

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA APLICADA

Naira Fernanda Zanchett Schneider

Avaliação da ação citotóxica de cardenólídeos em células tumorais

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Maria Oliveira Simões

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Schneider, Naira Fernanda Zanchett Schneider
Avaliação da ação citotóxica de cardenolídeos em células
tumoriais / Naira Fernanda Zanchett Schneider Schneider ;
orientador, Cláudia Maria Oliveira Simões Simões -
Florianópolis, SC, 2015.
254 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-
Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. cardenolídeos. 3. glucoevatromonosídeo.
4. citotoxicidade. 5. células de tumor de pulmão A549. I.
Simões, Cláudia Maria Oliveira Simões. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmácia. III. Título.

“Avaliação da ação citotóxica de cardenolídeos em células tumorais”

POR

Naira Fernanda Zanchett Schneider

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Farmácia” e aprovada em sua forma final pelo orientador e membros da comissão Examinadora.

Orientadora

Prof.^a Dr.^a Claudia Maria Oliveira Simões,
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Giordano Wosgrau Calloni
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Maria Claudia da Silva Santos
Universidade Federal de Santa Catarina

Dr. Eduardo Cremonese Filippi-Chiela
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Leandro Augusto de Oliveira Barbosa
Universidade Federal de São João Del Rei

Prof.^a Dr.^a Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC

Florianópolis, 16 de julho de 2015.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais Oto e Delma e ao meu irmão Otomar, que me apoiam incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha orientadora Cláudia Maria Oliveira Simões, por compartilhar seus conhecimentos e possibilitar todas as condições para a execução deste trabalho. Essa trajetória não teria sido a mesma sem você.

Aos colegas do laboratório Annelise de Carvalho, Ariadne Cabral da Cruz, Caroline Rigotto Borges, Clarissa Feltrin, Debora Argenta, Dóris Marques Souza, Fabiana Geller, Francielle de Souza Cardoso, Gislaine Fongaro, Izabella da Silva, Jadel Kratz, Lara Persich, Lucas Garcia, Laurita Boff, Lucas Marostica Mariana Nascimento, Mariana Silva, Mariana Pilloto, Marina Teixeira, Nicésio Delfino, Thiago Caon, Vanessa Moresco, pela paciência, conselhos, ensinamento das técnicas e companhia nas atividades do dia-a-dia. Em especial a Lara, que durante sua Iniciação Científica no LVA além de me auxiliar muito, sempre solícita e com vontade de aprender me ensinou a ter perseverança e sorrir mesmo nos momentos difíceis.

Ao Laboratório LBMCC de Luxemburgo, por terem me acolhido e auxiliado no aprendizado de uma nova rotina, em outro laboratório e em outro país. Em especial a minha supervisora Claudia Cerella e aos colegas do grupo *Cell Death*, Esma, Ayse, Berengère, Florean, Cristina, Maria Helène e Flavia por todo auxílio e as longas conversas no horário do almoço no Hospital. *Merci! Grazie! Teşekkür ederim!*

Aos técnicos do Laboratório Multiusuário Denis, Bibiana e Vanessa pela disponibilidade e ajuda durante as leituras e quantificação dos experimentos no LAMEB 1.

Aos meus pais, Oto e Delma Schneider, por estarem ao meu lado em mais uma etapa cumprida e serem exemplo de luta durante a trajetória da minha formação profissional.

Ao meu irmão Otomar, por ter se tornado meu norte, por acreditar mais em mim do que eu mesma.

Aos meus amigos que acompanharam um pouco ou muito dessa trajetória e de alguma forma sempre estiveram disponíveis a me ajudar e aconselhar nos momentos delicados, Ana Paula, Cris, Debora, Ieda e Talita, muito obrigada!!!

E a todos que participaram e contribuíram de alguma maneira para o aperfeiçoamento e conclusão deste trabalho.

“Nunca ande pelo caminho já traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram.”

Alexander Graham Bell

RESUMO

Os cardenólídeos, tais como digoxina e oubaína, são conhecidos por sua eficácia no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e como fármacos antiarrítmicos. Recentemente, foram detectadas novas atividades farmacológicas para esses "antigos" fármacos. Tendo em vista o crescente interesse na pesquisa e desenvolvimento desta classe de compostos como potenciais quimioterápicos, frente a diversas linhagens celulares tumorais, o presente trabalho de tese objetivou avaliar os efeitos citotóxicos em células tumorais de três cardenólídeos (glucoevatromonosídeo, digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina), previamente selecionados pela sua potente ação citotóxica. Inicialmente, eles foram avaliados em linhagens celulares tumorais de diferentes origens e todos demonstraram uma potente ação, em concentrações nanomolares, em todas as linhagens testadas, especialmente nas células de tumor de pulmão (A549). Essa linhagem tumoral foi então selecionada para a continuação dos experimentos para detectar o tipo de morte celular causada por esses três cardenólídeos. O glucoevatromonosídeo (GEV), composto mais promissor, também foi investigado em células U937 (linfoma histiolítico). Todos os três causaram bloqueio da fase G2/M, enquanto que a convalotoxina (CON) aumentou o número de células em subG0 do ciclo celular. O GEV foi capaz de inibir a expressão de importantes proteínas relacionadas ao ciclo celular, como ciclina B1 e p53 em A549. Ainda, esse composto causou bloqueio em subG0 em células U937, demonstrando um efeito dependente do tipo celular. O efeito de morte celular causado pelo GEV também foi tipo celular dependente, já que foi observada morte celular pela ação de caspases nas células U937 e independente da ação das caspases em células A549. A digitoxigenina monodigitoxosídeo não apresentou efeito significativo de morte celular em células A549. A CON aumentou o número de núcleos picnóticos e células Anexina-V positivas, configurando morte celular apoptótica. Além disso, os três compostos foram capazes de inibir a migração e invasão celulares, em células A549, bem como de reduzir a expressão das proteínas: MMP2, MMP9 e FAK (proteína de adesão focal), que são essenciais no processo de metástase. Além disso, o GEV foi capaz de inibir a expressão de importantes cinases, geralmente super expressas em células tumorais. O conjunto desses dados sugere que estes compostos, especialmente o GEV, podem ser considerados candidatos promissores para o desenvolvimento de uma forma farmacêutica a ser usada no tratamento do câncer de pulmão.

Palavras-chave: cardenólídeos, glucoevatromonosídeo, digitoxigenina monodigitoxosídeo, convalotoxina, citotoxicidade, células A549, células U937, tumor de pulmão.

ABSTRACT

Cardenolides such as ouabain and digoxin are known for their efficacy in treating congestive heart failure as antiarrhythmic drugs. Recently, new pharmacological activities have been found (antiviral and antitumor) to these "old" drugs. Given the growing interest in research and development of this group of compounds, as potential chemotherapeutic agents, this work aimed to evaluate the cytotoxic effects on tumor cells of three cardenolides (glucoevatromonoside, digitoxigenin monodigitoxoside and convallatoxin) previously selected for its potent cytotoxic action. Initially, they were screened in tumor cell lines of different origins and all of them showed potent action at nanomolar concentrations in all cell lines tested, particularly in lung tumor cells (A549). This cell line was then selected for further investigation to detect the kind of cell death caused by these three cardenolides. Glucoevatromonoside (GEV) was the most promising compound, and also investigated in U937 cells (histiocytic lymphoma). All these compounds block G2/M phase, whereas the convallatoxin increased the number of cells in subG0 phase. GEV was able to inhibit the expression of important proteins related to cell cycle, such as Cyclin B1 and p53. Beyond that, this compound caused cell cycle blockage in subG0 phase in U937 cells, demonstrating dependent cell type effect. The effect of cell death caused by GEV was also cell type dependent. In U937 cells, GEV showed a caspase dependent cell death while it is independent of caspase in A549 cells. Digitoxigenin monodigitoxoside did not show a significant percentage of cell death in A549 cells. Convallatoxin increased the number of pyknotic nuclei and Annexin-V positive cells, setting apoptotic cell death in A549 cells. Furthermore, the three compounds are capable of inhibiting cell migration and invasion in A549 cells as well as to reduce the expression of some proteins as MMP2, MMP9 and FAK (focal adhesion protein), which are essential in the process of metastasis. Moreover, GEV was able to inhibit the expression of important kinases, usually over expressed in tumor cells.. Taken together, these data suggest that these compounds, especially GEV can be considered promising candidates for the development of a pharmaceutical form to be used in the treatment of lung cancer.

Keywords: cardenolide, glucoevatromonoside, digitoxigenin monodigitoxoside, convallatoxin, cytotoxicity, A549 cells, U937 cells, lung cancer.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. <i>Hallmarks</i> do câncer	53
Figura 2. Etapas da cascata metastática.....	62
Figura 3. Mecanismos distintos de morte celular programada.....	67
Figura 4. Etapas da macroautofagia	70
Figura 5. Vias de sinalização da necrose programada.....	72
Figura 6. Estrutura básica de um cardenolídeo	77
Figura 7. Estrutura química dos cardenolídeos glucoevatromonosídeo (A) digitoxigenina monodigitoxosídeo (B) e convalotoxina (C).....	86

CAPÍTULO 2 - Estudo dos efeitos citotóxicos do glucoevatromonosídeo em células A549 e U937

Figure 1. Glucoevatromonoside (GEV): chemical structure and effects on PBMCs sub-population.....	133
Figure 2. Glucoevatromonoside (GEV) induces a caspase-independent death in A549 cells.....	134
Figure 3. Glucoevatromonoside (GEV) induces alteration of cell cycle consisting in G2/M accumulation accompanied by modulation of cyclin B1 and p53 in A549 cells.....	135
Figure 4. Glucoevatromonoside (GEV) induces a caspase-dependent cell death in U937 cells.....	136
Figure S1. Effects of different inhibitors of cell death on A549 cells treated with glucoevatromonoside.	137
Figure S2. Glucoevatromonoside (GEV) does not produce the same alterations of U937 cells cycle as observed for A549 cells.....	139

CAPÍTULO 3 - Efeitos do glucoevatromonosídeo na autofagia e via de sinalização mTOR

Figura 1. Efeito do GEV na expressão da proteína mTOR.....	144
Figura 2. Efeito do GEV na expressão da proteína mTOR1 (S6K) em células (A) A549 e em células (B) SH-SY5Y.....	145
Figura 3. Efeito do GEV na expressão da proteína Beclina-1.....	146
Figura 4. Efeito do GEV na expressão da proteína LC3I-II.	147

CAPÍTULO 4 - Estudo in vitro da ação antimetastática do glucoevatromonosídeo em células A549

Figura 1. Ensaio do <i>scratch</i>	152
Figura 2. <i>Transmembrane/Boyden Chamber Assay</i>	154
Figura 3. Metodologia de quantificação	156

Figura 4. Reepitelização das feridas.....	159
Figura 5. Efeito do glucoevatromonosídeo (GEV) na migração e proliferação de fibroblastos de gengiva no ensaio de <i>scratch</i> , após 16 h de incubação.....	160
Figura 6. Efeitos do glucoevatromonosídeo (GEV) e do controle positivo paclitaxel (PAC) na inibição da migração e proliferação de células A549 no ensaio de <i>scratch</i> , após 16 h de incubação.....	160
Figura 7. Inibição da migração celular.....	161
Figura 8. Efeito do glucoevatromonosídeo. (GEV) na inibição da invasão das células A549 no ensaio Transwell®, após 48h de incubação.....	162
Figura 9. Efeitos do glucoevatromonosídeo (GEV) na expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.....	164
Figura 10. Efeitos do glucoevatromonosídeo (GEV) na expressão de proteínas das vias PI3K/Akt.....	165
Figura 11. Efeito do glucoevatromonosídeo (GEV) na expressão de proteínas das vias NF- κ B e p38.....	167

CAPÍTULO 5- Estudo dos efeitos citotóxicos dos cardenolídeos digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina em células tumorais

Figura 1. Estruturas químicas dos cardenolídeos: digitoxigenina monodigitoxosídeo (A) e convalotoxina (B).....	175
Figura 2. Efeito da DGX e CON na proliferação de linhagens tumorais	187
Figura 3. Efeito da DGX e CON na viabilidade de células tumorais...	192
Figura 4. Efeitos da DGX e CON na formação de colônias.....	196
Figura 5. Histogramas da determinação do conteúdo de DNA em células A549.....	197
Figura 6. Histogramas da determinação do conteúdo de DNA em células A549.....	198
Figura 7. Determinação do conteúdo de DNA nas células A549.....	200
Figura 8. Efeito da DGX na morfologia do núcleo de células A549....	203
Figura 9. Efeito da CON na morfologia do núcleo de células A549....	204
Figura 10. Análise da área e índice de irregularidade nuclear das células A549 tratadas com CON.....	207
Figura 11. Análise morfométrica dos núcleos das células A549 corados com o corante Hoechst 33342, sob tratamento com DGX e CON (100 nM).....	207
Figura 12. Avaliação do tipo de morte celular, através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP).....	209

Figura 13. <i>Dot plots</i> representativos da avaliação do tipo de morte celular, através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP), por citometria de fluxo.....	210
Figura 14. Efeitos da DGX e CON na formação de organelas vesiculares acídicas coradas com o corante acidotrópico laranja de acridina.....	211
Figura 15. Percentuais de deformação de organelas vesiculares acídicas (AVOs) em células A549, coradas com laranja de acridina e analisadas por citometria de fluxo, após 24 e 48h de tratamento com a DGX e a CON.....	212
Figura 16. Análise de Western blott da proteína LC3B (conversão e acumulação de LC3B-I em LC3B-II) nas células A549.....	213

CAPÍTULO 6 - Estudo in vitro da ação antimetastática dos cardenolídeos digitoxigenina monodigitoxosídeo e convallatoxina em células A549

Figure S1. Chemical structures of (A) digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) and (B) convallatoxin (CON).....	236
Figure S2. Digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) and convallatoxin (CON) inhibited A549 cell migration and invasion.....	237
Figure S3. Comparative effects of digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) and convallatoxin (CON) in healthy cells (human gingival fibroblasts – HGF) in order to demonstrate selectivity.....	239

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A549: linhagem de células de tumor pulmonar humano
ALK: cinase de linfoma anaplásico
ATCC: American Type Culture Collection
AVOs: Acidic Vesicular Organelles/ organelas vesiculares acídicas
BAF: bafilomycin/bafilomicina
CC₅₀: concentração citotóxica a 50%, concentração que reduz a viabilidade celular em 50%
CI₅₀: concentração que inibe 50% do crescimento celular
CIF: Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFSC)
CON: convalotoxina/convallatoxin
DGX: digitoxigenina monodigitoxosídeo/digitoxigenin monodigitoxoside
DMSO: dimetilsulfóxido, dimethyl sulfoxide
DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol
DISC: Death-Inducing Signaling Complex/ complex de sinalização indutor de morte
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor/fator de crescimento epidérmico
FGH: fibroblastos de gengiva humana
GEV: glucoevatromonosídeo/glucoevatromonoside
HBV: vírus da hepatite B
HPV: papilomavírus humano
HT-29: human colon adenocarcinoma cells/ células de adenocarcinoma do cólon humano
Jurkat: T-cell leukemia/ leucemia de células T
K562: human chronic myelogenous leukemia/ leucemia mielóide crônica humana
LLA: Leucemia linfóide aguda
LLC: Leucemia linfóide crônica
LMA: Leucemia mieloide aguda
LMC: Leucemia mieloide crônica
IS / SI: índice de seletividade/ selectivity index
MEC: Matriz extracelular
MEM: Meio Essencial Mínimo, Minimal Essential Medium
MMP: Metaloproteínasases
MTT: brometo de [3 (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio], sal de tetrazólio
MRC-5: normal lung fibroblast cell line

NEC: necrostatin
NSCLC: non small lung cancer cells
OMS: Organização mundial de Saúde
PARP: ADP-ribose polymerase
PBMCs: peripheral blood mononucleated cells/ células mononucleadas do sangue periférico
PBS: Phosphate-buffered saline, solução de tampão fosfato
PSA: mistura de penicilina, estreptomicina e anfotericina B
Raji: Burkitt's Lymphoma/ linfoma de Burkitt
RIP-1: proten kinase 1
SDS: dodecil sulfato de sódio, do inglês Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE: gel de eletroforese de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio (do inglês, Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis)
PDGF: Platelet-derived growth factor
PI3K: fosfoinositol-3-cinase
SFB/FBS: soro fetal bovino/fetal bovine serum
SFB/FCS: soro fetal de bezerro/fetal calf serum
SK-N-AS: human neuroblastoma cells/ células de neuroblastoma humano
SH-SY5Y: human neuroblastoma cells/ células de neuroblastoma humano
TNFR: receptor do fator de necrose tumoral/ Tumor Necrosis Factor Receptor
U937: histiocytic lymphoma/ linfoma histiolítico
VEGF: Fator de crescimento endothelial vascular/ Vascular Endothelial Growth Factor/
XTT: 2,3-Bis-(2-metóxi-4-nitro-5-sulfonila)-2H-tetrazolium-5-carboxanilideo
zVAD: inibidor de caspases

Sumário

INTRODUÇÃO	47
CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	52
1. APRESENTAÇÃO	52
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	52
REFERÊNCIAS	87
CAPÍTULO 2 - Estudo dos efeitos citotóxicos do glucoevatromonosídeo em células A549 e U937	103
CAPÍTULO 3 - Efeitos do glucoevatromonosídeo na morte celular autofágica e via de sinalização mTOR	139
1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	139
2. MATERIAIS E MÉTODOS	139
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	141
REFERÊNCIAS	147
CAPÍTULO 4 - Estudo <i>in vitro</i> da ação antimetastática do glucoevatromonosídeo em células A549	149
1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	149
2. MATERIAIS E MÉTODOS	149
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	156
REFERÊNCIAS	166
CAPÍTULO 5 - Estudo dos efeitos citotóxicos dos cardenolídeos digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina em células tumorais	173
1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO	173
2. MATERIAIS E MÉTODOS	173
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	181
REFERÊNCIAS	212

CAPÍTULO 6 - Estudo <i>in vitro</i> da ação antimetastática dos cardenolídeos digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina em células A549	217
DISCUSSÃO GERAL	238
CONCLUSÕES	248
PERSPECTIVAS	250
APÊNDICE 1.....	252

INTRODUÇÃO

O câncer é o nome dado a um conjunto de inúmeras doenças, nas quais ocorre o crescimento descontrolado e a disseminação de células malignas, que podem afetar qualquer parte do corpo (OMS, 2015). A problemática dessa doença é global e responde por quase 13% das mortes em todo o mundo, a saber: em torno de sete milhões de mortes a cada ano. Estima-se que até 2020, haverá entre 15 e 17 milhões de novos casos, a cada ano, sendo a maioria deles em países em desenvolvimento (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2013). Dentre os tipos de câncer, o de pulmão é a principal causa de mortalidade por câncer em homens e mulheres, em todo o mundo, com 1,3 milhões de mortes por ano (LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION, 2015).

As estimativas de câncer para os próximos anos e a alta taxa de mortalidade dessa doença são preocupantes e necessitam de intervenções preventivas e terapêuticas. Com esse intuito, na última década, inúmeras pesquisas têm proporcionado perspectivas interessantes para auxiliar na pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos fármacos anticâncer, com melhor eficácia e seletividade para as células tumorais. Nesse contexto, os produtos naturais são uma fonte inesgotável de compostos com atividades farmacológicas promissoras, incluindo a ação antitumoral. Muitos compostos derivados de plantas têm desempenhado um papel importante no desenvolvimento de vários medicamentos anticâncer clinicamente úteis, tais como o paclitaxel e os alcalóides da vinca, vinblastina e vincristina (UNNATI et al., 2013).

Dentre os produtos naturais, os cardenolídeos, oriundos principalmente de espécies de *Digitalis* spp., são tradicionalmente utilizados no tratamento da insuficiência cardíaca congestiva e de algumas arritmias, inibindo a bomba Na^+/K^+ ATPase. Muito recentemente, esses compostos apresentaram efeitos citotóxicos *in vitro* e *in vivo* frente a várias linhagens celulares tumorais e diferentes tipos de tumores, devido aos seus efeitos antiproliferativos, sua capacidade de induzir apoptose e autofagia, culminando na morte celular (HENARY et al., 2011; MEKHAIL et al., 2006). Também recentemente, alguns cardenolídeos foram avaliados em ensaios clínicos de fase I para diferentes tumores sólidos, e apresentaram segurança e eficácia satisfatórias (PONGRAKHANANON, 2013; SLINGERLAND et al., 2013). Assim, maiores estudos com essa promissora classe de compostos são necessários para determinar seu possível papel no tratamento do câncer.

Diante do exposto e considerando a extensão dos relatos na literatura sobre tal potencial e da necessidade da P&D de novos fármacos para o combate ao câncer, principalmente o câncer de pulmão pelo baixo índice de sobrevivência, o objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos de três cardenolídeos (glucoevatromonosídeo, digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina) na proliferação de linhagens celulares tumorais de diferentes origens para posterior seleção da linhagem mais sensível a esses cardenolídeos. A seleção desses três compostos se deu previamente no âmbito de uma Dissertação de Mestrado realizada no nosso Laboratório, onde os mesmos apresentaram uma pronunciada ação citotóxica, em concentrações nanomolares, para as células tumorais humanas de pulmão e rhabdomiossarcoma (CARVALHO, 2012).

Neste contexto, há vários anos, a equipe do Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, sob a coordenação da Profa. Dra. Cláudia Maria Oliveira Simões, vem avaliando a citotoxicidade (frente a linhagens de células saudáveis e linhagens celulares tumorais) e a atividade antiviral de produtos naturais e compostos sintéticos. Essa equipe tem buscado constantemente a implementação de metodologias diferenciadas, a fim de complementar os estudos realizados no referido Laboratório, propiciando a prática da multidisciplinaridade e uma formação mais completa dos recursos humanos envolvidos. Neste sentido, metodologias que objetivam avaliar a morte celular e elucidar o mecanismo de citotoxicidade envolvendo células tumorais estão sendo paulatinamente estabelecidas no Laboratório, tendo em vista a importância de se definir o tipo e o perfil de morte envolvida na eliminação de tumores.

De acordo com o objetivo proposto, esta tese foi dividida em seis capítulos. Inicialmente, O **Capítulo 1** apresenta uma revisão bibliográfica referente ao tema abordado. O **Capítulo 2** apresenta os efeitos citotóxicos do glucoevatromonosídeo em células tumorais A549 e U937. Parte destes resultados foram obtidos durante o estágio sanduíche de doutoramento no exterior, no *Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire du Cancer*, Luxemburgo, sob a supervisão do Prof. Dr. Marc Diederich e da Dra. Claudia Cerella. Os dados estão compilados na forma de artigo a ser submetido para publicação. No **Capítulo 3** estão descritos os resultados relativos a investigação dos efeitos do glucoevatromonosídeo nas vias de sinalização mTOR e morte celular autofágica. No **Capítulo 4** estão apresentados os resultados do estudo *in vitro* da ação antimetastática do glucoevatromonosídeo, em células A549. No **Capítulo 5** estão apresentados os resultados obtidos

com os outros dois cardenólídeos ativos selecionados, digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina, frente à linhagem celular A549. No **Capítulo 6** estão apresentados os resultados obtidos no estudo *in vitro* da ação antimetastática dos dois cardenólídeos mencionados no capítulo anterior, aceitos para publicação no periódico *Journal of Natural Products Research*. O Apêndice 1 apresenta uma relação das atividades complementares realizadas durante o período de doutoramento e, ao final, são apresentadas as considerações finais, cujas reflexões foram elaboradas à partir de um olhar crítico dos resultados encontrados,, as conclusões e as perspectivas desta tese.

CAPÍTULO 1:
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

CAPÍTULO 1- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. APRESENTAÇÃO

Nesse capítulo será apresentada uma revisão bibliográfica sobre o tema em estudo nessa tese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Câncer

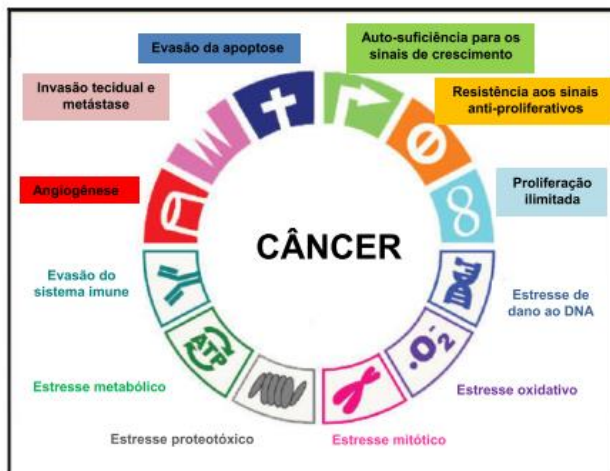
2.1.1 Considerações gerais

O documento com a descrição mais antiga do câncer, que se tem conhecimento, foi encontrado no Egito e data de aproximadamente 3.000 a.C. O papiro que o descreve faz parte de um antigo livro egípcio referente à cirurgia do trauma, que relata oito casos de tumores ou úlceras de mama, que foram tratados por cauterização. A origem da palavra câncer é creditada ao médico grego Hipócrates (460-370 a.C.) e significa “caranguejo”, por associação entre o crescimento infiltrante do câncer e a forma como esse crustáceo se prende ao solo usando suas patas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

A denominação câncer se dá a um conjunto de inúmeras doenças, nas quais ocorre o crescimento descontrolado e a disseminação de células transformadas (células malignas), podendo afetar qualquer parte do corpo (OMS, 2015).

Nesse processo, as células apresentam aparência e morfologia alteradas, sendo tais características usadas como indicativo do estágio da doença (AGUS et al., 2013). Morfologicamente, as células tumorais podem apresentar núcleo aumentado, com formato irregular, nucléolos proeminentes, citoplasma escasso e intensamente corado ou, pelo contrário, excessivamente pálido (BABA; CÂTOI, 2007). Além da morfologia, as células malignas são caracterizadas por provocarem alterações na cascata de eventos celulares, ocorrendo alterações do ciclo celular, alterações genômicas, aumento da motilidade celular, quimiotaxia, mudanças na superfície celular, secreção de fatores líticos, potencial proliferativo ilimitado, autossuficiência para os sinais de crescimento, resistência aos sinais antiproliferativos e apoptóticos, fuga do sistema imune, fenótipos de estresse (metabólico, proteotóxico, mitótico, oxidativo e de danos ao DNA), formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), invasão tecidual e capacidade de sofrer metástase. A Figura 1 mostra o conjunto de informações, que descrevem as características de uma célula tumoral, chamado de *hallmarks* do câncer (LUO; SOLIMINI; ELLEDGE, 2009).

Figura 1. Hallmarks do câncer



Fonte: Adaptado de Luo et al. (2009)

Estas alterações celulares, assim como as mutações no DNA, surgem geralmente com uma frequência de uma em cada 20 milhões, por gene e por divisão celular. Assim sendo, as populações humanas, em todo o mundo, deveriam apresentar frequências semelhantes de câncer; no entanto, as taxas de incidência variam drasticamente. Por isso, pode-se afirmar que alguns fatores podem intervir, de forma relevante, na incidência de câncer em algumas populações, tais como os fatores hereditários e/ou ambientais. Ainda, pode-se presumir que determinadas populações sejam portadoras de um grande número de genes de susceptibilidade ao câncer e que o ambiente no qual as populações vivem contribuem para a taxa de incidência do mesmo (HEJMADI, 2010). No entanto, o fato dos genes estarem distribuídos de forma desigual entre as populações não explica as diferenças nas taxas de incidência de câncer no mundo. Por exemplo, a incidência de câncer de estômago é seis a oito vezes maior entre os japoneses, em comparação com os norte-americanos. No entanto, filhos de imigrantes japoneses, que se estabeleceram na América do Norte, apresentam taxas de incidência de câncer de estômago comparáveis às da população norte-americana. Portanto, o risco de desenvolver câncer de estômago parece ter um forte componente ambiental, associado com a presença da

bactéria *Helicobacter pylori*. Já o uso excessivo de álcool tem sido associado aos cânceres de mama, fígado e boca. Além disso, o tabagismo aumenta significativamente o risco de surgimento de cânceres de pulmão, boca e garganta, igualmente em homens e mulheres (HEJMADI, 2010; EUA/NCI, 2015). Com relação aos cânceres de nasofaringe, colo do útero, sarcoma de Kaposi e hepático, o aumento do risco está relacionado com a presença de agentes infecciosos, tais como os vírus Epstein-Barr, o papilomavírus humano (HPV), os vírus herpéticos e o vírus da hepatite B (HBV), respectivamente (EUA/NCI, 2015).

Embora o câncer possa ocorrer em pessoas de todas as idades, é comum entre indivíduos com idade mais avançada, e existem várias teorias a respeito dos motivos que aumentariam a incidência de cânceres em idosos. À título ilustrativo, pode-se citar as alterações no sistema imunológico relacionadas à idade, o acúmulo de mutações genéticas aleatórias, a exposição mais prolongada a agentes cancerígenos, e as alterações hormonais ocorridas durante a vida (HEJMADI, 2010).

2.1.2 Carcinogênese

O processo de formação do câncer, chamado de carcinogênese, envolve vários estágios e, se desenvolve lentamente, e pode levar alguns anos para que uma célula maligna prolifere e dê origem a um tumor (BRASIL/INCA, 2015). O termo carcinogênese ou oncogênese define o início de um tumor e sua manutenção e evolução subsequentes (BABA; CÂTOI, 2007).

No processo de carcinogênese, o período entre a fixação de um carcinógeno no DNA cromossômico e a presença de uma população de células neoplásicas pode ser dividido nos seguintes estágios: iniciação, promoção e progressão (HANAHAN; WEINBERG; FRANCISCO, 2000). As duas primeiras fases são subjacentes ao desencadeamento da transformação celular e a terceira fase determina a transformação de um tumor benigno em uma forma maligna (BABA; CÂTOI, 2007).

Na **iniciação**, o processo é desencadeado por ação de um agente cancerígeno no DNA cromossômico, induzindo uma lesão, que pode ser reparada ou reproduzida. Os mecanismos biológicos de reparação são complexos, e as possibilidades de reparação, a curto e longo prazos, são desconhecidas. A fase de iniciação começa quando uma célula fica impossibilitada de reparar a lesão no DNA. O “início” de uma célula tumoral envolve sua compatibilidade genética com a ativação de diferentes fatores cancerígenos, que podem atuar isoladamente ou em associação. Nesse processo, os fatores cancerígenos (vírus oncogênicos,

radiação, substâncias químicas, entre outros) têm uma ação genotóxica irreversível e os processos de reparação não ocorrem (BABA; CÂTOI, 2007). Quando a célula é “iniciada”, ela passa a apresentar uma alteração irreversível do material genético e tem potencial para o desenvolvimento de um clone de células neoplásicas. A iniciação é um processo rápido, da ordem de alguns minutos ou horas, e as células “iniciadas” podem permanecer indefinidamente neste estado, sem produzir efeitos adversos, e sem serem reconhecidas pelos sistemas de defesa do organismo (BABA; CÂTOI, 2007).

No segundo estágio da carcinogênese, ou seja, no estágio de **promoção** ocorrem alterações genéticas crônicas das células “iniciadas”, e essas alterações determinam a transformação neoplásica e o aparecimento de células, que são capazes de crescimento autônomo. A promoção do tumor é, em grande parte, e talvez até mesmo totalmente, associada a fatores epigenéticos, que alteram, direta ou indiretamente, a expressão do DNA genômico (BABA; CÂTOI, 2007; TAYLOR; LADANYI, 2011).

A **progressão** caracteriza o terceiro estágio da carcinogênese, quando ocorre a multiplicação descontrolada e irreversível das células com algum grau de alteração. Nesse estágio, o câncer já está instalado, e volui até o surgimento das primeiras manifestações da doença (BRASIL/INCA, 2015). As células nessa fase são caracterizadas por alterações e rearranjos genéticos, alterações cariotípicas, e o tumor é fenotipicamente caracterizado por proliferação rápida, alterações bioquímicas e morfológicas, e propriedades invasivas e metastáticas (os termos invasão e metástase serão discutidos no item 2.1.6 (BABA; CÂTOI, 2007).

2.1.3 Epidemiologia

O câncer é um problema global, que responde por quase 13% das mortes, em todo o mundo, um número semelhante ao dos sete milhões de mortes anuais, provocadas pela infecção pelo HIV/AIDS, tuberculose e malária juntas (LÓPEZ-GÓMEZ et al., 2013). Nas últimas décadas, o câncer ganhou proporções maiores, convertendo-se em um problema alarmante de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, para o ano de 2030, são esperados 27 milhões de novos casos de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas convivendo com o câncer. Ainda, o número global de mortes por câncer aumentará para 45%, no período de 2007 a 2030 (BRASIL/INCA, 2015; OMS, 2015). No ano de 2012, 8,2 milhões de pessoas no mundo morreram por câncer (OMS, 2015).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2012, que também foram válidas para o ano de 2013, apontaram para a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes nos homens são os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon-retal e estômago, enquanto que os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon-retal e tireoide são mais incidentes no sexo feminino (BRASIL/INCA, 2015). Alguns tipos de câncer são mais comuns em países desenvolvidos, tais como os cânceres de próstata, mama e cólon, enquanto que os cânceres de fígado, estômago e cervical (cérvice uterino) são mais comuns nos países em desenvolvimento (OMS, 2015).

Ainda no Brasil, para o ano de 2014, foram esperados aproximadamente 257.870 novos casos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. A estimativa é que o câncer de pele do tipo não melanoma for o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon-retal, pulmão, estômago e colo do útero (BRASIL/INCA, 2015). No conjunto, estes dados reforçam a magnitude da problemática envolvendo o câncer no Brasil e no mundo.

2.1.4 Câncer de pulmão

O câncer de pulmão acomete um ou ambos os pulmões e, geralmente, se forma nas células que revestem as vias aéreas e as glândulas próximas. Nesse tipo de câncer, a mutação de células normais em células tumorais acontece em um longo período de tempo (LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION, 2015).

