et al.* 1997). As pimentas também são encontradas em gêneros pertencentes a outras famílias, como *Capsicum baccatum* (pimenta dedo-de-moça) e *Capsicum frutescens* (pimenta malagueta), da família Solenaceae e *Pimenta dioica* (pimenta da Jamaica), da família Myrtaceae (Zhang & Lokeshwar, 2012).

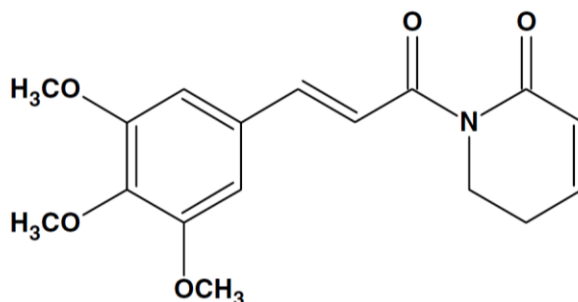


Figura 2: Estrutura molecular da pipartina

As espécies do gênero *Piper* têm sido utilizadas medicinalmente por diversas culturas. Na medicina ayurvédica indiana, a espécie *Piper longum* L. é utilizada para o tratamento de tumores, bronquites, asma, tosses, infecções respiratórias, dores de estômago, problemas no baço, entre outros. Na Malásia, a espécie *Piper arborescens* Roxb. é utilizada no tratamento do reumatismo. No nordeste brasileiro, a espécie *Piper*

tuberculatum (Figura 3) tem sido utilizada como sedativo e antídoto para veneno de serpente (Revisado por Bezerra *et al.* 2013).

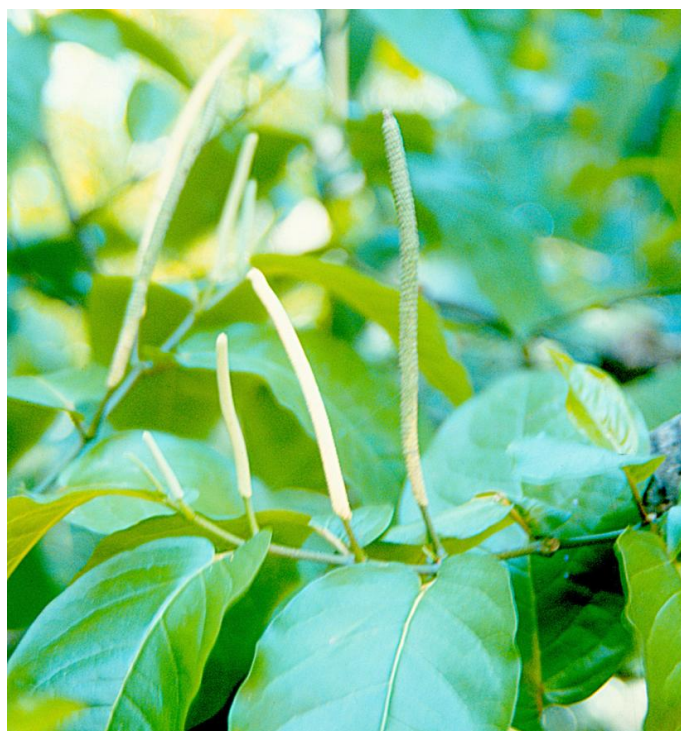


Figura 3: *Piper tuberculatum* (fonte: Dr. Massuo, USP)

Dentro dos compostos com atividade citotóxica encontrados nas piperáceas temos como exemplo as amidas, terpenos, esteroides e flavonoides, sendo que as amidas representam 53% do total de princípios ativos. A piplartina é o composto isolado mais promissor, demonstrando ampla atividade citotóxica e boa seletividade para linhagens tumorais (Bezerra *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014).

2.4.1 Atividades farmacológicas

Estudos com piplartina têm apresentado uma variedade de atividades biológicas como efeito fungicida em *Cladosporium sphaerospermum* e *Cladosporium cladosporioides* (Navickiene *et al.* 2000; Silva *et al.* 2002) e antibacteriano semelhante

ao do antibiótico ciprofloxacino em cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* (Naika *et al.* 2010). Também já foi descrito seu efeito *in vitro* contra os parasitas *Leishmania donovani* (Bodiwala *et al.* 2007), *Trypanosoma cruzi* (Contiguiba *et al.* 2009) e *Schistosoma mansoni* (Moraes *et al.* 2013).

A atividade de antiagregante plaquetária, através do bloqueio da ciclooxygenase e diminuição da formação de tromboxano A2, mecanismo semelhante ao da aspirina, também foi reportada (Park *et al.* 2007; Fontenele *et al.* 2009). A piplartina também apresentou atividade antiinflamatória através da diminuição da inflamação de vias aéreas induzida em modelo animal experimental e da redução de edema induzido por óleo de cróton em camundongos (Rodrigues *et al.* 2008). Outro estudo reportou atividade analgésica e supressora da resposta ao estresse em experimentos com estímulos elétricos e térmicos em camundongos (Yadav *et al.* 2015).

Além disso, em estudo com camundongos, a piplartina apresentou atividade ansiolítica similar ao fármaco Diazepam, com envolvimento de receptores benzodiazepínicos, e efeito antidepressivo, tornando-se promissora no tratamento de ansiedade e depressão (Felipe *et al.* 2007).

2.4.2 Atividade citotóxica

Os primeiros trabalhos conduzidos para avaliação da citotoxicidade da piplartina em células tumorais reportados na literatura foram realizados em 1990, com linhagens celulares de carcinoma nasofaríngeo humanos (KB), leucemia linfocítica murina (P-388), carcinoma de pulmão humano (A-549) e adenocarcinoma de cólon humano (HT-29) (Duh *et al.* 1990a, 1990b). Desde então, diversos grupos de pesquisadores tem

focado seus estudos nos efeitos citotóxicos da piplartina. A atividade citotóxica da piplartina para diferentes linhagens tumorais e sua relação com a concentração inibitória para 50% descrita na literatura está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: atividade citotóxica da piplartina em linhagens tumorais (adaptada de Bezerra *et al.*; 2013)

Linhagem celular	Histologia	IC_{50%} (µM)	Referência
HL-60	Leucemia promielocítica	5,3	Bezerra <i>et al.</i> (2005)
CEM	Leucemia linfocítica	4,4	
K-562	Leucemia mieloide	5,7	Bezerra <i>et al.</i> (2007)
JUKART	Leucemia linfocítica	5,3	
MOLT-4	Leucemia linfoblástica	1,7	
OPM2	Mieloma múltiplo	2,7	Yao <i>et al.</i> (2016)
MM1R	Mieloma múltiplo	0,9	
RPMI8226	Mieloma múltiplo	2,8	
NCI-929	Mieloma múltiplo	1,3	
IM-9	Mieloma múltiplo	2,1	
U266	Mieloma múltiplo	5,7	
HT-29	Carcinoma de cólon	1,4	Duh <i>et al.</i> (1990a)
HCT-8	Carcinoma de cólon	2,2	Bezerra <i>et al.</i> (2005)
HCT 116	Carcinoma de cólon	~7	Raj <i>et al.</i> (2011)
SW620	Carcinoma de cólon	~7	
DLD-1	Adenocarcinoma de cólon	~7	
B16	Melanoma	5,3	Bezerra <i>et al.</i> (2005)
MDA-MB-435	Melanoma	~7	Bezerra <i>et al.</i> (2008)
A-549	Carcinoma de pulmão	1,9	Duh <i>et al.</i> (1990a)
H1975	Carcinoma de pulmão	~7	Raj <i>et al.</i> (2011)
BT-474	Carcinoma de mama	~7	
MDA-MB-231	Carcinoma de mama	~7	
MCF7	Adenocarcinoma de mama	~14	Jin <i>et al.</i> (2014)
SF-295	Glioblastoma	~7	Bezerra <i>et al.</i> (2008)
LN229	Glioblastoma	~ 20	Liu <i>et al.</i> (2013)

U87	Glioblastoma	~15	
8MG	Glioblastoma	~ 20	
IMR32	Neuroblastoma	>25	Jyothi <i>et al.</i> (2009)
Panc-1	Carcinoma de pâncreas	~7	Raj <i>et al.</i> (2011) Raj <i>et al.</i> (2011)
Mia Paca-2	Carcinoma de pâncreas	~7	
U2OS	Osteossarcoma	~7	
SaoS-2	Osteossarcoma	~7	
EJ	Carcinoma de bexiga	~7	
PC-3	Carcinoma de próstata	~10	Kong <i>et al.</i> (2008)
LNCaP	Carcinoma de próstata	>30	
OC-2	Carcinoma oral de células escamosas	7,4	Chen <i>et al.</i> (2016)
OCSL	Carcinoma oral de células escamosas	11,3	

Segundo Bezerra e colaboradores (2007), em estudo realizado com células leucêmicas, o efeito citotóxico da piplartina parece estar relacionado com a inibição da síntese do DNA e a indução da morte celular por ambas as vias, apoptótica (pela ativação da caspase 3) e necrótica, dependendo da concentração utilizada. Em outro estudo, a piplartina causou bloqueio do ciclo celular na fase G2, seguida de fragmentação do DNA celular, induzindo a apoptose com participação da via intrínseca (Bezerra *et al.* 2008).

Raj e colaboradores (2011) reportaram que a piplartina é capaz de inibir a enzima glutathione S-transferase, induzindo a morte seletiva de células de diferentes tipos de câncer através do aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS). ROS são produtos do metabolismo celular que apresentam papel vital na indução de mecanismos de sinais, como proliferação celular e apoptose. Devido ao seu metabolismo elevado, as células cancerígenas apresentam níveis aumentados de ROS

em relação às células normais, estando assim, mais susceptíveis à morte celular induzida por estresse oxidativo (Trachootham, 2009, Nogueira e Hay, 2013).

A morte celular ocasionada pela piplartina também foi associada à indução da expressão e da acetilação de p53, embora o composto tenha causado morte celular na linhagem SaoS-2 selvagem e mutada para p53. O tratamento com piplartina foi capaz de reprimir a expressão das proteínas anti-apoptóticas BCL-2, survivin e XIAP, além de aumentar a expressão de genes pró-apoptóticos (Bim, PUMA e Noxa) e reduzir os níveis de RNA mensageiro de genes necessários para sobrevivência celular. Neste mesmo estudo, a piplartina reduziu a progressão e migração tumoral e foram identificados 12 potenciais alvos aos quais a piplartina induz citotoxicidade, estando a maioria deles relacionada à resposta ao estresse oxidativo (Raj *et al.* 2011).

Em estudos com células de carcinoma colorretal (HCT 116 e HT-29), a piplartina parece atuar, ao menos em parte, através dos mecanismos JNK e MEK/ERK, ativando as proteínas JNK e ERK, que podem induzir enzimas apoptóticas ou fosforilar fatores de transcrição que regulam a expressão de genes pró-apoptóticos (Randhawa *et al.*; 2013; Li *et al.*; 2015).

A piplartina também foi capaz de induzir a morte celular por autofagia em linhagens de câncer de próstata, mama, de colo de útero, carcinoma renal e osteossarcoma, quando na presença de inibidores de apoptose e necrose (zVAD-fmk e necrostatina, respectivamente), mostrando-se promissora em casos de resistência a drogas que induzam a apoptose (Wang *et al.* 2013; Makhov *et al.* 2014).

Estudos *in vivo*, mostraram que a piplartina é capaz de inibir o crescimento de tumor de mama e sarcoma 180 em camundongos transplantados. Através da análise histopatológica, observou-se que ela causa danos aos rins e o fígado, porém de uma maneira reversível (Bezerra *et al.* 2006; Raj *et al.* 2011).

A piplartina foi reportada com capacidade de aumentar a atividade antitumoral de drogas quimioterápicas. Quando utilizada combinada à droga 5-fluorouracil (5-FU), levou a uma diminuição no IC50 desta droga em linhagem de glioblastoma (de 2,33 para 0,49 μ M), além de reverter a leucopenia induzida pelo 5-FU *in vivo* (Bezerra *et al.* 2008). Quando combinada à droga cisplatina, a piplartina potencializou o efeito da mesma em linhagens de câncer de cabeça e pescoço aumentando a expressão de proteínas apoptóticas, e também inibiu o crescimento deste tipo de tumor *in vivo* (Roh *et al.* 2014).

2.4.3 Efeito mutagênico

Os primeiros ensaios a atividade mutagênica da piplartina demonstraram atividade sobre leveduras de *Saccharomyces cerevisiae*, com aumento de diferentes tipos de mutação (de ponto, direta - ou *foward-* e *frameshift*) (Bezerra *et al.*, 2008). Neste estudo, a piplartina também apresentou atividade genotóxica em células de fibroblastos de pulmão (V79) *in vitro*, devido ao aumento de quebras de fita dupla de DNA e parada de ciclo na fase G2/M. Esse tipo de lesão indica que as células que acumularam na fase G2/M sofrem apoptose, e as que sobrevivem, acumulam mutações explicadas pelos ensaios em *Saccharomyces cerevisiae*.

Bezerra e colaboradores (2009), reportaram que a piplartina foi capaz de induzir aberrações cromossômicas e de cromátides em células V79, indicando sua provável ação na fase G2/M do ciclo celular. Neste estudo, a piplartina ocasionou aumento da frequência de micronúcleos *in vitro* e *in vivo*, porém os resultados dos testes *in vivo* foram significativos apenas no menor tempo avaliado, indicando a atuação de mecanismos de reparo sobre os danos causados pela piplartina e apresentando

resultados semelhantes aos inibidores de topoisomerase I (camptotecina) e II (etoposídeo e ansacrina).