Os dois principais tipos são o câncer de pulmão de células pequenas (em inglês, *Small Cells Lung Cancer* - SCLC) e o câncer de pulmão de células não pequenas (em inglês, *Non Small Cells Lung Cancer* - NSCLC) (EUA/NCI, 2015). O SCLC ocorre nas grandes vias aéreas (brônquios primários e secundários) e está fortemente ligado ao tabagismo. Comparados aos não fumantes, os tabagistas têm cerca de 20 a 30 X mais risco de desenvolverem câncer do pulmão (BRASIL/INCA, 2015). Embora seja o tipo menos comum, afetando em torno de 15% dos pacientes, ele origina um pior prognóstico, pois geralmente ocorrem metástases (KRANS, 2013; GRIDELLI et al., 2015). O NSCLC, que acomete em torno de 85% dos pacientes é atualmente definido por características patológicas (GRIDELLI et al., 2015). Os dois fenótipos histológicos predominantes são os não-escamosos, como os adenocarcinomas (~90%), que geralmente se desenvolvem nas bordas dos pulmões, mas também podem ocorrer nas células das vias

respiratórias, e os carcinomas de células escamosas (10%), geralmente detectados nos brônquios. Embora existam outros subtipos de NSCLC, juntos, esses subtipos representam 80% dos cânceres de pulmão diagnosticados (KRANS, 2013; LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION, 2015; CHEN et al., 2014; GRIDELLI et al., 2015). Na tumorigênese do câncer de pulmão, a formação de novos vasos sanguíneos e linfáticos fornece nutrientes necessários para o crescimento do tumor e permite um influxo das células imunitárias das linhagens mielóide e linfóide. As células mielóides implicadas neste processo incluem macrófagos associados a tumores e neutrófilos associados a tumores (CHEN et al., 2014).

Apesar de o tabaco ser um dos principais fatores de risco para o câncer de pulmão, outros riscos podem estar envolvidos, tais como a história familiar, os altos níveis de poluição do ar, a presença de arsênio na água potável, o gás radônio, a exposição ao mineral asbesto (amianto), a exposição a agentes químicos cancerígenos, como o urânio, os produtos do carvão, a gasolina e a exaustão de partículas do diesel (KRANS, 2013).

O desenvolvimento do NSCLC é impulsionado por mutações genéticas, as quais são predominantemente causadas pela exposição a agentes cancerígenos. Os tumores de pessoas fumantes contêm cerca de 10 mutações por megabase de DNA e os tumores de pessoas que nunca fumaram têm 10 X menos mutações. As mutações mais importantes foram detectadas no receptor do fator de crescimento epidérmico (em inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor* - EGFR) e na cinase de linfoma anaplásico (ALK). As células podem também desenvolver mutações independentes, levando a heterogeneidade intra e inter-tumor. Além disso, os tumores se adaptam ao seu ambiente produzindo fatores de crescimento e outros para evadir do sistema imunológico (GRIDELLI et al., 2015).

Este tipo de câncer é geralmente detectado em estádios avançados, pois a sintomatologia nos estádios iniciais não é comum. Com isso, o câncer do pulmão permanece como uma doença altamente letal, sendo a razão mortalidade/incidência de, aproximadamente, 86%. A sobrevivência média cumulativa total em cinco anos varia entre 13 e 21%, em países desenvolvidos, e entre sete e 10%, nos países em desenvolvimento (BRASIL/INCA, 2015).

No Brasil, o câncer de pulmão foi responsável por 20.622 mortes em 2008, sendo o tipo que mais fez vítimas. No mesmo ano, as estimativas mundiais foram de 1,61 milhão de casos, representando 12,7% de todos os novos casos de câncer. Os dados continuaram alarmantes já que em

2012 ocorreram 1,82 milhão de casos novos de câncer de pulmão. Em 2011, o número de mortos por causa do câncer de pulmão, no Brasil, foi de 22.424 pessoas, sendo 13.698 homens e 8.726 mulheres (BRASIL/INCA, 2015).

Segundo o INCA, estimam-se que ocorreram, em 2014, 27.330 novos casos, sendo 16.400 homens e 10.930, mulheres, e esses valores correspondem a 18 casos novos a cada 100 mil homens, e 10 novos casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, o câncer do pulmão em homens é o segundo mais frequente nas regiões Sul e Centro-Oeste, sendo que nas mulheres ele é o terceiro mais frequente na região Sul.

Em outros países, como nos Estados Unidos da América (EUA), os números são ainda mais alarmantes. Para 2015, foram estimados 221.200 novos casos e 158.040 mortes por câncer de pulmão, sendo que mais de 1/4 de todas as mortes por câncer são de câncer de pulmão (27%) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015). Além disso, o câncer de pulmão é responsável por quase 1/3 de todas as mortes por câncer nos EUA entre as mulheres, mais do que os cânceres de mama e os ginecológicos combinados (LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION, 2015).

No entanto, a partir do final do século XX, este câncer se tornou uma das principais causas evitáveis de morte. O consumo de vegetais e frutas tem mostrado um efeito protetor, principalmente, por possuírem propriedades antioxidantes, mas a erradicação do tabagismo permanece sendo a principal forma de redução da ocorrência desse tipo de neoplasia (BRASIL/INCA, 2015).

Embora o câncer de pulmão possa ser evitável, o investimento nas pesquisas está ainda muito distante do financiamento para outros tipos de câncer (LUNG CANCER RESEARCH FOUNDATION, 2015). Além disso, esse câncer é frequentemente diagnosticado em um estágio final, o que não é um bom prognóstico para a sobrevivência do paciente. O surgimento de metástases ocorre muito precocemente, logo que o câncer se estabelece, sendo este o motivo pelo qual ele é tão mortal e difícil de tratar. Os lugares mais comuns de metástase do câncer de pulmão incluem as glândulas suprarrenais, fígado, cérebro e ossos. Os pulmões também são um lugar onde comumente outros cânceres metastáticos podem ocorrer (KRANS, 2013; VAPORCIYAN et al., 2000).

2.1.5 Leucemias

As leucemias constituem um grupo de neoplasias malignas que são caracterizadas pela proliferação descontrolada de células hematopoiéticas na medula óssea (MO) e/ou nos tecidos linfoides, que por sua vez, atingem a circulação periférica e podem se infiltrar em outros sistemas do organismo humano (SWERDLOW et al., 2008).

Quando ocorre a proliferação descontrolada de células leucêmicas, a infiltração da medula óssea por essas células impede a produção das células sanguíneas normais, tais como os leucócitos, os eritrócitos e as plaquetas. Ainda, pela perda de funcionalidade das células leucêmicas, os indivíduos afetados, além de sofrerem de desordens hemorrágicas e anemias, também são mais suscetíveis a infecções (LICÍNIO, SILVA; 2010).

De forma geral, as leucemias podem ser classificadas em agudas e crônicas de acordo com o grau de maturação das células, e em mielóides e linfóides dependendo da linhagem acometida (BAIN, 2003). Dessa forma, as leucemias podem ser divididas em linfóides e mielóides; e em agudas e crônicas (SWERDLOW et al., 2008; CORNELL; PALMER, 2012).

As leucemias agudas se caracterizam pelo acúmulo de células imaturas (blastos) incapazes de se diferenciar devido a um bloqueio de maturação (CORNELL; PALMER, 2012). Assim, quando o bloqueio maturativo ocorre na linhagem mielóide dá origem às leucemias mieloides agudas (LMAs) e, quando atinge a a linhagem linfóide, origina as leucemias linfóides agudas (LLAs).

Segundo a classificação de 2008 da Organização Mundial da Saúde (OMS) para

os tumores do tecido hematopoiético e linfóide, as **LMAs** foram divididas em sete subcategorias: LMA associada a anormalidades genéticas recorrentes; LMA relacionadas a síndrome mielodisplásica; neoplasias mieloides relacionadas ao tratamento; leucemia mielóide aguda não categorizada nos itens anteriores; Sarcoma mielóide; proliferações mielóides relacionadas a síndrome de Down e neoplasia de células blásticas dendríticas plasmocitóides (SWERDLOW et al., 2008). As **LLAs** foram subdivididas em três subgrupos: leucemia/linfoma linfoblástico B com anormalidades genéticas recorrentes, leucemia/linfoma linfoblástico B não categorizada nos itens anteriores e leucemia/linfoma linfoblástico T (SWERDLOW et al., 2008).

Com relação as estimativas de incidência das leucemias, estima-se nos EUA para 2015 a ocorrência de 54.270 novos casos de leucemia. A maioria dos casos (91%) é diagnosticada em adultos com mais de 20 anos de idade. Entre os adultos, os tipos mais comuns são LLC (36%) e

LMA (32%). Já a LLA é mais comum em indivíduos com menos de 20 anos de idade, acometendo 76% de todos os casos de leucemia. As taxas de incidência globais de leucemia têm aumentado lentamente ao longo das últimas décadas. Entre 2007 e 2011, as taxas de crescimento foram de 1,6% por ano para o sexo masculino e 0,6% por ano para o sexo feminino (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

No Brasil, as estimativas para 2014, também validas para 2015, são de 11.370 novos casos, sendo 5.050 homens e 4.320 mulheres (BRASIL/INCA, 2015). Entre os homens, a leucemia é a principal causa de morte por câncer para aqueles com idade entre 20 a 39 anos, enquanto que o câncer de pulmão ocupa o primeiro lugar entre os homens com 40 anos ou mais (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015).

Em geral, o risco de morrer devido à leucemia, linfoma ou mieloma vem diminuindo desde 1996 até o momento. No entanto, apesar dos avanços na terapia, novos medicamentos continuam a ser necessários, tendo em vista que a própria quimioterapia e a radioterapia, usadas no tratamento do câncer, podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de leucemias, tais como LMA, LMC e LLA (BRASIL/INCA, 2015).

Além disso, como mencionado anteriormente, na maioria dos casos, as células tumorais podem invadir outros tecidos normais, dando início a um novo tumor. Porém, nas leucemias, onde não ocorre formação de tumores, as células leucêmicas disseminam-se pelo sangue e órgãos hematopoiéticos, e podem alcançar outros tecidos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2015).

2.1.6 Metástase e invasão

A metástase (do grego *metastatis*, significa mudança de lugar, transferência) é a capacidade das células tumorais de se espalharem, se disseminarem a partir do órgão local e invadirem órgãos distantes (DUFFY; MCGOWAN; GALLAGHER, 2008; FRIEDL et al., 2012). As células metastizadas, bem como os tumores secundários, mostram algumas peculiaridades morfológicas, quando comparados com os tumores primários. Nem todas as células dos tumores primários têm a mesma capacidade de desenvolver metástases, o que prova o fato de que a heterogeneidade das células tumorais não é apenas morfológica. Algumas células apresentam uma maior capacidade para penetrar nos vasos e metastizar, mas nem todas as células que atingem outros órgãos (nódulos linfáticos, fígado, pulmões, etc.) irão desenvolver metástases (BABA; CÂTOI, 2007).

A distribuição das metástases a partir de um tumor primário não parece ser aleatória. É como se as células tumorais disseminadas só

colonizassem microambientes de órgãos que são compatíveis com o seu crescimento, apresentando um padrão de colonização metastático. Por exemplo, o câncer de mama, com frequência, gera metástases nos pulmões, ossos, fígado e cérebro; o câncer de próstata, em estágio mais avançado, tem um padrão mais seletivo para as ocorrências metastáticas, sendo os ossos o local predominante; já o melanoma da úvea (melanoma intraocular) cria metástases com alta especificidade no fígado; e os sarcomas nos pulmões (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006).

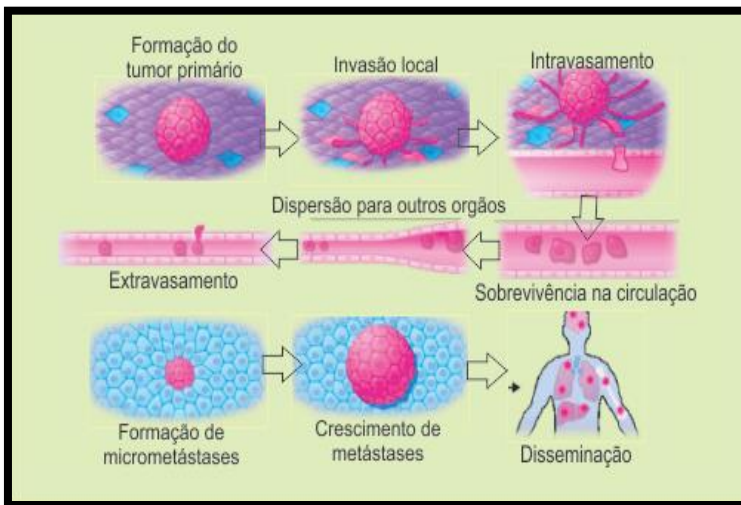
Os pulmões têm se mostrado um dos maiores sítios anatómicos de metástases. A ocorrência de metástases no parênquima pulmonar oriundas de câncer extratorácico causa de 20 a 54% dos óbitos. Análises de autópsias mostraram que os cânceres de mama, cólon, rim, útero, melanoma, tireóide, sarcoma ósseo, testículo e ovário são os sítios primários mais comuns de metástases pulmonares (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006; HIRAKATA; NAKATA; NAKAGAWA, 1995)

Uma explicação parcial para esta elevada prevalência seria o fato de que o sangue que circulou pelo coração passa depois por toda a rede capilar pulmonar. As lesões pulmonares metastáticas iniciam-se nas pequenas arteríolas pulmonares, e avançam através das junções oclusivas endoteliais dos vasos sanguíneos dos pulmões e da membrana basal subjacente. Uma vez no parênquima pulmonar, as células metastáticas devem sobreviver e crescer neste microambiente único, que contém matriz extracelular altamente organizada e tipos de células especializadas para a respiração (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006).

Classicamente, o processo de metástase tem sido descrito como uma série de passos sequenciais e interligados (DUFFY; MCGOWAN; GALLAGHER, 2008; GEIGER; PEEPER, 2009). A teoria de multi-estágios da metástase celular está descrita abaixo e esquematizada na Figura 2, que mostra como uma célula é capaz de completar o *decatlon* no organismo:

- (1) crescimento descontrolado das células,
- (2) perda de adesão célula-célula,
- (3) aquisição de capacidade migratória,
- (4) aquisição de capacidade invasiva,
- (5) saída da massa tumoral primária,
- (6) rompimento da membrana basal vascular,
- (7) intravasamento nos vasos,
- (8) sobrevivência na circulação (resistindo ao sistema imune),
- (9) extravasamento no novo órgão, distante do local primário,
- (10) invasão no tecido local, para criar um novo tumor e reiniciar o ciclo.

Figura 2. Etapas da cascata metastática.



Fonte: Adaptado de Robert (2013).

Mais especificamente, quando um tumor primário cresce, ele precisa de um suprimento sanguíneo para apoiar suas necessidades metabólicas, e esse processo é chamado de angiogênese. Estes novos vasos sanguíneos também podem fornecer uma rota de fuga, pela qual as células deixam o tumor e entram no sistema circulatório, processo conhecido como intravasamento. As células tumorais podem também entrar no sistema circulatório indiretamente, através do sistema linfático, e assim podem chegar aos linfonodos, onde irão se multiplicar e se disseminar (BABA; CÂTOI, 2007; CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002). Posteriormente, estas células necessitam sobreviver na circulação, até que possam chegar a um novo órgão, ocorrendo assim o extravasamento, a partir da circulação para o tecido circundante. Uma vez no novo local, as células devem iniciar e manter o crescimento para formar micrometástases pré-angiogênicas e esse crescimento deve ser sustentado pelo desenvolvimento de novos vasos sanguíneos a fim de que um tumor macroscópico se forme (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002).

No que diz respeito à formação do microambiente tumoral, uma das primeiras etapas envolvidas é a remodelação da matriz extracelular

(MEC), que é constituída por colagénio, elastina, proteoglicanas e outras proteínas estruturais especializadas, que fornecem suporte para a divisão celular no tecido do hospedeiro. Este evento é considerado estimulante para a formação desta rede dinâmica, que suporta a iniciação e a proliferação do tumor (WEBER; KUO, 2012). A estrutura da MEC é remodelada por enzimas denominadas metaloproteinases (MMPs), que são enzimas capazes de hidrolisar macromoléculas. As MMPs têm sido associadas com muitos tipos e fases do câncer e são essenciais no processo de metástase (OVERALL; KLEIFELD, 2006). Essas moléculas promovem a digestão da matriz extracelular, permitindo a entrada e a passagem de células tumorais para outros tecidos, bem como a migração de células endoteliais para a matriz, o que resulta em neovascularização (WEBER; KUO, 2012).

No quarto e no décimo estágios do *declaton*, o processo metastático necessita da capacidade invasiva das células tumorais, que é definida como a penetração de células individuais, grupos compactos de células, ou filamentos alongados conectados a células tumorais nos tecidos saudáveis (FRIEDL; HEGERFELDT; TUSCH, 2004; FRIEDL et al., 2012). A invasão consiste em alterações na adesão de células tumorais para outras células e para a MEC. Esta adesão é mediada pela presença de integrinas, tal como as caderinas. As integrinas são heterodímeros de 1 a 18 α e 1 a 8 β de proteínas transmembranárias. Cada heterodímero liga-se a proteínas específicas na MEC e pode transmitir sinais para dentro ou para fora das células. Em adição ao seu papel na adesão celular, estudos mostraram que as integrinas também estão envolvidas na migração celular (STEEG; THEODORESCU, 2008)

Outra questão importante e complexa é a relação entre a vascularização e a colonização metastática. O processo de angiogênese, estimulado pelas condições de hipóxia em tumores, é regulado pelo equilíbrio de fatores angiogênicos e antiangiogênicos. Um dos fatores angiogênicos mais amplamente estudado é o VEGF (em inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor*), que induz a proliferação, a migração e a organização de células endoteliais para formar novos vasos capilares. O VEGF é uma proteína multifuncional e tem várias isoformas. Em adição ao seu papel na angiogênese, o VEGF regula a permeabilidade vascular, a proliferação de algumas células tumorais, e a formação de um nicho pré-metastático. A super expressão do VEGF é responsável por um grande número de microvasos tumorais e por um aumento do processo de metástase (STEEG; THEODORESCU, 2008).

2.1.7 Vias de sinalização celular e alvos terapêuticos no câncer

A sinalização celular é uma rede de comunicação complexa, que controla as atividades biológicas básicas das células e coordena as ações das mesmas. As cascatas de sinalização são tipicamente compostas de vias tridimensionais de proteínas, que regulam umas as outras, em regiões específicas nas células. Devido ao complexo mecanismo de transdução da sinalização celular, as células tumorais apresentam alterações em várias vias de sinalização. Talvez seja essa a razão pela qual os inibidores específicos que têm como alvo apenas uma via, na maioria das vezes, falham no tratamento do câncer (SARKAR et al., 2009).

Em células tumorais, as vias de sinalização celular, que controlam o ciclo celular e a morte por apoptose, estão muito propensas a erros e funcionamento inadequado, o que provoca proliferação celular descontrolada e formação de tumores. Nessas células, as proteínas alteradas são produzidas a partir das mutações ou defeitos de genes que influenciam a forma de comunicação da sinalização celular. Algumas vias de suma importância para diversos fatores, tal como a proliferação celular, são conhecidos por funcionarem de forma errônea em células tumorais e incluem as vias do NF- κ B, Akt, MAPK e p53, entre muitas outras (SARKAR et al., 2009).

Inicialmente, pode-se citar a conservada via da PI3K (fosfoinositol-3-cinase), que é importante na regulação do crescimento, proliferação e sobrevivência das células. Esta via é ativada *downstream* (receptores abaixo da via) por diferentes fatores de crescimento, por ligação direta com esses receptores, ou pela ativação da via Ras.

Ela ainda pode promover a sobrevivência celular, através da ativação da Akt, uma cinase abaixo da sua via. A Akt, por sua vez fosforila e inativa um grande número de alvos, incluindo a família Bcl2, e regula a expressão de diversos genes (ARYA, WHITE 2015). A via da Akt desempenha um papel crítico na sinalização de sobrevivência das células de mamíferos e ela encontra-se aumentada em vários tipos de cancer. A Akt é ativada através da ligação de um fosfolípido e fosforilação em Thr308 pelo PDK1, ou em Ser473 pelo PDK2. As funções da via da Akt ativada incluem a promoção da sobrevivência celular por inibição da apoptose, através da inativação de diversos fatores pró-apoptóticos, incluindo Bad, fatores de transcrição *Forkhead*, e caspase-9. A ativação anormal dessa via também pode promover invasão e metástase em células tumorais (HSIEH et al., 2012). Alguns estudos mostraram que a Akt regula a via do NF- κ B por meio de

fosforilação e ativação das moléculas nessa via de e, dessa forma, acredita-se que a via da Akt seja um alvo atraente para a prevenção ou tratamento do câncer (SARKAR et al., 2009). Ainda, a Akt ativada (p-Akt-2) tem sido encontrada em 43 a 90% dos casos de câncer de NSCLC (HEAVEY; O'BYRNE; GATELY, 2013)

Outra via extensivamente estudada é a via do NF- κ B ou fator nuclear de cadeia-leve-kappa potenciador de células B ativadas. Esse fator é um complexo de proteínas, que pode ser formado a partir de homo- ou heterodímeros das proteínas p50, p52, p65, c-Rel e Rel B (essa última dimeriza com p50 e p52). Essa via de sinalização desempenha papéis importantes no controle do crescimento celular, apoptose, inflamação, resposta ao estresse, e muitos outros processos fisiológicos. Embora existam importantes moléculas nessa via de sinalização, o NF- κ B é a proteína-chave da via e é descrita como um potencial alvo terapêutico do câncer. O processo regulatório chave dessa via envolve a ativação do complexo de alto peso molecular I κ B cinase (IKK), cuja catálise é geralmente realizada por uma cinase heterodimérica formada por duas subunidades IKK α e IKK β (KARIN, 1999). Potentes ativadores da via do NF- κ B, tais como o TNF α (fator de necrose tumoral) e a IL-1 (interleucina-1), causam uma degradação rápida e quase total dos I κ Bs (especialmente I κ B α) (KARIN, 1999).

Além das vias NF- κ B e PI3K/Akt, a via da MAPK (proteína cinase ativada por mitógeno) também tem recebido atenção como sendo outra molécula alvo para a prevenção e terapia do câncer. Há, pelo menos, três famílias distintas de MAPKs em mamíferos, incluindo as cinases reguladas pelo sinal extracelular (Erk), a cinase cJun N-terminal (JNK) e a p38, que resultam na ativação de NF- κ B, crescimento e sobrevivência celulares. A ativação da MAPK tem sido relatada em vários tipos de câncer e está sendo diretamente relacionada com angiogênese, invasão e metástase (SARKAR et al., 2009; SUI et al., 2014)

A via Erk1/2 é ativada pela fosforilação de duas cinases específicas MKKs MAPK ou Erk 1/2 (MEK). Erk1/2 foram originalmente identificadas como proteínas cinases ativadas em resposta a estímulos extracelulares, tais como a insulina e o fator de crescimento nervoso (em inglês, *Nervous Growth Factor* - NGF). Adicionalmente, para controlar a proliferação e a diferenciação celulares a ativação da via Erk1/2 pode claramente promover a sobrevivência celular frente a uma série de estímulos importantes de estresse pela regulação dos membros da família de proteínas Bcl-2 (DARLING, COOK 2014).

A MAPK p38 foi originalmente identificada como proteína ativada em resposta a tensões celular, tais como hiperosmolaridade, arsenito de

sódio ou taxol e citocinas pró-inflamatórias. Elas requerem dupla fosforilação de Thr-Gli-Tir para a ativação. A ativação de p38 pode promover a proliferação celular ou induzir a parada do ciclo celular, e isso depende da cinética de ativação e das possíveis vias de sinalização *downstream* ativadas (DARLING, COOK 2014). Quando ativadas, as proteínas p38 podem translocar do citosol para o núcleo, o que orquestra respostas celulares mediando a fosforilação de seus fatores de transcrição *downstream*. Assim, a p38 possui um importante papel na regulação da apoptose, ciclo celular, inibição do crescimento e diferenciação celulares (SUI, et al., 2014)

É importante ressaltar que a sinalização celular é uma rede complexa com circuitos de realimentação negativos ou positivos, também regulados por mecanismos compensatórios. Em células tumorais, a desregulação de múltiplas vias de sinalização ocorre sucessivamente; no entanto, quando vários alvos da sinalização forem atingidos, novos caminhos para o tratamento do câncer estarão abertos (SARKAR *et al.*, 2009).

2.1.8 Morte celular e alvos terapêuticos no câncer

Uma célula monitora constantemente as suas condições, incluindo a disponibilidade de oxigênio e nutrientes, a integridade de seu genoma e o balanço do ciclo das vias de regulação celular. Se este monitoramento detecta danos ou mau funcionamento, sistemas de *backup* são ativados que, por sua vez, determinam se o crescimento celular deve pausar e reparar as vias ativadas, ou, alternativamente, se o dano for grave e as células devem ativar as vias de morte celular. Neste contexto, a homeostase do organismo é um equilíbrio entre a divisão e a morte das células, no qual o número das mesmas no tecido deve ser relativamente constante. Se este equilíbrio for perturbado, as células se dividem mais rapidamente do que elas podem morrer, resultando no desenvolvimento de câncer (HEJMADI, 2010).

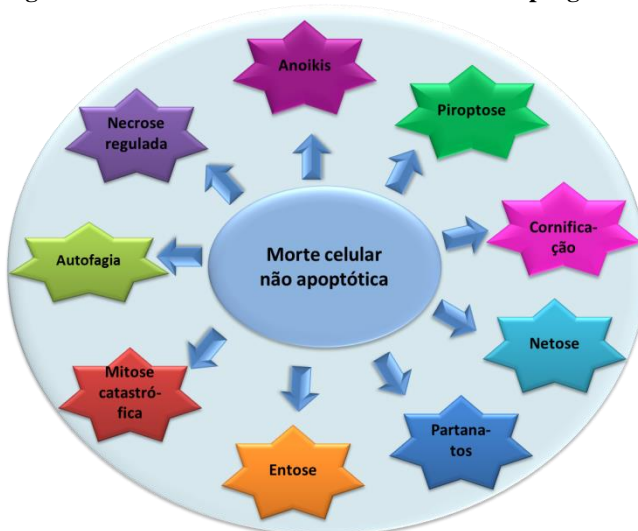
Os principais mecanismos de morte celular já descritos foram discutidos no relatório elaborado pelo Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (em inglês, *Nomenclature Committee on Cell Death* 2012), e foi proposto um conjunto de recomendações para as diferentes designações de morte celular. Desde a última recomendação, que havia sido em 2009, ocorreram progressos substanciais na exploração bioquímica e genética dos processos de morte celular. Devido a isso, a nomenclatura dos tipos de morte não é mais designada pela morfologia e sim pelas definições moleculares. Com base na nova classificação de 2012, que se aplica tanto *in vivo* quanto *in vitro*, subtipos de morte

celular são definidos por meio de uma série de características bioquímicas precisas e mensuráveis (GALLUZZI, et al., 2012).

Atualmente, está bem determinado que a apoptose não é o único mecanismo de morte celular programada e implicada na eliminação de células malignas. Além da apoptose, nove processos distintos foram relatados por contribuírem para a eliminação de células aberrantes no organismo humano. De acordo com a dependência da ativação de caspases, eles podem ainda ser divididos em dois subgrupos (Figura 3) (ORLIKOVA; DICATO; DIEDERICH, 2013).

O primeiro grupo de mecanismos independentes de caspases incluem necrose regulada, mitose catastrófica, entose, partanatos e netose. Por outro lado anoikis, piroptose e cornificação representam mecanismos de morte celular, onde a ativação de caspases é uma das características bioquímicas mais importantes na supressão da sobrevivência celular (GALLUZZI, et al., 2012; ORLIKOVA; DICATO; DIEDERICH, 2013)

Figura 3. Mecanismos distintos de morte celular programada



Fonte: Adaptado de Orlikova, Dicato, Diederich (2014).

A seguir serão relatados alguns tipos de morte celular mais comumente encontrados:

a) APOPTOSE: o termo **apoptose** (do grego: *apo* - separação e *ptosis* - queda) faz alusão à queda das folhas das árvores no outono, já que este é um exemplo de morte celular programada (INDRAN et al., 2011). A apoptose é um mecanismo essencial para diversos processos fisiológicos, incluindo a renovação das células normais, o desenvolvimento apropriado do organismo, o funcionamento do sistema imunológico e também o desenvolvimento embrionário (HEJMADI, 2010). Durante esse processo, a célula sofre alterações morfológicas características desse tipo de morte celular. Essas alterações podem incluir retração celular, perda de aderência com a MEC e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos (KROEMER, MARTIN 2005).

Duas grandes vias de apoptose, dependentes da ação de caspases, foram identificadas: as vias extrínseca e intrínseca.

A via extrínseca, que é desencadeada pela ligação de membros da superfamília TNF, tais como o receptor TNFR (em inglês, *Tumor Necrosis Factor Receptor*), o receptor da glicoproteína transmembranária CD95 (Fas/APO-1) e o receptor de TRAIL (em inglês, *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), tal como o FasL. A combinação Fas/FasL recruta proteínas contendo o domínio de morte FADD (em inglês, *Fas-Associated protein with Death Domain*) e pró-caspase-8, agregando-se o complexo de sinalização indutor de morte (em inglês, *Death-Inducing Signaling Complex - DISC*), que pode propagar sinais de morte de duas maneiras: por proteólise da proteína BH3-only Bid, que provoca a translocação desta última para a mitocôndria e a permeabilização da membrana externa mitocondrial, e por proteólise direta de caspases efetoras de morte. Por conseguinte, o complexo de proteína ativa a pró-caspase-8, que ativa a pró-caspase-3 efetora de morte (INDRAN et al., 2011).

A via intrínseca também conduz à apoptose, mas sob o controle de pró-enzimas mitocondriais. Em ambos os casos, se uma célula torna-se “iniciada”, tanto por estímulos extracelulares como por sinais intracelulares, a membrana mitocondrial externa torna-se permeável e internaliza o citocromo *c*, que é então liberado para o citoplasma. O citocromo *c* recruta Apaf-1 e pro-caspase-9 para compor a apoptossomo, o que desencadeia uma via de sinalização *downstream* de caspases 9/3, culminando na apoptose (KROEMER, MARTIN 2005).

Quando ocorre inibição das caspases, mas não inibição de morte celular, isso pode provocar, muitas vezes, alterações morfológicas celulares, com aquisição de um aspecto de morte celular, denominado de

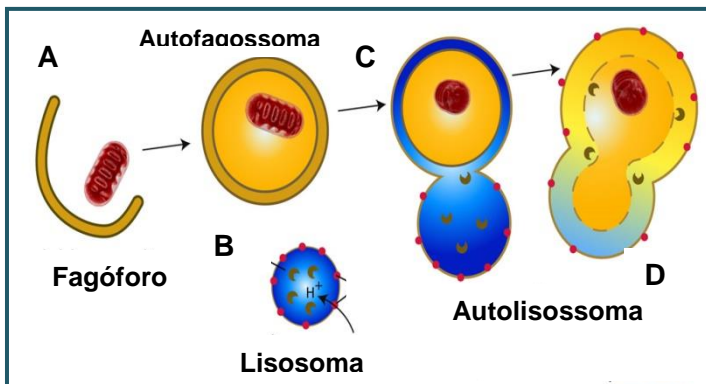
"*apoptose-like*" (semelhante à apoptose), com condensação da cromatina, fragmentação nuclear (cariorrhexis) e formação de corpos apoptóticos, e também pode causar morte celular autofágica (com acúmulo de vacúolos autofágicos- discutida a seguir) ou até mesmo necrose (morte com inchaço pronunciado de organelas citoplasmática) (KROEMER, MARTIN 2005).

b) AUTOFAGIA: a **autofagia** (do grego *auto-* próprio e *fagia* - alimentar-se) é um processo dinâmico, que envolve a degradação e a reciclagem de organelas citoplasmáticas e de proteínas (KATSUYA; SATOSHI; HIROYASU, 2009). Esse mecanismo pode ser ativado por fármacos antitumorais, toxinas, hipóxia ou ainda privação nutricional. Nesse processo, pode ocorrer uma maciça vacuolização citoplasmática com aumento do fluxo autofágico causando a morte celular, e tal evento é chamado de "morte celular autofágica" (HEJMADI, 2010). Porém, a autofagia pode mediar diferentes processos, tanto os de sobrevivência como os de morte celular. Assim como a apoptose, este processo representa uma resposta celular fisiológica importante que, geralmente opera em níveis basais nas células, mas pode ser fortemente induzido em certos estados de estresse celular, sendo o mais óbvio deles a deficiência de nutrientes (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Três tipos de autofagia já foram descritos e são denominados: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (em inglês, *Chaperone-Mediated Autophagy* - CMA). Na microautofagia, ocorre o sequestro direto dos componentes citosólicos por lisossomos. Na CMA, proteínas malformadas são translocadas por chaperonas citosólicas e lisossomais com o auxílio do transportador LAMP-2A (em inglês, *Lysosome-Associated Membrane Protein type 2A*) para os lisossomas. Uma vez nos lisossomas, as proteínas malformadas são degradadas pela ação de hidrolases lisossômicas (KATSUYA; SATOSHI; HIROYASU, 2009). A macroautofagia (Figura 4) é o tipo mais complexo e ocorre em 90% dos casos de autofagia celular, tendo sido identificados mais de 30 genes e proteínas envolvidos neste processo (ZHOU et al., 2012). Inicialmente, ocorre o desenvolvimento de uma estrutura com membrana dupla, chamada de fagóforo (Figura 4A), que engloba frações do citoplasma, de forma seletiva ou não, através da atividade de proteínas (SQSTM1/p62, NBR1, NDP52 e optineurina), formando uma ponte entre o alvo e o alongamento da membrana do fagóforo. Após a formação desse último (Figura 4A), ocorre o englobamento do material dito autofágico (estruturas celulares alvo de degradação) no autofagossoma (Figura 4B), que por sua vez funde-se com o lisossoma, cujas hidrolases ácidas

digerem os componentes celulares, envolvendo o material danificado e resultando na formação do autofagolisossoma (Figura 4C). Adicionalmente, a autofagia também pode reciclar macromoléculas não danificadas, como uma alternativa à degradação proteossomal (ZHOU et al., 2012).

Figura 4. Etapas da macroautofagia



Fonte: Adaptado de:

<http://flagellum.wordpress.com/2009/05/22/autofagia-no-autoregulada/>

Existem muitas proteínas envolvidas na regulação da autofagia, geralmente designadas de Atg (em inglês, *Autophagy-related genes*), sendo as principais as Atg's 5, 6 (beclina-1) e 12. Durante a fase de iniciação, a formação do complexo Atg5-Atg12 promove o recrutamento e a conversão da proteína citosólica associada à cadeia leve 3 (do inglês, LC- *Light Chain 3*). A LC3-I se encontra dispersa no citoplasma celular; no entanto, ao ocorrer a indução de autofagia, ela conjuga-se com uma fosfatidiletanolamina, convertendo-se em LC3-II e liga-se às membranas dos autofagossomas. A LC3-II permanece nos autofagossomas maduros até que a fusão com os lisossomos seja concluída, e depois é degradada com o conteúdo lisossomal. São conhecidas as isoformas LC3A, LC3B e LC3C desta proteína, que é considerada um dos principais marcadores da formação do autofagossoma (YANG et al., 2011).

Também é importante ressaltar que os dois tipos de morte descritos acima podem ser interligados por diferentes vias de sinalização (mencionadas no item 2.1.7), o que pode gerar diferentes condições de

morte celular. Um dos principais exemplos é a via PI3K/Akt/mTOR, que é considerada um importante alvo terapêutico, e pode estar envolvida tanto nos processos de apoptose quanto de autofagia (SU; MEI; SINHA, 2013). Outras vias de sinalização envolvidas nos dois processos foram descritas recentemente e sugerem uma ligação entre autofagia e via apoptótica extrínseca. A título ilustrativo, pode-se citar o caso da proteína sinalizadora de carga autofágica p62/SQSTM 1, que liga-se a caspase-8 (marcador de apoptose), permitindo sua ativação e induzindo a apoptose mediada por TRAIL. Outro exemplo é o da Bcl-2, que é uma família de proteínas anti-apoptóticas, superexpressas em vários tipos de tumores, que contribuem para a resistência ao tratamento quimioterápico. Foi constatado que essas proteínas Bcl-2, que inibem a apoptose, também inibem a autofagia. O mecanismo deste efeito dualístico reflete o fato de que as proteínas Bcl-2/Bcl-xL podem ligar-se e interromper a função da proteína autofágica Beclina-1. Dessa forma, compostos antagonistas de pequenas moléculas de Bcl-2/Bcl-xL, conhecido como miméticos BH3, podem atrapalhar competitivamente a interação Beclina-1-Bcl-2/Bcl-xL, inibindo a autofagia (YANG, et al., 2011).

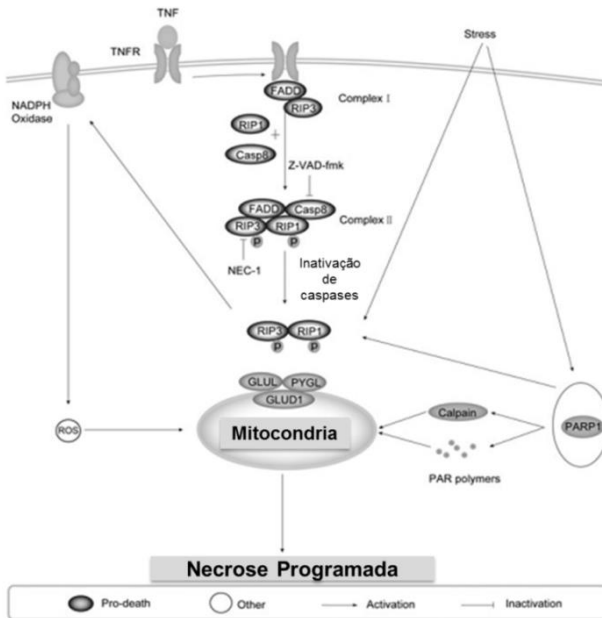
Assim sendo, quando a autofagia é inibida, a apoptose pode ser ativada nas células tumorais, mas por outro lado, quando a apoptose é desativada, o que ocorre com frequência nos cânceres humanos, células sob estresse geralmente morrem por outros mecanismos de morte celular. Neste contexto, a autofagia além de ser uma via preferencial de morte celular, também pode funcionar como um modo alternativo de morte em células resistentes à apoptose (SU; MEI; SINHA, 2013).

c) **NECROPTOSE**: a **necroptose** ou **necrose regulada** pode acontecer como uma cascata programada, dependendo das vias de transdução de sinais e de mecanismos catabólicos (ORLIKOVA; DICATO; DIEDERICH, 2013). Durante muito tempo, a necrose foi considerada meramente como um mecanismo de morte acidental de células e foi definida pela ausência de características morfológicas de apoptose ou de autofagia (GALLUZZI, et al., 2012).

Muitas pesquisas focaram interesse na necroptose induzida por TNF α . Esse mecanismo é baseado no receptor de interação da proteína cinase 1 ou 3 (em inglês, *Receptor-Interacting Protein* - RIP1 ou RIP3), que são, respectivamente necrostatina-1 sensível ou insensível, e são os ativadores desse tipo de morte celular (ORLIKOVA; DICATO; DIEDERICH, 2013).

A ligação entre os ligantes de morte, tais como TNF α , o ligante de TNF indutor de apoptose (TRAIL) e o Fas ligante (FasL), aos seus receptores cognatos resulta em um sinalizador, acionado pela caspase-8, que é a proteína adaptadora (em inglês, *Fas-Associated protein with Death Domain* - FADD) e sua interação com RIP-1. Em condições normais, a caspase-8 ativada, cliva RIP1 e a inativa (OUYANG et al., 2012). O mecanismo completo pode ser visualizado na Figura 5.

Figura 5. Vias de sinalização da necrose programada



Fonte Adaptado de: Ouyang et al. (2012)

No entanto, as caspases podem ser inativadas, por exemplo, após a exposição ao inibidor pancaspase z-VAD-fmk, ou após uma infecção viral. Em tais casos, os resultados da ligação do receptor de morte na montagem de um complexo envolve caspase-8, FADD, RIP1 e RIP3. Subsequentemente, o complexo pró-necrótico RIP1-RIP3 interage com enzimas metabólicas, tais como glicogênio-fosforilase (PYGL), glutamato-amoniaco-ligase (GLUL) e glutamato desidrogenase 1 (GLUD1) para melhorar o metabolismo, acompanhada por um aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Assim o excesso

de ROS pode permeabilizar a membrana mitocondrial e causar necrose programada. Existem outras proteínas envolvidas na rede de modulação da necrose programada, incluindo PARP1 (em inglês, *Poly [ADP-ribose] polymerase 1*), polímero PAR (em inglês, *Poly(ADP-ribose polymer)*), NADPH oxidases e calpaínas. As tensões causadas durante o início da morte celular por necrose pode ativar PARP1, que potencialmente induz necrose, quer através da ativação de cinases RIP, ativação de calpaínas, ou pela produção de polímero PAR. Além disso, a ativação de receptores de morte ou de estresse celular pode induzir a interação e a ativação das cinases RIP1 e RIP3, que influenciam as mitocôndrias, quer direta ou indiretamente, através da NADPH-oxidase, para induzir o aumento de espécies reativas de oxigênio (em inglês, *Reactive Oxygen Species – ROS*), produzindo, assim, a necrose (OUYANG et al., 2012).

O *cross-talk* entre apoptose, autofagia e necrose programada apresenta características morfológicas e processos fisiológicos distintos, mas existem ainda inter-relações complexas entre elas. Em algumas circunstâncias, a apoptose e a autofagia podem exercer efeitos sinérgicos, ao passo que em outras situações a autofagia só pode ser ativada quando a apoptose não ocorre (OUYANG et al., 2012, AMELIO, MELINO, KNIGHT 2011). Vários estudos têm demonstrado que a autofagia pode atuar, quer como um "guarda" ou como um "executor", dependendo do estágio da carcinogênese, do ambiente celular circundante ou das intervenções terapêuticas empregadas (OUYANG et al., 2012)

A necrose programada é independente da ação de caspases, sendo sempre acionada como um mecanismo de *backup* para a apoptose, quando as caspases estiverem inativadas. No entanto, a necroptose induzida pode ser revertida para apoptose, na presença de necrostatina-1 (NEC-1), um inibidor específico de necroptose. Essa reversão do tipo de morte se dá parcialmente pelas alterações da permeabilização da membrana mitocondrial interna, que provoca modificações na permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP). Sob certas condições, a apoptose e a necrose programadas podem ser induzidas simultaneamente; porém, esses dois tipos de morte também podem estar inativados (OUYANG et al., 2012)

d) SENESCÊNCIA: a **senescência** celular é um processo de transdução de sinal, que provoca uma parada irreversível do crescimento celular, acompanhada de alterações morfológicas e de um padrão de expressão gênica específicos, parando de forma irreversível o crescimento das

células na fase G1 do ciclo celular. As alterações morfológicas são células aumentadas com aparência achatada e alto grau de granularidade, e a relação entre as dimensões do núcleo e do citoplasma também fica alterada. No entanto, estas células permanecem metabolicamente ativas e mostram um padrão bastante alterado da expressão de genes. Assim, a senescência é um mecanismo primário para evitar a progressão do ciclo celular inadequado com danos não reparados e, assim, aumenta a instabilidade genômica, que é uma característica marcante do câncer. Os mecanismos que estabilizam o fenótipo senescente não foram totalmente elucidados, mas uma produção demasiada de ROS e uma ativação contínua de γ -H2AX “*damagi foci*” ou alterações epigenéticas, bem como uma combinação desses eventos são possíveis candidatos (SARETZKI, 2010).

Este processo pode ser induzido por meio de vários mecanismos, mas o resultado final da indução do fenótipo senescente é bastante semelhante, pois partilha vias de sinalização e propriedades morfológicas comuns (SARETZKI, 2010). Um dos tipos de senescência, a senescência induzida por oncogenes, é descrita como um bloqueio estável do ciclo celular, que é desencadeado por sinais aberrantes da proliferação de oncogenes. As células senescentes são caracterizadas por uma morfologia plana e larga, com vacúolos, um aumento da atividade da β -galactosidase associada à senescência e por alterações na estrutura da cromatina, conhecidas como senescência associada a focos de heterocromatina, que pode inibir a expressão de genes de promoção da proliferação celular (DENOYELLE et al., 2006).

A molécula de sinalização p53 é o ator central para muitos eventos que levam à interrupção do ciclo celular, senescência e apoptose. Apesar da p53 estar frequentemente mutada em muitos cânceres, moléculas semelhantes à p53, tais como p63 e p73, também mediam a parada do ciclo celular e causam apoptose independente do status da p53 nas células (SARETZKI, 2010).

Importante ressaltar que esses mecanismos de morte celular muitas vezes podem ocorrer de forma concomitante, dependendo principalmente da natureza e da concentração/dose do fármaco/medicamento ou do tipo celular investigado.

2.1.9 Tratamento do câncer

O tratamento do câncer depende de diversos fatores, tais como o tamanho do tumor, a idade do paciente, a localização do tumor e o tipo de células tumorais. Para cada situação específica existem diferentes abordagens, tais como a excisão cirúrgica, que remove tumores com alta

eficácia, se não houver metástases; a radioterapia e a quimioterapia. Há, ainda, terapias adjuvantes, como a fototerapia dinâmica e a imunoterapia, que têm evoluído graças à compreensão da biologia da transformação maligna e das diferenças no controle da proliferação das células normais e tumorais (BORGHAEIA; SMITHA; CAMPBELLB, 2009; DE ALMEIDA et al., 2005).

Quando o câncer é detectado em um estágio inicial, antes de se espalhar, muitas vezes ele pode ser tratado com sucesso pela cirurgia ou pela radioterapia. No entanto, quando o câncer é detectado posteriormente, já com metástase, esses dois tratamentos, geralmente, não são muito bem sucedidos. Desta forma, torna-se necessário uma forma de tratamento sistêmico, tal como a quimioterapia, que emprega medicamentos aplicados, em sua maioria, via intravenosa ou, também, por via oral (CHAMBERS; GROOM; MACDONALD, 2002).

Os quimioterápicos disponíveis para o tratamento de cânceres são classificados de acordo com seu mecanismo de ação. Muitos fármacos exercem sua ação sobre células em processo de divisão, sendo denominados fármacos ciclo-celular específicos (ex. antimetabólitos, alcaloides, hormônios), enquanto que outros fármacos são capazes de induzir a morte de células que não estejam em estado de proliferação, chamados então de fármacos ciclo-celular não específicos (antibióticos, complexos de platina, agentes alquilantes diversos) (DE ALMEIDA et al., 2005).

Para o câncer de pulmão, especificamente para o tipo NSCLC, que é considerada uma doença heterogênea, o tratamento deve ser adaptado para o estágio da doença e as características do tumor. Além da retirada cirúrgica e radioquimioterapia, fármacos direcionados para mutações específicas, se presentes, têm um papel importante no tratamento. Fármacos inibidores dos receptores de tirosina cinase, tais como o do fator de crescimento epidérmico (em inglês, *Epidermal Growth Factor Receptor* - EGFR) e do linfoma anaplásico (em inglês, *Anaplastic Lymphoma Kinase* – ALK), e fármacos inibidores da formação de ROS já estão disponíveis. Como todos os tumores, eventualmente, podem desenvolver resistência, fármacos inibidores de segunda e terceira linhas foram ou estão atualmente em desenvolvimento. Esses compostos líderes são ativos contra as proteínas resistentes ou mesmo dirigidos especificamente para as mesmas. Outras estratégias incluem a inibição do fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, *Vascular Endothelial Growth Factor* - VEGF) e a imunoterapia (GRIDELLI et al., 2015).

Embora os estudos genômicos do câncer de pulmão tenham estabelecido vários genes como mediadores cruciais dos processos de iniciação e progressão tumorais, a validação experimental das alterações genômicas mais importantes, funcionais em células de câncer de pulmão, continua sendo um desafio. Apesar da utilização de diversas abordagens computacionais para separar as "alterações que controlam os danos" das "alterações passageiras", esta distinção é muito complicada e trabalhosa e terá de ser remodelada especificamente para o câncer de pulmão do tipo NSCLC (CHEN et al., 2014).

Neste contexto, muitos são os fármacos quimioterápicos disponíveis e, dentre eles, muitos são derivados de produtos naturais. Uma revisão dos fármacos anticâncer introduzidos nos mercados farmacêuticos da América do Norte, Europa Ocidental e Japão, desde 1940 até 2006, indicou que cerca de 49% de um total de 175 medicamentos anticâncer, aprovados pelas agências regulatórias desses países, eram direta ou indiretamente derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012)

Os fármacos derivados de produtos naturais, empregados na clínica oncológica, desempenham um papel importante. Como exemplos podem ser citados os alcaloides da vinca, vinblastina e vincristina, isolados de *Catharanthus roseus* L., Apocynaceae, usados no tratamento de leucemias, linfomas, cânceres de testículos, de mama, de pulmão e sarcoma de Kaposi; e o paclitaxel, obtido de *Taxus brevifolia* Nutt., Taxaceae, que é significativamente ativo contra cânceres de ovário, mama e pulmão (UNNATI et al., 2013).

Diante desse contexto, uma revisão sobre uma classe importante de produtos naturais, os cardenolídeos, que são o objeto de estudo desta tese de Doutorado, e considerados potenciais agentes anticâncer, será descrita a seguir.

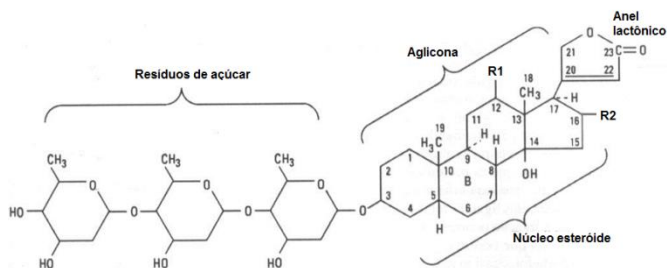
2.2 Cardenolídeos

Os cardenolídeos são glicosídeos cardiotônicos encontrados em algumas famílias vegetais, tais como Apocynaceae (*Asclepias* sp. L. e *Nerium oleander* L.) e Plantaginaceae (*Digitalis lanata* Ehrh. e *Digitalis purpúrea* L.) (RATES; BRIDI, 2007) e em animais (hipotálamo bovino) (TYMIAK et al., 1993). Alguns trabalhos já relataram que seres humanos apresentam a capacidade de produzir substâncias endógenas semelhantes à ouabaína (HAMLYN et al., 1991) e à digoxina (GOTO et al., 1990). Além disso, outros grupos de pesquisa demonstraram que o colesterol e a progesterona são substratos para a

biossíntese de cardenólídeos endógenos e esta produção é controlada por outros hormônios, como renina-angiotensina, endotelina e adrenalina (BAGROV; SHAPIRO; FEDOROVA, 2009; QAZZAZ et al., 2004).

Com relação à estrutura química, os cardenólídeos apresentam um núcleo esteroidal e um anel pentagonal lactônico insaturado na posição C17 (porção aglicona ou genina), além de uma porção açúcar ligada ao C3. Nos cardenólídeos, os anéis A/B e C/D apresentam-se na conformação *cis*, enquanto os anéis B/C encontram-se fusionados na conformação *trans* (RATES; BRIDI, 2007). Em relação à sua porção aglicona, os cardenólídeos são divididos em seis séries, de acordo com a estrutura química das mesmas (KREIS; HENSEL; STUHLEMMER, 1998). A Figura 6 mostra o esqueleto básico dos cardenólídeos.

Figura 6. Estrutura básica de um cardenólídeo



Fonte: adaptado de Rates, Bridi (2007).

Uma grande variedade de açúcares pode estar ligada à aglicona dos glicosídeos cardíacos, mais especificamente no C3. Os açúcares mais comuns são digitoxose, sarmentose, diginose, valarose, digitalose, frutose, ramnose e glicose (RATES; BRIDI, 2007). Embora os açúcares não sejam os responsáveis pela atividade cardiotônica dos cardenólídeos, eles afetam a farmacodinâmica e a farmacocinética dessa classe de compostos. Por exemplo, agliconas são absorvidas mais rapidamente e metabolizadas mais facilmente que cardenólídeos glicosilados (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008). No entanto, a presença dos açúcares confere maior solubilidade, fator importante na distribuição dessas moléculas pelo corpo, e a conformação

estereoquímica dos açúcares influencia a afinidade da ligação pelo sítio ligante da proteína receptora (RATES; BRIDI, 2003).

Os cardenólídeos têm sido utilizados no tratamento de doenças cardíacas há mais de 200 anos (BESSEN, 1986). Eles são caracterizados por sua alta especificidade e poderosa ação no músculo cardíaco: sua ação cardiotônica. Por isso, são utilizados para o tratamento da insuficiência cardíaca congestiva (ICC), podendo ser administrados em associação com diuréticos, se existir fibrilação atrial. Também são recomendados na profilaxia e tratamento de algumas arritmias, como por exemplo, da taquicardia atrial paroxística e, ainda, no tratamento do choque cardiogênico (RATES; BRIDI, 2007).

Os cardenólídeos mais conhecidos são digoxina, digitoxina, digitoxigenina, lanatosídeo C e ouabaína. Do ponto de vista terapêutico, os mais importantes são digoxina e digitoxina (PONGRAKHANANON, 2013). No mercado farmacêutico brasileiro, estão disponíveis medicamentos elaborados com digoxina e deslanosídeo (BRASIL, 2013).

O mecanismo da ação cardiotônica ocorre através da inibição da enzima Na^+/K^+ -ATPase, envolvida no mecanismo da bomba Na^+/K^+ dependente destes íons, que promove, neste caso, a contração muscular cardíaca (HORISBERGER, 2004). Com a inibição desta bomba, os níveis de Na^+ no interior dos miócitos aumentam, ao contrário do que acontece com os íons K^+ , que são expelidos da célula, sendo que esta troca iônica ocorre através do gasto de moléculas de ATP. O aumento intracelular dos íons Na^+ modula a atividade de um carreador de membrana, envolvido nas trocas do íon Ca^{2+} por íons Na^+ , promovendo o aumento dos níveis intracelulares de Ca^{2+} , por influxo ou pela mobilização dos reservatórios sarcoplasmáticos. Tal elevação da concentração intracelular dos íons cálcio resulta no aumento da força contrátil cardíaca, pois o Ca^{2+} fica disponível para as proteínas contráteis (RAHIMTOOLA; TAK, 1996).

No coração relaxado, a tropomiosina mascara o sítio de ligação da miosina, através de um bloqueio estérico. No processo de contração muscular, o contato dos íons Ca^{2+} com a troponina resulta numa alteração conformacional da tropomiosina, desmascarando o sítio de ligação da miosina e possibilitando a formação do complexo actina-miosina e, assim, induzindo a contração miocárdica ATP-dependente. Portanto, o aumento dos níveis intracelulares dos íons Ca^{2+} , ocasionado pelo tratamento com cardenólídeos, provoca um aumento do tônus muscular e do volume sanguíneo circulante por minuto e reduz a frequência e o volume cardíacos (RATES; BRIDI, 2007).

Apesar da ampla utilização dos cardenólídeos como agentes inotrópicos positivos, a investigação dos efeitos desses compostos em outras situações patológicas se intensificou, nos últimos anos, apresentando novas possibilidades terapêuticas para os mesmos (PRASSAS; DIAMANDIS, 2008).

Uma das investigações diz respeito à sua potencial ação antiviral. Recentemente, o efeito inibitório do vírus herpético humano do tipo 1 (HSV-1) foi observado para digoxina (HARTLEY et al., 2006), ouabaína (DODSON et al., 2007) e digitoxina (SU et al., 2008). A atividade antiviral da digoxina foi, ainda, relatada por Hartley (2006) para outros vírus DNA (HSV-2, vírus da varicela zoster, citomegalovírus e adenovírus), e por Hoffmann e colaboradores (2008) para vírus RNA (vírus influenza, vírus da doença de New Castle e vírus da estomatite vesicular). Mais recentemente ainda, o mecanismo da ação inibitória da replicação do HSV-1 pelo cardenólídeo glucoevatromonosídeo, isolado de uma cultivar brasileira da *Digitalis lanata* Ehrh., foi proposto por Bertol e colaboradores (2011), fruto de uma Dissertação de Mestrado realizada no nosso Laboratório, orientada pela mesma professora desta Tese, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da UFSC. Estudos muito recentes relataram sua ação inibitória da replicação do HIV, tais como com o extrato aquoso de *Nerium oleander* L. (espirradeira) e a oleandrina, principal cardenólídeo isolado desse extrato (SINGH et al., 2013), além da digoxina (WONG et al., 2013).

Outra investigação crescente com os cardenólídeos se refere ao seu potencial como agentes anticâncer. As primeiras evidências dos efeitos citotóxicos *in vitro* dos cardenólídeos frente a células tumorais e sua ação antitumoral *in vivo* foram relatadas no final da década de 60 (SHIRATORI, 1967). Quase duas décadas depois, estes compostos despertaram a atenção dos pesquisadores, principalmente, através dos estudos epidemiológicos conduzidos por Stenkvist e colaboradores (1980), nos quais pacientes com câncer de mama, que usavam concomitantemente heterosídeos cardioativos para o tratamento de seus problemas cardíacos, apresentaram taxa de mortalidade por esse câncer bastante inferior à dos pacientes que não utilizaram tais medicamentos (STENKVIST; BENGTTSSON; EKLUND, 1980; STENKVIST et al., 1979). Um pouco depois, Stenkvist et al. (1982) também mostraram que, cinco anos após a mastectomia, a recorrência entre as pacientes, que não foram tratadas com cardenólídeos, foi de 9,6 vezes maior do que entre as pacientes que tomaram. Logo após, outros autores investigaram a mortalidade em 127 pacientes com câncer, que receberam tratamento

com cardenólídeos, e relataram que 21 pacientes do grupo controle morreram de câncer, enquanto que apenas um membro do grupo tratado com estes fármacos foi a óbito (GOLDIN; SAFA, 1984)

Em 2001, foi publicado um estudo analítico-descritivo com 9.271 pacientes sobre os efeitos antineoplásicos da digitoxina no tratamento de cânceres dos rins/trato urinário e de leucemias. Este estudo indicou que as doses deste cardenólídeo, que são ativas contra o câncer, são semelhantes às concentrações plasmáticas terapêuticas encontradas nos pacientes cardíacos tratados com este fármaco (HAUX et al., 2001). Desta forma, estes dados são considerados como um marco para os estudos que se seguiram sobre o potencial citotóxico, antitumoral e anticâncer dos cardenólídeos.

Após estes relatos iniciais, foram publicados vários estudos sobre a atividade antiproliferativa de extratos vegetais contendo cardenólídeos, de cardenólídeos semissintéticos e de cardenólídeos isolados de plantas, bem como dos possíveis efeitos provocados por estes compostos em linhagens celulares de cânceres de mama, próstata, pâncreas, pulmão, rins, além de leucemias, neuroblastomas e melanomas (CHANG et al., 2013; JUNCKER et al., 2009; MIJATOVIC et al., 2007; NEWMAN et al., 2007; PONGRAKHANANON; CHUNHACHA; CHANVORACHOTE, 2013; ROCHA et al., 2014; SLINGERLAND et al., 2013).

Até a presente data, três produtos à base de cardenólídeos foram investigados para o tratamento do câncer em ensaios clínicos de fase I. O primeiro investigado foi o Anvirzel™, um extrato aquoso liofilizado de *Nerium oleander* (espirradeira); o segundo foi o PBI-05204, outro extrato de *Nerium oleander*, mas produzido por extração com CO₂ supercrítico; e o terceiro foi o composto UNBS1450, um cardenólídeo semissintético derivado da 2-oxovuscharina, extraído de *Calotropis procera* (SLINGERLAND et al., 2013).

O extrato denominado Anvirzel™ contém vários cardenólídeos, tais como oleandrina, neritalosídeo e a aglicona oleandrigenina. Dois desses cardenólídeos, oleandrina e oleandrigenina, inibiram a atividade catalítica da bomba Na⁺K⁺ATPase e o fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), em linhagens tumorais de câncer de próstata (PATHAK et al., 2000; SMITH et al., 2001). Um estudo para determinar a dose máxima tolerada (DMT) e a segurança deste extrato, em pacientes com tumores sólidos, em estágio avançado, indicou que ele pode ser administrado com segurança em doses de até 1,2 mL/m²/dia. A dose tóxica limitante não foi encontrada, mas a DMT foi definida como 0,8

mL/m²/dia. Dezoito pacientes foram inscritos e completaram pelo menos um ciclo de três semanas de tratamento. Para os estudos de fase II, a dose recomendada foi de 0,8 mL/m²/dia (MEKHAIL et al., 2006).

A oleandrina, um dos cardenolídeos presente em ambos os extratos acima citados (AnvrizelTM e PBI-05204) inibiu a subunidade α -3 da bomba Na⁺K⁺ATPase, que está correlacionada com a proliferação celular, e o FGF-2. Além disso, inibiu a via do NF-kB e a fosforilação da Akt e p70S6K atenuando a atividade da mTOR. Recentemente, os estudos de fase I foram concluídos com o PBI-05204 e foi determinada sua DMT, que é a dose recomendada para a fase II, além dos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos em pacientes com câncer avançado. Os 46 pacientes avaliados receberam oito diferentes doses do extrato PBI-05204 (0,6 a 10,2 mg/dia), e desses, sete ficaram estáveis por mais de quatro meses (cânceres de bexiga, cólon-retal, trompa de Falópio, mama e pâncreas). Nesse estudo, os autores concluíram que o extrato PBI-05204 foi bem tolerado na dose máxima testada (10,2 mg/dia) com poucos efeitos adversos comuns ou cardiotoxicidade (HENARY et al., 2011; SLINGERLAND et al., 2013). Este primeiro estudo em humanos determinou a segurança, farmacocinética (PK) e farmacodinâmica (PD) do PBI-05204 em pacientes com câncer avançado. Este estudo de Fase 1 determinou a dose recomendada para a fase II que é de 0,2255 mg/kg. (HONG,et al., 2014)

O composto 2-oxovorucharina, um cardenolídeo com um anel diidrotiazol, raro em sua molécula, foi isolado a partir de um arbusto tropical, *Calotropis procera* (Aiton) W.T., Asclepiadaceae, apresentou potentes efeitos citotóxicos e inibiu a bomba Na⁺K⁺ATPase (QUAQUEBEKE et al., 2005). O composto derivado da 2-oxovorucharina, por redução do grupamento formila a hidroximetila, foi denominado de UNBS1450, e exibiu um perfil de citotoxicidade *in vitro* mais potente, quando comparado ao do composto de origem. O UNBS1450 apresentou atividade antiproliferativa *in vitro* com valores de IC₅₀ entre 10 e 50 nM, em 58 linhagens celulares tumorais humanas de 11 tipos histopatológicos diferentes (QUAQUEBEKE et al., 2005). Ele induziu o rompimento dos filamentos de actina e afetou várias vias de sinalização, por meio da sua ligação com a bomba Na⁺K⁺ATPase (MIJATOVIC et al., 2007). Este composto entrou em ensaio clínico de fase I na Comunidade Européia para o tratamento de pacientes com linfomas e tumores sólidos (PAN; CHAI; KINGHORN, 2012).

Apesar dos inúmeros estudos realizados com estes compostos, o mecanismo pelo qual eles agem nas células tumorais não é claro. Muitas

são as teorias propostas para desvendar tal mecanismo de ação e, de fato, vários intermediários intracelulares e vias moleculares independentes foram descritas como sendo moduladores dos efeitos observados. No entanto, nenhuma destas teorias parece ser suficientemente sólida para a proposição de uma conclusão definitiva, já que o mecanismo de ação em questão é, sem sombra de dúvida, complicado e complexo. A heterogeneidade dos mecanismos propostos foi descrita como consequência dos tipos celulares específicos, contra os quais os compostos foram testados (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2013; RIGANTI et al., 2011).

Uma das teorias propostas é que o alvo primário dos cardenolídeos, nas células tumorais, é a ligação na subunidade alfa da bomba $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}$. Essa ligação seria capaz de determinar alterações na atividade de bombeamento, com aumento da produção de Na^+ intracelular, depleção de K^+ e aumento de Ca_2^+ a partir da mitocôndria, devido à exacerbação da atividade mitocondrial na troca de $\text{Na}^+/\text{Ca}_2^+$; e também a estimulação do não bombeamento da bomba que, por sua vez, ativa cascatas de sinalização intracelular. Outros alvos primários dos cardenolídeos seriam a possibilidade deles se ligarem à membrana plasmática, devido ao seu núcleo esteroide, e modificarem sua fluidez, afetando indiretamente a função das proteínas/receptores de membrana; a possibilidade de interagirem diretamente e se ligarem com outros receptores transmembranários; e a capacidade de se internalizarem e interagirem diretamente com alvos intracelulares, potencialmente receptores (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2013).

Além da identificação do alvo primário, as vias de sinalização ativadas/inibidas pelos cardenolídeos também estão sendo investigadas. A partir dos estudos já realizados, alguns alvos foram propostos, como por exemplo, perturbações iônicas, ou seja, alterações nos níveis intracelulares de Na^+ e K^+ , que podem gerar efeitos prejudiciais, alterando a conformação de muitas proteínas (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2013); inibição da DNA topoisomerase II (BIELAWSKI; WINNICKA; BIELAWSKA, 2006); inibição de vias mediadas por $\text{NF}\kappa\text{B}$, constitutivamente ativas em muitos tipos de câncer (MIJATOVIC; KISS, 2013; SLINGERLAND et al., 2013); alterações do ciclo celular, especificamente bloqueio das fases S e G2/M (JUNCKER et al., 2011; WANG et al., 2012); inibição da produção da interleucina 8 (JUNCKER et al., 2009); ativação da via Src-cinase (KHAN et al., 2009), modulação da proteína Mcl-1 como fator essencial para a morte celular (CERELLA et al., 2015) entre outras vias que estão

sendo estudadas (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2013; SLINGERLAND et al., 2013).

Por exemplo, a ligação dos glicosídeos cardíacos com a bomba de Na^+/K^+ provoca a ativação da proteína tirosina-cinase Src que por sua vez ativa o receptor do fator de crescimento epidérmico EGFR. O EGFR ativado recruta e estimula as proteínas adaptadoras SHC, GRB2 e SOS levando a ativação da cascata Ras e MAPK. Em paralelo, a fosfolipase C (PLC) e o inositol trifosfato (IP3) permitem que a bomba de Na^+/K^+ tenha contato com o retículo endoplasmático. Tal estimulação do retículo endoplasmático resulta em uma libertação temporária ou repetida de Ca_2^+ no citoplasma, gerando variações na concentração de ions Ca_2^+ e, portanto, capazes de induzir as vias de sinalização que conduzem à ativação de NF- κ B (CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2013; SLINGERLAND et al., 2013).

Mais especificamente, pode-se dizer que embora a função de transporte de Na^+/K^+ da bomba Na^+/K^+ -ATPase foi investigada extensivamente no passado, durante as últimas décadas vários trabalhos têm identificado que quando ocorre a ligação dos cardenolídeos nas subunidades da bomba, a mesma fornece as células normais sinais de sobrevivência (LIANG et al., 2007; XIE, ASKARI, 2002; WANG et al., 2004) e sinais de morte em células tumorais (LEFRANC et al., 2009; MIJATOVIC et al., 2007; MATHIEU et al., 2009, XIE et al., 2002)

De fato, Xie e Askari (2002) propuseram a existencia de 2 canais de Na^+/K^+ dentro da membrana: um sendo o classico canal da enzima agindo como uma transdução energética de íons e o outro sendo o sinal de transdução da enzima ao qual é restrita a caveola (pequenas invaginações lipídicas nas células), formando a chamada Na^+/K^+ -ATPase signalossoma.