Okamoto *et al*, 2014 demonstraram que a piplartina causa aberrações cromossômicas em células DT40 selvagens. Ao avaliar a resposta de células DT40 deficientes nos diferentes mecanismos de reparo de DNA, foi observado que apenas linhagens deficientes para o mecanismo de reparo por recombinação homóloga apresentam sensibilidade à piplartina. Isto reforça que a citotoxicidade causada pela piplartina ocorre através da geração de quebras de fitas duplas. Neste mesmo estudo, foi observado que a piplartina torna as células DT40 selvagens hipersensíveis ao inibidor de PARP-1 Olaparib, o que mostra que a mesma também atue inibindo o mecanismo de reparo por recombinação homóloga.

3. OBJETIVOS

Avaliar a atividade citotóxica e possíveis alterações de vias metabólicas relacionadas a apoptose e ciclo celular, induzidas pela piplartina, em células de câncer colorretal (HCT 116, HCT 116 p53^{-/-}, HCT 116 p21^{-/-}, HCT 116 Bax^{-/-}) e não tumorais (Hek-293).

3.1 Objetivos específicos

- determinar a viabilidade celular em culturas de células tumorais (HCT 116, HCT 116 p53^{-/-}, HCT 116 p21^{-/-}, HCT 116 Bax^{-/-}) e não tumorais (Hek-293) frente ao efeito da piplartina;
- analisar as alterações morfológicas e indução de apoptose nas linhagens estudadas observadas após tratamento com piplartina;
- verificar a presença de dano ao DNA plasmidial e dano em DNA de células tumorais após exposição à piplartina;
- propor os prováveis mecanismos da atividade antitumoral de extratos de piplartina após exposição de linhagens de carcinoma colorretal proficientes e deficientes em genes relacionados ao controle do ciclo celular e indução de apoptose.

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de um artigo científico. O artigo intitulado “*Piperlongumine induces apoptosis in colorectal cancer HCT 116 cells independent from Bax, p21 and p53 status*” será submetido à revista *Planta Medica*.

4.1 Capítulo I

Piperlongumine induces apoptosis in colorectal cancer HCT 116 cells independent from Bax, p21 and p53 status

Fernanda da Silva Machado¹, Fernanda Mosena Munari¹, Fernando Joel Scariot², Sergio Echeverrigaray^{2,3}, Cesar Aguzzoli⁴, Claus Tröger Pich⁵, Massuo Jorge Kato⁶, Lydia Yamaguchi⁶, Sidnei Moura⁷, João Antonio Pegas Henriques^{1}, Mariana Roesch-Ely^{1*}*

Affiliation

¹ Laboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

² Laboratory of Applied Microbiology, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

³ Cytogene Molecular Diagnostics Company, RS, Brazil.

⁴ Center for Exact and Technological Sciences, University of Caxias do Sul, RS, Brazil

⁵ NITBIO Federal University of Santa Catarina, Araranguá, SC, Brazil

⁶ Nucleus of Support for Molecular Diversity Research of Natural Products, Institute of Chemistry, USP, São Paulo, SP, Brazil

⁷ Laboratory of Natural and Synthetic Products, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

* both authors contributed equally to this work

Correspondence

Prof. Mariana Roesch-Ely, Laboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, Francisco Getúlio Vargas Street, 1130, BL 57, Caxias do Sul, Brazil. E-mail: mrely@ucs.br Phone: +55 54 3218 2100
Fax: 55 54 3218 26 64

ABSTRACT

Despite advances in the oncology field, the number of new cases of colorectal tumors has been growing every year. Colorectal cancer is one of the most common types of cancer, with reported resistance to conventional treatment, in most cases due to loss of function in apoptosis and cell cycle proteins. Piperlongumine (PPLGM) is a natural alkaloid isolated from *Piper* species, with promising anti-cancer properties. The aim of this study was to investigate whether PPLGM is able to induce cell death in colorectal carcinoma HCT 116 wild-type and deficient in Bax, p21 and p53 genes cell lines. PPLGM was able to induce selective cell death in colorectal cancer cells independent from Bax, p21 and p53 status (IC50 range from 10,7 to 13,9 μM). In all cases, there was an increase of late apoptotic population, in a concentration-dependent manner. Alterations in cell cycle distribution were observed, with different profiles for wild-type and mutant cells. Plasmidial DNA analysis showed that PPLGM does not interact directly with DNA, suggesting that DNA fragmentation occurs indirectly, perhaps via ROS production. The data here presented suggests that PPLGM may be a promising molecular candidate in colorectal cancer therapy and for ongoing cancer resistance investigations.

Keywords: *Piper tuberculatum*, Piperaceae, piperlongumine, colorectal cancer, apoptosis.

Abbreviations:

HRMS - High Resolution Mass Spectrometry

IC50 - Half Maximal Inhibitory Concentration

PPLGM – piperlongumine

ROS - reactive oxygen species

Introduction

According to the last GLOBOCAN publication (2012), colorectal cancer is the third most common malignancy in men and the second in women worldwide. Chemotherapeutic resistance and toxicity found in this type of cancer reinforce the need for alternative therapies.

Secondary metabolites in plants have been studied in traditional medicine and many of them show anticancer effects by modulating cell proliferation, differentiation, apoptosis, angiogenesis and metastasis [1,2]. Noteworthy examples are the indole alkaloids vinblastine and vincristine, obtained from *Catharanthus roseus*. Both alkaloids and synthetic derivatives are commercialized for antitumor therapies, currently used in Hodgkin's lymphoma, Kaposi's sarcoma and acute lymphoblastic leukemia [3].

Extracts from Piper (pepper) plants have been used for medicinal purposes for centuries in the treatment of tumors, bronchitis, asthma, rheumatism, sedative and antidote for snake venom [4]. Piperlongumine (PPLGM) is an alkaloid found in fruits and roots from members of Piper species that shows promising anticancer activity. Raj *et al.* 2011 [5], reported that PPLGM induces cancer-selective cell death by elevating reactive oxygen species (ROS) levels, through the inhibition of antioxidant enzyme glutathione S-transferase. As cancer cells have increased ROS levels compared to normal cells, they showed more susceptibility to cell death induced by oxidative stress [6,7]. This therapeutic strategy has been extensively studied to selectively kill cancer

cells [8,9]. PPLGM also suppresses tumor growth in mice xenografts and showed antiangiogenic mechanisms [5].

Cell death induced by PPLGM has been related to apoptotic signals such as increased p53 and PUMA expression, cleaved caspase-3, decreased bcl-2 expression and DNA fragmentation [4,10]. However, some studies show that PPLGM also activates autophagy mechanism in the presence of apoptotic inhibitors [11,12]. In colon cancer cell lines, PPLGM seems to work, at least in part, through the JNK and MEK/ERK pathways, by activating JNK and ERK, which can induce apoptotic enzymes or phosphorylate transcription factors that regulate the expression of pro-apoptotic genes [13,14].

Apoptosis is a programmed cell death mechanism that occurs through two major pathways. The extrinsic pathway is induced by extracellular stress signals and is propagated by specific transmembrane receptors, while the intrinsic pathway is mediated by mitochondrial outer membrane permeabilization [15]. p53 is a tumor suppressor protein that acts as a transcription factor inducing cell cycle arrest, apoptosis or senescence when activated by cellular stress. Hundreds of target genes have been associated to p53, including the pro-apoptotic Bax and the cell cycle regulator p21 [16,17]. Bax protein is a Bcl-2 family member that inserts in the mitochondrial outer membrane upon the activation of apoptosis, releasing cytochrome c and activating caspase cascade. Bax-deficient cells are resistant to stimuli known to promote p-53 dependent apoptosis and TRAIL-induced apoptosis, which shows that Bax is also required for the extrinsic pathway [16,18]. p21 is another p53 transcription target, activated after DNA damage that temporarily arrest cells at G1 and G2 checkpoints of the cell cycle, providing enough time to repair DNA and prevent mutations [19]. p21 also acts as apoptosis modulator, showing both antiapoptotic and proapoptotic functions

through the inhibition of proteins directly involved in apoptosis induction and some unclear mechanism involving up-regulation of the pro-apoptotic protein Bax, activation of members of the tumor necrosis factor family of death receptors and effects on DNA repair [20]. Abnormalities in apoptotic function contribute to the pathogenesis of colorectal cancer and resistance to chemotherapy and radiotherapy [21]. Dysfunctional proteins and loss of function mutations in p53, p21 and Bax has been correlated with *in vitro* and *in vivo* multidrug resistance, including colorectal carcinoma cells [22,23].

In this scenario, we investigated the response of tumor cell line HCT 116 wild type and cell lines deficient for Bax, p21 and p53 proteins exposed to PPLGM to evaluate the influence of PPLGM in different cell signaling pathways involved in apoptosis dependent death mechanisms.

Results and Discussion

The 8(Z)-N-(12,13,14-trimethoxycinnamoyl)-3-pyridin-2-one known as piperlongumine is an alkaloid, which was first isolated and characterized by Navickiene *et al.* (2000). Chemical structure confirmation was performed by HRMS. Figure 1 shows the full spectra (A), in which is possible observe the molecular ion $[M + H]^+$ m/z 318.1356. The adducts $[M + Na]^+$ and $[M + K]^+$, and the dimer $[2M + Na]^+$ with m/z 340.1178; 356.0917; and 657.2465, respectively, are well evident in the spectrum. The trimers adducts of sodium $[3M + Na]^{2+}$ and potassium $[3M + K]^{2+}$ multicharger are also revealed in HRMS. The compound fragmentation at the source is evidenced with the formation of ion $[M - C_5H_6NO]^+$ with m/z 221.0821, which was confirmed by tandem mass (MS-MS). The comparison between the theoretical and experimental for the $[M + H]^+$ with formula $C_{17}H_{20}NO_5$ is displayed on C in Figure 1. The error of 6.2

ppm between the exact masses of both, and an overlap between the isotopic ratio, confirmed the elemental formula.

To evaluate the cytotoxic activity of PPLGM, the MTT assay was performed. The viability of HCT 116 and Hek-293 cell lines after 24 h treatment with PPLGM is represented in Figure 2. PPLGM induces cell death in HCT 116 cells independent from Bax, p21 and p53 status, but showed reduced cytotoxicity against the non-tumor cell line Hek-293 at concentration ≥ 10 μM . IC50 values are reported in Table 1. The resistance index (R.I.) between the IC50 from each cell line is compared with HCT 116 wild-type, showing a very similar response pathern.

Table 1: Piperlongumine IC50 values obtained after 24 h exposure in different HCT 116 cell lines and Hek-293.

Cell line	IC50 (μM)	R.I. ^a
Hek - 293	n.a.	-
HCT 116 wt	12.8 \pm 1.0	1.0
HCT 116 Bax -/-	13.9 \pm 1.3	1.1
HCT 116 p21 -/-	12.2 \pm 0.5	0.95
HCT 116 p53 -/-	10.7 \pm 0.9	0.85

^a Resistance index (R.I.) was calculated as the ratio between the IC50 values obtained for each cell line and HCT 116 wild-type. n.a. = not available.

In order to confirm the results found in MTT, a direct method to evaluate cytotoxic effect was performed. PPLGM was able to reduce significantly the clonogenic capacity of HCT 116 cells after 24 h exposure followed by 10 days in culture (Figure 3). IC50 values of PPLGM obtained from clonogenic assay are represented in Table 2.

Table 2. PPLGM IC50 values obtained after clonogenic assay

Cell lines	IC50 (μM)
HCT 116	1.22
HCT 116 Bax -/-	0.90
HCT 116 p21 -/-	1.03
HCT 116 p53 -/-	0.95

The anti-cancer effect of PPLGM has been previously reported. PPLGM was screened and showed no cytotoxicity in six non-tumor cell types, but cytotoxic effects were observed with an average IC50 of 7 μM in thirteen cancer cell lines [5]. PPLGM targets and inhibits the endogenous oxidative stress response in cancer cells, increasing ROS levels and oxidative stress. Here, the effects of PPLGM on HCT 116 colon cancer cell lines (wild-type, Bax -/-, p21 -/- and p53 -/-) and non-tumor Hek-293 cell viability were investigated and demonstrated a selective cell death pattern in cancer cells, with IC50 range from 10.7 μM to 13.9 μM . This results are similar to Randhawa *et al.* 2013 [13], which shows PPLGM is toxic toward HT-29 and HCT 116 colon cancer cells, presenting IC50 6.4 μM and 10.1 μM , respectively.

Cell lines exhibit apoptotic typical characteristics after PPLGM treatment (Figure 4). Untreated HCT 116 cells (control) exhibited normal features with typical adherent morphology. After 24 h of exposure to PPLGM, cells developed a rounded morphology, with membrane shrinkage, nuclear condensation and loss of adherence. Scanning electron microscopy highlighted the presence of apoptotic bodies, shown in Figure 4 (K, L). The AO/BE staining evidences the presence of membrane blebbing and apoptotic bodies in HCT 116 cells treated with PPLGM (Figure 5).

Control and PPLGM-treated HCT 116 cells were evaluated by flow cytometry subsequent to Annexin V and PI staining at concentration 6 μ M and 12 μ M. After 24h treatment, there was an increase in the percentage of late apoptotic/necrotic cells in PPLGM exposed cells (Figure 6). At the higher tested concentration, late apoptosis and/or necrosis events ranged from 16.5% to 37.9%.

Several studies have shown that PPLGM induces cell death through different pathways in multiple types of cancer cells [5,11-13]. In this study, apoptotic events in HCT 116 wt, Bax $-/-$, p21 $-/-$ and p53 $-/-$ HCT 116 cells exposed to PPLGM were observed and evidenced by chromatin condensation, membrane blebbing and presence of apoptotic bodies. Morphological evaluation showed that PPLGM treatment leads to membrane shrinkage, with treated cells showing rounded shapes, distinct from untreated ones. The Annexin-V/PI assay shows that HCT 116 proficient and deficient cells were induced to apoptotic and necrotic cell death, in a PPLGM concentration-dependent manner. Previous studies [14,24] also found that PPLGM treatment lead to apoptosis in HT-29 and HCT 116 colorectal cancer cell lines, via induction of ERK and JNK signaling pathways, respectively.