Ainda, acredita-se que o sinal de domínio da bomba Na^+/K^+ está localizado nas depressões membranares de clatrina, no lado citoplasmático. As alterações conformacionais na estrutura da proteína, durante a ligação dos glicosídeos cardiotônicos, desencadeiam uma cascata de interações nas vias de transdução de sinal (MIJATOVIC, DUFRASNE, KISS 2012).

Esse sítio de ligação dos glicosídeos cardiotônicos é evolutivamente conservado, inibindo a bomba de sódio pela interação com um “canal” extracelular composto por grupos multifuncionais de subunidades α e β . A parte mais importante do sítio de ligação é representada pelo primeiro canal extracelular da subunidade α (OGAWA, et al., 2009, YATIME et al., 2011). Já foram descritas quatro isoformas α (α 1-4) e três isoformas β (β 1-3) que foram caracterizadas em mamíferos com distribuição

dependente do tipo celular. Todas as possíveis α e β combinações resultam em enzimas cataliticamente competentes, indicando que multi Na^+/K^+ ATPase isoenzimas podem operar nas células (BLANCO, 2005; MIJATOVIC et al., 2007).

Importante ressaltar que a subunidade α -1 é superexpressa em alguns tipos de câncer, incluindo NSCLC, carcinoma renal, glioma e melanoma, enquanto a subunidade α -3 é superexpressa em carcinoma de colon (MIJATOVIC et al., 2007; LEFRANC et al., 2009; MATHIEU et al., 2009).

Ainda nesse contexto, em murinos, as isoformas α 2, α 3 e α 4 são naturalmente susceptíveis a glicosídeos cardíacos. Por outro lado, α 1 é, por exemplo, uma ligação resistente à ouabaina. Nos seres humanos, a situação é diferente, a isoforma α 1 é sensível aos glicosídeos cardíacos e pode assim desempenhar um papel-chave na via de transdução de sinal (MIJATOVIC, DUFRASNE, KISS 2012).

Como discutido até o momento, a interação com a bomba Na^+/K^+ ATPase e a ativação dessas cascatas de sinalização intracelular pode culminar em diferentes tipos de morte celular. Assim, já é conhecido que os cardenolídeos podem induzir apoptose ou autofagia, dependendo do tipo celular e das suas características químicas. Esse potencial citotóxico duplo está atraindo o interesse dos pesquisadores, uma vez que ele poderia ser uma alternativa para os tumores resistentes à quimioterapia realizada com agentes indutores de apoptose (SLINGERLAND et al., 2013).

O composto UNBS1450, já mencionado anteriormente, é um exemplo de cardenolídeo que pode induzir os dois tipos citados de morte celular. Ele induziu morte celular apoptótica, em células leucêmicas humanas (JUNCKER et al., 2011), e induziu morte celular autofágica, em linhagens celulares humanas de glioma, próstata e pulmão de tipo NSCLC (MIJATOVIC et al., 2007).

Adicionalmente, alguns cardenolídeos que induziram morte celular apoptótica em diferentes linhagens tumorais podem ser citados: oleandrina (RAGHAVENDRA; SREENIVASAN; MANNA, 2007), digitoxina (HAUX, 1999), digoxina (WINNICKA, 2010), ouabaina (XU et al., 2011), lanatosídeo C, e os cardenolídeos extraídos de *Cerbera manghas* L. (FENG et al., 2010; WANG et al., 2010) e *Periploca graeca* L. (LU et al., 2010). Alguns desses compostos induziram a via apoptótica intrínseca, causada pela liberação do citocromo *c*, além de provocarem perda do potencial de membrana (RAMIREZ-ORTEGA et al., 2006), e ativaram membros pró-apoptóticos da família Bcl-2

(BAK/BAX) (JUNCKER et al., 2011). Outros estudos, por sua vez, demonstraram a capacidade destes compostos de afetarem a via extrínseca da apoptose, através da regulação para cima (em inglês, *upregulation*) de receptores de morte (FRESE et al., 2006) ou de seus ligantes, tal como o FasL (fragmento ligante estimulador de apoptose) (RAGHAVENDRA; SREENIVASAN; MANNA, 2007).

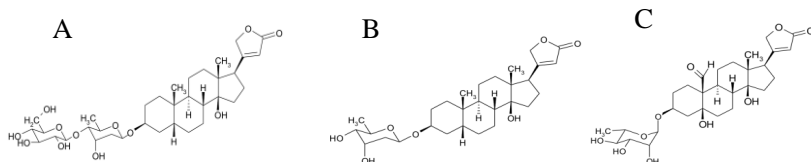
Com relação à autofagia, os cardenólídeos digoxina e ouabaína induziram autofagia em células de câncer de pulmão do tipo NSCLC (WANG et al., 2012), e a oleandrina induziu morte celular autofágica em glioblastoma humano e células tumorais pancreáticas (NEWMAN et al., 2007). Esses compostos provocaram aumento da formação de autofagossomas e elevada atividade lisossomal, marcadores característicos deste tipo de morte, assim como foi demonstrado o envolvimento de diferentes proteínas nesse processo, como por exemplo as Atg's, LC3BII, beclina-I e mTOR.

Ainda, os efeitos da ouabaína na migração e invasão de células tumorais também foram relatados recentemente (PONGRAKHANANON; CHUNHACHA; CHANVORACHOTE, 2013). Uma triagem identificou os efeitos citotóxicos de alguns glicosídeos cardíacos (ouabaína, digoxina e digitoxigenina), que agem por meio de anoikis (SIMPSON et al., 2009). Ainda, Pongrakhananon e colaboradores (2013) demonstraram que a ouabaína inibiu a migração de células tumorais de pulmão H292, via supressão de proteínas reguladoras de migração, tais como a cinase de adesão focal (FAK) e Akt; porém, esse composto não teve efeito significativo algum na anoikis, como citado anteriormente no trabalho do Simpson et al., (2009), para células de tumor de próstata.

Em face do exposto nessa revisão bibliográfica sobre a problemática do câncer, esse trabalho teve por objetivo investigar o efeito antitumoral de três cardenólídeos. Estes foram, selecionados previamente, por apresentarem potente ação citotóxica em células de tumor de pulmão. Esse efeito foi investigado inicialmente em linhagens tumorais de diferentes origens e posteriormente as células A549 foram selecionadas para investigação do mecanismo de ação anti-tumoral desses compostos. Os três compostos foram gentilmente cedidos pelos Profs. Drs. Fernão Castro Braga e Rodrigo Maia de Pádua, da Faculdade de Farmácia da UFMG, e pelo Prof. Dr. Wolfgang Kreis, da Friedrich-Alexander Universität, Erlangen, da Alemanha. A convalotoxina (CON) foi adquirida comercialmente da Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA. As

estruturas químicas dos três cardenólídeos testados, e que serão apresentados nos próximos capítulos, encontram-se na Figura 7.

Figura 7. Estrutura química dos cardenólídeos glucoevatromonosídeo (A) digitoxigenina monodigitoxosídeo (B) e convalotoxina (C).



REFERÊNCIAS

AGUS, D. B. et al. A physical sciences network characterization of non-tumorigenic and metastatic cells. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1449, 2013.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer Basics. Disponível em: <<http://www.cancer.org/>>. Acesso em: maio de 2015.

ARYA, R. WHITE, K. Cell death in development: Signaling pathways and core mechanisms. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 39, p.12-19, 2015.

AUTOFAGIA NO AUTOREGULADA; Etapas da Macroautofagia. Imagem. Disponível em: < <http://flagellum.wordpress.com/2009/05/22/autofagia-no-autoregulada/>> Acesso em: outubro de 2013.

BABA, A. I.; CÂTOI, C. **Comparative Oncology**. Bucharest: The Publishing House of the Romanian Academy, 2007. 150 p.

BAIN, B.J. **Diagnóstico em Leucemias**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2003.

BAGROV, A. Y.; SHAPIRO, J. I.; FEDOROVA, O. V. Endogenous cardiotonic steroids : Physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. **Pharmacological Reviews**, v. 61, n. 1, p. 9-38, 2009.

BERTOL, J. W. et al. Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, v. 92, n. 1, p. 73-80, 2011.

BESSEN, H. Therapeutic and toxic effects of digitalis: William Withering, 1785. **The Journal of Emergency Medicine**., v. 4, n. 3, p. 243-248, 1986.

BIELAWSKI, K.; WINNICKA, K.; BIELAWSKA, A. Inhibition of DNA topoisomerases I and II, and growth inhibition of breast cancer

MCF-7 cells by ouabain, digoxin and proscillaridin A. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 7, p. 1493-1497, 2006.

BLANCO, G. The Na/K-ATPase and its isozymes: what we have learned using the baculovirus expression system. *Front. Biosci.*, v. 10, p. 2397-2411, 2005.

BORGHAEIA, H.; SMITHA, M. R.; CAMPBELLB, K. S. Immunotherapy of cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, p. 41-54, 2009.

BRASIL. **Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA)**. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/vigilancia/incidencia.html>> Acesso em maio de 2015.

BRASIL. **Bulário Eletrônico Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)**. 2013. Disponível em:<<http://www4.anvisa.gov.br/BularioEletronico>>. Acesso em: outubro de 2013

CARVALHO, A. DE. **Avaliação dos efeitos citotóxicos de cardenólídeos em células tumorais**. 2012. 112 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Curso de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2012.

CERELLA, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. **Mitochondrion**, v. 13, n. 3, p. 225-34, 2013.

CERELLA, C. et al., Early downregulation of Mcl-1 regulates apoptosis triggered by cardiac glycoside UNBS1450. **Cell Death and Disease**, v. 6, p. e1782, 2015.

CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C. G.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563-572, 2002.

CHANG, H.S. et al. Cytotoxic cardenolide glycosides from the root of *Reevesia formosana*. **Phytochemistry**, v. 87, p. 86-95, 2013.

CHEN, Zhao et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 8, p. 535–546, 2014.

DARLING, N. J.; COOK, S. J. The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1843, p. 2150-2163, 2014.

DE ALMEIDA, V. L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

DODSON, A. W. et al. Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. **Virology**, v. 366, p. 340–348, 2007.

DUFFY, M. J.; MCGOWAN, P. M.; GALLAGHER, W. M. Cancer invasion and metastasis : changing views. **Journal of Pathology**, v. 214, n.13, p. 283-293, 2008.

ESTADOS UNIDOS DA AMERICA (EUA). **National Cancer Institute (NCI): Types of Cancer/Cancer statistics**. Disponível em: <<http://www.cancer.gov/>> Acesso em: maio de 2015.

FENG, B. et al. 2'-epi-2'-O-Acetylthevetin B extracted from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, n. 1, p. 142-153, 2010.

FRESE, S. et al. Cardiac glycosides initiate Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by up-regulation of death receptors 4 and 5. **Cancer Research**, v. 66, n. 11, p. 5867-5874, 2006.

FRIEDL, P. et al. Classifying collective cancer cell invasion. **Nature Cell Biology**, v. 14, n. 8, p. 777–783, 2012.

FRIEDL, P.; HEGERFELDT, Y.; TUSCH, M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 5-6, p. 441-449, 2004.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107-120, 2012.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1796, n. 2, p. 293-308, 2009.

GOLDIN, A.; SAFA, A. *Digitalis* and cancer. **Lancet**, v. 1, p. 1134, 1984.

GOTO, A. I. et al. Isolation of digitalis-like from digoxin factor indistinguishable **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 173, n. 3, p. 1093-1101, 1990.

GRIDELLI, C. et al. Non-small cell lung cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 1, p. 1-16, 2015.

GRIGOROPOULOS, N. F. et al. Leukaemia update. Part 1: diagnosis and management. **British Medical Journal**, v. 346, p. 1-6, 2013

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-695, 2006.

HAMLYN, J. M. et al. Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 6259-6263, 1991.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A.; FRANCISCO, S. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of Cancer : The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARTLEY, C. et al. Ionic Contra-Viral Therapy (ICVT); A new approach to the treatment of DNA virus infections. **Archives of Virology**, v. 151, p. 2495-2501, 2006.

HAUX, J. Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. **Medical Hypotheses**, v. 53, n. 6, p. 543-548, 1999.

HAUX, J. et al. Digitoxin medication and cancer; case control and internal dose-response studies. **BMC Cancer**, v. 1, p. 11, 2001.

HEAVEY, S.; O'BYRNE, K. J.; GATELY, K. Strategies for co-targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in NSCLC. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 3, p. 445-456, 2013.

HEJMADI, M. **Introduction to Cancer Biology**. New York: Momna Hejmadi & Ventus Publishing: ApS, 2010. p. 46

HENARY, H. et al. Final results of a first-in-human phase I trial of PBI-05204, an inhibitor of Akt, FGF-2, NF-Kb, and p70S6K in advanced cancer patients. **Journal Clinical of Oncology**, v. 29, p. 1, 2011.

HIRAKATA, K.; NAKATA, H.; NAKAGAWA, T. CT of pulmonary metastases with pathological correlation. **Seminars in Ultrasound**, v. 16, n. 5, p. 379–394, 1995.

HOFFMANN, H.-H.; PALESE, P.; SHAW, M. L. Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. **Antiviral research**, v. 80, n. 2, p. 124–34, 2008.

HONG, D. S. et al. First-in-human study of pbi-05204, an oleander-derived inhibitor of AKT, FGF-2, NF-KB and p70S6K, in patients with advanced solid tumors. **Investigational New Drugs**, v. 32, n. 6, p. 1204-1212, 2014.

HORISBERGER, J.D. Recent insights into the structure and mechanism of the sodium pump. **Physiology**, v. 19, p. 377-387, 2004.

HSIEH, T.C. et al. AKT/mTOR as Novel Targets of Polyphenol Piceatannol Possibly Contributing to Inhibition of Proliferation of Cultured Prostate Cancer Cells. **ISRN Urology**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

INDRAN, I. R. et al. Recent advances in apoptosis, mitochondria and drug resistance in cancer cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1807, n. 6, p. 735–45, 2011.

JUNCKER, T. et al. UNBS1450 from *Calotropis procera* as a regulator of signaling pathways involved in proliferation and cell death. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, n. 1, p. 1-10, 2009.

JUNCKER, T. et al. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 1, p. 13-23, 2011.

KARIN, M. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. **Oncogene**, v. 18, p.6867-74, 1999.

KATSUYA, T.; SATOSHI, F.; HIROYASU, E. Autophagy and cancer: dynamism of the metabolism of tumor cells and tissues. **Cancer Letters**, v. 278, n. 2, p. 130-138, 2009.

KHAN, M. I. et al. Digitalis, a targeted therapy for cancer? **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 337, n. 5, p. 355-359, 2009.

KRANS, B. **Symptoms & Stages of Lung Cancer**. Disponível em: <<http://www.healthline.com/health-slideshow/symptoms-stages-lung-cancer>>. Acesso em outubro de 2013.

KREIS, W.; HENSEL, A.; STUHLEMMER, U. Cardenolide biosynthesis in foxglove 1. **Planta Medica**, v. 64, n. 6, p. 491–499, 1998.

LEFRANC, F. The sodium pump alpha 1 sub-unit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**., v. 13, p. 3960-3972, 2009,

LICINIO, M; SILVA, M. Importância da detecção das mutações no gene FLT3 e no gene NPM1 na leucemia mieloide aguda - Classificação da Organização Mundial de Saúde 2008. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 6, p. 476-481, 2010.

LIANG, M. et al. Identification of a pool of non-pumping Na/K-ATPase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 10585-10593, 2007.

LÓPEZ-GÓMEZ, M. et al. Cancer in developing countries: The next most preventable pandemic. The global problem of cancer. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 88, n. 1, p. 117-22, 2013.

LORIN, S. et al. Autophagy regulation and its role in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 23, n. 5, p. 361-379, 2013.

LU, Z. J. et al. Periplocin inhibits growth of lung cancer in vitro and in vivo by blocking Akt / ERK Signaling Pathways. **Cellular Physiology and Biochemistry** p. 609-618, 2010.

Lung Cancer Research Foundation. Disponível em: <https://www.lungcancerresearchfoundation.org/lung_cancer_facts.htm>. Acesso em maio de 2015.

LUO, J.; SOLIMINI, N. L.; ELLEDGE, S. J. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. **Cell**, v. 136, n. 5, p. 823-837, 2009.

MATHIEU, V.; et al. The sodium pump alpha1 sub-unit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. **Journal of Cellular and Molecular Medicine.**, v. 13, p. 3960-3972, 2009,

MEKHAIL, T. et al. Phase 1 trial of Anvirzel in patients with refractory solid tumors. **Investigational New Drugs**, v. 24, n. 5, p. 423-427, 2006.

MIJATOVIC, T. et al. UNBS1450: A new hemi-synthetic cardenolide with promising anti-cancer activity. **Drug Development Research**, v. 173, p. 164-173, 2007.

MIJATOVIC, T.; KISS, R. Cardiotoxic steroids-mediated Na⁺/K⁺-ATPase targeting could circumvent various chemoresistance pathways. **Planta Medica**, v. 79, n. 3-4, p. 189-198, 2013.

MIJATOVIC, T.; et al. The alpha1 subunit of the sodium pump could represent a novel target to combat non- small cell lung cancers. **The Journal of Pathology**, v. 212, p. 170-179, 2007,

MIJATOVIC, T.; DUFRASNE, F.; KISS, R. Cardiotoxic steroids-mediated targeting of the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase to combat chemoresistant cancers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 627-646, 2012.

NEWMAN, R. et al. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, n. 4, p. 354-364, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OGAWA, H. et al. Crystal structure of the sodium-potassium pump (Na⁺,K⁺-ATPase) with bound potassium and ouabain. **PNAS**, v. 106, p. 13742-7, 2009,

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), **Câncer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>> Acesso em: maio de 2015.

ORLIKOVA, B.; DICATO, M.; DIEDERICH, M.. 1,000 Ways to die: natural compounds modulate non-canonical cell death pathways in cancer cells. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 277-293, 2013.

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

OVERALL, C. M.; KLEIFELD, O. Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 227-239, 2006.

PATHAK, S. et al. Anvirzel, an extract of *Nerium oleander*, induces cell death. **Anticancer Drugs**, v. 11, n. 6, p. 455-463, 2000.

PONGRAKHANANON, V. Anticancer properties of cardiac glycosides. In: RANGEL, L. **Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches**. Rijeka: InTech, 2013. p. 618.

PONGRAKHANANON, V.; CHUNHACHA, P.; CHANVORACHOTE, P. Ouabain suppresses the migratory behavior of lung cancer cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68623, 2013.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 11, p. 926-935, 2008.

QAZZAZ, H. M. A M. et al. *De novo* biosynthesis and radiolabeling of mammalian digitalis-like factors. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 3, p. 612-620, 2004.

QUAQUEBEKE, E. VAN et al. Identification of a novel cardenolide (2'-oxovorucharin) from *Calotropis procera* and the hemisynthesis of novel derivatives displaying potent *in vitro* antitumor activities and high *in vivo* tolerance: structure-activity relationship analyses. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, p. 849-856, 2005.

RAGHAVENDRA, P. B.; SREENIVASAN, Y.; MANNA, S. K. Oleandrin induces apoptosis in human, but not in murine cells: dephosphorylation of Akt, expression of FasL, and alteration of membrane fluidity. **Molecular Immunology**, v. 44, n. 9, p. 2292-2302, 2007.

RAHIMTOOLA, S.; TAK, T. The use of digitalis in heart failure. **Current Problems in Cardiology**, v. 21, n. 12, p. 781-853, 1996.

RAMIREZ-ORTEGA, M. et al. Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by *in vitro* stimulation with digitalis. **European Journal of Pharmacology**, v. 534, n. 1-3, p. 71-76, 2006.

RATES, S. M.; BRIDI, R. Heterosídeos cardioativos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade/UFGRS / Editora da UFSC, 2007. p. 685-710.

RIGANTI, C. et al. Pleiotropic effects of cardioactive glycosides. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 872-885, 2011.

ROBERT, J. Biologie de la métastase. **Bulletin du Cancer**, v. 100, n. 4, p. 333-342, 2013.

ROCHA, S. C. et al. 21-Benzylidene Digoxin: A Proapoptotic Cardenolide of Cancer Cells That Up-Regulates Na,K-ATPase and Epithelial Tight Junctions. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e108776, 2014.

SARETZKI, G.. Cellular senescence in the development and treatment of cancer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 16, n. 1, p. 79–100, 2010.

SARKAR, F. H. et al. Cellular signaling perturbation by natural products. **Cellular Signalling**, v. 21, n. 11, p. 1541-1547, 2009

SHIRATORI, O. Growth inhibitory effect of cardiac glycosides and aglycones on neoplastic cells: *in vitro* and *in vivo* studies. **Gann**, v. 58, n. 6, p. 521–528, 1967.

SIEGEL, R. L; MILLER, K. D; JEMAL, A.. Cancer Statistics, 2015. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 65, n. 1, p. 5–29, 2015.

SIMPSON, C. et al. Inhibition of the sodium potassium adenosine triphosphatase pump sensitizes cancer cells to anoikis and prevents distant tumor formation. **Cancer Research**, v.69, p.2739-2747, 2009.

SINGH, S. et al. *Nerium oleander* derived cardiac glycoside oleandrin is a novel inhibitor of HIV infectivity. **Fitoterapia**, v. 84, p. 32–39, 2013.

SLINGERLAND, M. et al. Cardiac glycosides in cancer therapy: from preclinical investigations towards clinical trials. **Investigational New Drugs**, v. 31, n. 4, p. 1087-1094, 2013.

SMITH, J. A et al. Inhibition of export of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) from the prostate cancer cell lines PC3 and DU145 by Anvirzel and its cardiac glycoside component, oleandrin. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 4, p. 469-472, 2001.

STEEG, P. S.; THEODORESCU, D. Metastasis : A Therapeutic target for cancer. **Nature Clinical Practice Oncology**, v. 5, n. 4, p. 206-219, 2008.

STENKVIST, B. et al. Cardiac glycosides and breast cancer. **Lancet**, v. 1, p. 563, 1979.

STENKVIST, B.; BENGTTSSON, E.; EKLUND, G. Evidence of a modifying influence of heart glucosides on the development of breast cancer. **Analytical & Quantitative Cytology & Histology**, v. 2, p. 49-54, 1980.

STENKVIST, B. et al. Cardiac glycosides and breast cancer, revisited. **New England Journal of Medicine**, v. 306, p. 484, 1982.

SU, C. T. et al. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. **Antiviral Research**, v. 79, n. 1, p. 62-70, 2008.

SU, M.; MEI, Y.; SINHA, S. Role of the crosstalk between autophagy and apoptosis in cancer. **Journal of Oncology**, v. 10, n. 9, p. 1533-1541, 2013.

SUI, X. et al. P38 and JNK MAPK pathways control the balance of apoptosis and autophagy in response to chemotherapeutic agents. **Cancer Letters**, v. 344, n. 2, p. 174–179, 2014.

SWERDLOW, S.H.;et al. **WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press; 2008.

TAYLOR, B. S.; LADANYI, M. Clinical cancer genomics: how soon is now? **Journal of Pathology**, v. 223, p. 318-326, 2011.

TYMIAK, A. A. et al. Physico-chemical characterization of a ouabain isomer isolated from bovine hypothalamus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 8189-8193, 1993.

UNNATI, S. et al. Novel anticancer agents from plant sources. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 1, p. 16-23, 2013.

VAPORCIYAN, A. A. et al. Cancer of the lung. In: BAST, R. et al. (Eds). **Holland-Frei Cancer Medicine**. 5. ed. New York: BC Decker, 2000, p. 1778.

WANG, H. et al. Ouabain assembles signaling cascades through the caveolar Na⁺/K⁺-ATPase. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 279, p. 17250-17259, 2004.

WANG, G.-F. et al. Tanghinigenin from seeds of *Cerbera manghas* L. induces apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 30, n. 1, p. 31-36, 2010.

WANG, Y. et al. Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through regulation of dual signaling pathways. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 11, p. 1813-1824, 2012.

WEBER, C. E.; KUO, P. C. The tumor microenvironment. **Surgical Oncology**, v. 21, n. 3, p. 172-177, 2012.

WINNICKA, K. Dual effects of ouabain, digoxin and proscillaridin A on the regulation of apoptosis in human fibroblasts. **Natural Products Research**, v. 24, p. 274-285, 2010.

WONG, R. W. et al. Digoxin suppresses HIV-1 replication by altering viral RNA processing. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, p. e1003241, 2013.

XIE, Z.; ASKARI, A. Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase as a signal transducer. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, p. 2434-2439, 2002.

XU, Z.W. et al. Cardiotonic steroids attenuate ERK phosphorylation and generate cell cycle arrest to block human hepatoma cell growth. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, n. 3-5, p. 181-191, 2011. YANG, Z. J. et al. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 9, p. 1533-1541, 2011.

YATIME, L. et al. Structural insights into the high affinity binding of cardiotonic steroids to the Na⁺,K⁺-ATPase. **Journal of Structural Biology.**, v. 174, 296-306, 2011.

ZHOU, S. et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? **Cancer Letters**, v. 323, n. 2, p. 115-127, 2012.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* os efeitos de cardenolídeos na progressão e proliferação de células tumorais, com o intuito de identificar e definir os mecanismos celulares de ação.

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos anti-proliferativos dos cardenolídeos glucoevatromonosídeo, digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina, em diversas linhagens tumorais (Capítulos II e V);
- Avaliar os efeitos dos cardenolídeos glucoevatromonosídeo, digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina na progressão do ciclo celular, em células A549 e/ou U937 (Capítulos II e V);
- Investigar o mecanismo de morte celular induzida pelos cardenolídeos glucoevatromonosídeo, digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina, em células A549 e/ou U937 (Capítulos II, III e V);
- Avaliar os efeitos anti-metástáticos dos cardenolídeos glucoevatromonosídeo, digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina, em células A549 (Capítulos IV e VI).

CAPÍTULO 2:
ESTUDO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS
DO GLUCOEYATROMONOSÍDEO EM
CÉLULAS A549 E U937

CAPÍTULO 2 - Estudo dos efeitos citotóxicos do glucoevatromonosídeo em células A549 e U937

Research Article to be submitted for evaluation to Journal of Biochemical Pharmacology (FI=4.65)

Glucoevatromonoside induces a non-canonical cell death in A549 cells and a canonical cell death in U937 cells

Naira F. Z. Schneider¹, Claudia Cerella⁴, Annelise de Carvalho¹, Rodrigo M. Pádua², Wolfgang Kreis³, Fernão C. Braga², Cláudia M. O. Simões¹, Marc Diederich^{4,5*}

Affiliation

¹ *Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil*

² *Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

³ *Department of Biology, Friedrich-Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg, Germany*

⁴ *Laboratory of Molecular and Cellular Biology of Cancer (LBMCC), Hôpital Kirchberg, 9, rue Edward Steichen, 2540 Luxembourg, Luxembourg*

⁵ *Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea*

*Corresponding author: Tel.: +352 2468 4040; fax: +352 2468 4060.
E-mail address: marc.diederich@lbmcc.lu (M. Diederich)

ABSTRACT

Cardenolides are natural compounds known for their inhibitory action of the sodium/potassium pump and resulting property of regulating cardiovascular alterations. Besides, in the past years they were also studied for their anticancer potential. In this study, we performed a cytotoxic screening of 64 cardenolides on A549 lung cancer cells and identified the cardenolide glucoevatromonoside (GEV) isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata* Ehrh. as the most cytotoxic compound ($IC_{50}=19.27 \pm 4.26$ nM obtained after 48 h). Further analyses on a panel of cancerous vs. non-cancerous human cell lines showed the selectivity and broad spectrum of action towards cancer cells. GEV induced cell cycle arrest in G2/M phase, reducing the expression of molecular markers of cell cycle as cyclin B1 and p53 in A549 cells in a concentration-dependent manner. Moreover, at later times of treatment, GEV induced a caspase-independent cell death. This effect was cell type-specific since the same compound acted differently in the hematopoietic cancer cell line U937. Here, GEV induced accumulation of cells in sub-G0 accompanied by the appearance of typical apoptotic nuclear fragmentation and cleavage of caspase-3 prevented by pan-caspase inhibition. Taken together, the obtained results showed the cytotoxic effects of a new cardiac glycoside on A549 and U937 cells by inducing a canonical cell death in solid tumor cells and a non-canonical cell death in human leukemia cells.

Keywords: cardenolides; glucoevatromonoside; cytotoxic effects; A549 cells; U937 cells, cell death.

LIST OF ABBREVIATIONS

BAF: bafilomycin

DMSO: dimethyl sulfoxide

FBS: fetal bovine serum

FCS: fetal calf serum

GEV: glucoevatromonoside

HT-29: human colon adenocarcinoma cells

Jurkat: T-cell leukemia

K562: human chronic myelogenous leukemia

MRC-5 normal lung fibroblast cell line

NEC: necrostatin

NSCLC: non small lung cancer cells

PARP: ADP-ribose polymerase

PBMCs: peripheral blood mononucleated cells

Raji: Burkitt's Lymphoma

RIP-1: protein kinase 1

SK-N-AS: human neuroblastoma cells

SH-SY5Y: human neuroblastoma cells

U937: histiocytic lymphoma

1. Introduction

Natural products directly or indirectly originated approximately 48% of the clinically approved anticancer drugs (Newman and Cragg, 2012) and are considered as an important source for anticancer drug research and development processes (Pan et al., 2010). Cardenolides belong to a larger group of naturally derived compounds, the cardiac glycosides, which have attracting much interest in clinical research. Along with its traditional clinical use for the treatment of cardiac failure and atrial arrhythmia for some of them (e.g., digoxin), other pharmacological activities were described such as antiviral (Hartley et al., 2006, Dodson et al., 2007, Hoffmann et al., 2008, Su et al., 2008, Bertol et al., 2011) and anticancerous (Prassas and Diamandis, 2008, Newman et al., 2008, Mijatovic et al., 2012, Cerella et al., 2013, Rocha et al., 2014).

Regarding the anticancer potential, cardenolides have been shown to trigger different mechanisms of cell death induction. A number of *in vitro* studies reported these compounds as inducers of apoptotic cell death, either by activating the intrinsic or the extrinsic pathways (Haux, 1999, Frese et al., 2006, Ramirez-Ortega et al., 2006, Raghavendra et al., 2007, Feng et al., 2010, Winnicka et al., 2010, Wang et al., 2010, Lu et al., 2010, Juncker et al., 2011, Xu et al., 2011, Elbaz et al., 2012). Furthermore, cardenolides were proved to induce autophagic cell death in different cancer cell lines as revealed by the formation of acidic vesicular organelles and the expression/modulation of specific autophagy markers (Mijatovic et al., 2006, Newman et al., 2007, Lefranc et al., 2008b, Hundeshagen et al., 2011, Wang et al., 2012,). More recently, some studies also highlighted the ability of cardiac glycosides to trigger other types of cell death as anoikis (Pongrakhananon et al., 2014) and immunogenic cell death (Menger et al., 2012).

This cytotoxic versatility to trigger alternative forms of cell demise may represent an important advantage of these compounds thinking about those forms of cancer developing resistance towards canonical apoptosis-inducing agents (Lefranc and Kiss, 2008, Cerella et al., 2013, Giuliani and Dass, 2013).

Also the possibility the excerpt cell-specific anti-cancer effects will potentially allow the treatment personalization for each kind of cancer (Cerella et al., 2013). Thus, further studies need to be carried out in order to unveil cardenolides anticancer potential in different cell lines.

Herein, 64 cardenolides obtained from plants (Braga et al., 1996, Braga et al., 1997), by semi-synthesis (Extrasynthèse, Genay, France; Merck,

Darmstadt, Germany; Boehringer, Mannheim, Germany and Carl Roth, Karlsruhe, Germany) or by fungi biotransformation (Pádua et al., 2005, Pádua et al., 2007,) were screened for their cytotoxic effects on non small cell lung cancer (NSCLC, A549 cells).

Among them, there are some well known cardiac glycosides as digitoxigenin, digitoxin, lanatoside C, convallatoxin and digoxin that showed in several studies antitumoral effects (Felth et al., 2009, Wang et al., 2012, Haux, 1999, Newman et al., 2007, Newman et al., 2008). Some of them are here investigated for the first time, as, glucoevatromonoside (GEV), a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata* Ehrh. (Braga et al., 1996) that was selected for further investigation since it exhibited a significant cell growth inhibition at nanomolar levels.

2. Material and Methods

2.1 Cardenolides and chemicals

The 64 tested cardenolides were obtained from plants (Braga et al., 1996, Braga et al., 1997), by semi-synthesis (Extrasynthèse, Genay, France; Merck, Darmstadt, Germany; Boehringer, Mannheim, Germany and Carl Roth, Karlsruhe, Germany) or by fungi biotransformation (Pádua et al., 2005, Pádua et al., 2007). Prior to dilution in culture medium, the compounds were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) (Merck). Paclitaxel (> 95 %, P1958) and etoposide (> 98 %, E1383) were used as positive controls; the chemical inhibitors: 3-aminobenzamide (*Poly (ADP-ribose) polymerase*, PARP inhibitor) (>99% A0788) and bafilomycin A1 (>90 %, B1793) were obtained from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO, USA). Caspase inhibitor (z-VAD-FMK, CAS 187388522) and receptor-interacting protein kinases (RIP-1) inhibitor (necrostatin-1, CAS 4311880) were purchased by Calbiochem (San Diego, CA, USA).

2.2 Cell cultures

Human NSCLC (A549 cells, ATCC: CCL185) and normal fetal lung fibroblast cell line (MRC-5 cells, ECACC: 05090501) were grown in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco® Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco®). MRC-5 cells were also supplemented with 2 mM glutamine (Cultilab, Campinas, São Paulo, BR) and 1% non essential amino acids (Gibco). HT-29 (human colon adenocarcinoma cells), SK-N-AS and SH-SY5Y (human neuroblastoma cells), K562 (human chronic myelogenous

leukemia), U937 (histiocytic lymphoma), Jurkat (T-cell leukemia), and Raji (Burkitt's Lymphoma) were cultured in RPMI medium (Lonza, Verviers, BE) supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS) (Lonza) and 1% (v/v) antibiotic-antimycotic (penicillin, streptomycin and amphotericin B) (BioWhittaker, Verviers, BE). Peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) were obtained from the blood of healthy donors as buffy coats donated by Red Cross (Luxembourg, LU). A dilution of blood and RPMI medium was added to a Ficoll[®] (Paque, GE Healthcare, Diegem, BE) and then centrifuged. After isolation, PBMCs were washed with RPMI medium, counted, resuspended at cell density of 2×10^6 cells/mL in medium supplemented with 10% (v/v) FCS and antibiotic-antimycotic (BioWhittaker). All cells lines were maintained at 37°C and 5 % CO₂ in a humidified atmosphere.

2.3. Cell viability and proliferation assays

2.3.1 MTT and XTT assays

The initial cytotoxic screening was performed by MTT assay (Mosmann, 1983). Briefly, A549 cells were plated in 96-well culture plates (6×10^4 cells/well) and after 24 h, cells were treated with different concentrations of the cardenolides for 48 h. Paclitaxel was used as positive control. Afterwards, other cell lines were selected (HT-29, SHSY-5Y, SK-N-AS, K562, Jurkat, Raji and U937), plated, and the most effective cardenolide in A549 cells (GEV) was tested at different concentrations by XTT cell proliferation assay (Roche, Basel, Swiss) for 24 and 48 h. After the incubation period, the 50% inhibition concentration (IC₅₀) of each compound was calculated as the concentration that inhibited cell proliferation by 50%, when compared to untreated controls.

2.3.2 Trypan blue proliferation and exclusion assays

Trypan blue staining was used to evaluate the viability of A549 and U937 cells. Cells (2×10^5 /well in 6-well plates) were treated with GEV up to 48 h. Then, cells were harvested and the dye was added to cell suspensions. Viable and non-viable cells were counted with Cedex XS[®] cell counting system (Roche Innovatis, Basel, CH). Data were normalized to the control and described as number of cells and percentages of trypan blue positive cells.

2.4 Flow cytometry analysis

2.4.1 Monocytes and lymphocytes

PBMCs were isolated and maintained as described above (item 2.2).

After 24 h, PBMCs were treated with GEV (10-1000nM) for 24 and 48 h. The experiments were performed on mixed mononuclear cells (lymphocytes+monocytes) distinguished by differential size upon flow cytometry analysis. To study these specific populations affected by GEV, a fluorescence-activated cell sorting BD FACSCalibur™ (BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, GE) was used and 10,000 events/sample were recorded. Dot plots forward-scattered light (FSC) *versus* side-scattered light (SSC) were made to gate singular populations of monocytes and lymphocytes allowed counting each specific area by *FlowJo*® software (Tree Star, Inc.).

2.4.2 Analysis of cell cycle

The cell cycle was analyzed according to a standard protocol (Gray and Coffino, 1979). In brief, A549 and U937 cells were treated with different concentrations of GEV, at different experimental times. Cells were then washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), centrifuged at $500 \times g$ for 5 min, and fixed with 70% ice-cold ethanol at 4°C for at least 30 min. After fixation, cells were treated with RNase (100 µg/ml), and DNA was stained with propidium iodide (1 µg/mL) for 20 min at room temperature. Flow cytometry analyses were carried out on a fluorescence-activated cell sorting BD FACSCalibur™ and 10,000 events/sample were recorded. The population of cells in each cell-cycle phase was determined using *FlowJo*® software.

2.5 Analysis of cell death

Cell death was measured in A549 and U937 cells by microscopic examination of nuclear morphology upon staining with the DNA-specific dye Hoechst (1 µg/ml Hoechst 33342) (Sigma-Aldrich, Bornem, BE) as described by Junker et al. 2011. Cells treated with GEV for 24 and 48 h were stained for 15 min, and fragmented and shrinkage nuclei were counted and photographed by fluorescence microscope (Leica-DM IRB microscope, Lecuit, LU). To identify the nature of cell death implicated in both cell lines, the experiments below were performed.

2.5.1 Analysis of apoptosis

Apoptosis evaluation was performed by enzymatic activities of caspases-3/7 and cleavage of caspase-3 by Western blot analyses (described on item 2.6). Briefly, A549 cells were treated with GEV for 12, 24, 36 and 48 h. Activity of caspases-3/7 was measured using the Caspase-Glo® 3/7 kit provided by Promega (Leiden, NE). The assay was performed according to the manufacturer's instructions and

luminescence was measured using white 96-well plates Orion Microplate Luminometer (Berthold, Pforzheim, GE). Data were normalized to luminescence of untreated cells. Apoptosis-inducer etoposide (50 μ M VP16) was used as a positive control. Also, A549 cells were pre-treated for 1 h with the caspase inhibitor zVAD (50 μ M), then treated with either GEV or DMSO and analyzed by different approaches. In the first approach, the untreated (DMSO) and treated A549 cells were maintained for 72 h in an incubator (37°C and 5 % of CO₂) coupled with IncuCyte[®] advice imaging system (ESSEN BioScience, Hertfordshire, UK). After that, the percentages of cell proliferation were calculated from the images taken by IncuCyte[®]. On the second approach, A549 cells were treated with this combination (GEV + zVAD) and then analysed by MTT assay as described by (Mosmann, 1983)

2.5.2 Analysis of other types of cell death

A549 cells (2 x 10⁵ cells/mL) were pre-treated for 1 h with different inhibitors of cell death: necroptosis inhibitor necrostatin-1, bafilomycin autophagy inhibitor (10 nM), PARP inhibitor (5 mM), calpain inhibitor PD 150606 (25 μ M), and then treated with either GEV (50 nM) or DMSO. Untreated (DMSO) and treated cells were maintained for 72 h in an incubator (37°C and 5 % of CO₂) coupled with IncuCyte[®] advice imaging system. Three brightness filter images were collected every 3 h up to 72 h. The IncuCyte[®] software was used to calculate the proliferation mean from nine non-overlapping brightness contrast images of each well tested.

2.6 Western blot analysis

A549 and U937 cells (2 x 10⁵ in six well plates) were treated with GEV and lysed with M-PER[®] (Mammalian Protein Extraction Reagent; Pierce, Erembodegem, BE) lysis buffer. After centrifugation at 10,000 × g for 15 min, supernatants were collected and total proteins (20-40 μ g) were separated by size using sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to polyvinylidene difluoride membranes (PVDF) (Amersham Hybond P, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and blocked with 5% non-fat milk in PBS/Tween 20 for 1 h. Equal loading of samples was controlled using β -actin. Blots were incubated with primary antibodies: anti-cyclin B1 (1/1000), p53 (1/1000, Santa Cruz, Boechnout, BE), anti-caspase-3 (1/1000, Santa Cruz 31A1067), and anti- β -actin (1/10000, Sigma-

Aldrich A5441). All antibodies were diluted in a PBS-Tween 20 solution containing 5% of bovine serum albumin (BSA) or 5% of non-fat milk. After over-night incubation with primary antibodies, membranes were washed with PBS-Tween 20, followed by an incubation of 1 h at room temperature with the corresponding secondary horseradish peroxidase-conjugated antibodies from Santa Cruz Biotechnology. After washing 3 times with PBS/Tween 20, specific immunoreactive proteins were visualized by ImageQuant LAS 4000® mini system (GE Healthcare) using a chemiluminescent detection reagent kit (Amersham ECL Prime, GE Healthcare).

2.7 Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Dunnet's post test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. Graphs were performed with GraphPad Prism software 5.1 version (GraphPad, La Jolla, CA, USA).

Results

Screening of 64 cardenolides on A549 cells identified glucoevatromonoside as the most effective ones

We performed the screening of 64 cardenolides on A549 cells. About 40 % of them (24 compounds) were considered as effective with IC_{50} values lower than 1 μ M (Table S1). The most cytotoxic cardenolide was glucoevatromonoside (GEV, Figure 1A), a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata* Ehrh. (Braga et al., 1996), which showed 14-fold greater potency with respect paclitaxel (IC_{50} = 19.27 \pm 4.5 nM) and 260.52 \pm 70.81 nM, respectively). Paclitaxel was selected as positive control since it is widely used for the treatment of non-small cell lung cancer (NSCLC)(Ramalingam and Belani, 2004, Socinski, 1999). GEV was therefore selected for further studies to verify its potential for cytostatic and cytotoxic effects towards different human cancer cell lines.

Evaluation of the cytotoxic potential of glucoevatromonoside in a panel of cancerous versus non-cancerous human cells

We evaluated the anti-cancer potential and selectivity of GEV by selecting a broader panel of human cell lines. They included different human cancerous cell models derived from blood (the histiocytic lymphoma U937, the chronic myeloid leukemia K562, Burkitt's Lymphoma Raji, acute T-cell leukemia Jurkat), gastrointestinal (colon

carcinoma HT-29) and nerve tissues (SH-SY5Y and SK-N-AS neuroblastoma cells). These cell lines have been tested for other cardiac glycosides and showed a high sensitivity to them (Kulikov et al., 2007, Felth et al., 2009, Juncker et al., 2011, Xie et al., 2013, Chan et al., 2013, Pongrakhananon et al., 2014). The results obtained are shown in Table 1. GEV was cytotoxic at nanomolar level to all tested cell lines after 48 h. U937 cells appeared the most susceptible ones to GEV together with A549, as follows: U937 = A549 > SH-SY5Y > Jurkat > K562 > Raji > SK-N-AS > HT-29 cells.

Additionally, the effects of GEV was evaluated on non-cancerous cell models including the proliferating lung MRC-5 cells and the quiescent hematopoietic peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) taken from healthy donors (Table 1 and Figure 1B). At 48 h treatment, GEV was 45-fold and 8.5-fold more selective to A549 and U937 with respect to PBMCs and MRC-5 non-cancerous cells, respectively. The effects of GEV on sub populations of PBMCs were also investigated. The lymphocytes population was not affected by this compound at all tested concentrations. The population of monocytes was affected by GEV only at the highest tested concentration (1000 nM) that correspond to 50-fold the IC₅₀ value obtained in A549 and U937 cancer cells at 48 h.

Taken into account the selectivity and the major effectiveness of GEV towards A549 and U937 cells, we selected these cell models for further mechanistic studies.

Glucosylated monoside exhibited cytostatic and cytotoxicity effects on A549 cells

The effects of GEV on cell proliferation and viability of A549 cells were also investigated by Trypan blue assay (Figure 2A and 2B). GEV reduced the proliferation of A549 cells in a concentration-dependent manner. This effect was accompanied by the accumulation of Trypan blue-positive cells at concentrations ≥ 50 nM. Effects were significant after 48 h of treatment for all concentrations tested. Specifically, no differences relative to the controls were observed on cell proliferation and Trypan-blue positive cells after 24 h for the cells treated with 10 nM of GEV. The treatment with 50 or 100 nM GEV caused a decrease in the number of viable cells with respect to control cells, which was significant already within the first 24 h (by 21% and 36%, respectively), to reach 40% and 53% of difference after 48 h, respectively.

Glucosylated monoside induced a caspase-independent cell death in A549 cells

Next, we characterized GEV effects on cell death. A549 cells were exposed to different concentrations of this compound for 24 and 48 h. GEV induced alterations in nuclear morphology as assessed by Hoechst staining. Observation by fluorescence microscopy after 24 h of GEV incubation confirmed nuclear alterations at concentrations ≥ 50 nM (Figure 2C) The quantification of cell death was evaluated by calculating the percentage of shrinkage, condensed and fragmented nuclei (Ghibelli et al., 1998, Juncker et al., 2011, Henry et al., 2013,) (Figure 2D). Major changes in the nuclear morphology consisted in events of cell shrinkage.

To verify the nature of cell death induced under GEV treatment, we investigated any involvement of caspases. GEV induced a very mild caspase-3 cleavage even at 100 nM after 48 h (Figure 2E). The enzymatic caspase-3/7 assay further indicated they were not activated (Figure 2F) in a strong contrast to the chemotherapeutic agent etoposide, a known inducer of apoptosis. In line with these results, the pan-caspase inhibitor zVAD did not protect A549 cells from the inhibition of cell proliferation/metabolism by GEV (Figure 2G and H).

We also verified the impact of other different inhibitors of cell death pathways on the effects of GEV, by monitoring modulatory effects on GEV-induced cell proliferation/metabolism. The analyses included the poly-(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor 3-aminobenzamide; the receptor-interacting protein kinase 1 RIP-1 inhibitor necrostatin-1 (necroptosis inhibitor); the calpain inhibitor PD 150606; and the autophagic flux inhibitor bafilomycin. Figure S1 shows that all tested inhibitors were unable to prevent the impact of GEV on A549 cells. The inhibitor bafilomycin was *per se* cytotoxic after 12 h, but even at earlier times, however, it could not counteract the effects of GEV.

Glucoevatromonoside induced apoptosis in U937 cells

We verified if the effects of GEV observed on A549 cells were ubiquitous. For comparative studies, we selected U937 cells that showed a similar susceptibility to GEV, when compared to A549 cells (Table 1). In line with this observation, Figure 3A shows a reduction of the proliferation of U937 cells in a concentration-dependent manner, similarly to A459 cells. This effect was accompanied by the accumulation of around 40% of Trypan blue-positive cells after 48 h of treatment with 100 nM GEV (Figure 4B). Cells exposed to GEV (10 and 25 nM) for 24 h showed minor differences in their nuclear morphology when compared to untreated cells (Figure 4C). In contrast, cells treated with 50 or 100 nM GEV undergo severe changes in their nuclei

morphology, i.e., nuclear condensation and fragmentation typical of apoptotic cells (Figure 4C and D). GEV induced cleavage of caspase-3 after 24 and 48 h starting from 50 nM (Figure 4E). Etoposide, a positive control of apoptosis, showed an efficient caspase cleavage. Moreover, zVAD significantly rescued (> 50%) U937 cells from nuclear fragmentation (Figure 4E). Taken together, these results indicate the ability of GEV of triggering a caspase-dependent apoptotic program in U937 cells.

Glucoevatomonoside induces a cell cycle blockage with different features in A549 and U937 cells

Effects of GEV on cell cycle progression on A549 and U937 cells were evaluated through flow cytometry analysis of propidium iodide stained cells.

GEV induced an accumulation of approximately 30% cells in the G2/M phase after 24 and 48 h in A549 cells, accompanied by a decrease of cells in G1 phase and a small increase of cells in sub-G0/G1 phase. In parallel, the key proteins implicated on cell cycle transition were evaluated by Western blot. GEV upregulated cyclin B1 at 10 nM followed by its downregulation at 50 and 100 nM detectable as early as 12 h. It also downregulated p53 at all concentrations tested as earlier as 12 h.

However, GEV did not produce the same alterations of cell cycle in U937 cells as observed in A549 cells. As shown in Figure S2, GEV (100 nM) led to the accumulation of 32% and 81% cells in sub-G0 after 24 and 48 h, respectively, with a corresponding decrease in the percentages of cells in G1 phase, when compared to untreated cells.

Discussion

Cardenolides potential as anticancer drugs arose due to the epidemiological evidences of a low mortality rate of patients suffering from both congestive heart failure and breast cancer, and treated with digoxin (Haux, 1999, Stenkvis, 2001). Since then, they have been estimated *in vitro* (Newman et al., 2007, Hundeshagen et al., 2011, Juncker et al., 2011, Elbaz et al., 2012, Wang et al., 2012, Xue et al., 2015) *in vivo* (Svensson et al., 2005) and in clinical trials, as an oleander-derived PBI-05204 (Hong et al., 2014), aqueous extract of *Nerium oleander* (AnvirzelTM) (Mekhail et al., 2006) and digoxin for different types of tumor (National Cancer Institute (NCI), <<http://www.cancer.gov/drugdictionary?CdrID=485249>>). These compounds have been also investigated since they belong to a class of

clinically known drugs, which would allow a shorter period and fewer costs for their research and development as new anticancer drugs (Duenas-Gonzalez et al., 2008, Cragg et al., 2014).

Herein, the growth inhibition screening of A549 cells showed that 40% of the evaluated cardenolides presented IC_{50} values lower than 1 μ M, which is the maximum cytotoxic concentration recommended for further investigation of the mechanism of action of natural compounds (Bugelski et al., 2000). As far as we are aware, GEV cytotoxic effects were here investigated for the first time, and in the preliminary cytotoxic screening it was the most effective cardenolide even when compared to paclitaxel, a well-known drug clinically used for the treatment of lung cancer, which might represent an advantage over the drug resistance observed for NSCLCs (Tsvetkova and Goss, 2012). Another important aspect to be considered for an effective anticancer drug candidate is its ability to kill or inhibit the proliferation of cancerous cells at concentrations that do not significantly affect human non-cancerous cells as it was shown here for GEV in both healthy cells tested. This compound was unable to affect the proliferation of MRC-5 cells and the viability of PBMCs cells that are quiescent, at the lowest concentrations tested.

In order to unveil the inhibitory effects of GEV in A549 and U937 cells, the mechanisms involved in drug induced cytotoxicity, such as cell cycle arrest, apoptosis and other types of cell death were investigated.

Cardiac glycosides demonstrated to have anti-proliferative activity via the regulation of cell cycle (Mijatovic et al., 2012). These effects are well documented showing, essentially, cell accumulation in G2/M (Feng et al., 2010, Xue et al., 2015) and in S phases (Xu et al., 2011). As herein observed, GEV arrested treated A549 cells in G2/M phase. These effects may precede the onset of cell death prompted by these class of compounds (Newman et al., 2008). Wang and coworkers (2012) showed in two lung cancer cell lines (A549 and H460) the effects on cell cycle distribution upon treatment with two well-known cardiac glycosides, digoxin (50 nM) and ouabain (25 nM) for 24 h, and reported no significant alterations in G1 or S phases. They observed a slight increase of G2/M arrest in A549 cells and a more significant G2/M arrest has been shown in H460 cells.

In U937 cells, GEV showed an increase of cells in subG0 phase, which is in agreement with the results obtained with another cardenolide named UNBS1450 in hematopoietic cancer cells (Juncker et al., 2011). Subsequently, the effects of GEV on the expression of two important key cell cycle regulators (cyclin B1 and p53) were investigated in A549

cells. Cyclin B1 expression was increased at 10 nM followed by a decrease at the highest concentrations tested. It has been reported that cancer cells exhibit elevated cyclin B1 expression levels (Dutta et al., 1995, Mashal et al., 1996, Kushner et al., 1999, Yasuda et al., 2002, Grabsch et al., 2004). These high levels of cyclin B1 expression are likely associated to a poor prognosis for patients with lung cancer (Soria et al., 2000). Cyclin B-CDK complexes are positive regulators of the progression of cell cycle as they initiate and maintain the phosphorylated state of the Rb protein, which plays a central role in the controlling of cell proliferation. Cyclin B-CDK1 complex needs to be activated during the G2/M phase of the cell cycle in order to allow its progression (Lapenna and Giordano, 2009, Elbaz et al., 2012).

Herein, it was also observed that p53 was downregulated at all concentrations tested. This tumor suppressor controls multiple cell cycle checkpoints regulating the mammalian response to DNA damage. Nakayama and Yamaguchi (2013) suggested that the reduction of cyclin B1 levels may lead to the restoration of p53 pathway, but this profile cannot be seen when A549 cells were treated with GEV. In addition, cells died independently of cyclin-B1 and p53 status. Although the downregulation of p53 expression has been shown, A549 cells were able to reduce cell viability when exposed to GEV. These results are supported by the findings of Wang et al. (2009) and Elbaz et al. (2012). In addition, Wang and coworkers (2009) showed a downregulation of p53 by digoxin and ouabain in multiple human cancer cell lines independently of p53 status of wild-type or mutant. They also showed that these effects occur preferentially in cancerous cell lines than in non-cancerous cells, which is considered an essential aspect for healthy cells survival.

Caspase enzymes could be used to identify pathways of apoptosis whether it involves extrinsic or intrinsic pathways. Caspase-3 is an executioner endoprotease that cleaves cytoskeletal proteins and causes morphological changes of apoptotic cells (Li and Yuan, 2008, McIlwain et al., 2013). In order to evaluate the GEV potential to induce apoptosis, a set of assays was carried out. From these assays, it was observed that A549 cells did not undergo apoptotic cell death as evidenced through caspase-3 cleavage and caspases 3/7 activity assays. In correlation, p53 inactivation leads to a decrease in apoptosis (Innocente et al., 1999) and these two steps were observed in this work, even though this correlation was not here investigated, and the cells possibly undergo other types of cell death.

However, the results obtained with U937 cells treated with GEV showed

an early cell cycle arrest with accumulation of cells in subG0 phase, nuclear fragmentation, induction of caspase cleavage, and protection of cell death by z-VAD. All together, these results suggest a potent induction of apoptotic cell death at a nanomolar concentration range.

It is noteworthy that previous investigations of the cytotoxic effects of cardenolides unveiled distinct cellular signaling and types of cell death in different tumor cell lines induced by the same compound, as reported for some cardenolides, such as UNBS1450, oleandrin and digoxin (Mijatovic et al., 2006, Juncker et al., 2011, Newman et al., 2008). UNBS1450, for example, was able to induce autophagic cell death in lung, prostate, pancreatic and glia cancer cell lines (Newman et al., 2007, Mijatovic et al., 2006, Lefranc et al., 2008a, Kulikov et al., 2007, Mijatovic et al., 2008), while apoptosis induction was observed in melanoma and leukemia cell lines (i.e. U937 cells) (Juncker et al., 2011, Mathieu et al., 2009).

After verifying the failure of apoptosis induction by GEV in A549 cells, the potential to induce other types of cell death was evaluated by using inhibitors of different types of death (necroptosis, parthanatos and autophagy), as well as an inhibitor of apoptosis in order to compare the results already observed. All tested inhibitors were not able to protect the cell death caused by GEV, suggesting a different mechanism of action than those already described for other cardiac glycosides. In conclusion, GEV reduced the proliferation and the viability of A549 cells inducing a higher percentage of cell death independent of caspases, RIP-1 kinase and PARP activation cell death, as well as downregulated cyclin B1 and p53 expression, and caused an accumulation of cells in G2/M. The obtained results showed the cytotoxic effects of a new cardiac glycoside on A549 and U937 cells by inducing a canonical cell death in solid tumor cells and a non-canonical cell death in human leukemia cells. Even though, the exact mechanism of cell death caused by GEV in A549 cells remains to be further elucidated.

TABLES

Table 1. Comparative effects of glucoevatromonoside in cancerous and non-cancerous cell lines.

Effects of glucoevatromonoside on the metabolism of different cancer and non-cancer cell lines. The IC_{50} value was defined as the compound concentration need to inhibit 50% of the cell growth compared to untreated controls. The data represent the mean \pm SD of three independent experiments.

FIGURES

Figure 1. Glucoevatromonoside (GEV): chemical structure and effects on PBMCs sub-population. (a) Chemical structure of GEV; (b) Analysis of monocytes and lymphocytes isolated from human blood of healthy donors and incubated with different concentrations of GEV (0-1000 nM). Cells were incubated for 24 and 48 h in order to assess their effects in non-cancerous cells. The data represent the mean \pm SD of five independent experiments; * $p < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett's test) when compared to untreated controls.

Figure 2. Glucoevatromonoside (GEV) induces a caspase-independent death in A549 cells. (a) GEV reduces proliferation of A549 cells in a concentration-dependent manner; (b) Analysis of cell death performed by Trypan blue staining after 24 and 48 h of GEV treatment at 10, 50 and 100 nM; (c) Hoechst staining pictures; and (d) quantification of cell fractions presenting shrinking and fragmented nuclei (represented by yellow arrows) in treated cells vs. untreated cells; (e) A549 cell lysates treated with GEV were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot using the caspase-3 antibody. As positive control, U937 cells were treated with etoposide (50 nM VP16, 3 h); (f) Quantification of substrate-cleavage using luminescence-based assays. Cells were incubated with GEV at 10, 50 and 100 nM and the activation of caspases 3 and 7 was investigated using a luminescence assay. Cleavage of caspase-substrate was monitored after 12, 24, 36 and 48 h. As positive control, A549 cells were treated with etoposide (50 μ M VP16). Data were normalized with untreated controls; (g) The results are expressed as percentage of zVAD protection of cell metabolism by MTT assay; (h) The graphics represent the percentages of A549 cell proliferation up to 72 h GEV treated with and without zVAD. The data are representative of bright filter images taken each three hours with IncuCyte[®] advice system. The data represent the mean \pm SD of three

independent experiments. $*p < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett's test) when compared to untreated controls.

Figure 3. Glucoevatromonoside (GEV) induces alteration of cell cycle consisting in G2/M accumulation accompanied by modulation of cyclin B1 and p53 in A549 cells. (a) GEV induces accumulation of A549 cells in G2/M phase. Cell cycle analysis of cells incubated in the presence of DMSO or GEV for 24 h and 48 h. The values indicate the percentages of A549 cells in the indicated phases of cell cycle (subG0, G0/G1, S, and G2/M). The data represent the mean \pm SD of three independent experiments; $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ (ANOVA followed by Dunnett's test) when compared to untreated controls; (b) Western blot analysis of cyclin B1 and p53 expression in cells untreated and treated with the vehicle (DMSO) or GEV at 10, 50 and 100 nM, for 24 and 48 h. β -actin was used as loading control. The blots shown are representative of three independent experiments. Expression levels of cyclin B1 and p53 were quantified by using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Numbers below Western blot signals represent quantification of proteins signals using β -actin for normalization of the sample input.

Figure 4. Glucoevatromonoside (GEV) induces a caspase-dependent cell death in U937 cells. (a) GEV reduces proliferation of U937 cells in a concentration-dependent manner; (b) Analysis of cell death performed by Trypan blue staining after 24 and 48 h of GEV treatment at 10, 50 and 100 nM; (c) GEV induces accumulation of apoptotic nuclear morphology. Yellow arrows show fragmented nuclei; (d) Quantification of cell death by Hoechst staining nuclei (represented by white arrows) in treated cells vs. untreated cells; (e) zVAD protection evaluated by Hoechst staining quantification at 50 and 100 nM; (f) U937 cell lysates treated with GEV were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blot using the caspase-3 antibody. Etoposide was used as positive control at 50 μ M for 3h. The data represent the mean \pm SD of three independent experiments. $*p < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett's test) when compared to untreated controls.

SUPPLEMENTARY DATA

Figure S1. Effects of different inhibitors of cell death on A549 cells treated with glucoevatromonoside. Representative bright filter images of treated cells taken each three hours with IncuCyte[®] advice system and

the graphics represent the percentages of proliferation up to 72 h. (a) 3-aminobenzamide (PARPi), (b) RIP necrostatin, (c) bafilomycin A, and (d) calpain inhibitor. The data represent the mean \pm SD of three independent experiments; * p < 0.05 (ANOVA followed by Dunnett's test) when compared to untreated controls.

Figure S2. Glucoevatromonoside (GEV) does not produce the same alterations of U937 cells cycle as observed for A549 cells. Effects of GEV on U937 cells cycle distribution after 8, 16, 24 and 48 h of treatment at 10, 50 and 100 nM. The values represent the percentages of U937 cells in the indicated phases of cell cycle (subG0, G0/G1, S, and G2/M). The data represent the mean \pm SD of three independent experiments; * p < 0.05, ** p < 0.01 and *** p < 0.001 (ANOVA followed by Dunnett's test) when compared to untreated controls.

Table S1. Growth inhibition of A549 cells by the most effective tested cardenolides.

Values represent the mean \pm SD of three independent experiments. The IC₅₀ value was defined as the compound concentration need to inhibit 50% of the cell growth, when compared to untreated control cells. P = plant origin; S = semisynthetic origin.

Movie S1. Representative full length 72 h brightness contrast images were taken each three hours on an IncuCyte[®] of A549 untreated cells for 72 hours.

Movie S2. Representative full length 72 h brightness contrast images were taken each three hours on an IncuCyte[®] following exposure treatment of A549 cells to GEV (50 nM) for 72 hours.

Movie S3. Representative full length 72 h brightness contrast images were taken each three hours on an IncuCyte[®] following exposure treatment of A549 cells to zVAD (50 μ M) for 72 hours.

Movie S4. Representative full length 72 h brightness contrast images were taken each three hours on an IncuCyte[®] following exposure treatment of A549 cells to NEC-1 (160 μ M) for 72 hours.

Movie S5. Representative full length 72 h brightness contrast images were taken each three hours on an IncuCyte[®] following exposure treatment of A549 cells to PARPi (10 nM) for 72 hours.

Movie S6. Representative full length 72 h brightness contrast images were taken each three hours on an IncuCyte[®] following exposure treatment of A549 cells to BAF (5 mM) for 72 hours.

Movie S7. Representative full length 72 h brightness contrast images were taken each three hours on an IncuCyte[®] following exposure treatment of A549 cells to GEV (50 nM) + zVAD (50 μ M) for 72 hours.

Movie S8. Representative full length 72 h brightness contrast images were taken each three hours on an IncuCyte[®] following exposure treatment of A549 cells to GEV (50 nM)+ NEC-1 (160 μ M) for 72 hours.

Movie S9. Representative full length 72 h brightness contrast images were taken each three hours on an incuCyte[®] following exposure treatment of A549 cells to GEV (50 nM) + PARPi (5mM) for 72 hours.

Movie S10. Representative full length 72 h bright-field images were taken each three hours on an incuCyte[®] following exposure treatment of A549 cells to GEV (50 nM) + BAF (10 nM) for 72 hours.

REFERENCES

- (NCI), N. C. I. (2015) Digoxin. <http://www.cancer.gov/drugdictionary?CdrID=485249>.
- BERTOL, J. W., RIGOTTO, C., DE PADUA, R. M., KREIS, W., BARARDI, C. R., BRAGA, F. C. & SIMOES, C. M. (2011) Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. *Antiviral Res*, 92, 73-80.
- BRAGA, F. C., KREIS, W. & BRAGA DE OLIVEIRA, A. (1996) Isolation of cardenolides from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata* by rotation locular counter-current chromatography. *J Chromatogr A*, 756, 287-91.
- BRAGA, F. C., KREIS, W., RÉCIO, R. A. & OLIVEIRA, A. B. (1997) Avaliação quantitativa de cardenolideos no cultivar experimental de *Digitalis lanata* do maciço de Itatiaia e perspectivas de seu emprego industrial. *Química Nova*, 20, 481-485.