To determine whether PPLGM cytotoxic effect on colorectal cells was associated with induction of cell cycle arrest, cell distribution in cycle phases was analyzed by flow cytometry (Figure 7). HCT 116 wild type cells show no alterations in cell cycle distribution. This result corroborates with Li *et al.*, 2015 [14], which found no effect of PPLGM in HCT116 wild type cell cycle distribution, suggesting that the loss of viability in this cells may be attributable to cell death, but not to cell cycle withdrawal.

Interestingly, HCT 116 Bax $-/-$, HCT 116 p21 $-/-$ and HCT 116 p53 $-/-$ shows a significant increase in G2/M phase after PPLGM exposure. Cell cycle arrest at G2/M prevents cells with damaged DNA from entering mitosis, providing an opportunity for repair and stopping the proliferation of damaged cells. PPLGM also induces G2/M arrest in V79 and gastric cancer cells, with similar effects from inhibitors of both topoisomerase I (camptothecin) and II (etoposide) [25, 26]. In the present study, telomerase activity was not evaluated.

Colorectal cancer is a very common malignancy with poor prognosis, especially when diagnosed in late stages. The currently used chemotherapeutic combination agents are frequently associated with acquiring resistance, which can be related to multifactorial mechanisms, including deregulation of cell cycle and cell death pathways. Previous studies with HCT 116 Bax $-/-$ cells demonstrated that deficient cells provide partial protection against camptothecin and cisplatin and resistance to indomethacin, sulindac acid and 5-FU [27-31]. In our study, PPLGM induced apoptosis in both wild-type and Bax $-/-$ HCT 116 cells, with no significant difference between the IC50, which lead us to believe that PPLGM can be a promising candidate anticancer target against mutated tumor cells.

The p53 protein regulates the response to genotoxic stress by activation or repression of genes encoding proteins involved in cell cycle control, DNA repair and apoptosis [32]. Loss of p53 function correlates with multidrug resistance in many tumor types [33]. p21 protein can be activated by both p53 dependent and p-53 independent mechanism. p21 has significant role in modulating DNA repair processes, inhibiting cell cycle progression to allow DNA repair while inhibiting apoptosis. p21 synergizes with tumor suppressors and antagonizes with oncogenes to protect against cancer

development. Many human cancers such as colorectal and cervical are associated with reduced p21 expression [20].

Previous studies reported that PPLGM increases p53, p21 and Bax expression in colorectal carcinoma, myeloid leukemia and oral squamous carcinoma respectively [5,34,35]. In our study, PPLGM treatment induces cell death independent from Bax, p21 and p53 status, which corroborates with the fact that, although PPLGM induces the expression of these proteins, they are not fully requested in apoptotic mechanism induced by PPLGM.

To evaluate PPLGM genotoxicity, *in vitro* methods were performed using plasmid DNA and CT-DNA. Cleavage activity assay showed that in the presence of DMSO solvent PPLGM presented no significant cleavage activity on plasmid DNA (Figure 8A), with no significant increase of the open circular form of DNA (represented by FII bands). In Circular Dichroism assay, PPLGM was not able to induce differences in circularly polarized electromagnetic rays reading (Figure 8B).

Increased ROS levels can result in many types of DNA damage, including single and double-strand breaks, base modifications, deoxyribose modification and DNA cross linking. In plasmidial analysis, a DMSO solution with PPLGM showed no genotoxic effects. As DMSO is considered a ROS scavenger, this result indicates that PPLGM effects on DNA are dependent of ROS production. This result corroborates with Dhillon *et al.* 2014 [36], which found that PPLGM-induced DNA damage on pancreatic cancer cell was reversed by treating the cells with an exogenous antioxidant.

Therefore, our results shows that PPLGM is a potent antiproliferative inhibitor of HCT 116 cells, that induces apoptosis independent from Bax, p21 and p53 status,

which supports the fact that PPLGM can be a potential cancer agent and a promising candidate for ongoing cancer resistance investigations.

EXPERIMENTAL SECTION

Piperlongumine - Extraction And Purification. The 8(Z)-N-(12,13,14-trimethoxycinnamoyl)-3-pyridin-2-one - PPLGM - was provided by the Chemistry Institute of University of São Paulo (CI-USP). Briefly, PPLGM was extracted from the roots of *Piper tuberculatum* species with ethyl acetate, and from the crude extract obtained directly by methanol crystallization, generating a yield of approximately 30%. The identification was made by comparison with previously spectral data published [37,38] and chemical structure confirmation was performed by High Resolution Mass Spectrometry – HRMS.

Chemical Confirmation – High Resolution Mass Spectrometry. PPLGM was diluted in a solution of 50% (v/v) chromatographic grade acetonitrile (Tedia, Fairfield, OH, USA), 50% (v/v) deionized water and 0.1% formic acid (positive mode) at 1.0 ppm. The solution was infused directly into the ESI source by means of a syringe pump (Harvard Apparatus) at a flow rate of 10 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. The ESI(+)MS and tandem ESI(+)MS/MS (MS-2) were acquired using a hybrid High-Resolution and high accuracy (5 $\mu\text{L}/\text{L}$) microTof (Q-TOF) mass spectrometer (QII-TOF Bruker Scientific) under the following conditions: capillary and cone voltages were set to + 3500 V and + 40 V, respectively, with a de-solvation temperature of 180 °C. Diagnostic ions were identified by the comparison with theoretical results given the difference in ppm. In tandem mass MS-MS, the energy for the Collision Induced Dissociations (CID) was setting between in a range 1 to 50 eV, using N_2 as collision gas. For data acquisition and processing, the TOF control software (Bruker Scientific) was used. Data were collected

in the m/z range of 70-1000 at the speed of two scans per second providing the resolution of 50.000 (FWHM) at m/z 200. No important ions were observed below m/z 100 or above m/z 750.

Cell Culture. Hek-293 (human embryonic kidney) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. HCT 116, HCT 116 Bax $-/-$, HCT 116 p21 $-/-$ and HCT 116 p53 $-/-$ were gently provided by Annete K. Larsen (Université Pierre et Marie Curie - INSERM, Paris). Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% penicillin-streptomycin, and maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO₂. All cell lines were periodically tested for *Mycoplasma* contamination with DAPI staining.

Cell Viability Assay. Cell viability was determined by measuring the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) to formazan. HCT 116 (wild-type and deficient lines) and Hek-293 cells were seeded in 96-well plates at a density of 1×10^4 and 8×10^3 cells per well, respectively, in 10% fetal bovine serum DMEM. After cell attachment, a concentration range of 1-15 μ M was added for 24 hours. Negative controls were treated with the same amounts of DMSO solvent. After treatment, 1 mg/mL MTT dye in serum-free medium was added to wells for 2 h at 37 °C in humidified 5 % CO₂ atmosphere. MTT solution was removed, the formazan violet product was dissolved in 100 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO), and absorption was determined at 570 nm (Spectra Max190, Molecular Devices, USA). IC₅₀ values were determined using equation previously described in literature [39].

Clonogenic Assay. HCT 116 cells were seeded in a 6-well plate at a density of 4×10^2 cells/well and treated with 0.5; 1; 1.25; 1.5; 2 μ M of PPLGM. After 24 h, cells were

washed with PBS, and supplemented medium was added to wells for 10 days. Subsequently, the medium was removed, and cells were fixed for 5 min with 2 mL of methanol then rinsed with water. Cell colonies were stained for 10 min in 2 ml of 1% crystal violet solution, washed once again with water, and then counted.

Cell Morphology Assays By Giemsa And Scanning Electron Microscopy. HCT 116 cells were seeded in rounded coverslips in 24-well plates at a 5×10^4 cells per well. After cell attachment, the medium was removed and PPLGM was added to the wells for 24 hours. For Giemsa staining, cells were fixed with methanol for 5 minutes, then received 10% Giemsa stain for 10 minutes. The coverslips were washed with distilled water and analyzed in light microscopy. For the scanning electron microscopy (SEM), the treatment was removed from the wells and a 3% glutaraldehyde solution was added for 15 minutes, followed with PBS and dehydrated with crescent concentrations of ethanol (30% to 100%) for 10 minutes each. The coverslips were removed from the wells, coated with gold and examined in a SHIMADZU Superscan SS-500 scanning electron microscope (SEM).

Apoptosis Assay By Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. HCT 116 cells were seeded in a 6-well plate and treated with 6 μM and 12 μM concentrations of PPLGM. After 24 h, cells were washed with PBS, detached from the wells with trypsin and resuspended in 50 μL of PBS. Cells were stained with 100 $\mu\text{g/mL}$ acridine orange and 100 $\mu\text{g/mL}$ ethidium bromide and viewed in an Olympus BX43 fluorescent microscope. Acridine orange penetrates normal and early apoptotic cells with intact membranes and shows green fluorescent. Ethidium bromide only entered cells with membrane damage, such as late apoptotic and necrotic cells, emitting orange-red fluorescence. Negative controls were treated with DMSO.

Flow Cytometry Of Cell Death And Cell Cycle. HCT 116 cells (5×10^5 per well) were seeded into 6 well plates culture flasks with supplemented culture medium. After 24 h, tumor cells were treated with 6 μM and 12 μM of PPLGM for 24 h. The negative control groups were treated with the same amount of DMSO solution used for treatment. For cell death assay, cells were stained with propidium iodide using Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (APOAF, Sigma, USA), according to manufacturer's instruction. For cell cycle distribution, cells were trypsinized and collected for centrifugation (1800 rpm for 7 min) in PBS. Cell pellets were gently resuspended, fixed in ice-cold 70% ethanol and stored overnight at $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Prior to analysis, cells were collected by centrifugation to remove ethanol, gently resuspended in PBS and re-pelleted. Cells were then resuspended, Triton X-100 in PBS was added for permeabilization, followed by incubation with RNase A and propidium iodide in the dark for 30 min at room temperature. Cells were then analyzed by flow cytometry using a BD FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson LTDA). Data were collected by CellQuest Pro software (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo (TreeStar, Inc). Experimental procedures were performed in triplicate.

Plasmid Cleavage Activity Assays. Plasmid DNA pBSK II (Stratagene) was obtained and purified according to standard techniques [40]. The DNA cleavage ability of piperlongumine, diluted in 100% DMSO, were examined in order to establish the influence of concentration in the conversion of pBSK II supercoiled DNA form I (F I) to the open circular form II (F II) and linear DNA form II (F III) using agarose gel electrophoresis to separate the cleavage products. Experiments were conducted with 300 ng of pBSK II DNA ($\sim 30\text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ bp) in 10 mmol L⁻¹ Hepes Buffer pH 7.5 treated with PPLGM diluted at 0, 1, 5, 10, 15, 20 and 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ concentrations, in a final concentration of 1% of the solvent at 37° C, in absence of light (AL) for 16 hours. All

the assays were conducted using freshly prepared solutions and included control reactions with 1% DMSO, without complex, to serve as a reference of spontaneous plasmid DNA fragmentation. Thereafter, each reaction was quenched by adding 4 μL of a loading buffer solution (50 mmol L⁻¹ Tris-HCl pH 7.5, 0.01% bromophenol blue, 50% glycerol, and 250 mmol L⁻¹ EDTA) and then subjected to electrophoresis on a 1.0% agarose gel containing 0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of ethidium bromide in 0.5 X TBE buffer (44.5 mmol L⁻¹ Tris pH 8.0, 44.5 mmol L⁻¹ boric acid, and 1 mmol L⁻¹ EDTA) at 90 V for 1.5 h. The resulting gels were visualized and digitized using a DigiDoc-It gel documentation system (UVP) (KODAK). The proportion of plasmid DNA in each band was quantified using Kodak Molecular Imaging Software 5.0 (Carestream Health). The quantification of supercoiled DNA (F I) was corrected by a factor of 1.47, since the ability of ethidium bromide to intercalate into this DNA topoisomeric form is decreased relative to open circular and linear DNA [41]. The results are expressed as graphic representations of concentration order to maximize the Form II (open circular) plasmid DNA.

Circular Dichroism (CD) DNA Interaction Assay. CD is a method able to detect alterations in optical activity of chiral molecules using its interaction with circularly polarized electromagnetic rays. The B-form conformation of Calf Thymus DNA(CT-DNA) shows two CD bands in the UV region, a positive band at 278 nm due to base stacking and a negative band at 246 nm due to polynucleotide helicity. The experiments were performed as described in the literature with small modifications [42]. One sample of 2000 μM CT-DNA in 10 mM of HEPES buffer were titrated with PPLGM diluted in 100% DMSO in concentrations ranging from 9.95 to 95.24 μM (molar ratios of 0.03 to 0.25) and 0 (negative control). The screenings were realized ranging from 220 to 600 nm at 37 °C immediately after the addition of the complexes. Results were plotted on

tables and graphics and spectra containing only growing concentrations of piperlongumine or DNA with growing concentrations of solvent (DMSO) were performed as control reactions.

Statistical Analysis. Results were expressed as mean \pm standard deviation obtained from three independent experiments. Statistical significance was evaluated using t-test and one way analysis of variance (ANOVA) with post hoc multiple comparisons procedure (Tukey test) to assess statistical differences in normal distribution. Significance was accepted at p lower than 0,05 using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 20.0) for Windows.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge Seong-Su Han, Ph.D, from Iowa University for assisting with PPLGM dilution protocol. The authors also thank the LCMicro-UCS and Cytogene Molecular Diagnostics Company, Lajeado, RS, Brazil.

Conflict of Interest Disclosure

The authors declare no conflict of interest.

References

- [1] Lu JJ, Bao JL, Chen XP, Huang M, Wang YT. Alkaloids Isolated from Natural Herbs as the Anticancer Agents. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012; 1-12
- [2] Ovadje P, Roma A, Steckle M, Nicoletti L, Arnason JT, Pandey S. Advances in the research and development of natural health products as main stream cancer therapeutics. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015; 2015, 1-12
- [3] Keglevich P, Hazai L, Kalaus G, Szántay C. Modifications on the Basic Skeletons of Vinblastine and Vincristine. *Molecules* 2012; 17, 5893–5914

- [4] Bezerra DP, Pessoa C, Moraes MO, Saker-Neto N, Silveira ER, Costa-Lotufo LV. Overview of the therapeutic potential of piplartine (piperlongumine). *Eur. J. Pharm Sci* 2013; 48, 453-463
- [5] Raj L, Ide T, Gurkar AU, Foley M, Schenone M, Li X, Tolliday NJ, et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. *Nature* 2011; 475, 231-234
- [6] Pelicano H, Carney D, Huang P. ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist Updat* 2004; 7, 97-110
- [7] Fruehauf JP, Meyskens FL. Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clin Cancer Res* 2007; 13, 789–794
- [8] Trachootham D, Alexandre J, Huang P. Targeting cancer cells by ROS- mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? *Nat Rev Drug Discov* 2009; 8, 579-591
- [9] Panieri E, Santoro MM. ROS homeostasis and metabolism: a dangerous liason in cancer cells. *Cell Death Dis*, advance online publication 9 July 2016; doi: 10.1038/cddis.2016.105
- [10] Kong EH, Kim YJ, Kim YJ, Cho HJ, Yu SN, Kim KY, et al. Piplartine induces caspase-mediated apoptosis in PC-3 human prostate cancer cells. *Oncol. Rep* 2008; 20, 785-792
- [11] Wang Y, Wang JW, Xiao X, Shan Y, Xue B, Jiang G, et al. Piperlongumine induces autophagy by targeting p38 signaling. *Cell Death and Disease*, advance online publication 3 October 2013; doi: 10.1038/cddis.2013.358.
- [12] Makhov P, Golovine K, Teper E, Kutikov A, Mehrazin R, Corcoran A, et al. Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signaling and mediates cancer cell death. *Br J Cancer* 2014; 110, 899-907
- [13] Randhawa H, Kibble K, Zeng H, Moyer MP, Reindl KM. Activation of ERK signaling and induction of colon cancer cell death by piperlongumine. *Toxicology in Vitro* 2013; 27, 1626-163
- [14] Li W, Wen C, Bai H, Wang X, Zhang X, Huang L, et al. JNK signaling pathway is involved in piperlongumine-mediated apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells. *Oncology Letters* 2015; 10, 709-715
- [15] Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19, 107-120
- [16] Hemann MT, Lowe SW. The p53–Bcl-2 connection. *Cell Death Differ* 2006; 13, 1256–1259

- [17] Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008; 27, 6507-6521
- [18] Zhu S, Li T, Tan J, Yan X, Zhang D, Zheng C, et al. Bax is Essential for Death Receptor-Mediated Apoptosis in Human Colon Cancer Cells . *Cancer Biother Radiopharm* 2012; 27, 577-581
- [19] Gartel A. Is p21 an oncogene? *Mol Cancer Ther* 2006; 5, 1385-1386
- [20] Abbas T, Dutta A. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. *Nat Rev Cancer* 2009; 9, 400-414
- [21] Watson AJ. Apoptosis and colorectal cancer. *Gut* 2004; 53, 1701-1709
- [22] Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, et al. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997, 275, 967-969
- [23] Herr I, Debatin KM. Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy. *Blood* 2001; 98, 2603-2614.
- [24] Mojžišová G, Kello M, Pilátová M, Tomečková V, Vašková J, Vaško L, et al. Antiproliferative effect of β -escin - an in vitro study. *Acta Biochimica Polonica* 2016; 63, 79-87.
- [25] DiPaola R. To Arrest or Not To G2-M Cell-Cycle Arrest. *Clin Can Res* 2002; 8, 3311-3314
- [26] Zhang WH, Poh A, Fanous AA, Eastman A. DNA damage-induced S phase arrest in human breast cancer depends on Chk1, but G2 arrest can occur independently of Chk1, Chk2 or MAPKAPK2. *Cell Cycle* 2008; 7, 1668-1677
- [27] Wang C, Youle RJ. Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak. *Oncogene* 2012; 31, 3177-3189
- [28] Ravi R, Bedi A. Requirement of BAX for TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of colorectal cancers: Synergism with sulindac-mediated inhibition of Bcl-xL. *Cancer Res* 2002; 62, 1583-1587
- [29] Zhang L, Yu J, Park BH, Kinzler KW, Vogelstein B. Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. *Science* 2000; 290, 989-992
- [30] Deng, Y, Lin Y, Wu X. TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABLO. *Genes Dev* 2012; 16, 33-45
- [31] Gillissen B, Wendt J, Richter A, Richter A, Mürer A, Overkamp T, et al. Endogenous Bak inhibitors Mcl-1 and Bcl-xL: differential impact on TRAIL resistance in Bax-deficient carcinoma. *J C Biol* 2010; 188, 851-862

- [32] Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews of Cancer* 2002; 2, 594-604
- [33] Wallace-Brodeur RR, Lowe SW. Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55, 64-75
- [34] Xiong XX, Liu JM, Qiu XY, Pan F, Yu SB, Chen XQ. Piperlongumine induces apoptotic and autophagic death of the primary myeloid leukemia cells from patients via activation of ROS-p38/JNK pathways. *Acta pharmacologica Sinica* 2015; 36, 362-374
- [35] Chen SY, Liu GH, Chao WY, Shi CS, Lin CY, Lim YP, et al. Piperlongumine Suppresses Proliferation of Human Oral Squamous Cell Carcinoma through Cell Cycle Arrest, Apoptosis and Senescence. *Intl Journal Mol Sci* 2016; 17, 616-630
- [36] Dhillon H, Chikara S, Reindl KM. Piperlongumine induces pancreatic cancer cell death by enhancing reactive oxygen species and DNA damage. *Toxicol Reports* 2014; 1, 309–318
- [37] Navickiene HM, Alécio AC, Kato MJ, Bolzani VD, Young MC, et al. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 2000; 55, 621-626
- [38] Silva RV, Navickiene HM, Kato MJ, Bolzani VDAS, Meda CI, et al. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 2002; 59, 521-527
- [39] Monks A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83, 757-766
- [40] Silva PP, Guerra W, Silveira JN, Ferreira AMDC, Bortolotto T, Fischer FL, et al. Two New Ternary Complexes of Copper(II) with Tetracycline or Doxycycline and 1,10-Phenanthroline and Their Potential as Antitumoral: Cytotoxicity and DNA Cleavage. *C. Inorg. Chem* 2011; 50, 6414–6424
- [41] Ausubel DDMFM, Brent R, Kingston RE. *Short protocols in molecular biology: a compendium of methods from current protocols in molecular biology*. 2nd edition. *Acta Biotechnol.*, 13:88 2002.
- [42] Bortolotto T, Silva PP, Neves A, Pereira-Maia EC, Terenzi H. Photoinduced DNA Cleavage Promoted by Two Copper(II) Complexes of Tetracyclines and 1,10-Phenanthroline. *Inorg. Chem* 2011; 50, 10519–10521.

Figures

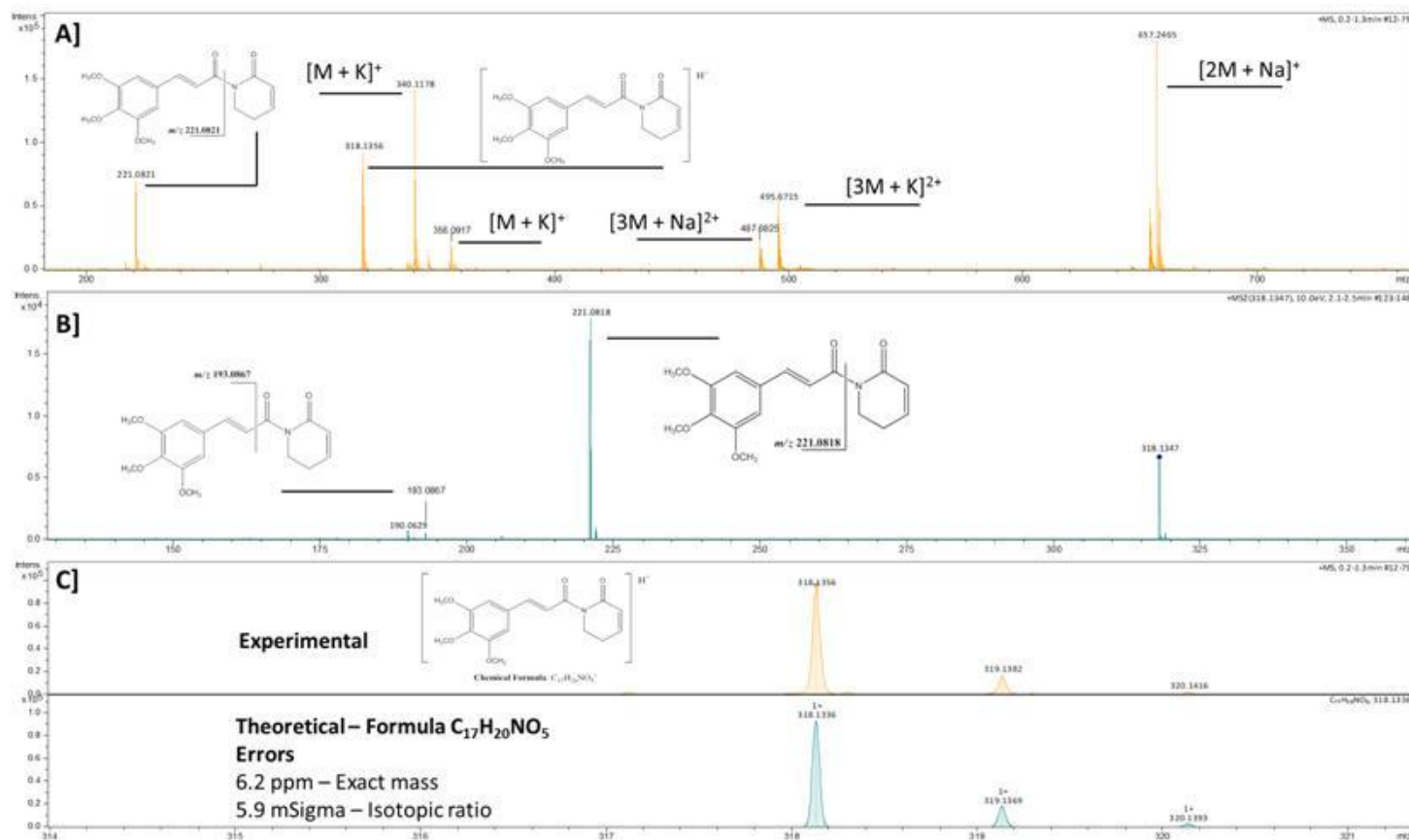


Fig 1. Piperlongumine chemical characterization. (A) Full HRMS mass spectrum from PPLGM, showing molecular ion $[M + H]^+$ m/z 318.1356, adducts $[M + Na]^+$ and $[M + K]^+$, dimer $[2M + Na]^+$ and trimmers adducts of sodium $[3M + Na]^{2+}$ and potassium $[3M + K]^{2+}$. (B) The tandem mass MS-MS for the ion m/z 318.1356. (C) Comparison between the experimental and theoretical for the molecular ion $[M + H]^+$ with formula C₁₇H₂₀NO₅.

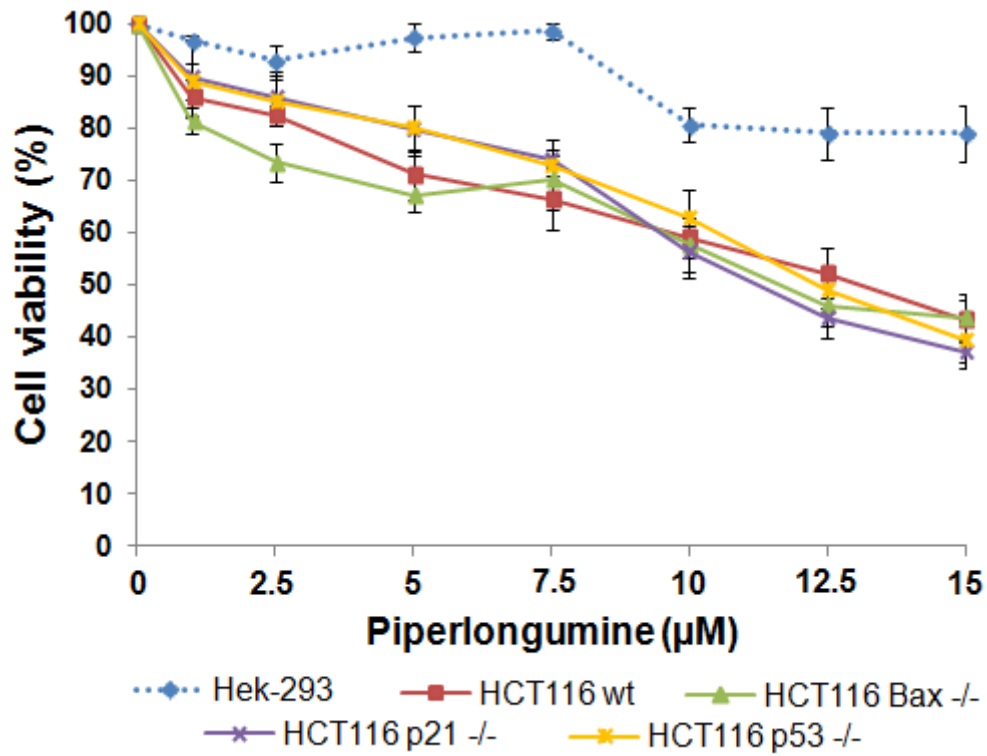


Fig 2. Cell viability after PPLGM exposure in wild-type and deficient HCT 116 cell lines and non-tumor Hek-293 cell line. Cells were treated with different concentrations of PPLGM for 24 h and viability was measured by MTT assay. Mean \pm SD are from 3 independent experiments.