- BUGELSKI, P. J., ATIF, U., MOLTON, S., TOEG, I., LORD, P. G. & MORGAN, D. G. (2000) A strategy for primary high throughput cytotoxicity screening in pharmaceutical toxicology. *Pharm Res*, 17, 1265-72.
- CERELLA, C., DICATO, M. & DIEDERICH, M. (2013) Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. *Mitochondrion*, 13, 225-34.
- CHAN, S. H., LEU, W. J., HSU, L. C., CHANG, H. S., HWANG, T. L., CHEN, I. S., CHEN, C. S. & GUH, J. H. (2013) Reevesioside F induces potent and efficient anti-proliferative and apoptotic activities through Na(+)/K(+)-ATPase alpha3 subunit-involved mitochondrial stress and amplification of caspase cascades. *Biochem Pharmacol*, 86, 1564-75.
- CRAGG, G. M., GROTHAUS, P. G. & NEWMAN, D. J. (2014) New horizons for old drugs and drug leads. *Journal of Natural Products*, 77, 703-723.
- DODSON, A. W., TAYLOR, T. J., KNIPE, D. M. & COEN, D. M. (2007) Inhibitors of the sodium potassium ATPase that impair herpes simplex virus replication identified via a chemical screening approach. *Virology*, 366, 340-8.
- DUENAS-GONZALEZ, A., GARCIA-LOPEZ, P., HERRERA, L. A., MEDINA-FRANCO, J. L., GONZALEZ-FIERRO, A. & CANDELARIA, M. (2008) The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. *Mol Cancer*, 7, 82.
- DUTTA, A., CHANDRA, R., LEITER, L. M. & LESTER, S. (1995) Cyclins as markers of tumor proliferation: immunocytochemical studies in breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5386-90.
- ELBAZ, H. A., STUECKLE, T. A., WANG, H. Y., O'DOHERTY, G. A., LOWRY, D. T., SARGENT, L. M., WANG, L., DINU, C. Z. & ROJANASAKUL, Y. (2012) Digitoxin and a synthetic monosaccharide analog inhibit cell viability in lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 258, 51-60.
- FELTH, J., RICKARDSON, L., ROSEN, J., WICKSTROM, M., FRYKNAS, M., LINDSKOG, M., BOHLIN, L. & GULLBO, J. (2009) Cytotoxic effects of cardiac glycosides in colon cancer cells, alone and in combination with standard chemotherapeutic drugs. *J Nat Prod*, 72, 1969-74.
- FENG, B., GUO, Y. W., HUANG, C. G., LI, L., CHEN, R. H. & JIAO, B. H. (2010) 2'-epi-2'-O-Acetylthevetin B extracted from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis

- in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Chem Biol Interact*, 183, 142-53.
- FRESE, S., FRESE-SCHAPER, M., ANDRES, A. C., MIESCHER, D., ZUMKEHR, B. & SCHMID, R. A. (2006) Cardiac glycosides initiate Apo2L/TRAIL-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells by up-regulation of death receptors 4 and 5. *Cancer Res*, 66, 5867-74.
- GHIBELLI, L., FANELLI, C., ROTILIO, G., LAFAVIA, E., COPPOLA, S., COLUSSI, C., CIVITAREALE, P. & CIRIOLO, M. R. (1998) Rescue of cells from apoptosis by inhibition of active GSH extrusion. *FASEB J*, 12, 479-86.
- GIULIANI, C. M. & DASS, C. R. (2013) Autophagy and cancer: taking the 'toxic' out of cytotoxics. *J Pharm Pharmacol*, 65, 777-89.
- GRABSCH, H., LICKVERS, K., HANSEN, O., TAKENO, S., WILLERS, R., STOCK, W., GABBERT, H. E. & MUELLER, W. (2004) Prognostic value of cyclin B1 protein expression in colorectal cancer. *Am J Clin Pathol*, 122, 511-6.
- GRAY, J. & COFFINO, P. (1979) Cell cycle analysis by flow cytometry. *Methods Enzymol*, 58, 233-248.
- HARTLEY, C., HARTLEY, M., PARDOE, I. & KNIGHT, A. (2006) Ionic Contra-Viral Therapy (ICVT); a new approach to the treatment of DNA virus infections. *Arch Virol*, 151, 2495-501.
- HAUX, J. (1999) Digitoxin is a potential anticancer agent for several types of cancer. *Med Hypotheses*, 53, 543-8.
- HENRY, C. M., HOLLVILLE, E. & MARTIN, S. J. (2013) Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. *Methods*, 61, 90-7.
- HOFFMANN, H. H., PALESE, P. & SHAW, M. L. (2008) Modulation of influenza virus replication by alteration of sodium ion transport and protein kinase C activity. *Antiviral Res*, 80, 124-34.
- HONG, D. S., HENARY, H., FALCHOOK, G. S., NAING, A., FU, S., MOULDER, S., WHELER, J. J., TSIMBERIDOU, A., DURAND, J. B., KHAN, R., YANG, P., JOHANSEN, M., NEWMAN, R. A. & KURZROCK, R. (2014) First-in-human study of pbi-05204, an oleander-derived inhibitor of akt, fgf-2, nf-kappaBeta and p70s6k, in patients with advanced solid tumors. *Invest New Drugs*, 32, 1204-12.
- HUNDESHAGEN, P., HAMACHER-BRADY, A., EILS, R. & BRADY, N. R. (2011) Concurrent detection of autolysosome

- formation and lysosomal degradation by flow cytometry in a high-content screen for inducers of autophagy. *BMC Biol*, 9, 38.
- INNOCENTE, S. A., ABRAHAMSON, J. L., COGSWELL, J. P. & LEE, J. M. (1999) p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2147-52.
- JUNCKER, T., CERELLA, C., TEITEN, M. H., MORCEAU, F., SCHUMACHER, M., GHELFI, J., GAASCHT, F., SCHNEKENBURGER, M., HENRY, E., DICATO, M. & DIEDERICH, M. (2011) UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol*, 81, 13-23.
- KULIKOV, A., EVA, A., KIRCH, U., BOLDYREV, A. & SCHEINER-BOBIS, G. (2007) Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 1691-702.
- KUSHNER, J., BRADLEY, G., YOUNG, B. & JORDAN, R. C. (1999) Aberrant expression of cyclin A and cyclin B1 proteins in oral carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 28, 77-81.
- LAPENNA, S. & GIORDANO, A. (2009) Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 8, 547-66.
- LEFRANC, F. & KISS, R. (2008) The sodium pump alpha1 subunit as a potential target to combat apoptosis-resistant glioblastomas. *Neoplasia*, 10, 198-206.
- LEFRANC, F., MIJATOVIC, T. & KISS, R. (2008a) [The sodium pump could constitute a new target to combat glioblastomas]. *Bull Cancer*, 95, 271-81.
- LEFRANC, F., MIJATOVIC, T., KONDO, Y., SAUVAGE, S., ROLAND, I., DEBEIR, O., KRSTIC, D., VASIC, V., GAILLY, P., KONDO, S., BLANCO, G. & KISS, R. (2008b) Targeting the alpha 1 subunit of the sodium pump to combat glioblastoma cells. *Neurosurgery*, 62, 211-21; discussion 221-2.
- LI, J. & YUAN, J. (2008) Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene*, 27, 6194-206.
- LU, Z. J., ZHOU, Y., SONG, Q., QIN, Z., ZHANG, H., ZHOU, Y. J., GOU, L. T., YANG, J. L. & LUO, F. (2010) Periplocin inhibits growth of lung cancer in vitro and in vivo by blocking AKT/ERK signaling pathways. *Cell Physiol Biochem*, 26, 609-18.
- MASHAL, R. D., LESTER, S., CORLESS, C., RICHIE, J. P., CHANDRA, R., PROPERT, K. J. & DUTTA, A. (1996)

- Expression of cell cycle-regulated proteins in prostate cancer. *Cancer Res*, 56, 4159-63.
- MATHIEU, V., PIRKER, C., MARTIN DE LASSALLE, E., VERNIER, M., MIJATOVIC, T., DENEVE, N., GAUSSIN, J. F., DEHOUX, M., LEFRANC, F., BERGER, W. & KISS, R. (2009) The sodium pump alpha1 sub-unit: a disease progression-related target for metastatic melanoma treatment. *J Cell Mol Med*, 13, 3960-72.
- MCILWAIN, D. R., BERGER, T. & MAK, T. W. (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a008656.
- MEKHAIL, T., KAUR, H., GANAPATHI, R., BUDD, G. T., ELSON, P. & BUKOWSKI, R. M. (2006) Phase 1 trial of Anvirlzel in patients with refractory solid tumors. *Invest New Drugs*, 24, 423-7.
- MENGER, L., VACCHELLI, E., ADJEMIAN, S., MARTINS, I., MA, Y., SHEN, S., YAMAZAKI, T., SUKKURWALA, A. Q., MICHAUD, M., MIGNOT, G., SCHLEMMER, F., SULPICE, E., LOCHER, C., GIDROL, X., GHIRINGHELLI, F., MODJTAHEDI, N., GALLUZZI, L., ANDRE, F., ZITVOGEL, L., KEPP, O. & KROEMER, G. (2012) Cardiac glycosides exert anticancer effects by inducing immunogenic cell death. *Sci Transl Med*, 4, 143ra99.
- MIJATOVIC, T., DE NEVE, N., GAILLY, P., MATHIEU, V., HAIBEKAINS, B., BONTEMPI, G., LAPEIRA, J., DECAESTECKER, C., FACCHINI, V. & KISS, R. (2008) Nucleolus and c-Myc: potential targets of cardenolide-mediated antitumor activity. *Mol Cancer Ther*, 7, 1285-96.
- MIJATOVIC, T., DUFRASNE, F. & KISS, R. (2012) Cardiotonic steroids-mediated targeting of the Na(+)/K(+)-ATPase to combat chemoresistant cancers. *Curr Med Chem*, 19, 627-46.
- MIJATOVIC, T., MATHIEU, V., GAUSSIN, J. F., DE NEVE, N., RIBAUCCOUR, F., VAN QUAQUEBEKE, E., DUMONT, P., DARRO, F. & KISS, R. (2006) Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. *Neoplasia*, 8, 402-12.
- MOSMANN, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.

- NAKAYAMA, Y. & YAMAGUCHI, N. (2013) Role of cyclin B1 levels in DNA damage and DNA damage-induced senescence. *Int Rev Cell Mol Biol*, 305, 303-37.
- NEWMAN, D. J. & CRAGG, G. M. (2012) Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. *J Nat Prod*, 75, 311-35.
- NEWMAN, R. A., KONDO, Y., YOKOYAMA, T., DIXON, S., CARTWRIGHT, C., CHAN, D., JOHANSEN, M. & YANG, P. (2007) Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. *Integr Cancer Ther*, 6, 354-64.
- NEWMAN, R. A., YANG, P., PAWLUS, A. D. & BLOCK, K. I. (2008) Cardiac glycosides as novel cancer therapeutic agents. *Mol Interv*, 8, 36-49.
- PÁDUA, R. M., OLIVEIRA, A. B., SOUZA FILHO, J. D., TAKAHASHI, J. A., SILVA, M. D. A. & BRAGA, F. C. (2007) Biotransformation of digitoxigenin by *Cochliobolus lunatus*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 18, 1303-1310.
- PÁDUA, R. M., OLIVEIRA, A. B., SOUZA FILHO, J. D., VIEIRA, G. J., TAKAHASHI, J. A. & BRAGA, F. C. (2005) Biotransformation of digitoxigenin by *Fusarium ciliatum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 614-619.
- PAN, L., CHAI, H. & KINGHORN, A. D. (2010) The continuing search for antitumor agents from higher plants. *Phytochem Lett*, 3, 1-8.
- PONGRAKHANANON, V., STUECKLE, T. A., WANG, H.-Y. L., O'DOHERTY, G. A., DINU, C. Z., CHANVORACHOTE, P. & ROJANASAKUL, Y. (2014) Monosaccharide digitoxin derivative sensitize human non-small cell lung cancer cells to anoikis through Mcl-1 proteasomal degradation. *Biochemical Pharmacology*, 88, 23-35.
- PRASSAS, I. & DIAMANDIS, E. P. (2008) Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. *Nat Rev Drug Discov*, 7, 926-35.
- RAGHAVENDRA, P. B., SREENIVASAN, Y. & MANNA, S. K. (2007) Oleandrin induces apoptosis in human, but not in murine cells: dephosphorylation of Akt, expression of FasL, and alteration of membrane fluidity. *Mol Immunol*, 44, 2292-302.
- RAMALINGAM, S. & BELANI, C. P. (2004) Paclitaxel for non-small cell lung cancer. *Expert Opin Pharmacother*, 5, 1771-80.

- RAMIREZ-ORTEGA, M., MALDONADO-LAGUNAS, V., MELENDEZ-ZAJGLA, J., CARRILLO-HERNANDEZ, J. F., PASTELIN-HERNANDEZ, G., PICAZO-PICAZO, O. & CEBALLOS-REYES, G. (2006) Proliferation and apoptosis of HeLa cells induced by in vitro stimulation with digitalis. *Eur J Pharmacol*, 534, 71-6.
- ROCHA, S. C., PESSOA, M. T., NEVES, L. D., ALVES, S. L., SILVA, L. M., SANTOS, H. L., OLIVEIRA, S. M., TARANTO, A. G., COMAR, M., GOMES, I. V., SANTOS, F. V., PAIXAO, N., QUINTAS, L. E., NOEL, F., PEREIRA, A. F., TESSIS, A. C., GOMES, N. L., MOREIRA, O. C., RINCON-HEREDIA, R., VAROTTI, F. P., BLANCO, G., VILLAR, J. A., CONTRERAS, R. G. & BARBOSA, L. A. (2014) 21-Benzylidene digoxin: a proapoptotic cardenolide of cancer cells that up-regulates Na,K-ATPase and epithelial tight junctions. *PLoS One*, 9, e108776.
- SOCINSKI, M. A. (1999) Single-agent paclitaxel in the treatment of advanced non-small cell lung cancer. *Oncologist*, 4, 408-16.
- SORIA, J. C., JANG, S. J., KHURI, F. R., HASSAN, K., LIU, D., HONG, W. K. & MAO, L. (2000) Overexpression of cyclin B1 in early-stage non-small cell lung cancer and its clinical implication. *Cancer Res*, 60, 4000-4.
- STENKVIST, B. (2001) Cardenolides and cancer. *Anticancer Drugs*, 12, 635-8.
- SU, C. T., HSU, J. T., HSIEH, H. P., LIN, P. H., CHEN, T. C., KAO, C. L., LEE, C. N. & CHANG, S. Y. (2008) Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. *Antiviral Res*, 79, 62-70.
- SVENSSON, A., AZARBAYJANI, F., BACKMAN, U., MATSUMOTO, T. & CHRISTOFFERSON, R. (2005) Digoxin inhibits neuroblastoma tumor growth in mice. *Anticancer Res*, 25, 207-12.
- TSVETKOVA, E. & GOSS, G. D. (2012) Drug resistance and its significance for treatment decisions in non-small-cell lung cancer. *Curr Oncol*, 19, S45-51.
- WANG, G. F., GUO, Y. W., FENG, B., LI, L., HUANG, C. G. & JIAO, B. H. (2010) Tanghinigenin from seeds of *Cerbera manghas* L. induces apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells. *Environ Toxicol Pharmacol*, 30, 31-6.
- WANG, Y., QIU, Q., SHEN, J. J., LI, D. D., JIANG, X. J., SI, S. Y., SHAO, R. G. & WANG, Z. (2012) Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through

- regulation of dual signaling pathways. *Int J Biochem Cell Biol*, 44, 1813-24.
- WANG, Z., ZHENG, M., LI, Z., LI, R., JIA, L., XIONG, X., SOUTHALL, N., WANG, S., XIA, M., AUSTIN, C. P., ZHENG, W., XIE, Z. & SUN, Y. (2009) Cardiac glycosides inhibit p53 synthesis by a mechanism relieved by Src or MAPK inhibition. *Cancer Res*, 69, 6556-64.
- WINNICKA, K., BIELAWSKI, K., BIELAWSKA, A. & MILTYK, W. (2010) Dual effects of ouabain, digoxin and proscillaridin A on the regulation of apoptosis in human fibroblasts. *Nat Prod Res*, 24, 274-85.
- XIE, C. M., LIU, X. Y., YU, S. & CHENG, C. H. (2013) Cardiac glycosides block cancer growth through HIF-1 α - and NF- κ B-mediated Plk1. *Carcinogenesis*, 34, 1870-80.
- XU, Z. W., WANG, F. M., GAO, M. J., CHEN, X. Y., SHAN, N. N., CHENG, S. X., MAI, X., ZALA, G. H., HU, W. L. & XU, R. C. (2011) Cardiotonic steroids attenuate ERK phosphorylation and generate cell cycle arrest to block human hepatoma cell growth. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 125, 181-91.
- XUE, R., HAN, N., XIA, M., YE, C., HAO, Z., WANG, L., WANG, Y., YANG, J., SAIKI, I. & YIN, J. (2015) TXA9, a cardiac glycoside from *Streptocaulon juvenas*, exerts a potent anti-tumor activity against human non-small cell lung cancer cells in vitro and in vivo. *Steroids*, 94, 51-9.
- YASUDA, M., TAKESUE, F., INUTSUKA, S., HONDA, M., NOZOE, T. & KORENAGA, D. (2002) Overexpression of cyclin B1 in gastric cancer and its clinicopathological significance: an immunohistological study. *J Cancer Res Clin Oncol*, 128, 412-6.

Supplementary data: Table 1. Growth inhibition of A549 cells by the most active tested cardenolides after 48 h.

Compound number	Tested cardenolides	A549cells IC ₅₀ ^a ± S.D. (nM)
1	Digitoxigenin (P)	62.68±5.1
2	Digitoxigenin monodigitoxoside (P)	33.46±2.6
3	Digitoxigenin bisdigitoxoside (P)	58.54±4.7
4	Glucocoevatromonoside (P)	19.27±4.5
5	Glucodigifucoside (P)	63.12±13.3
6	Digitoxin (P)	368.46±21.8
7	β-acetyldigitoxin (P)	220.50±30.5
10	Glucogitoroside (P)	609.68±28.0
12	Digoxigenin-bis digitoxoside (P)	153.55±20.0
13	Digoxigenin-tetradigitoxoside (P)	241.50±80.5
14	Lanatoside C (P)	264.60±18.4
15	Deacetyl lanatoside C (P)	133.79±50.9
16	β-methyl digoxin (S)	207.84±20.2
29	Digoxin (P)	133.81±7.0
38	K-strophantoside (P)	607.59±10.0
41	3β-[2-(1-amantadin)-1-on-ethylamin] digitoxigenin (S)	88.40±5.37
42	(3β,5β)-card-20(22)-enolide, 14-hydroxy-3-[(4-morpholinylacetyl)amino] (S)	236.80±84.46
59	3-(phosphit-O-dimethyl)- digitoxigenin (S)	795.27±14.43
60	3-(phosphat-O-dimethyl)- digitoxigenin (S)	276.90±30.62
64	α-methyl digitoxin (S)	288.53±20.76
65	β-methyl digitoxin (S)	185.67±2.95
66	Convallatoxin (P)	32.80±1.84
67	Helveticoside (P)	45.56±3.92
68	Cymarin (P)	123.21±3.89
-	Paclitaxel	260.52±70.81

Values represent the mean ± SD of three independent experiments;

IC₅₀= concentration that inhibited 50% of A549 cell growth;

P = plant origin;

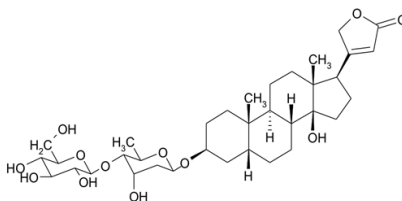
S = synthetic origin.

Table 1. Comparative effects of glucoevatromonoside in cancerous vs. non-cancerous cells lines.

	IC₅₀ nM (mean ± SD)	
	24h	48h
SK-N-AS	>200	56.47±6.97
SHSY-5Y	35.30±0.97	32.88±15.99
HT-29	>200	120.79±7.67
K562	130.72±18.11	39.12±3.26
U937	72.41±14.96	19.04±5.94
JURKAT	88.48±23.41	35.15±9.81
RAJI	111.95±35.84	53.03±4.23
PBMCs	>1000	869.33±178.56
MRC-5	>250	161.87±13.67

Effects on cell metabolism of different cancer and non-cancer cell lines by glucoevatromonoside. The IC₅₀ value was defined as the compound concentration need to inhibit 50% of the cell metabolism, when compared to untreated control cells. The data represent the mean ± SD of three independent experiments.

A



B

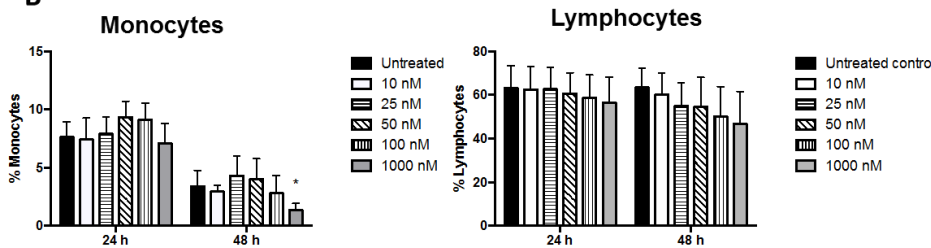


Figure 1. Glucoevatromonoside: chemical structure and effects on PBMCs sub-population.

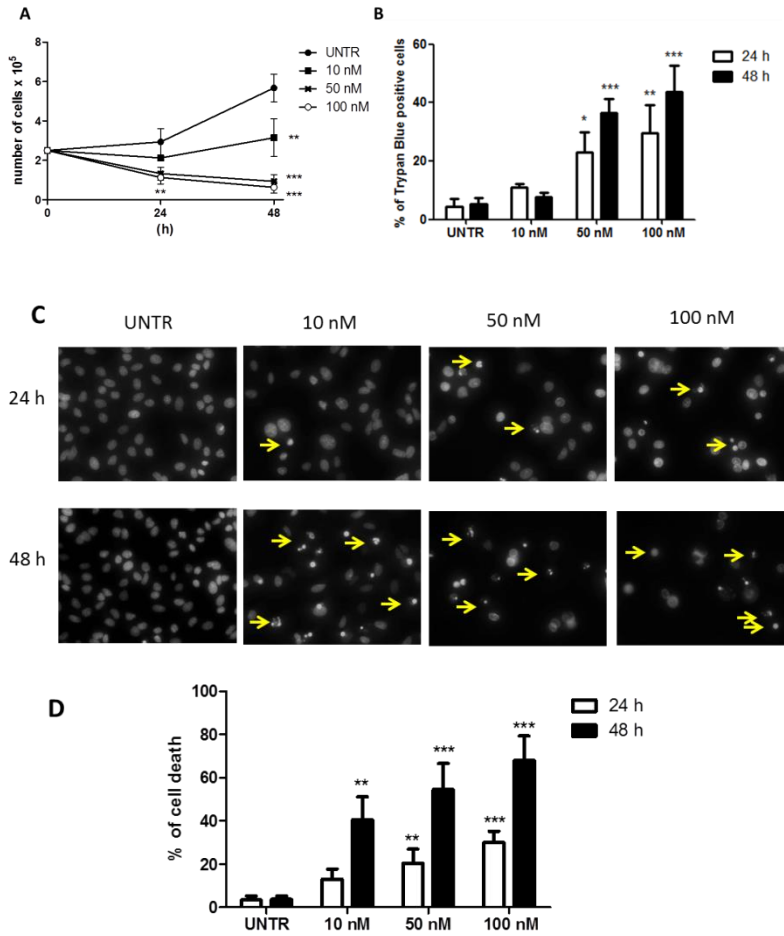
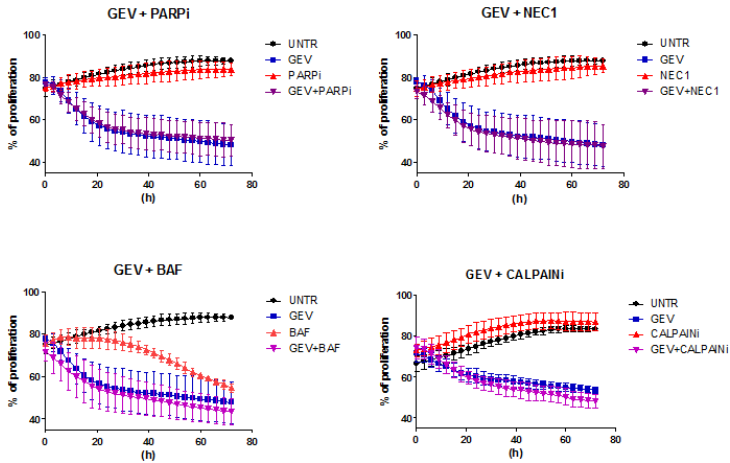


Figure 2. Glucoevatromonoside induces a caspase-independent cell death in A549.



Suppl. Fig. 1 Effects of 3-aminobenzamide (PARPi), bafilomycin, necrostatin and calpain on Glucocorticoid in A549.

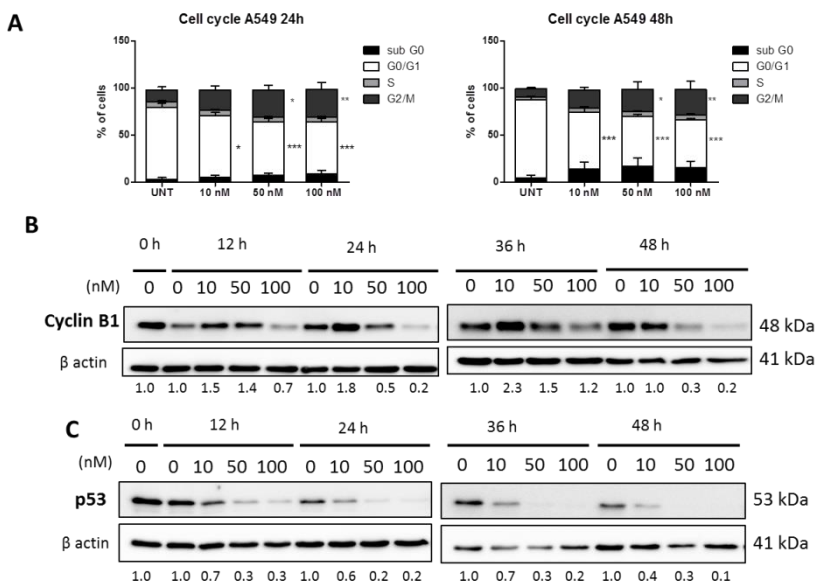


Figure 3. Glucoevatromonoside induces alteration of cell cycle consisting in G2/M accumulation accompanied by modulation of cyclin B1 and p53 in A549.

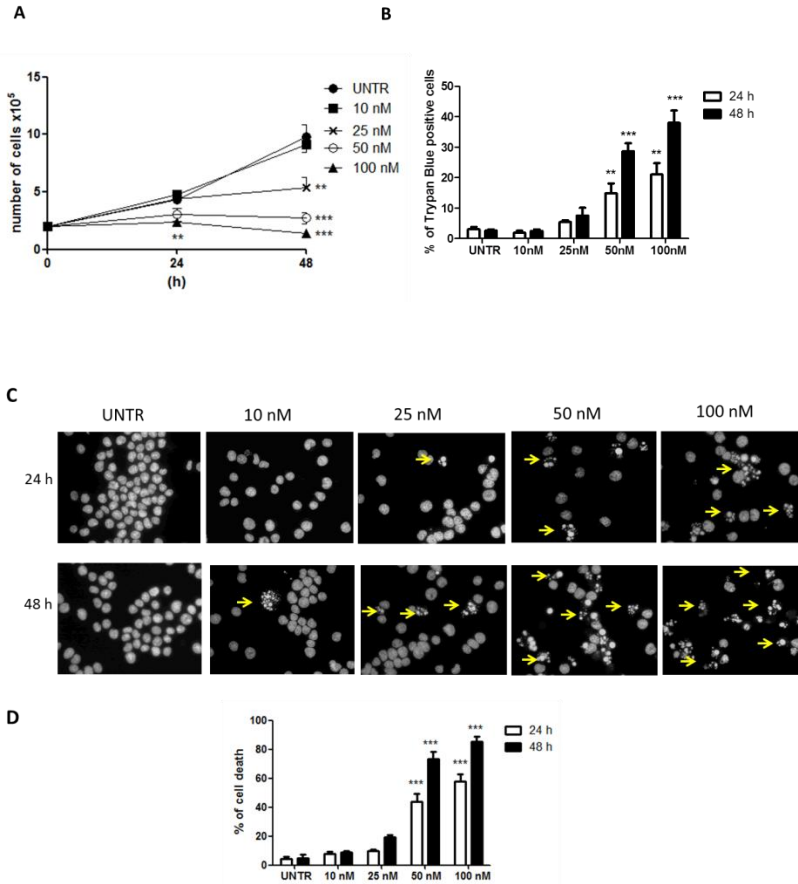


Figure 4. Glucoevatromonoside induces a caspase-dependent cell death in U937.

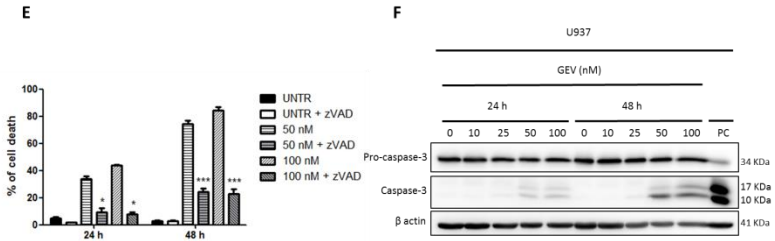
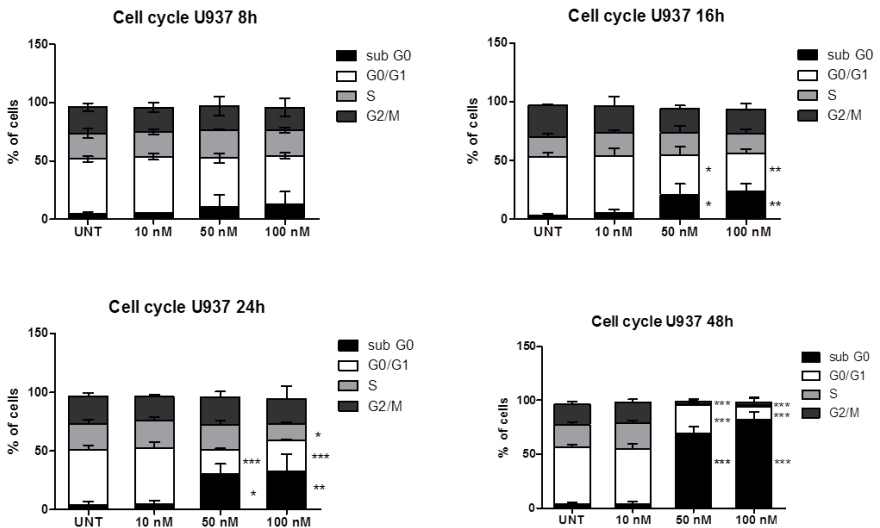


Figure 4. Glucoevatromonoside induces a caspase-dependent cell death in U937.



Suppl. Fig.2. Glucoevatromonoside does not produce the same alterations of cell cycle observed for A549 cells.

CAPÍTULO 3:
EFEITOS DO
GLUCOEYATROMONOSÍDEO NA
MORTE CELULAR AUTOFÁGICA E VIA
DE SINALIZAÇÃO MTOR EM CÉLULAS
A549

CAPÍTULO 3 - Efeitos do glucoevatromonosídeo na morte celular autofágica e via de sinalização mTOR

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo serão apresentados resultados complementares ao apresentados no Capítulo 2, referentes aos efeitos do glucoevatromonosídeo na morte celular autofágica e via de sinalização mTOR

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material de estudo:

O cardenolídeo glucoevatromonosídeo (GEV) foi gentilmente cedido pelos Profs. Drs. Fernão Castro Braga e Rodrigo Maia da Pádua, da Faculdade de Farmácia da UFMG e pelo Prof. Dr. Wolfgang Kreis, da Friedrich-Alexander Universität, da Alemanha.

2.2 Culturas celulares

2.2.1 Células

As linhagens celulares que foram utilizadas para o estudo foram, células A549 (adenocarcinoma de pulmão), adquirida do ATCC: CCL-18, e SH-SY5Y (neuroblastoma humano) fornecidas pelo banco de células alemão DSMZ (Braunschweig, Alemanha). As células foram cultivadas a 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂.

2.2.2 Meios de cultura e reagentes

Para manutenção e crescimento celular foram utilizados os meios DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Cultilab[®] Campinas, SP, Brasil) suplementados com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco[®] Carlsbad, CA, EUA) para as células A549 e meio RPMI (Lonza, Verviers, Bélgica) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de vitelo (Lonza) e 1% (v/v), antibióticos-antimicótico (penicilina, estreptomina e anfotericina B) (BioWhittaker, Verviers, Bélgica) para as células SH-SY5Y. As duas linhagens foram mantidas em frascos de cultura estéreis de 75cm² a 37°C, em atmosfera umedecida de 5% de CO₂. Antes e durante a realização deste estudo, todas as linhagens celulares foram submetidas a testes para garantia da ausência de bactérias, leveduras e micoplasmas.

2.3 Avaliação dos efeitos do glucoevatrmonosídeo na expressão da via de sinalização mTOR e de marcadores do fluxo autofágico

Inicialmente, as células A549 e/ou SH-SY5Y foram cultivadas na densidade de $5,0 \times 10^5$ células/cavidade, em placas de seis cavidades, na presença do meio DMEM, para a A549 e RPMI para a SH-SY5Y por 24 h, até confluência. Após este período, as células foram lavadas com PBS, e no volume final de 2 mL de meio, o GEV foi adicionado, em diferentes concentrações, bem como o controle (DMSO). Em seguida, o meio foi aspirado e as células lavadas 2X com 2 mL de PBS, seguindo-se da adição de 150 μ L de tampão de lise [137 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0; 10% glicerol; 1,5% inibidor de proteases; 1% inibidor de fosfatase; 1% TritonX 100; 0,5% deoxicolato de sódio; e 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS)]. As amostras foram transferidas para microtubos, centrifugadas a $14.000 \times g$, por 15 min, a 4°C, e os sobrenadantes das amostras foram transferidos novamente para microtubos e fervidos, durante 5 min, a 99°C. As amostras foram armazenadas a -20°C e seu conteúdo proteico foi determinado através do método de Bradford (1976).

As amostras foram adicionadas ao tampão [100% 2-mercaptoetanol; 100% glicerol; 10% dodecil sulfato de sódio; 2% azul de bromofenol e 0,5% Tris-HCl pH 6,8] e as proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida)/SDS a 15% (SDS-PAGE). Após, foram transferidas para uma membrana de polifluoreto de vinilideno (PVDF) (Millipore, Billerica, MA, EUA) em tampão de transferência [25 mM de Tris Base e 192 mM de glicina, dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 20% de metanol (v/v)], a 400 mA, por 1 h. A análise eletroforética e a transferência foram realizadas com aparatos da marca BioRad (Hercules, CA, EUA). Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 1 h com 5% de leite em pó (Molico®) em tampão de lavagem [1 M de Tris Base; 18% NaCl e 0,5 % Tween 20, dissolvidos em 1 L de água ultrapura, com pH ajustado para 7,6 e armazenado a 4°C até o uso], e lavadas 3X por 5 min (cada lavagem) com este tampão. As membranas foram, então, incubadas durante a noite, a 4°C, separadamente e sob agitação, com os anticorpos primários p-mTOR, mTOR, p-S6K, S6K, beclina-1 e LC3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA). O anticorpo direcionado para β -actina foi usado como controle positivo (Millipore, Billerica, MA, USA). Após este período, as membranas foram lavadas 3X por 5 min com tampão de lavagem e incubadas com os anticorpos secundários (conjugados à peroxidase), durante 1 h, à temperatura ambiente e sob agitação, segundo a origem do anticorpo primário, IgG anti-coelho (Chemicon,

Millipore) ou IgG anti-rato (Chemicon, Millipore), todos diluídos 1:2000 em tampão de lavagem. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas 3X por 5 min com o tampão de lavagem e a detecção foi feita com o kit de quimioluminescência Pierce ECL SuperSignal® Western Blotting (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), segundo especificações do fabricante, misturando-se 500 µL de cada reagente (reagentes 1 e 2), e deixando em contato com a membrana por 5 min. Após este período, a membrana foi adequadamente acomodada em uma folha plástica transparente e a revelação foi realizada com o auxílio do equipamento ChemiDoc™ (BioRad, EUA).

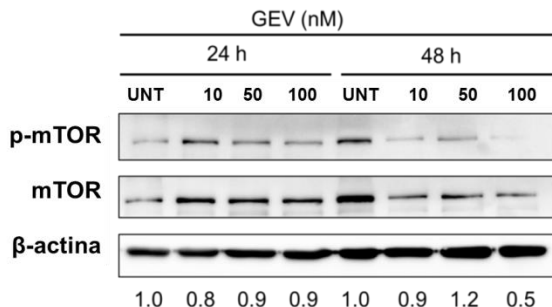
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para que a autofagia aconteça diversos fatores podem ser considerados, esses pontos já foram discutidos no Capítulo 1 e 2 desta tese. De modo geral, esses eventos podem ser iniciados nos receptores tirosina cinase, que inibem a via PI3K e sua cinase abaixo da via, Akt, provocando inibição ou diminuição da atividade da cinase alvo da rapamicina, em mamíferos (mTOR), a qual por meio de outros complexos sinalizadores, promove autofagia. A mTOR consiste de dois complexos de sinalização distintos, conhecidos como mTORC1 e mTORC2, e é considerado um processo chave na regulação da autofagia. Quando ativada, a mTOR inibe a autofagia por causar redução da interação de proteínas Atg's e cinases ULK, bem como por controlar a fosforilação de efetores da autofagia, tal como o complexo Vps34-beclina1 (AMARAVADI, 2011). Quando inibida por condições fisiológicas ou farmacológicas específicas, a mTOR reverte esta fosforilação, promovendo a ativação da beclina 1. Desta forma, essa via pode ser considerada um alvo terapêutico importante, pois se encontra comumente desregulada em tumores humanos (ZHOU et al., 2012). A indução de autofagia vem sendo demonstrada em diversos tipos tumorais e para inúmeros fármacos, tais como tamoxifeno, lítio, rapamicina, carbamazepina e compostos de diferentes classes que estão sob estudo. Por exemplo, o inibidor de mTOR, rapamicina, foi associado com uma redução de 90% em tumores de pulmão induzidos por agentes carcinogênicos, em modelo murino (YANG et al., 2011).