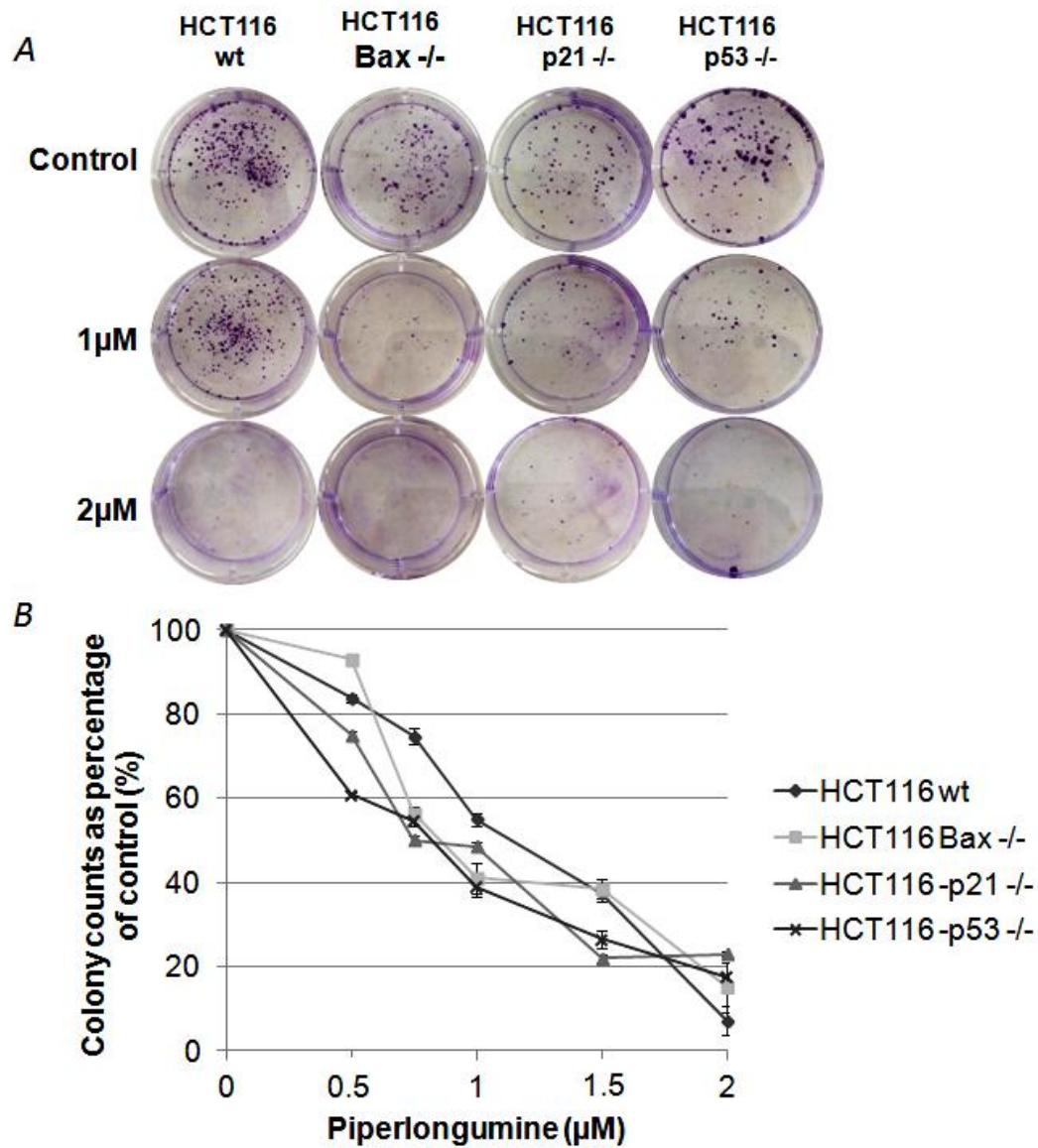


Fig 3. Effects of PPLGM on colony formation in wild-type and mutant HCT 116 cells. (A) Images photographed from stained colonies. (B) Colonies counted and plotted as percentage of the control number of colonies.

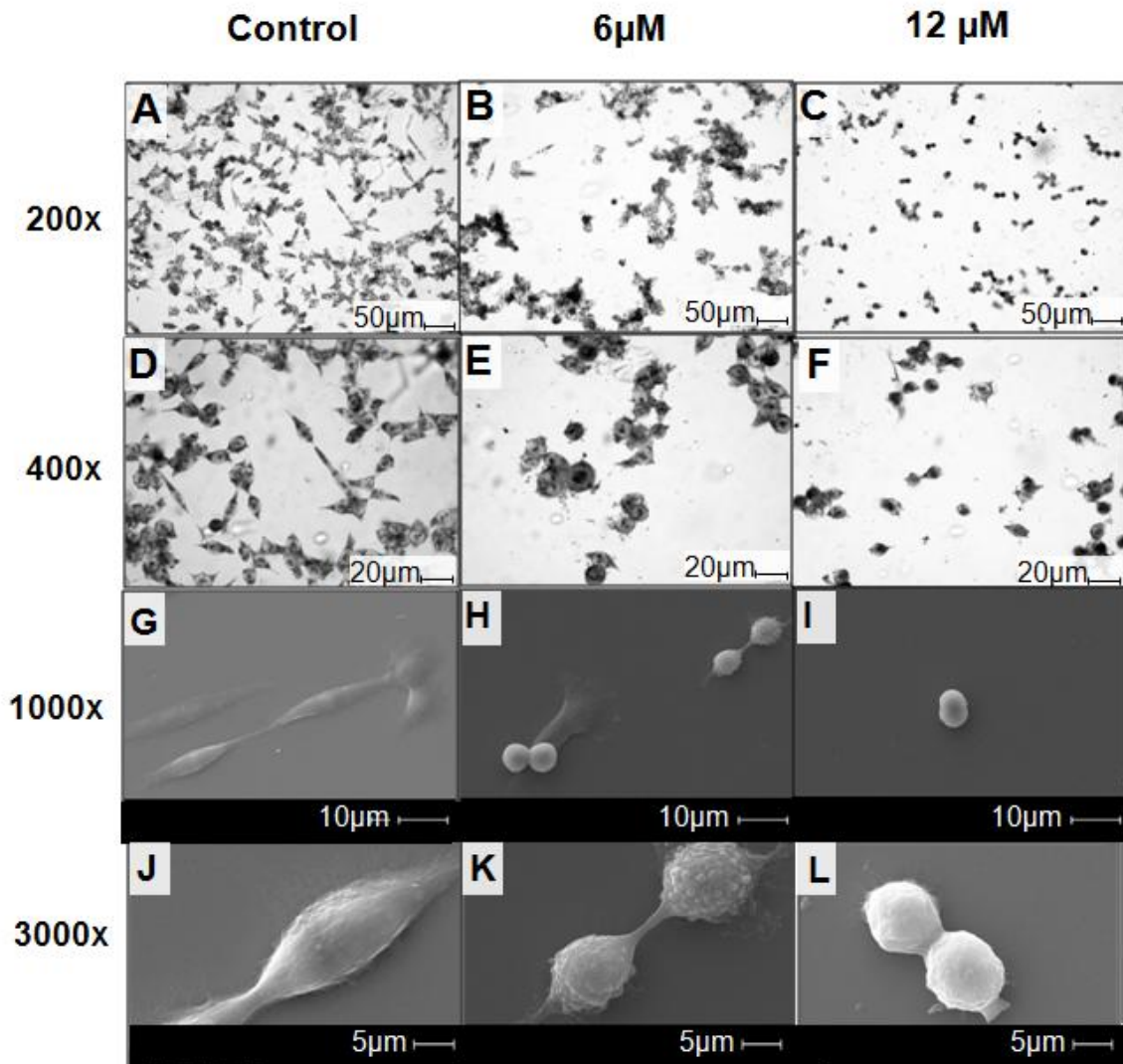


Fig 4. Morphologically changes in HCT 116 wild-type after 24h exposure to PPLGM. Cells were fixed and stained with Giemsa (A-F) and analyzed by scanning electron microscopy (G-L). Treated cells showed rounded morphology, membrane shrinkage, nuclear condensation and apoptotic bodies (K).

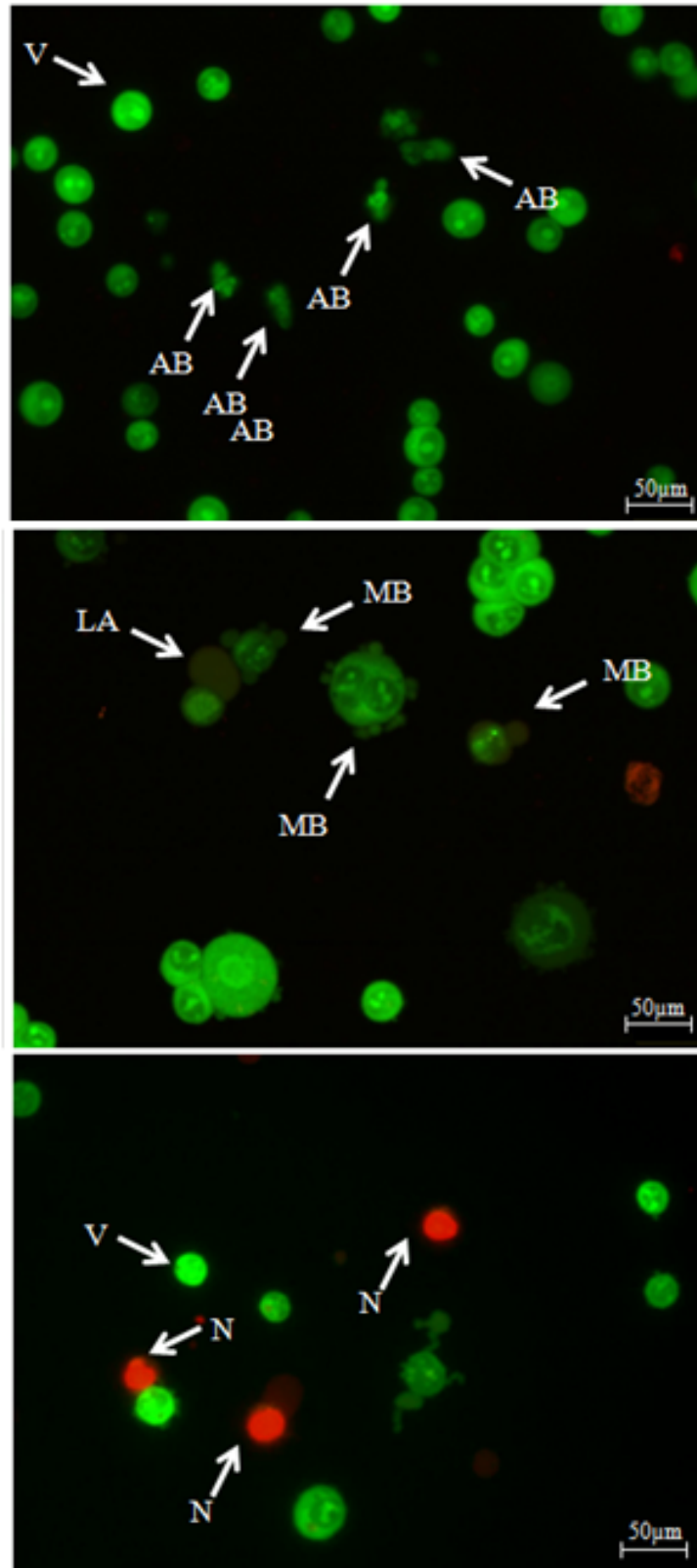


Fig 5. Typical morphological changes in HCT 116 cells after PPLGM treatment stained with AO/EB. The images were taken under fluorescence microscopy at 400X. V: viable cells; AB: apoptotic bodies; MB: membrane blebbing; LA: late apoptosis; N: necrotic cell.

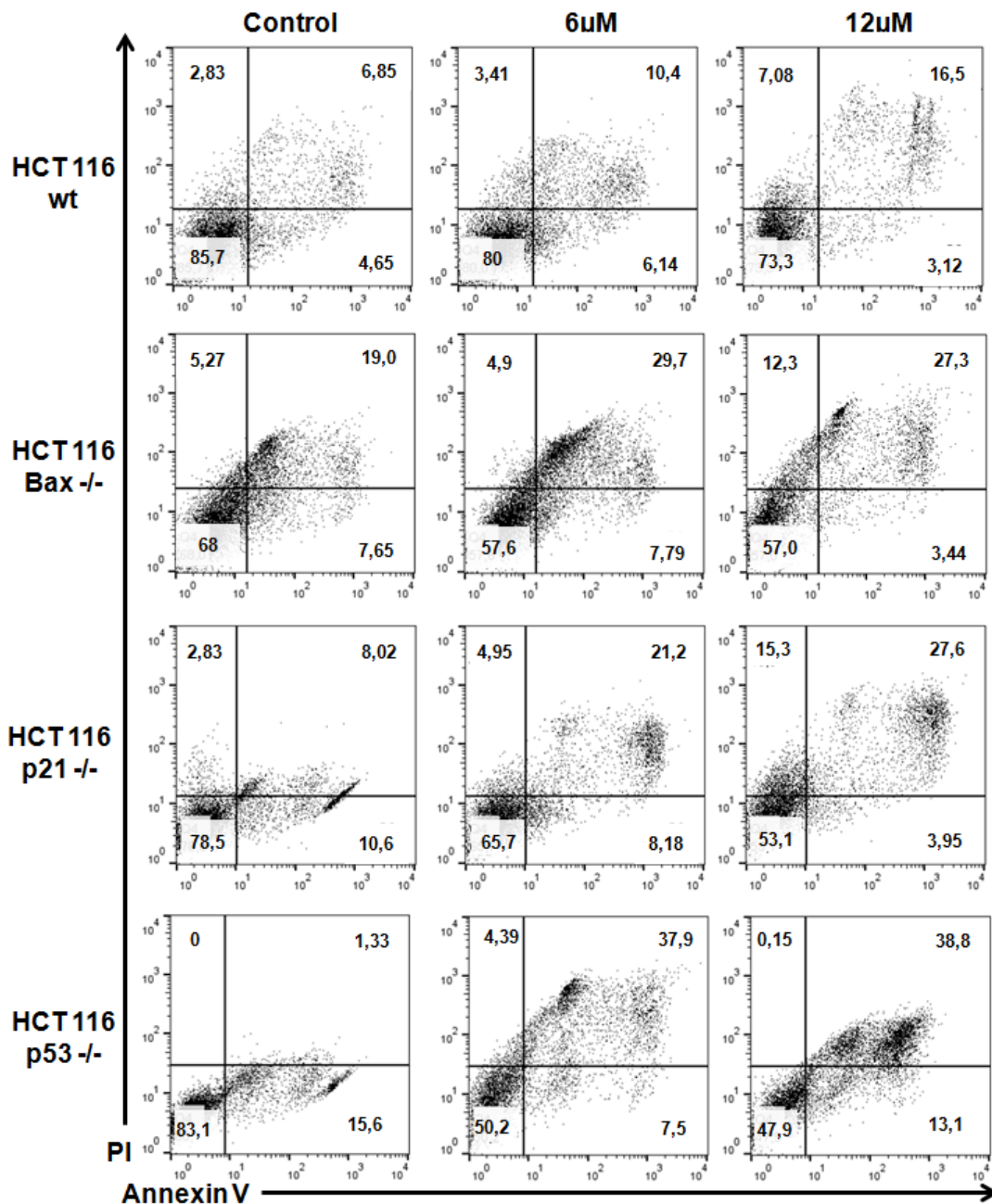


Fig 6. Flow cytometry data after Annexin V/Propidium Iodide staining. HCT 116 cells were incubated for 24 h in the presence of 6 and 12 μ M piperlongumine, or vehicle (DMSO). Cells were then harvested by trypsinization, and stained with Annexin V/PI for analysis by flow cytometry. Annexin-V only staining early apoptotic events (bottom right quadrant) whereas dual Annexin V and PI staining indicated the late phase of apoptosis (top right quadrant). Dots in the each quadrant represent the cell population containing the information on the status of cell viability, representing percentage of cells in each quadrant.

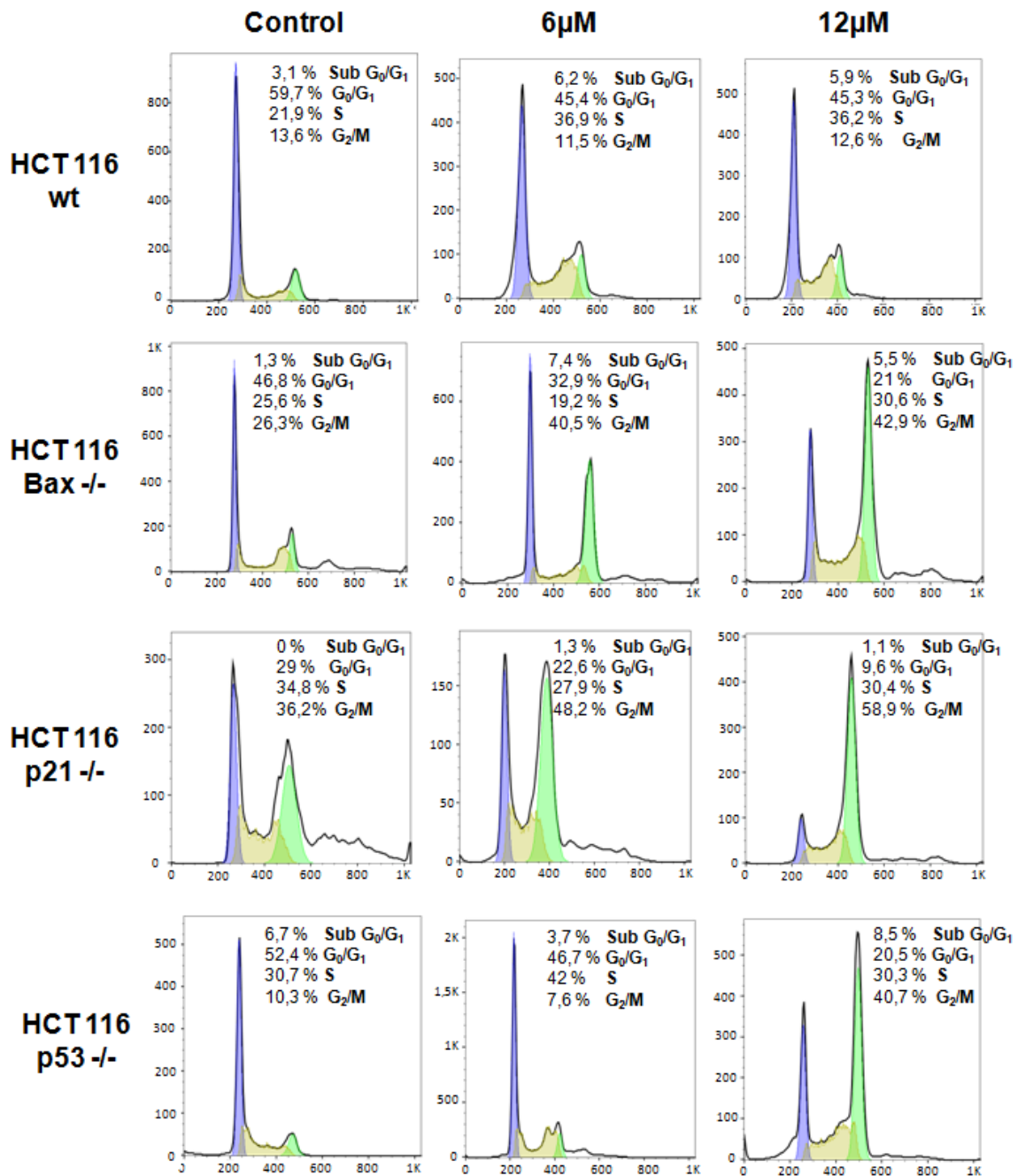


Fig 7. Flow cytometric analysis of cell cycle parameters. HCT 116 cells were incubated for 24 h in the presence of 6 and 12 μ M piperlongumine, or vehicle (DMSO). Cells were then harvested by trypsinization, fixed, and stained with propidium iodide for analysis by flow cytometry. Each histogram indicates the percent of cells in G₁ (blue fraction), S (yellow fraction), and G₂/M (green fraction) phases of the cell cycle. Figures were selected as representative data from three independent experiments.

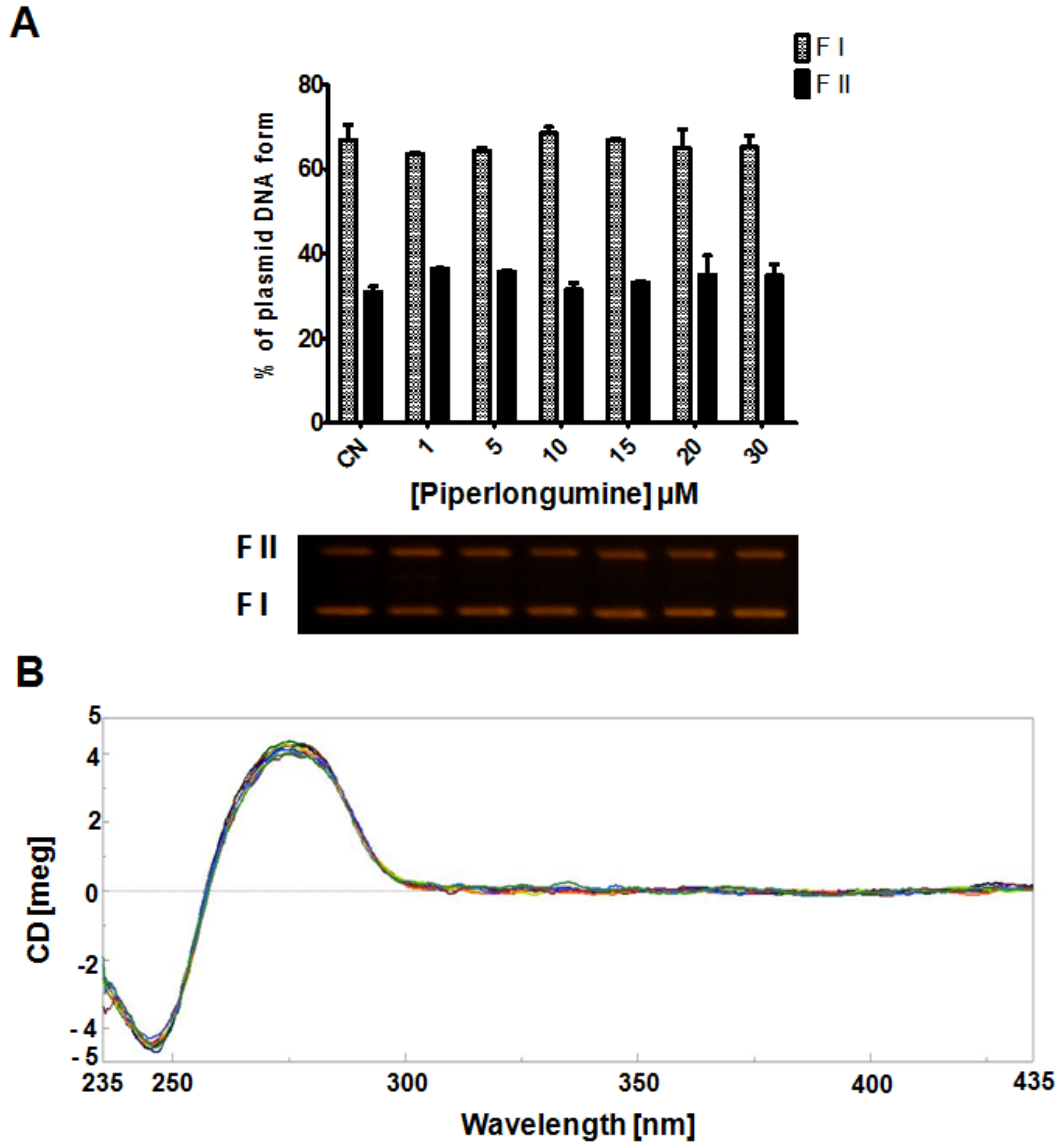


Fig 8. DNA interaction assays. (A) Plasmidial DNA cleavage by PPLGM. Graphic representation of percentual plasmidial DNA FI (supercoiled - intact DNA) and FII (open circular - single strand break) forms after addition of PPLGM (0-30 μM). Agarose gel bands are represented from both FI and FII forms. (B) Circular Dichroism Assay, with the CD spectra of different PPLGM concentrations represented in the graph by wavelength absorption of polarized light. Lines represent the 9.95 to 95.24 μM doses of PPLGM.

5. DISCUSSÃO GERAL

Os produtos naturais têm sido utilizados na prevenção e no tratamento de diversas doenças ao longo da história. Além de atuarem como agentes terapêuticos, as plantas medicinais também são fontes importantes para pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. No que diz respeito ao câncer, compostos naturais têm sido reportados na prevenção da tumorigênese e supressão do crescimento de tumores já estabelecidos.

Atualmente, mais de 50% das terapias antitumorais são derivadas de fontes naturais como a actinomicina D, paclitaxel, vincristina e vimbastina, ou mimetizam produtos naturais, como dexametasona, etoposídeo e tamoxifeno (Ovadje *et al.* 2015). Extratos e compostos isolados de plantas do gênero *Piper* têm sido estudados como agentes anticancerígenos, apresentando atividade citotóxica e antitumoral. Os alcaloides/amidas representam 53% dos compostos com atividade, sendo que, entre eles, a piplartina mostra-se a mais promissora, com citotoxicidade reportada para dezenas de linhagens cancerígenas e atividade antitumoral em modelos animais (Wang *et al.* 2014).

Neste estudo, foi possível observar que a piplartina, um alcaloide/amida obtido a partir das raízes da planta *Piper tuberculatum*, apresentou efeito citotóxico dose-dependente seletivo para a linhagem HCT 116 de carcinoma colorretal, com baixa citotoxicidade para a linhagem não-tumoral de epitélio de rim (Hek-293). Em 2011, Raj e colaboradores relacionaram o efeito seletivo da piplartina em linhagens tumorais ao aumento de espécies reativas de oxigênio. Tendo em vista que as células tumorais apresentam, muitas vezes, níveis basais mais elevados de ROS em relação a células normais, elas tornam-se mais vulneráveis a agentes que induzam aumento de ROS. A literatura aponta a existência de outros compostos que também demonstram atividade *in*

vitro e *in vivo* através do aumento de ROS, como isocianato de fenetilo, partenólídeo, erastin e lamperisona (Adams *et al.* 2013).