O envolvimento da mTOR nos efeitos causados pelo GEV em células A549 foram investigados, visto que diferentes cardenólídeos já demonstraram inibir essa via (WANG et al., 2012) e consequentemente induzir autofagia (LEFRANC, 2008; NEWMAN et al., 2007).

Os dados apresentados na Figura 1 mostram o efeito do GEV na fosforilação da mTOR. Após 24 e 48 h de experimento, não foi possível verificar uma redução significativa na fosforilação da mTOR, exceto na concentração de 100 nM, após 48h.

Figura 1. Efeito do glucoevatromonosídeo nos níveis da proteína mTOR.



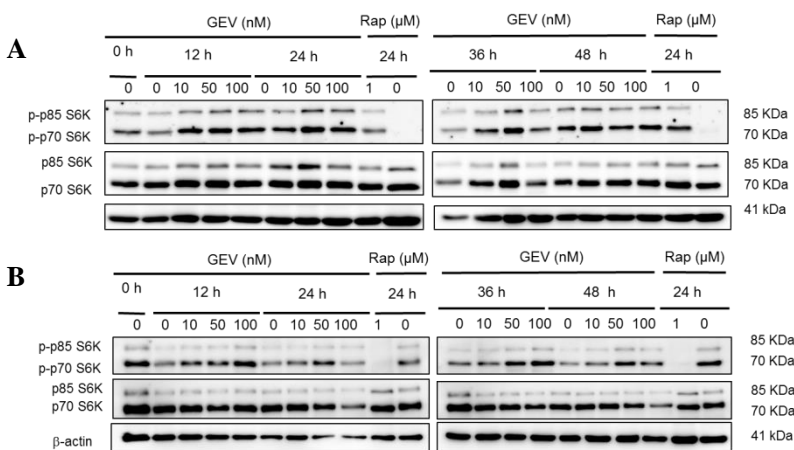
As células A549 foram incubadas por 24 ou 48 h sem tratamento (UNT=controle não tratado) ou tratadas com o GEV, nas concentrações de 10, 50 e 100 nM. Posteriormente, as células foram lisadas e analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de dois experimentos independentes. Os números abaixo da imagem são relativos a quantificação da banda p-mTOR em relação a banda da proteína β-actina.

Como mencionado anteriormente a mTOR consiste de dois complexos de sinalização distintos, chamados de mTORC1 e mTORC2. A mTORC1 consiste no componente principal da mTOR e é a mais estudada dos dois complexos por gerenciar várias vias biossintéticas, desempenhando um papel anabólico chave na promoção do crescimento e proliferação celular. Enquanto a mTORC1 está comprovadamente envolvida na sinalização lisossomal e autofagia, há muito menos evidências experimentais mostrando o papel da mTORC2 (DUNLOP; TEE, 2014).

Com base nos dados da literatura e os resultados obtidos da mTOR total mostrados na Figura 1, decidiu-se melhor caracterizar o possível efeito desse marcador pelo GEV. Duas linhagens celulares sensíveis ao tratamento com esse composto (A549 e SH-SY5Y) foram selecionadas para demonstrar o efeito na mTORC1 (S6K). Os dados obtidos estão apresentados na figura 2 e pode se observar que nos diferentes tempos experimentais e concentrações testados não ocorreu uma redução da fosforilação das isoformas p70 e p85. No entanto, o controle positivo

avaliado, a rapamicina, foi capaz de inibir a fosforilação das duas isoformas.

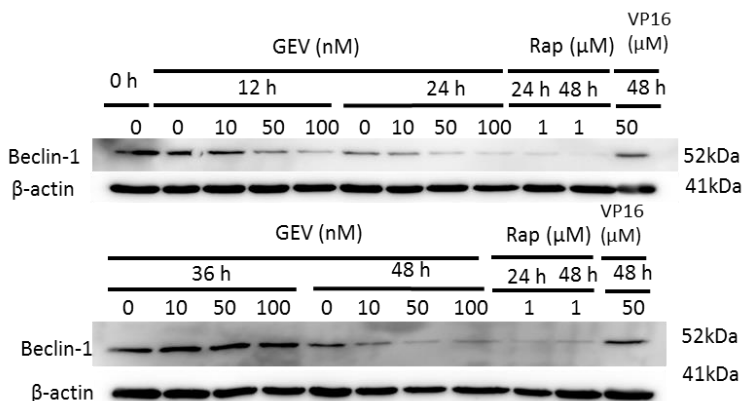
Figura 2. Efeito do glucoevatromonosídeo (GEV) nos níveis da proteína mTOR1 (S6K) em células (A) A549 e em células (B) SH-SY5Y.



As células foram incubadas por 12, 24, 36 e 48 h sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com GEV, nas concentrações de 10, 50 e 100 nM e com o controle positivo rapamicina. Posteriormente, as células foram lisadas e analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de dois experimentos independentes.

A beclina-1 é outro marcador comumente usado na autofagia e encontra-se geralmente super expressa, quando ocorre aumento do fluxo autofágico. Nesse sentido, os efeitos de GEV na expressão dessa proteína foram investigados. A Figura 3 mostra que nas maiores concentrações testadas após 12, 24 e 48h houve redução da expressão da beclina-1. Em 36 h, os níveis basais de expressão foram similares aos do controle não tratado, diferentemente do que foi encontrado nos outros tempos experimentais. No entanto, um estudo realizado com dois cardenólídeos (digoxina e oubaína) que induziram autofagia em células A549 relatou um aumento significativo da expressão dessa proteína dentro de 12 h (WANG et al., 2012). Os dados relatados acima podem parecer contraditórios, mas já foi demonstrado que a morte celular autofágica em muitos casos podem ocorrer independente do status da beclina-1 (TIAN et al., 2010; GRISHCHUK et al., 2011).

Figura 3. Efeito do glucoevatromonosídeo (GEV) na expressão da proteína beclina-1.



As células foram incubadas por 12, 24 36 e 48 h sem tratamento (controle negativo, 0h) ou tratadas com GEV, nas concentrações de 10, 50 e 100 nM, e com os controles rapamicina (24 e 48 h) e etoposídeo (=VP16, 48h). Posteriormente, as células foram lisadas e analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de dois experimentos independentes.

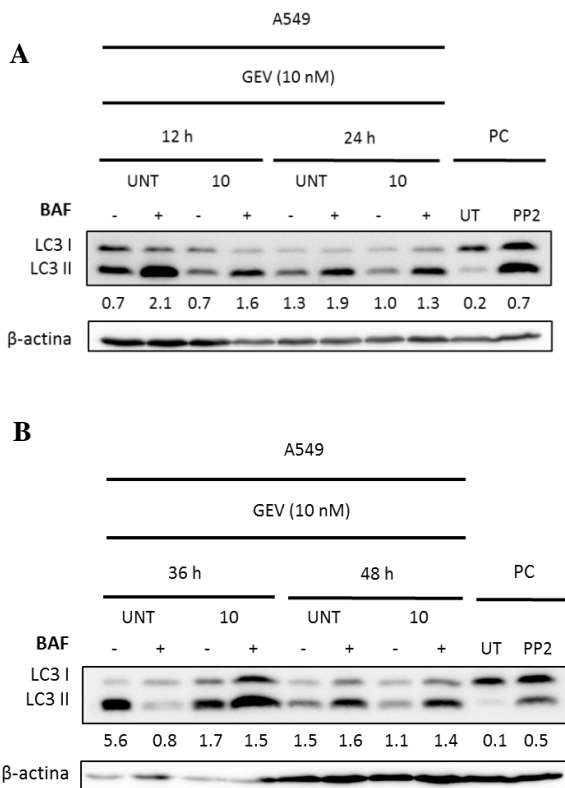
Como já mencionado, a autofagia é um processo catabólico que começa com a formação dos autofagossomas, englobe o conteúdo citoplasmático, incluindo proteínas citosólicas e organelas. Assim, a forma citosólica da LC3 (LC3-I) é conjugada com a fosfatidiletanolamina para formar o conjugado LC3-fosfatidiletanolamina. A forma lipidada da LC3, LC3-II, é anexada na membrana do autofagossoma. Os autofagossomas fundem com os lisossomas e intra-fagossomal componentes são degradados por hidrolases lisossomais completando o processo de autofagia. (TANIDA et al., 2008).

Para a detecção da conversão da proteína marcadora de fluxo autofágico LC3-I para LC3-II foi utilizado um inibidor de fase final desse processo, a bafilomicina, que inibe nesse caso a degradação da proteína convertida (Figura 4). Nesse contexto, o tratamento com GEV foi realizado em concentrações em que ocorreu morte celular, porém em em tempos experimentais iniciais, onde a morte ainda não havia sido detectada e em tempos experimentais longos onde os danos foram detectados (resultados apresentados no Capítulo 2). E como pode ser

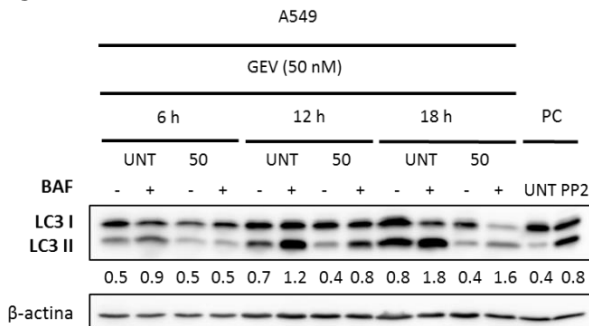
observado na figura 4, nas duas concentrações testadas 10 e 50 nM não foi possível detectar um aumento expressivo da conversão da LC3I-II quando comparado aos respectivos controles celulares. Ocorreu um aumento da conversão da LC3I-II mesmo quando tratados concomitantemente com o inibidor bafilomicina.

Estudos com outros cardenolídeos mostraram a conversão de LC3-I para LC3-II entre 6 e 72 h em diferentes linhagens celulares. A autofagia foi induzida pela digoxina e ouabaina em células A549 e H460 dentro de 24 h (WANG et al., 2012), enquanto que o UNBS1450 e a oleandrina mostraram efeitos similar de indução da morte celular autofágica em células de glioblastoma e células tumorais após exposição de 24-72h (LEFRANC et al., 2008; NEWMAN et al., 2007).

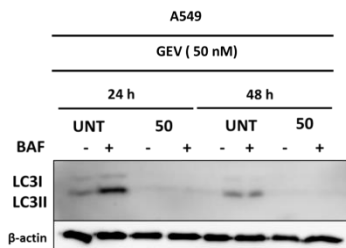
Figura 4. Efeito do glucoevatromonossídeo (GEV) na expressão da proteína LC3I-II.



C



D



As células foram incubadas por diferentes tempos experimentais sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com GEV, na concentração de 10 nM (A e B) e 50 nM (C e D). A bafilomicina (160 nM) foi adicionada 2h antes da lise celular para cada tempo experimental. Posteriormente, as células foram analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de dois experimentos independentes. Os números abaixo da imagem são relativos a quantificação da banda LC3-II em relação a banda da proteína β-actina.

UNT: controle celular não tratado; BAF: bafilomicina; PC: controle positivo PP2.

Dessa forma, com os resultados obtidos até o momento não foi possível confirmar a morte celular autofágica nos efeitos causados por GEV em células A549. Da mesma forma, o envolvimento da mTOR nesse processo também não foi observado já que essa via não foi inibida em células A549 e SH-SY5Y após tratamento com GEV. Muitos são os indicativos de que a morte celular não está ocorrendo por autofagia, mesmo assim as amostras foram enviadas para análise de MEV (microscopia eletrônica de varredura) e dessa forma investigar se outras

organelas, até mesmo os lisossomas estariam envolvidos na morte celular mediada pelo GEV.

REFERÊNCIAS

AMARAVADI, R.K. Cancer. Autophagy in tumor immunity. **Science** 2011, v. 334, n. 6062, p. 1501-1502.

DUNLOP, E A; TEE, A R. mTOR and autophagy : A dynamic relationship governed by nutrients and energy. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 36, p. 121-129, 2014.

GRISHCHUK Y, G. V. et al. Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons. **Autophagy**, v. 7, n. 10, p.1115-1131, 2011.

LEFRANC, F. La pompe à sodium pourrait représenter une nouvelle cible pour le traitement des glioblastomes. **Bulletin du Cancer**, v. 95, n. 3, p. 271-281, 2008.

NEWMAN, R. et al. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, n. 4, p. 354-364, 2007.

TIAN S, L. J. et al. Beclin 1-independent autophagy induced by a Bcl-XL/Bcl-2 targeting compound, Z18. **Autophagy**, v. 6, n. 8, p. 1032-1041, 2010.

WANG, Y. et al. Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through regulation of dual signaling pathways. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 11, p. 1813-1824, 2012.

YANG, Z. J. et al. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 10, n. 9, p. 1533-1541, 2011.

ZHOU, S. et al. Autophagy in tumorigenesis and cancer therapy: Dr. Jekyll or Mr. Hyde? **Cancer Letters**, v. 323, n. 2, p. 115-127, 2012.

CAPÍTULO 4:
ESTUDO *IN VITRO* DA AÇÃO
ANTIMETASTÁTICA DO
GLUCOEVATROMONOSÍDEO
EM CÉLULAS A549

CAPÍTULO 4 - Estudo *in vitro* da ação antimetastática do glucoevatromonosídeo em células A549

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos com os ensaios de inibição da migração e invasão das células A549, quando tratadas com o glucoevatromonosídeo (GEV), que foi apresentado no Capítulo 2 desta tese (*Estudo dos efeitos citotóxicos do glucoevatromonosídeo em células A549 e U937*). Também foram avaliadas as proteínas chave no processo metastático e as possíveis vias de sinalização envolvidas, assim como os efeitos desse cardenolídeo na migração de células não tumorais humanas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material de estudo:

Como citado no capítulo anterior, o cardenolídeo glucoevatromonosídeo (GEV) foi gentilmente cedido pelos Profs. Drs. Fernão Castro Braga e Rodrigo Maia da Pádua, da Faculdade de Farmácia da UFMG e pelo Prof. Dr. Wolfgang Kreis, da Friedrich-Alexander Universität, da Alemanha.

2.2 Culturas celulares

2.2.1 Células

As linhagens celulares que foram utilizadas para o estudo da ação antimetastática e da capacidade migratória foram, respectivamente, células A549 (adenocarcinoma de pulmão), adquiridas do ATCC: CCL-18, e fibroblastos gengivais humanos saudáveis, obtidos de cultura celular primária de gengiva humana (protocolo aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC, número 021/2009). Todas as células foram cultivadas a 37°C, em 5% de CO₂.

2.2.2 Meios de cultura e reagentes

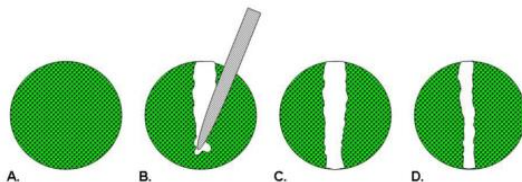
Para manutenção e crescimento celular foram utilizados os meios DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Cultilab[®] Campinas, SP, Brasil) para as células A549 e para os fibroblastos gengivais humanos (FGH), ambas suplementados com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco[®] Carlsbad, CA, EUA) e mantidas em frascos de cultura estéreis

de 75cm² a 37°C, em atmosfera umedecida de 5% de CO₂. Antes e durante a realização deste estudo, todas as linhagens celulares foram submetidas a testes para garantia da ausência de bactérias, leveduras e micoplasmas.

2.3 Avaliação dos efeitos do glucoevatromonosídeona migração e invasão celulares

Existem diferentes ensaios para avaliar quantitativamente a motilidade de uma população de células num ambiente bidimensional (2D), sendo um dos mais conhecidos o ensaio do *scratch* (DECAESTECKER et al., 2007). Nesse ensaio, uma "lacuna/ferida" artificial é criada (com o auxílio de uma pipeta estéril), em uma monocamada confluyente de células, chamada de *scratch* zero, seguida da monitorização da "cicatrização" da ferida por migração celular e crescimento em direção ao centro da abertura, fechando a lacuna criada. A monocamada se reestabelece e "cura" a ferida em um processo, que pode ser observado ao longo de um período de várias horas ou até de vários dias, dependendo do tipo de célula, das condições do meio e da extensão da ferida (Figura 1) (DECAESTECKER et al., 2007; HULKOWER; HERBER, 2011; LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Figura 1. Ensaio do *scratch*.



Uma ferida artificial é criada em uma camada confluyente de células. (A), através de toda a camada de células, (B). A área sem células é medida como o limite da ferida artificial na pré-migração, (C) depois que as células migram para dentro da ferida e (D) preenchem o vazio. Fonte: Hulkover; Herber (2011).

Os fatores que alteram a motilidade e/ou crescimento das células podem levar a um aumento ou diminuição da taxa de "cicatrização/migração" (MENON et al., 2009). Por isso, este ensaio tem sido amplamente adaptado e modificado pelos pesquisadores para estudar os efeitos de diferentes amostras sobre a migração e a proliferação celulares, em diversas condições experimentais. Através dessas modificações, é possível prever os perfis migratório e antimigratório de um composto em células saudáveis e em células tumorais, respectivamente, ou seja, pode-se avaliar as atividade

cicatrizante e antimetastática, respectivamente (DECAESTECKER et al., 2007; MENON et al., 2009).

Assim, dada a fundamental importância da locomoção de células *in vivo*, os ensaios *in vitro* foram desenvolvidos para caracterizar este fenômeno mais facilmente e, dessa forma, permitir o estudo dos efeitos de compostos sobre a migração celular. Testes *in vitro* são geralmente usados por fornecerem inúmeras informações preliminares, tendo em vista que os testes *in vivo* são mais complexos, onerosos e exigem maiores períodos de tempo para os experimentos (DECAESTECKER et al., 2007).

2.3.1 Ensaio do *scratch* em células A549

As células A549, na densidade de 2×10^5 células/cavidade, foram semeadas em placas de doze cavidades, a 37 °C, 5% CO₂ por 24 h. Após, uma ferida artificial (*scratch*) foi gerada na monocamada celular, com o auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL. Em seguida, as células foram lavadas com PBS para remoção das células não aderidas e incubadas com meio de cultivo fresco, na ausência e presença do GEV e dos controles (DMSO 0,25% e paclitaxel), por 16 h (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Posteriormente, as células foram fixadas com paraformaldeído a 2%, durante 15 min, coradas com 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI), e observadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus). Os experimentos foram realizados em triplicata.

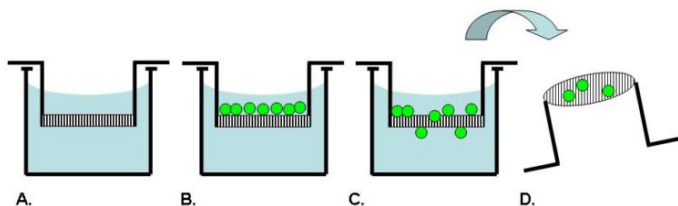
2.3.2 Ensaio do *scratch* em fibroblastos saudáveis de gengiva

Esse ensaio foi realizado com adaptações, conforme descrito por Fronza e colaboradores (2009). Os fibroblastos saudáveis de gengiva foram cultivados em meio DMEM, suplementado com 10% SFB e mantidos a 37°C em estufa de CO₂. As células foram semeadas ($1,5 \times 10^5$ células/cavidade) em placas de 12 cavidades, por 24 h. Após confluência, uma ferida artificial (*scratch*) foi gerada com o auxílio de uma ponteira estéril de 200 µL. A monocamada celular foi lavada com PBS para remover as células não aderidas. Neste momento, foi adicionado o composto em estudo (GEV) e os controles: negativo (DMSO 0,25%) e positivo (*Platelet-derived growth factor* - PDGF) e incubados por 16 h. Ao final do tratamento, as células foram fixadas com paraformaldeído a 2 %, durante 15 min, coradas com DAPI e observadas em microscópio invertido de fluorescência (Olympus). Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.4 Avaliação dos efeitos do glucoevatromonosídeo em estudo na invasão celular

Em contraste com o experimentos 2D, nos experimentos tridimensionais (3D) as células podem exibir comportamentos completamente diferentes, em termos da expressão de genes, proliferação, forma, locomoção e organização multicelular (DECAESTECKER et al., 2007). O ensaio Transwell® é um dos testes 3D mais comumente usado para quimioatração celular e quimioinvasão (Figura 2). O mesmo é realizado em placas de 24 cavidades, que recebem insertos contendo filtros recobertos com Matrigel®. Os insertos possuem um filtro com tamanho de poro 8µm, suficiente para restringir a passagem ativa das células, que forem adicionadas no compartimento superior (HULKOWER; HERBER, 2011). A camada de Matrigel® é usada para mimetizar a matriz extracelular, permitindo assim que as células degradem essa matriz antes de a invadirem, semelhantemente ao que ocorre *in vivo* (VALSTER et al., 2005). Para a análise de quimiotaxia, um agente atrativo é colocado no compartimento inferior da câmara. O SFB tem ação quimioatratante, ou seja, é um agente que apresenta capacidade de atrair as células do compartimento apical para que elas atravessem o inserto e passem a fazer parte do compartimento basolateral, pela maior presença de nutrientes (HULKOWER; HERBER, 2011). Posteriormente, para avaliar a taxa de invasão, as células são coradas e contadas, sendo a leitura realizada em microscópio invertido de fluorescência (DECAESTECKER et al., 2007).

Figura 2. Transmembrane/Boyden Chamber Assay.



Um inserto é utilizado para estabelecer dois compartimentos em uma cavidade (A); As células são adicionadas no compartimento superior (B); e invadem através da membrana (C); A invasão celular é medida pela contagem do número de células na parte inferior da membrana (D). Fonte: Hulkover; Herber (2011).

Neste trabalho, foi avaliada a capacidade anti-invasiva do glucoevatromonosídeo, pelo ensaio com placas/insertos Transwell® (Millipore Corporation, Billerica, MA, EUA), no qual foram usados 12

insertos com filtros de policarbonato (tamanho do poro 8 μm), recobertos por Matrigel®, em placas de 24 cavidades. Foi adicionado meio DMEM, em ambos os compartimentos, para hidratar e propiciar a formação da matriz extracelular por 2 h. Após, as células A549 foram semeadas em uma densidade de $2,5 \times 10^5$ células/inserto no compartimento apical e o compartimento basolateral recebeu o meio DMEM livre de soro, e os dois compartimentos foram incubados por 24h a 37°C e 5% CO₂. Após esse período, os compartimentos superiores receberam o GEV por 48h e os controles (DMSO 0,25% e Paclitaxel) com DMEM livre de soro. Já os compartimentos inferiores receberam o meio de cultura, com 10% de SFB (quimiotaxia), enquanto que outras cavidades contendo só meio de cultura foram usadas como controle. Posteriormente, as células que invadiram a membrana com Matrigel® e alcançaram o compartimento inferior foram fixadas (Cavidade 1). As células que não invadiram foram removidas com o auxílio de um *swab*. Já as células que invadiram a membrana, mas não chegaram ao compartimento inferior foram removidas de cada inserto por dissociação com tripsina 0,25%, sendo a ação dessa enzima bloqueada com DMEM contendo SFB (10%). Após a aderência das células em outra cavidade (3 h), as mesmas foram fixadas com paraformaldeído e coradas com DAPI por 15 min. (Cavidade 2). Assim, as células das cavidades 1 e 2 correspondem ao total de células que invadiram a partir de um único inserto.

2.5 Quantificação dos percentuais relativos de migração e invasão celulares

Após a fixação e coloração das células, que invadiram e migraram em cada cavidade, as mesmas foram fotografadas para posterior quantificação. Nos ensaios de *scratch*, foram obtidas seis fotos por cavidade, ao longo do arranhão criado em linha. Para os ensaios de invasão foi realizada uma varredura por toda a cavidade para fotografar todos os campos com células.

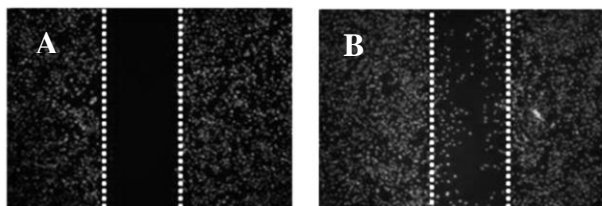
Para a determinação da largura do *scratch*, foram utilizadas as cavidades denominadas *scratch zero*, cujas células foram fixadas logo após a realização da ferida artificial.

As cavidades contendo diluições de DMSO a 0,25% foram o grupo controle, tanto nos experimentos com células tumorais quanto saudáveis, já que as amostras foram diluídas em DMSO e não ultrapassaram 0,25% do mesmo nos experimentos.

O método que foi utilizado para a quantificação é apresentado na Figura 3. Primeiramente, foi determinada a largura do *scratch zero*.

Assim, foi possível determinar a região a ser analisada pelo *software* GIMP versão 2.6 (*GNU Image Manipulation Program*).

Figura 3. Metodologia de quantificação:



(A) Zero *Scratch*; (B) DMSO 0,25%.

Imagens disponibilizadas pela Dra. Fabiana Geller.

Os valores percentuais de indução da migração nos FGH e de inibição da migração e invasão, em células A549, foram determinados em relação ao número de células do controle celular (0,25% de DMSO), utilizando-se o *software* CellC (SELINUMMI et al., 2005). Para essa quantificação, foi utilizada a seguinte fórmula, onde NC representa o Número de Células:

$$\% = \frac{NC_{material-teste} \times 100 - 100}{NC_{controle\ celular}}$$

2.6 Avaliação dos efeitos do glucoevatromonosídeo na expressão das vias de sinalização envolvidas na migração, proliferação e invasão celulares

Como mencionado no Capítulo 1 (Revisão Bibliográfica), as vias de sinalização envolvidas na migração e invasão celulares, assim como as metaloproteinases (MMPs), têm um papel importante na formação de metástases (RODRÍGUEZ; MORRISON; OVERALL, 2010). Por isso, neste trabalho foi avaliada a expressão de diversas proteínas de diferentes vias de sinalização, assim como das metaloproteinases MMP2 e MMP9. Para isso, foram semeadas células A549 na densidade de $5,0 \times 10^5$ células/cavidade, em placas de seis cavidades, na presença do meio MEM e 5% de SFB por 24 h, até confluência. Após este período, as células foram lavadas com PBS, e no volume final de 2 mL de meio, o GEV foi adicionado, em diferentes concentrações, bem como o controle (DMSO). As placas foram incubadas a 37°C, em estufa de CO₂, durante 48 h. O TNFα foi adicionado a cada cavidade, por 15 min, antes do

período de 48h. O TNF α foi utilizado por ser considerado como uma citocina pleiotrópica envolvida na promoção do tumor. Em seguida, o meio foi aspirado e as células lavadas 2X com 2 mL de PBS, seguindo-se da adição de 150 μ L de tampão de lise [137 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0; 10% glicerol; 1,5% inibidor de proteases; 1% inibidor de fosfatase; 1% TritonX 100; 0,5% deoxicolato de sódio; e 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS)]. As amostras foram transferidas para microtubos, centrifugadas a $14.000 \times g$, por 15 min, a 4°C, e os sobrenadantes das amostras foram transferidos novamente para microtubos e fervidos, durante 5 min, a 99°C. As amostras foram armazenadas a -20°C e seu conteúdo proteico foi determinado através do método de Bradford (1976).

As amostras foram adicionadas ao tampão [100% 2-mercaptoetanol; 100% glicerol; 10% dodecil sulfato de sódio; 2% azul de bromofenol e 0,5% Tris-HCl pH 6,8] e as proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS a 15% (SDS-PAGE). Após, foram transferidas para uma membrana de polifluoreto de vinilideno (PVDF) (Millipore, Billerica, MA, EUA) em tampão de transferência [25 mM de Tris Base e 192 mM de glicina, dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 20% de metanol (v/v)], a 400 mA, por 1 h. A análise eletroforética e a transferência foram realizadas com aparatos da marca BioRad (Hercules, CA, EUA). Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 1 h com 5% de leite em pó (Molico®) em tampão de lavagem [1 M de Tris Base; 18% NaCl e 0,5 % Tween 20, dissolvidos em 1 L de água ultrapura, com pH ajustado para 7,6 e armazenado a 4°C até o uso], e lavadas 3X por 5 min (cada lavagem) com este tampão. As membranas foram, então, incubadas durante a noite, a 4°C, separadamente e sob agitação, com os anticorpos primários p-Akt (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA); Akt, , p-NF- κ B p65, PI3Ki, Erk 1/2, PTEN, PDK1, NF- κ B p65, anti-I κ B (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, EUA); e I κ B α (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). O anticorpo direcionado para β -actina foi usado como controle positivo (Millipore, Billerica, MA, USA). Após este período, as membranas foram lavadas 3X por 5 min com tampão de lavagem e incubadas com os anticorpos secundários (conjugados à peroxidase), durante 1 h, à temperatura ambiente e sob agitação, segundo a origem do anticorpo primário, IgG anti-coelho (Chemicon, Millipore) ou IgG anti-rato (Chemicon, Millipore), todos diluídos 1:2000 em tampão de lavagem. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas 3X por 5 min com o tampão de lavagem e a detecção foi feita com o kit de

quimioluminescência Pierce ECL SuperSignal® Western Blotting (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), segundo especificações do fabricante, misturando-se 500 µL de cada reagente (reagentes 1 e 2), e deixando em contato com a membrana por 5 min. Após este período, a membrana foi adequadamente acomodada em uma folha plástica transparente e a revelação foi realizada com o auxílio do equipamento ChemiDoc™ (BioRad, EUA).

2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ±desvio padrão (DP) de três experimentos independentes. A análise estatística foi realizada por *one-way* ANOVA seguida do *post* teste de Tukey ($p < 0.05$; $p < 0.01$; $p < 0.001$). Os cálculos foram realizados com GraphPad Prism® software versão 5.1 (GraphPad, La Jolla, CA, EUA).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A migração celular é um processo complexo que requer várias atividades celulares coordenadas indispensável para o desenvolvimento normal e a homeostase, mas também podendo contribuir para patologias importantes (MENON et al., 2009), tais como cicatrização de feridas, câncer, inflamação, crescimento e diferenciação celulares (HULKOWER; HERBER, 2011). Para melhor compreender esse fenômeno complexo, vários ensaios foram desenvolvidos, e o ensaio do *scratch* é um deles, que é utilizado para avaliar a migração direcional de células *in vitro* (MENON et al., 2009).

3.1 Ensaio do *scratch* em fibroblastos de gengiva humanos (FGH)

Os resultados obtidos nesse ensaio estão disponíveis nas Figuras 4 e 5. Primeiramente, para avaliar se no tempo experimental do ensaio (16 h) as concentrações do composto não eram citotóxicas para os FGH, foi realizado o ensaio colorimétrico da sulforrodamina B. Dessa forma, foi possível determinar que as concentrações a serem testadas do GEV não eram cistostáticas ou citotóxicas para os fibroblastos ($CI_{50} > 250 \mu\text{M}$). Ademais, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF, *Platelet-derived Growth Factor*) foi utilizado como controle positivo por estimular a proliferação celular (GEIGER; PEEPER, 2009). Por último, os fibroblastos são um dos tipos celulares mais estudados neste modelo de migração celular, e por isso, foram aqui utilizados (MENON et al., 2009). O efeito de 2 ng/mL do PDGF aumentou o número de células na área da ferida em torno de 55%, após 16 h de incubação

(Figura 5). Diferentes concentrações de PDGF foram testadas previamente, sendo que essa foi a mais efetiva (dados não mostrados).

Na Figura 4 podem ser observados os efeitos dos tratamentos na menor concentração testada, quando comparados com o do PDGF.

Figura 4. Reepitelização das feridas.

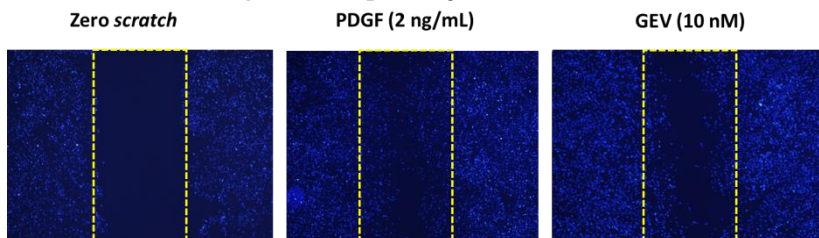
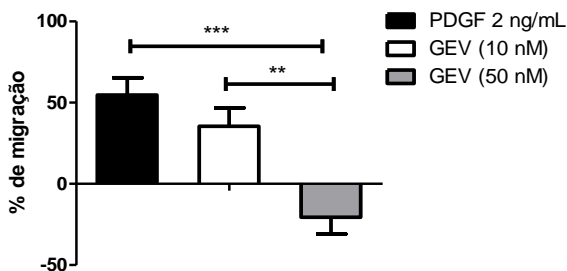


Imagem de microscopia de fluorescência para avaliar a cicatrização de feridas *in vitro* no ensaio de *scratch*, em uma monocamada confluyente de fibroblastos de gengiva humanos. A migração celular na ferida foi observada em resposta a uma lesão artificial: (A) *Zero scratch* (ferida no tempo 0); (B) PDGF 2ng/mL; e (C) GEV 10 nM, sendo B e C após 16 h de incubação. Aumento de 400X.