Os estudos publicados até o momento com uso de células de câncer colorretal tratadas com piplartina abordam a atividade deste composto em linhagens proficientes. O estudo com linhagens deficientes em vias de apoptose e ciclo celular, entretanto, propicia uma avaliação de alterações em vias metabólicas, apresentando resultados diferenciados quanto ao mecanismo de sinalização celular observado nas linhagens proficientes. Nas últimas duas décadas, estudos conduzidos com linhagens HCT 116 deficientes mostraram fatores de maior sensibilidade e resistência quanto a exposição a diferentes compostos, conforme listados na Tabela 2 deste documento. A partir dos dados listados nesta tabela, é possível notar uma diferença bastante expressiva entre os efeitos que cada composto gera em um modelo celular. Aproximadamente 50% dos cânceres colorretais apresentam mutações que inativam as proteínas p53 e Bax (Iacopetta, 2003; Ionov *et al.* 2000). Estudos anteriores utilizando a linhagem HCT 116 e outras drogas mostram que a deficiência das proteínas Bax, p21 e p53 pode trazer respostas diferentes em relação à linhagem proficiente, incluindo resistência ao tratamento (Ravi & Bedi, 2002; Ravizza *et al.* 2004; Wang *et al.* 2012).

Raj e colaboradores (2011) encontraram um aumento da expressão da proteína p53 na linhagem HCT 116 wt tratada com piplartina. O aumento da expressão das proteínas Bax e p21 em células de leucemia mielóide e carcinoma escamoso oral também já foi reportado (Xiong *et al.* 2015; Chen *et al.* 2016). Neste contexto, o presente estudo buscou avaliar o comportamento de linhagens HCT 116 deficientes para Bax, p21 e p53. Como o p53 é capaz de ativar a proteína pró-apoptótica Bax e a proteína p21, diferenças em padrões de sinalização celular induzida após exposição a piplartina foram observadas. O ensaio de Anexina-V/PI mostrou um aumento do

percentual de células em apoptose e necrose, dependente da concentração de piplartina. Com o aumento da concentração, houve uma diminuição do percentual de células em apoptose inicial, e aumento do percentual de células em apoptose tardia e necrose em todas as linhagens estudadas.

Ao analisar a atividade da piplartina sobre o ciclo celular, pode-se observar que a linhagem HCT 116 selvagem não apresentou alterações após o tratamento, resultado que corrobora com Li e colaboradores (2015). Já as linhagens deficientes para as proteínas Bax, p21 e p53 apresentaram parada de ciclo na fase G2/M após o tratamento com a piplartina. A parada do ciclo na fase G2/M ocorre para prevenir que células com DNA danificado entrem em divisão, estando relacionada a danos causados por quebra de dupla fita de DNA (DiPaola, 2002; Zhang *et al.* 2008).

Os ensaios clássicos de citotoxicidade, avaliação morfológica e indução de apoptose apresentados neste estudo, mostraram que a piplartina foi capaz de inibir proliferação nas células HCT 116 selvagem e deficientes para as proteínas Bax, p21 e p53, com valores de IC50 muito próximos. Através da coloração de Giemsa, da microscopia eletrônica e do ensaio de laranja de acridina e brometo de etídeo, foram detectados eventos apoptóticos nas células HCT 116 selvagem e deficientes para as proteínas Bax, p21 e p53 expostas à piplartina. Essas metodologias permitiram avaliar a presença de condensação de cromatina, prolongamentos na membrana celular (blebs), presença de corpos apoptóticos e perda de membrana celular.

Estudos com linhagens deficientes em vias de apoptose e ciclo celular mostram que as vias de sinalização celular são alteradas após exposição a diferentes compostos. A ausência da proteína Bax está relacionada à proteção parcial ao tratamento com camptotecina e cisplatina, e resistência ao tratamento com indometacina, 5-FU e

Bortezomibe (Wang *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2000; Yu *et al.* 2003). Células HCT 116 p53 -/- mostram resistência ao tratamento com colcemida e cisplatina (Mahyar-Roemer & Roemer, 2001). Já estudos com células que não expressam as proteínas p21 e p53, apresentaram mais resistência ao tratamento com doxorrubicina (Ravizza *et al.* 2014) e noscapina (Aneja *et al.* 2007).

Estudos prévios detectaram a indução das proteínas Bax, p21 e p53 em células tumorais tratadas com piplartina (Xiong *et al.* 2015; Chen *et al.* 2016; Raj *et al.* 2011). No presente estudo, a piplartina induziu a morte em células de câncer colorretal independentemente do status de Bax, p21 e p53, o que confirma que, embora a piplartina induza a expressão dessas proteínas, elas não são indispensáveis ao mecanismo apoptótico induzido por ela.

A apoptose é considerada um mecanismo de morte celular programado, responsável pela manutenção da homeostase tecidual em organismos multicelulares. Ela ocorre sem gerar resposta inflamatória local, diferentemente da necrose. A desregulação deste mecanismo está implicada em várias doenças, incluindo formação de tumores e desenvolvimento de resistência a drogas (Millimouno *et al.* 2014). Uma vez que as vias da apoptose possam estar preferencialmente alteradas em células tumorais, drogas que atuem nesse mecanismo apresentam potencial para um efeito seletivo (Ghobrial *et al.* 2005). As células de câncer desenvolvem mecanismos de resistência à indução de apoptose, portanto a modulação da sinalização deste mecanismo por produtos naturais tem se constituído essencial na atividade antitumoral dos mesmos.

O câncer colorretal é bastante incidente e está relacionado a um prognóstico ruim, principalmente quando diagnosticado em estágios avançados. Atualmente, existem vários medicamentos disponíveis para seu tratamento, porém nenhuma droga é

considerada totalmente eficaz e segura devido à toxicidade e aos mecanismos de resistência desenvolvidos. O fenótipo de resistência está relacionado a mecanismos multifatoriais, incluindo alterações proteicas que levem à perda do controle do ciclo celular e desregulação de mecanismos de morte celular (De Rosa *et al.*, 2015)

Este estudo foi o pioneiro a observar uma indução de apoptose pela piplartina, independentemente do status de proteínas de vias de apoptose e ciclo celular, o que mostra que a mesma pode ser uma candidata promissora no tratamento de células tumorais de câncer colorretal mutadas e resistentes aos tratamentos convencionais. Ao contrário de alguns fármacos sintéticos, os compostos naturais são capazes de induzir apoptose pelo direcionamento de múltiplas vias de sinalização celular (Millimouno *et al.* 2014). A resposta citotóxica nas células deficientes para as proteínas p53, considerada a “guardiã do genoma”, Bax, importante proteína pró-apoptótica, e p21, proteína envolvida no controle do ciclo celular observada no presente trabalho, foi semelhante ao efeito observado na linhagem proficiente, o que indica que a piplartina esteja atuando em diferentes mecanismos que se compensam na ausência dessas proteínas. As linhagens selvagem e deficientes em proteínas de vias de apoptose e ciclo celular apresentam diferenças nos padrões de distribuição no ciclo celular após o tratamento com a piplartina, sendo que o resultado mais evidente foi o aumento da população na fase Sub-G0/G1 nas linhagens HCT 116 selvagem e p21 *-/-*. Esses resultados, assim como o pequeno aumento na fase G2/M encontrado em HCT 116 Bax *-/-* e na fase S encontrado em HCT p53 *-/-*, mostram a que a piplartina pode atuar através de diferentes mecanismos de regulação celular, independentemente das vias de ação dessas proteínas.

Para avaliar a interação da piplartina com o DNA, foram realizados ensaios *cell-free*, onde concentrações crescentes de piplartina são adicionadas a DNA plasmidial e

de timo de bezerro (CT-DNA). Os ensaios de clivagem de DNA plasmidial e dicróismo circular mostraram que a piplartina não interage diretamente com o DNA, pois concentrações crescentes da substância não causaram nenhuma alteração nas suas formas (superenovelada, circular e linear) ou modificação em sua conformação. Como o DMSO atua captando radicais livres, como hidroxilas, este resultado indica que a ação da piplartina sobre o DNA ocorre de forma indireta, através do já descrito aumento da produção de ROS (Santos *et al.* 2003).

Atualmente, sabe-se que a indução da morte celular por apoptose é uma estratégia terapêutica para o controle da progressão de tumores (Mester & Reduilh, 2008; Hanahan & Weinberg, 2011). Os estudos com a piplartina têm demonstrado sua importante atividade citotóxica através da ativação de diferentes vias metabólicas, porém seu mecanismo de ação ainda não está elucidado. Assim, pesquisas que buscam a compreensão de mecanismos moleculares presentes na atividade antitumoral deste composto são necessárias para promover seu desenvolvimento como agente terapêutico contra o câncer.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- ✓ A piplartina é capaz de inibir o crescimento e formação de colônias (dose-dependente) das células de carcinoma colorretal HCT 116 selvagem e deficiente das proteínas Bax, p21 e p53;
- ✓ A piplartina apresentou seletividade para células tumorais, com baixa citotoxicidade sobre células não tumorais epiteliais de rim (Hek-293);
- ✓ A indução de apoptose, independentemente do status das proteínas Bax, p21 e p53, torna a piplartina promissora no tratamento de tumores resistentes às terapias convencionais.
- ✓ A interação da piplartina com o DNA ocorre de forma indireta, muito provavelmente pela produção de ROS

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade deste trabalho seria importante:

- ✓ Avaliar a expressão das proteínas envolvidas nas vias de apoptose intrínseca e extrínseca;

- ✓ Avaliar indução de ROS em diferentes tempos de tratamento;

- ✓ Avaliar se a piplartina é capaz de induzir morte celular na linhagem HCT 116 mesmo na presença de agentes antiapoptóticos;

- ✓ Avaliar a ação citotóxica de análogos da piplartina em linhagens de câncer

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas T.; Dutta A. (2009). p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nat Rev Cancer**. 6:400-414.
- Adams D.J.; Boskovic Z.V.; Theriault J.R.; Wang A.J.; Stern A.M.; Wagner B.K.; Shamji A.F.; Schreiber S.L.(2013). Discovery of Small-Molecule Enhancers of Reactive Oxygen Species That are Nontoxic or Cause Genotype-Selective Cell Death. **ACS Chem. Biol**. 5: 923–929.
- Alexandrov, L.B.(2015). Understanding the origins of human cancer. **Science** , 350:1175-1177.
- Aneja R.; Ghaleb A.M.; Zhou J.; Yang V.W.; Joshi H.C. (2007). p53 and p21 determine the sensitivity of noscipine-induced apoptosis in colon cancer cells. **Cancer Res**. 67:3862-3870.
- Aparicio S.B.M.; Caldas C. (2013) The Implications of Clonal Genome Evolution for Cancer Medicine. **N Engl J Med**. 368:842-851.
- Baig S.; Seevasant I.; Mohamad J.; Mukheem A.; Huri H.Z.; Kamarul T. (2016). Potential of apoptotic pathway-targeted cancer therapeutic research: Where do we stand? **Cell Death Dis**. e2058, 2016.
- Bezerra D. P.; Castro F.O.; Alves A.P.; Pessoa C.; Moraes M.O.; Silveira E.R.; Lima M.A.; Elmiro F.J.; Costa-Lotufo L.V.(2006). In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from Piper. **Braz. J. Med. Biol. Res**. 39:801-807.
- Bezerra D. P.; Militão G.C.; de Castro F.O.; Pessoa C.; de Moraes M.O.; Silveira E.R.; Lima M.A.; Elmiro F.J.; Costa-Lotufo L.V. (2007). Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicol. In vitro**. 21:1-8.
- Bezerra D.P.; Castro F.O.; Alves A.P.; Pessoa C.; de Moraes M.O.; Silveira E.R.; Lima M.A.; Elmiro F.J.; de Alencar N.M.; Mesquita R.O.; Lima M.W.; Costa-Lotufo L.V. (2008a). *In vitro* and *in vivo* antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J Appl Toxicol**. 28:156-163.
- Bezerra D.P.; Moura D.J.; Rosa R.M.; Vasconcellos M.C.; Silva A.C.R.; Silveira E.R.; Moraes M.O.; Henriques J.A.P.; Costa-Lotufo L.V.; Saffi J. (2008b) Evaluation of the genotoxicity of piplartine, an alkaloid amide from *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian v79 cells, **Mutat. Res**. 652:164–174.
- Bezerra D.P.; Vasconcellos M.C.; Machado M.S.; Villela I.V.; Rosa R.M.; Moura D.J.; Pessoa C.; Moraes M.O.; Silveira E.R.; Lima M.A.S.; Aquino N.C.; Henriques

- J.A.P.; Saffi J.; Costa-Lotufo L.V. (2009). Piplartine induces genotoxicity in eukaryotic but not in prokaryotic model systems. **Mutat Res.**677:8-13.
- Bezerra D.P.; Pessoa C.; Moraes M.O.; Saker-Neto N.; Silveira E.R.; Costa-Lotufo L.V. (2013). Overview of the therapeutic potential of pipilartine (piperlongumine). **Eur. J. Pharm Sci**, 48:453-463.
- Bodiwala H.S.; Singh G.; Singh R.; Dey C.S.; Sharma S.S.; Bhutani K.K, Singh I.P.(2007). Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **J. Net. Med.** 61:418-421.
- Brunelle J.K.; Letai A. (2009). Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. **J. Cell Sci.** 122:437-441.
- Colman M.S.; Afshari C.A.; Barrett J.C. (2000). Regulation of p53 stability and activity in response to genotoxic stress. **Mutat Res.** 462:179-188.
- Contiguba F.; Regasini L.O.; Bolzani V.S.; Debonsi H.M.; Passerini G.D.; Cicarelli R.M.B, Kato M.J.; Furlan M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Med. Chem. Res.**18:703-711.
- Curtin, J. F.; Donovan M.; Cotter T.G. (2002). Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J Immunol Methods.**265:49-72.
- De Rosa M.D.; Pace U.; Rega D.; Costabile V.; Duraturo F.;Izzo P.; Delrio P. Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer (Review). **Oncol. Rep.** 34:1087-1096.
- Duh C.Y.; Wu Y.C.; Wang S.K.(1990a). Cytotoxic pyridine alkaloids from the leaves of *Piper aborescens*. **Phytochemistry.** 53:1575-1577.
- Duh C.Y.; Wu Y.C.; Wang S.K. (1990b). Cytotoxic pyridine alkaloids from *Piper aborescens*, **Phytochemistry.** 29:2689-2691.
- Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol.** 35:495-516.
- Felipe F.C.B.; Sousa-Filho J.T.; Souza L.E.O.; Silveira J.A.; Uchoa D.E.A.; Silveira E.R.; Pessoa O.D.L.; Viana G.S.B. (2007). Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine.** 14:605–612.
- Ferlay J.S.; Ervik M.; Dikshit R.; Eser S.; Mathers C.; Rebelo M.; Parkin D.M.; Forman D.; Bray F. Cancer incidence and mortality worldwide: IARC CancerBase. GLOBOCAN 2012 v10. 2013, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. **Disponível (online)** <http://globocan.iarc.fr> (25 de agosto).
- Fontenele J. B.; Leal L. K. A. M.; Silveira E. R.; Felix F. H.; Felipe C. F. B.; Viana G. S. B. (2009). Antiplatelet effects of pipilartine, an alkamide isolated from *Piper*

tuberculatum: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **J. Pharm. Pharmacol.** 61:511–515.

Galluzzi L.; Vitale I.; Abrams J.M.; Alnemri E.S.; Baehrecke E.H.; Blagosklonny M.V.; Dawson T.M.; Dawson V.L.; El-Deiry W.S.; Fulda S.; Gottlieb E.; Green D.R.; Hengartner M.O.; Kepp O.; Knight R.A.; Kumar S.; Lipton S.A.; Lu X.; Madeo F.; Malorni W.; Mehlen P.; Nuñez G.; Peter M.E.; Piacentini M.; Rubinsztein D.C.; Shi Y.; Simon H.U.; Vandenabeele P.; White E.; Yuan J.; Zhivotovsky B.; Melino G.; Kroemer G.(2012). Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." **Cell Death Differ.** 19:107-120.

Ghobrial I.M.; Witzig T.E.; Adjei A.A. (2005). Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA Cancer J Clin.** 55:178-194.

Grady W.M.; Pritchard C.C. (2014). Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. **Toxicol Pathol.** 42:124-139.

Han Z.; Wei W.; Dunaway S.; Darnowski J.W.; Calabresi P.; Sedivy J.; Hendrickson E.A.; Balan K.V.; Pantazis P.; Wyche J.H. (2002). Role of p21 in apoptosis and senescence of human colon cancer cells treated with camptothecin. **J Biol Chem.** 277:17154-17160.

Hanahan D.; Weinberg R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell,** 144:646-674.

Haupt, S.; Haupt, Y.(2006). Importance of p53 for cancer onset and therapy. **Anticancer Drugs.** 17:725-732.

Iacopetta B. (2003). TP53 mutation in colorectal cancer. **Hum Mutat.** 21:271-276.

Ionov Y.; Yamamoto H.; Krajewski S.; Reed J.C.; Perucho M. (2000) Mutational inactivation of the proapoptotic gene BAX confers selective advantage during tumor clonal evolution. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 97:10872-10877.

INCA (2015) Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil. **Disponível (on line)** <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf> . (5 de setembro).

Jain M.V.; Paczulla A.M.; Klonisch T.; Dimgba F.N.; Rao S.B.; Roberg K.; Schweizer F.; Lengerke C.; Davoodpour P.; Palicharla V.R.; Maddika S.; Los M. (2013). Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. **J Cell Mol Med.** 17:12-29.

King M.L.; Murphy L.L. (2010). Role of cyclin inhibitor protein p21 in the inhibition of HCT116 human colon cancer cell proliferation by American ginseng (*Panax quinquefolius*) and its constituents. **Phytomedicine.** 17:261-268.

- Kroemer, G. (2010). Pathophysiological implications of mitochondrial cell death control. **Bull Mem Acad R Med Belg.** 165:205-210.
- Kuipers E.J.; Grady W.M.; Lieberman D.; Seufferlein T.; Sung J.J.; Boelens P.G.; van de Velde C.J.; Watanabe T. (2015). Colorectal cancer. **Nat. Rev. Dis. Primers.** 1:
- Li W.; Wen C.; Bai H.; Wang X.; Zhang X.; Huang L.; Yang X.; Iawamoto A.; Liu H. (2015). JNK signaling pathway is involved in piperlongumine-mediated apoptosis in human colorectal cancer HCT116 cells. **Oncol Lett,** 10:709-715.
- Mahyar Roemer M.; Roemer K. (2001). p21 Waf1/Cip1 can protect human colon carcinoma cells against p53-dependent and p53-independent apoptosis induced by natural chemopreventive and therapeutic agents. **Oncogene.** 20:3387-3398.
- Makhov P.; Golovine K.; Teper E.; Kutikov A.; Mehrazin R.; Corcoran A.; Tulin A.; Uzzo R.G.; Kolenko V.M. (2014). Piperlongumine promotes autophagy via inhibition of Akt/mTOR signalling and mediates cancer cell death. **Br J Cancer.** 110:899-907.
- Melo, P. S.; Maria S.S.; Vidal B.C.; Haun M.; Durán N. (2000). Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.** 36:539-543.
- Mester J.; Redeuilh. (2008). Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy. **Anticancer Agents Med Chem.** 8:872-885.
- Millimouno F.M.; Dong J.; Yang L.; Li J.; Li X. (2014). Targeting Apoptosis Pathways in Cancer and Perspectives with Natural Compounds from Mother Nature. **J Cancer Prev.** 11: 1081-1107.
- Moraes S.J.; Keiser J.; Ingram K.; Nascimento C.; Yamaguchi L.F.; Bittencourt C.R.; Bemquerer M.P.; Leite J.R.; Kato M.J.; Nakano E. (2013). *In vitro* synergistic interaction between amide pipartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. **Curr. Med. Chem. In,** 20:301-309.
- Naika R.; Prasanna K.P.; Ganapathy P.S.S. (2010). Antibacterial activity of piperlongumine and alkaloid isolated from methanolic root extract of *Piper Longum L.* **Pharmacophore.** 2:141-148.
- Nogueira V.; Hay N. (2013). Molecular pathways: reactive oxygen species homeostasis in cancer cells and implications for cancer therapy. **Clin Cancer Res.** 19:4309-4014.
- Okamoto S.; Narita T.; Sasanuma H.; Takeda S.; Masunaga S.; Bessho T.; Tano K. (2014). Impact of DNA repair pathways on the cytotoxicity of piperlongumine in chicken DT40 cell-lines. **Genes Cancer,** 5:285-292

- Ovadge P.; Roma A.; Steckle M.; Nicoletti L.; Arnason J.T.; Pandey S. (2015) Advances in the Research and Development of Natural Health Products as Main Stream Cancer Therapeutics. **Evid Based Complement Alternat Med**, 2015:751348.
- Park B.S.; Son D.J.; Choi W.S.; Takeoka G.R.; Han S.O.; Kim T.W.; Lee S.E. (2007). Antiplatelet activities of newly synthesized derivatives of piperlongumine. **Phytother. Res.** 22:1195–1199.
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. **Int J Cancer**. 118:3030-3044.
- Parmar, V.S.; Jain S.C.; Bisht K.S.; Jain R.; Taneja P.; Jha A.; Tyagi O.D.; Prasad A.K.; Wengel J.; Olsen C.E.; Boll P.M. (1997). Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry**. 46:597-673.
- Papamichael D.; Audisio R.A.; Glimelius B.; de Gramont A.; Glynne-Jones R.; Haller D.; Köhne C.H.; Rostoft S.; Lemmens V.; Mitry E.; Rutten H.; Sargent D.; Sastre J.; Seymour M.; Starling N.; Van Cutsem E.; Aapro M. (2015). Treatment of colorectal cancer in older patients: International Society of Geriatric Oncology (SIOG) consensus recommendations 2013. **Annals of Oncology** 26:463–476.
- Qiu, P.; Guan H.; Dong P.; Li S.; Ho C.T.; Pan M.H.; McClements D.J.; Xiao H. (2011). The p53, Bax and p21 dependent inhibition of colon cancer cell growth by 5-hydroxy polymethoxyflavones. **Mol Nutr Food Res**. 55:613–622.
- Raj L.; Gurkar A.U.; Foley M.; Schenone M.; Li X.; Tolliday N.J.; Golub T.R.; Carr S.A.; Shamji A.F.; Stern A.M.; Mandinova A.; Schreiber S.L.; Lee S.W. (2011). Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**. 475:231-234.
- Randhawa H.; Kibble K.; Zeng H.; Moyer M.P.; Reindl K.M. (2013). Activation of ERK signaling and induction of colon cancer cell death by piperlongumine. **Toxicol In Vitro**.27:1626-1633.
- Ravi R.; Bedi A. (2002). Requirement of BAX for TRAIL/Apo2L-induced apoptosis of colorectal cancers: synergism with sulindac-mediated inhibition of Bcl-x(L). **Cancer Res**. 62:1583-1587.
- Ravizza R.; Gariboldi M.B.; Passarelli L.; Monti E. (2004). Role of the p53/p21 system in the response of human colon carcinoma cells to Doxorubicin. **BMC Cancer**. 4:92.
- Rodrigues S.D.; Baroni S.; Svidzinski A.E.; Bersani-Amado C.A.; Cortez D.A. (2008). Anti-inflammatory activity of the extract, fractions and amides from the leaves of *Piper ovatum Vahl* (Piperaceae). **J Ethnopharmacol**. 116:569-573.
- Roh J.L.; Kim E.H.; Park J.Y.; Kim J.W.; Kwon M.; Lee B.H. (2014). Piperlongumine selectively kills cancer cells and increases cisplatin antitumor activity in head and neck cancer. **Oncotarget**. 5:9227-9238.

- Silva R.V.; Nacickiene H.M.; Kato M.J.; Bolzani V.D.A.S, Meda C.I.; Young M.C.; Furlan, M. (2002). Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**. 59:521-527.
- Stevens J.B.; Abdallah B.Y.; Liu G.; Ye C.J.; Horne S.D.; Wang G.; Savasan S.; Shekhar M.; Krawetz S.A.; Huttemann M.; Tainsky M.A.; Wu G.S.; Xie Y.; Zhang K.; Heng H.H.Q. (2011). Diverse system stresses: common mechanisms of chromosome fragmentation. **Cell Death Dis**. 2:e178.
- Stevens J.B.; Abdallah B.Y.; Liu G.; Horne S.D.; Bremer S.W.; Ye K.J.; Huang J.Y.; Kurkinen M.; Ye C.J.; Heng H.H. (2013). Heterogeneity of cell death. **Cytogenet Genome Res**. 139:164–173.
- Trachootham D.; Alexandre J.; Huang P. (2009). Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach? **Nat Rev Drug Discov**. 8:579-591.
- Tsai I.L.; Lee F.P.; Wu C.C.; Duh C.Y.; Ishikawa T.; Chen J.J.; Chen Y.C.; Seki H.; Chen I.S. (2005). New cytotoxic cyclobutanoid amides, a new furanoid lignan and antiplatelet aggregation constituents from *Piper arborescens*. **Planta Med**. 71:535–542.
- Waerzeggers Y.; Monfared P.; Viel T.; Faust A.; Kopka K.; Schäfers M.; Tavitian B.; Winkeler A.; Jacobs A. (2011). Specific biomarkers of receptors, pathways of inhibition and targeted therapies: pre-clinical developments. **Br J Radiol**. 84:168–178.
- Wang C.; Youle R.J. (2012). Predominant requirement of Bax for apoptosis in HCT116 cells is determined by Mcl-1's inhibitory effect on Bak. **Oncogene**. 31:3177-3189.
- Wang Y.; Wang J.W.; Xiao X.; Shan Y.; Xue B.; Jiang G.; He Q.; Chen J.; Xu H.G.; Zhao R.; Werle K.D.; Cui R.; Liang J.; Li Y.L.; Xu Z.X. (2013). Piperlongumine induces autophagy by targeting p38 signaling. **Cell Death Dis**.4:e824.
- Wang Y.; Morris-Natschke S.L.; Yang J.; Niu H.; Long C.; Lee K. (2014). Anticancer Principles from Medicinal Piper (胡椒 Hú Jiāo). **Plants. J Tradit Complement Med**. 4:8-16.
- Wyllie A. H.; Kerr J.F.; Currie A.R.(1980). Cell death: the significance of apoptosis. **Int Rev Cytol**. 68:251-306.
- Wong, R. (2011). Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. **J Exp Clin Cancer Res**. 30: 87-101.
- Yadav V.; Chatterjee S.S.; Majeed M.; Kumar V. (2015). Preventive potentials of piperlongumine and a *Piper longum* extract against stress responses and pain. **J Tradit Complement Med**. 6:413-423.

Yu J.; Tiwari S.; Steiner P.; Zhang L. (2003). Differential apoptotic response to the proteasome inhibitor Bortezomib [VELCADE, PS-341] in Bax-deficient and p21-deficient colon cancer cells. **Cancer Biol Ther.** 6:694-699.

Zhang L.; Lokeshwar B.L.; (2012). Medicinal properties of the Jamaican pepper plant *Pimenta dioica* and Allspice. **Curr Drug Targets.** 13:1900-1906.

Zhang L.; Yu J.; Park B.H.; Kinzler K.W.; Vogelstein B. (2000). Role of BAX in the apoptotic response to anticancer agents. **Science.** 290:989-992.