O glucoevatromonosídeo, na concentração de 50 nM, não apresentou efeito migratório. No entanto, na menor concentração testada (10 nM), esse composto aumentou em 35% o número de células na região ferida (Figuras 4 e 5), sendo esse efeito similar ao apresentado pelo PDGF, já que não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com GEV e PDGF.

Este ensaio foi realizado com o intuito de verificar o efeito em células não tumorais, já que a característica fundamental de um candidato a fármaco antitumoral eficaz é a sua capacidade de suprimir ou de inibir a proliferação de células tumorais humanas, em concentrações que não afetam significativamente as células não malignas.

Figura 5. Efeito do glucoevatromonosídeo (GEV) na migração e proliferação de fibroblastos de gengiva no ensaio de *scratch*, após 16 h de incubação.

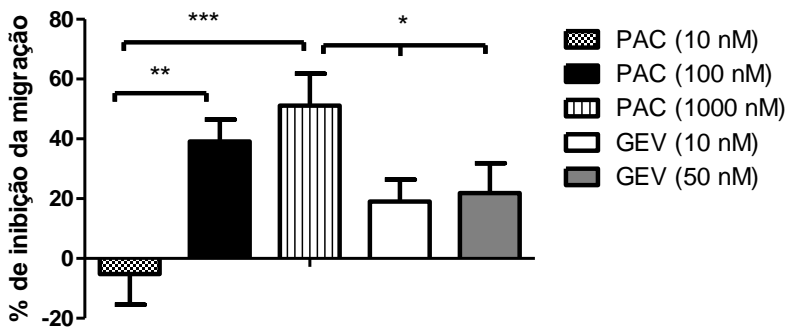


Os dados expressam os percentuais de células na “ferida”, quando comparados com o controle celular (DMSO 0,5%). Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 indicam diferenças estatisticamente significativas (ANOVA, post teste de Tukey).

3.2 Ensaio do *scratch* em células A549

Como pode ser observado na Figura 6, no período de 16 h, o GEV inibiu a migração e proliferação celulares, em torno de 20%, nas duas concentrações testadas. Na concentração de 10 nM, o fármaco usado como controle positivo (paclitaxel) não foi capaz de inibir a migração celular. Porém, o mesmo foi capaz de inibir 40 e 50% da migração celular, nas concentrações de 100 e 1.000 nM, respectivamente. Não houveram diferenças estatísticas entre os grupos tratados com GEV (10 e 50nM) e com paclitaxel (100 nM).

Figura 6. Efeitos do glucoevatomonosídeo (GEV) e do controle positivo paclitaxel (PAC) na inibição da migração e proliferação de células A549 no ensaio de *scratch*, após 16 h de incubação.

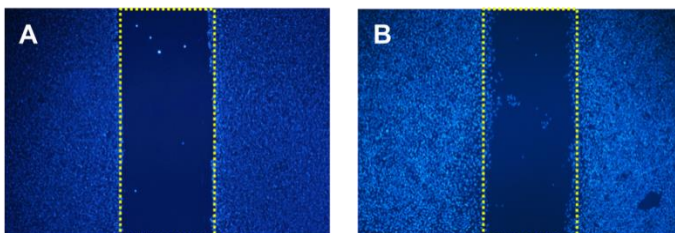


Os dados expressam o percentual de células na “ferida”, quando comparados com o controle celular (DMSO 0,5%). Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 indicam

diferenças estatisticamente significativas entre as amostras (ANOVA, post teste de Tukey).

De forma ilustrativa, as imagens obtidas das monocamadas de células A549 com o “arranhão”, após o tratamento com o GEV, na concentração de 50 nM, estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7. Inibição da migração celular.

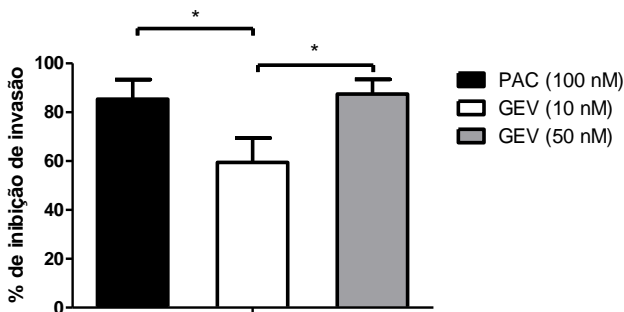


Imagens obtidas por microscopia de fluorescência para avaliar a inibição das células A549 no ensaio do *scratch*, em uma monocamada celular confluenta. A migração celular na “lesão” foi observada em resposta a uma ferida artificial: (A) Zero *scratch* (ferida no tempo 0); (B) tratamento com glucoevatromonosídeo, após 16 h de incubação. Aumento de 400X.

3.3 Avaliação dos efeitos do glucoevatromonosídeo na invasão celular

Conforme pode ser observado na Figura 8, o GEV apresentou ação anti-invasiva, em 48 h, nas duas concentrações testadas. As porcentagens de células tratadas com o GEV, e que não invadiram, situaram-se entre 87 e 99%. Esses resultados são similares aos do fármaco paclitaxel, que apresentou 85% de inibição, na concentração de 100 nM. Na menor concentração testada (10 nM), o GEV apresentou um efeito menor ($p < 0,05$) do que na concentração de 50 nM.

Figura 8. Efeito do glucoevatromonosídeo (GEV) na inibição da invasão das células A549 no ensaio Transwell[®], após 48h de incubação.



Os dados expressam os percentuais de células que não invadiram (do inserto para a placa), em comparação com o controle celular (DMSO 0,5%). Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ indica diferenças estatisticamente significativas entre as amostras (ANOVA, post teste de Tukey).

Sabe-se que no processo metastático há necessidade que as células tumorais apresentem capacidade invasiva para que possam penetrar nos tecidos saudáveis e, assim, disseminar o câncer, sendo este passo um dos principais motivos de morte em pacientes com diversos tipos de tumores sólidos. No câncer de pulmão isso não é diferente, já que a invasividade do tumor demonstrou afetar a mortalidade dos pacientes em fase inicial desse câncer. Uma meta-análise de 52 estudos publicados, abrangendo 16.535 pacientes com NSCLC, que é o tipo mais disseminado de câncer de pulmão) demonstrou que a invasão resultou na pior sobrevida global e aumentou as recidivas nos pacientes em qualquer estágio da doença (BUNN, KIM 2015). Tendo em vista esses dados, o tratamento para as diversas etapas de aparecimento das metástases torna-se crucial para aumentar a sobrevida do paciente.

3.4 Avaliação dos efeitos do glucoevatromonosídeo na expressão das proteínas envolvidas na migração e invasão celulares

A matriz de metaloproteínases (MMPs) é uma família de proteínases zinco-dependentes, que promovem invasão tumoral e metástase, regulando os mecanismos de defesa do hospedeiro e das funções celulares normais. As MMPs estão envolvidas na degradação e remodelação de proteínas da matriz extracelular (MEC), que são associadas com o processo tumorigênico. Essa atividade proteolítica das

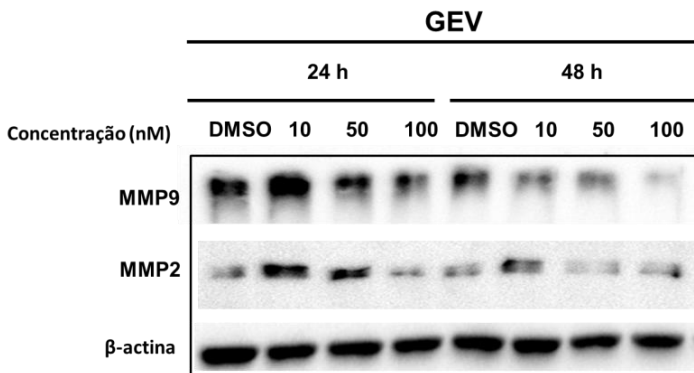
MMPs é necessária para uma célula tumoral degradar as barreiras físicas, durante a expansão local, e promover o intravasamento em vasos sanguíneos, em locais próximos, e o extravasamento, em locais distantes da invasão (GIALELI; THEOCHARIS; KARAMANOS, 2011; TU et al., 2008). Diante desse contexto, os inibidores de MMPs (MMPIs) são úteis para o tratamento de câncer por impedirem que essas metaloproteínases auxiliem na invasão das células tumorais para outros órgãos (TU et al., 2008)

A partir do exposto, foi avaliada a expressão de duas MMPs frente ao cardenolídeo em estudo, em células A549. Na Figura 9 pode se observar o efeito do GEV na expressão das MMP-2 e -9, tendo ocorrido uma redução da expressão das duas MMPs, nas concentrações testadas. Não obstante, o GEV apresentou uma redução expressiva da MMP-2, após 48 h, a 50 e 100 nM.

Adicionalmente, a MMP-2 tem sido relatada como um marcador mais sensível de progressão, metástase e sobrevida de células não pequenas do câncer de pulmão, quando comparada com a MMP-9. Um estudo realizado com pacientes com metástase de tecido pulmonar identificou um aumento nos níveis séricos da MMP-2 correlacionada com o estágio avançado do tumor e a presença de metástases à distância (GUO et al., 2007). Esses resultados indicam a importância dos inibidores da MMP-2 na terapia de estágios avançados do câncer de pulmão (DUFFY; MCGOWAN; GALLAGHER, 2008; GUPTA; MASSAGUÉ, 2006).

O efeito anti-migratório do cardenolídeo ouabaína também foi investigado em células de tumor de pulmão e foi demonstrada a redução da expressão dessas MMPs, assim como a supressão da proteína de adesão focal FAK (LIU et al., 2013; PONGRAKHANANON; CHUNHACHA; CHANVORACHOTE, 2013).

Figura 9. Efeito do glucoevatromonosídeo (GEV) na expressão das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.



As células A549 foram tratadas com o GEV, durante 24 e 48 h, lisadas e analisadas por Western blotting.

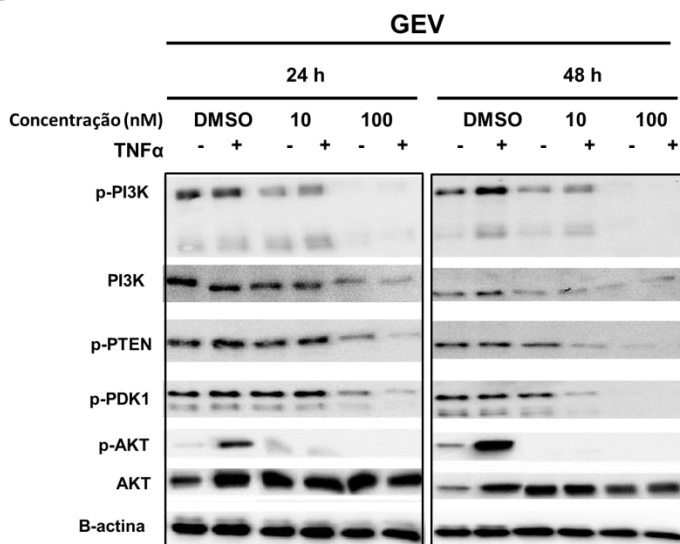
3.5 Avaliação dos efeitos do glucoevatromonosídeo na expressão das vias de sinalização celular potencialmente envolvidas na migração e invasão celulares

No sentido de investigar os mecanismos envolvidos na proliferação, migração e invasão das células A549, quando tratadas com o GEV, o status de fosforilação das proteínas PI3K, Akt e MAPK, assim como a expressão do NF- κ B p-65, foi avaliado por Western blotting, em células estimuladas ou não com TNF- α .

O tratamento com o GEV reduziu a fosforilação da PI3K, enquanto que a da Akt foi inibida (Figura 10). O tratamento com 10 nM e 100 nM do GEV diminuiu a fosforilação da PI3K, afetando outros mediadores *upstream* (acima da via), tais como PTEN e PDK1 (Figura 10). Já no caso da Akt, o tratamento com este composto, durante 24 e 48 h, inibiu sua ativação, de forma tempo e concentração dependentes, tanto em células A549 estimuladas como em não estimuladas (Figura 10). Essa via de sinalização está envolvida em diversas e importantes funções celulares fisiológicas, incluindo proliferação, diferenciação, sobrevivência, motilidade e metabolismo (MARTELLI et al., 2010). As proteínas Akt são importantes reguladores *downstream* da via PI3K e de muitos processos celulares, incluindo proliferação e sobrevivência. Vários

estudos indicaram que a ativação da Akt aumenta a capacidade das células tumorais de migrarem e invadirem (PONGRAKHANANON; CHUNHACHA; CHANVORACHOTE, 2013). Alguns cardenólídeos, tal como a oleandrina, também foram capazes de inibir a fosforilação da Akt (NEWMAN et al., 2007; WANG et al., 2012). Além disso, vários estudos *in vitro* demonstraram que a atividade da MMP-2 e da MMP-9 são reguladas, de forma coordenada, pela via de sinalização PI3K /Akt (LEE et al., 2011; SU et al., 2013).

Figura 10. Efeitos do glucoevatromonosídeo (GEV) na expressão de proteínas das vias PI3K/Akt.



As células foram incubadas por 24 ou 48 h, sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com GEV, nas concentrações de 10 e 100 nM. Posteriormente, as células foram tratadas com TNF α , 15 min antes de serem lisadas, para estimular as células a expressarem as proteínas correspondentes a cada via e analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de dois experimentos independentes.

As vias MAPK/Erk 1/2 e NF- κ B também encontram-se, frequentemente, alteradas no câncer (KARIN et al., 2002; DHILLON et al., 2007; CAIRNS et al., 2011). A investigação dos efeitos do GEV na via MAPK revelou que ele reduziu a fosforilação da Erk, sob estimulação do TNF α , por 24 h e 48 h, nas duas concentrações testadas,

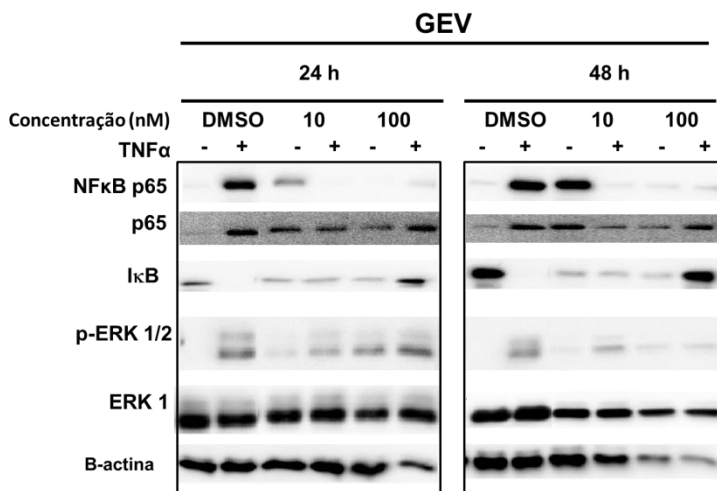
enquanto que nas células que não foram estimuladas, o GEV induziu a fosforilação da Erk após 24h (Figura 11). Em trabalhos anteriores, Erk 1/2 teve sua regulação positiva causada por olendrina, digoxina e oubaina com indução da autofagia em células tumorais de pâncreas e pulmão (NEWMAN et al., 2007; WANG et al., 2012). Além disso, a interação da FAK e Erk1/2 foi capaz de controlar a motilidade celular (PONGRAKHANANON; CHUNHACHA; CHANVORACHOTE, 2013).

O efeito do GEV na expressão da p-p38 também foi investigado; porém, não foram observados efeitos expressivos na redução dessa via, principalmente quando ela foi ativada por TNF α (dados não mostrados).

Na via do NF- κ B, é possível observar que no controle celular, o I κ B encontra-se degradado quando essa via está ativada pela ação do TNF α . Quando as células foram tratadas com GEV, o mesmo foi capaz de reduzir a fosforilação deo NF- κ B p65, enquanto causou a ativação do I κ B, especialmente na concentração de 100 nM, após 24 h (Figura 11). A progressão tumoral e a metástase associadas com inflamação são eventos que causam a ativação dessa via (LUO et al., 2004; PIKARSKY et al., 2004).

Estudos anteriores mostraram que os cardenolídeos efetivamente inibem a via do NF- κ B (MANNA et al., 2000; YANG et al., 2005; JUNCKER et al., 2011) e essa inibição pode ser uma das razões pela qual os cardenolídeos bloqueiam a tumorigenese (MANNA et al., 2000). Ainda, foi reportado que a desativação da via NF- κ B pelo cardenolídeo UNBS1450, em células A549, cooperou para a morte celular autofágica dessas células (MIJATOVIC et al., 2006). Além disso, a ativação constitutiva de um conjunto de proteínas, tais como PI3K (LEE et al., 2003), Akt e NF- κ B também contribuem para a resistência das NSCLC (MAYO et al, 2003, CASTILLO et al, 2004).

Figura 11. Efeito do glucoevatromonosídeo (GEV) na expressão de proteínas das vias NF- κ B e Erk.



As células foram incubadas por 24 ou 48 h sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com o GEV, nas concentrações de 10 e 100 nM. Posteriormente, as células foram estimuladas com TNF α , 15 min antes de serem lisadas, para estimular as células a expressarem as proteínas correspondentes a cada via e analisadas por Western blotting. Cada imagem é representativa de dois experimentos independentes.

Como exposto no Capítulo 2, o GEV, na concentração de 100 nM, induziu um alto índice de morte celular, porém na concentração de 10 nM, após 24h, não foi possível observar morte celular, mas sim efeitos significativos na redução da migração, invasão e nas vias de sinalização implicadas. Isso corrobora para a hipótese de que os efeitos observados na inibição da invasão celular não são decorrentes da morte celular causada por esse composto, mas sim pela inibição de vias e, dessa forma, suprimindo o processo metastático.

Em conclusão, no presente estudo, foram mostradas evidências de que o GEV desempenha um papel importante na inibição da migração e invasão de células A549. Primeiramente através da inibição das vias de sinalização PI3K/Akt, Erk e subsequentemente reduzindo a expressão das proteínas MMP-2 e MMP-9.

REFERÊNCIAS

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUNN, P.A., KIM, E.S. Improving the care of patients with stage ib non-small cell lung cancer: Role of prognostic signatures and use of cell cycle progression biomarkers. **Clinical Lung Cancer**. v. 16, n. 4, p. 245-251, 2015.

CAIRNS, R. A., HARRIS, I. S., AND MAK, T. W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 85-95, 2011.

CASTILLO, S. S. et al. Preferential inhibition of Akt and killing of Akt-dependent cancer cells by rationally designed phosphatidylinositol ether lipid analogues. **Cancer Research**, v. 64, p. 2782-2792, 2004.

DECAESTECKER, C. et al. Can anti-migratory drugs be screened in vitro? A review of 2D and 3D assays for the quantitative analysis of cell migration. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 2, p. 149-176, 2007.

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

DUFFY, M. J.; MCGOWAN, P. M.; GALLAGHER, W. M. Cancer invasion and metastasis : changing views. **Journal of Pathology**, v. 214, p. 283-293, 2008.

FRIEDL, P.; GILMOUR, D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 10, n. 7, p. 445-457, 2009.

FRONZA, M. et al. Determination of the wound healing effect of Calendula extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, n. 3, p. 463-467, 2009.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1796, n. 2, p. 293-308, 2009.

GIALELI, C.; THEOCHARIS, A. D.; KARAMANOS, N. K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. **The FEBS Journal**, v. 278, n. 1, p. 16-27, 2011.

GUO, C.B. et al. Relationship between matrix metalloproteinase 2 and lung cancer progression. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v. 11, n. 3, p. 183-192, 2007.

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer metastasis: building a framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-695, 2006.

HULKOWER, K. I.; HERBER, R. L. Cell migration and invasion assays as tools for drug discovery. **Pharmaceutics**, v. 3, n. 4, p. 107-124, 2011.

KARIN, M. et al. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. **Nature Reviews. Cancer**, v. 2, p. 301-310, 2002.

LEE, H. et al., Evidence that phosphatidylinositol 3-kinase- and mitogen-activated protein kinase kinase-4/c-Jun NH2-terminal kinase-dependent Pathways cooperate to maintain lung cancer cell survival. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 23630-23638, 2003.

LEE, Y.C. et al. Nobiletin, a citrus flavonoid, suppresses invasion and migration involving FAK/PI3 K/Akt and small GTPase signals in human gastric adenocarcinoma AGS cells. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 347, p. 103-115, 2011.

LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

LIU N. ET al., Inhibition of cell migration by ouabain in the A549 human lung cancer cell line. **Oncology Letters**, v. 6, n. 2, p. 475-479, 2013.

LUO, J. L. et al. Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. **Cancer Cell**, v. 6, p. 297-305, 2004.

MANNA, S. K. et al. Oleandrin suppresses activation of nuclear transcription factor-kappaB, activator protein-1, and c-Jun NH2-terminal kinase. **Cancer Research**, v. 60, p. 3838-3847, 2000.

MAYO, M. W. et al. Ineffectiveness of histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis involves the transcriptional activation of NF-kappa B through the Akt pathway. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 18980-18989, 2003.

MARTELLI, A.M. et al. The emerging role of the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt/ mammalian target of rapamycin signaling network in normal myelopoiesis and leukemogenesis **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, p. 991-1002, 2010.

MENON, M. B. et al. Fluorescence-based quantitative scratch wound healing assay demonstrating the role of MAPKAPK-2/3 in fibroblast migration. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 66, n. 12, p. 1041–1047, 2009.

MIJATOVIC, T. et al., The cardenolide UNBS1450 is able to deactivate nuclear factor kappaB-mediated cytoprotective effects in human non-small cell lung cancer cells. **Molecular Cancer Therapy**, v. 5, p. 391-399, 2006.

MIJATOVIC, T. et al. UNBS1450: A new hemi-synthetic cardenolide with promising anti-cancer activity. **Drug Development Research**, v. 173, p. 164-173, 2007.

MIJATOVIC, T.; DUFRASNE, F.; KISS, R. Cardiotoxic steroids-mediated targeting of the Na(+)/K(+)-ATPase to combat chemoresistant cancers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 5, p. 627-646, 2012.

NEWMAN, R. A. et al. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. **Integrative Cancer Therapy**, v. 6, p. 354-364, 2007.

PIKARSKY, E. et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. **Nature**, v. 431, p. 461-466, 2004.

PONGRAKHANANON, V. Anticancer properties of cardiac glycosides. In: autores do livro (eds) **Cancer Treatment - Conventional and Innovative Approaches**. Local: InTech: 2013. p. 618.

RODRÍGUEZ, D.; MORRISON, C. J.; OVERALL, C. M. Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1803, n. 1, p. 39-54, 2010.

SELINUMMI, J. et al. Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. **BioTechniques**, v. 39, n. 6, p. 859-863, 2005.

SU, Y.; et al. Id1 enhances human ovarian cancer endothelial progenitor cell angiogenesis via PI3 K/Akt and NFkappaB/MMP-2 signaling pathways. **Journal of Translational Medicine**, v.11, p.132, 2013.

TU, G. et al. Progress in the development of matrix metalloproteinase inhibitors. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 14, p. 1388-1395, 2008.

VALSTER, A. et al. Cell migration and invasion assays. **Methods**, v. 37, n. 2, p. 208-215, 2005.

PONGRAKHANANON, V.; CHUNHACHA, P.;
CHANVORACHOTE, P.. Ouabain suppresses the migratory behavior of lung cancer cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e68623, 2013.

WANG, Y. ET AL. Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through regulation of dual signaling pathways. **International Journal of Biochemical Cell Biology**, v. 44, p. 1813-1824, 2012

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos a Dra. Izabella Thais da Silva pela realização dos experimentos de WB relativos às vias de sinalização apresentados nesse capítulo, durante seu estágio de doutoramento no *Institute of Molecular Virology* na Universidade de Münster, em Münster, Alemanha. Agradecemos também a Dra. Fabiana Geller por ter padronizado e auxiliado na realização dos experimentos do *scratch* e de invasão celular.

CAPÍTULO 5:
ESTUDO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS
DOS CARDENOLÍDEOS
DIGITOXIGENINA
MONODIGITOXOSÍDEO E
CONVALOTOXINA EM CÉLULAS
TUMORAIS

CAPÍTULO 5 - Estudo dos efeitos citotóxicos dos cardenolídeos digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina em células tumorais

1. APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO

Neste capítulo serão apresentados os resultados da avaliação dos efeitos citostáticos e citotóxicos causados pelos cardenolídeos digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina, em diferentes linhagens de células tumorais. Por fim, as células A549 foram selecionadas para complementação do mecanismo de ação desses cardenolídeos.

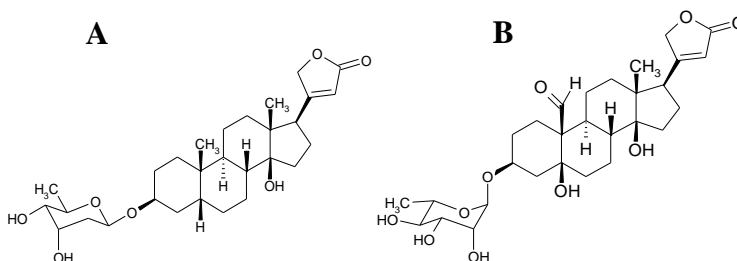
2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Objetos de estudo

O cardenolídeo digitoxigenina monodigitoxosídeo (DGX) foi gentilmente cedido pelos Profs. Drs. Fernão Castro Braga e Rodrigo Maia de Pádua, da Faculdade de Farmácia da UFMG, e pelo Prof. Dr. Wolfgang Kreis, da Friedrich-Alexander Universität, Erlangen, da Alemanha. A convalotoxina (CON) foi adquirida comercialmente da Sigma Aldrich, St. Louis, MO, EUA. As estruturas químicas dos dois cardenolídeos testados estão encontram-se na Figura 1.

As soluções-estoques foram preparadas a partir das massas disponíveis de cada amostra, em concentrações variadas, através da solubilização em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Darmstadt, Alemanha). Para a realização dos ensaios, as soluções-estoques foram diluídas em meio de cultura, nas concentrações desejadas, não ultrapassando 1% de DMSO, que é a concentração já testada no Laboratório e que não se mostrou citotóxica (dados não mostrados).

Figura 1. Estruturas químicas dos cardenolídeos: digitoxigenina monodigitoxosídeo (A) e convalotoxina (B).



2.2 Culturas celulares, meios de cultura e reagentes

As linhagens celulares que foram utilizadas para o estudo do mecanismo de ação citotóxica e para a seletividade dos compostos são descritas a seguir. A linhagem A549 (adenocarcinoma de pulmão), adquirida do ATCC: CCL-185 foi mantida com meio MEM (*Minimal Essential Medium*, Cultilab[®] Campinas, SP, Brasil), suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco[®] Carlsbad, CA, USA) e mantida em frascos de cultura estéreis de 75cm² a 37°C, em atmosfera umedecida de 5% de CO₂.

As demais linhagens celulares tumorais utilizadas foram fornecidas pelo banco de células alemão DSMZ (Braunschweig, Alemanha), a saber: células de adenocarcinoma do cólon humano (HT-29), células de neuroblastoma humano (SK-N-AS e SH-SY5Y), leucemia mielóide crônica humana (K562), linfoma histiolítico (U937), leucemia de células T (Jurkat) e linfoma de Burkitt (Raji). Todas foram cultivadas em meio RPMI (Lonza, Verviers, Bélgica) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de vitelo (Lonza) e 1% (v/v), antibióticos-antimicótico (penicilina, estreptomicina e anfotericina B) (BioWhittaker, Verviers, Bélgica). As células mononucleadas do sangue periférico (PBMC) foram obtidas a partir do sangue de doadores saudáveis, como *buffy coats*, gentilmente fornecidos pela Cruz Vermelha (Luxemburgo, LU). Uma diluição de sangue e meio RPMI foi adicionado ao Ficoll[®] (Paque, GE Healthcare, Diegem, BE) para a separação das fases e, em seguida, centrifugada. Após o isolamento, as células PBMC foram lavadas com meio RPMI, contadas, ressuspensas a uma densidade celular de 2×10^6 células/mL em meio suplementado com 10% (v/v) de soro fetal de vitelo e antibióticos-antimicótico (BioWhittaker). Todas as células foram cultivadas a 37°C, em 5% de CO₂. Antes e durante a realização deste estudo, todas as linhagens celulares foram submetidas a testes para garantia da ausência de bactérias, leveduras e micoplasmas.

2.3 Ensaio de proliferação celular pelo método do XTT

Primeiramente, foi avaliado o impacto dos cardenolídeos em estudo sobre a proliferação de diversas linhagens tumorais através do método do XTT (2,3-Bis-(2-metóxi-4-nitro-5-sulfonila)-2H-tetrazolium-5-carboxanilídeo (Roche, Basileia, Suíça). Resumidamente, as células HT-29, SH-SY5Y, SK-N-AS, K562, Jurkat, Raji e U937 foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e, após 24 h, as células foram tratadas

com diversas concentrações dos cardenolídeos em estudo por 24, 48 e 72 h. Da mesma forma, as células PBMCs foram semeadas em uma concentração de 2×10^5 células/cavidade e diferentes concentrações dos compostos foram testadas (10, 50, 100, 200 e 1000 nM), que correspondem de 1 a 10 vezes seus valores de CI_{50} , em células A549. Após o tempo experimental determinado, uma alíquota das células em cada condição experimental foi redirecionada para análise pelo ensaio do XTT. Após o período de incubação, a concentração que inibiu 50% da proliferação celular (CI_{50}) de cada composto foi calculada.

2.4 Efeitos na proliferação e viabilidade das linhagens celulares selecionadas, pelo ensaio com azul de tripano

A coloração com azul de tripano foi utilizada para avaliar a proliferação e a viabilidade de algumas das linhagens celulares em estudo (HT-29, SH-SY5Y, SK-N-AS, K562, Jurkat, Raji e U937). As células foram plaqueadas e tratadas com DGX e CON até 72 h. Em seguida, as células foram coletadas e o corante foi adicionado nas suspensões celulares. As células, viáveis e não viáveis, foram contadas no equipamento para contagem de células Cedex XS® (Roche Innovatis, Basileia, Suíça). Os dados foram expressos como número de células viáveis (*10000) indicando assim a proliferação celular ao longo do tempo. Os dados também foram expressos em porcentagens de células viáveis, indicando a porcentagem de células mortas, ou seja permeáveis ao azul de tripano.

Para a continuação da avaliação dos efeitos citotóxicos desses cardenolídeos, as células A549 foram selecionadas por apresentarem resultados motivadores e também pelo alto grau de relevância desse tipo de câncer, no sentido de continuar as investigações de novos agentes, bem como entender a complexidade desse tipo de tumor.

2.5 Avaliação dos efeitos da DGX e CON na formação de colônias, pelo ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico ou ensaio de formação de colônias é um ensaio *in vitro* de sobrevivência de células que se baseia na capacidade de uma única célula de crescer em colônia. O ensaio testa essencialmente todas as células na população por sua capacidade de sofrer divisão "ilimitada", sendo que cada colônia consiste de pelo menos 50 células. Esse ensaio foi realizado de acordo com Franken e colaboradores (2006), com algumas adaptações. Inicialmente, 5×10^2 células/cavidade foram semeadas em placas de seis cavidades e incubadas a 37 °C em estufa de

CO₂ por 24 h. Após, foi realizado tratamento com os cardenólídeos em diferentes concentrações por 48 h. Em seguida, o tratamento com os compostos foi retirado das placas e cada cavidade foi lavada com tampão fosfato salino (PBS: *Phosphate Buffered Saline*) e recebeu meio suplementado com 10% de SFB, e as placas foram incubadas por 10 dias. Após esse período, o meio suplementado com soro foi retirado, as placas lavadas novamente com PBS e coradas com cristal violeta (0,5% p/v). As colônias formadas coradas foram contadas utilizando-se um estereomicroscópio. O cálculo foi realizado considerando-se o número de colônias do controle celular como 100% e o número de colônias dos tratamentos é X %. Os valores de % de formação de colônias representam a média de três experimentos independentes ± desvio padrão.

2.6 Análise dos efeitos da DGX e CON na progressão do ciclo celular, por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular foi baseada na metodologia proposta por Riccardi e Nicoletti (2006), com as devidas adaptações abaixo descritas. A partir de uma suspensão das células A549, foram semeadas $5,0 \times 10^5$ células/cavidade em placas de seis cavidades e incubadas a 37°C em estufa de CO₂ por 24 h. Posteriormente, as células foram tratadas com os compostos, em diferentes concentrações, e incubadas durante 24, 48 e 72 h. Em seguida, as células foram retiradas das cavidades por meio de dissociação química (300 µL/cavidade de tripsina 0,25 %), coletadas e lavadas 2 X com solução de PBS, centrifugadas a $500 \times g$ por 5 min e fixadas com etanol 70 % a 4°C por 30 min. Após fixação, uma solução de RNase (50 µg/mL) e iodeto de propídeo (100 µg/mL) foi adicionada às células, e as mesmas foram incubadas ao abrigo de luz por 30 min, à temperatura ambiente. Após este período, as células foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson (BD), Nova Jersey, EUA), com registro de 20.000 eventos para cada amostra. O registro dos eventos foi realizado de forma lenta para garantir que as células não fossem lidas em dupletes ou grupos, configurando assim o dobro da quantidade de DNA que seria referido à fase G2/M. A partir dos dados obtidos, a população de células em cada fase do ciclo celular foi determinada utilizando o software *Flowing*®. Todas as amostras analisadas foram previamente tratadas para retirada das células em dupletes da população celular analisada, minimizando o falso positivo da análise (HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013). Foram realizados três experimentos independentes.

Para auxiliar na identificação da natureza da morte celular implicada por esses compostos em células A549 foram realizados os experimentos a seguir.

2.7 Identificação das alterações morfológicas nucleares causadas pela DGX e CON

Para identificar as alterações morfológicas causadas pelos compostos em estudo, foi realizado o tratamento das células A549 nas concentrações de 10 e 100 nM, através da análise microscópica da morfologia nuclear, por coloração com o corante de DNA Hoechst (1 µg/mL de Hoechst 33342, Sigma-Aldrich, Bornem, BE), como descrito por Junker et al. (2011). As células tratadas com DGX e CON durante 24, 48 e 72 h foram coradas durante 15 min, e os núcleos foram fotografadas com o auxílio de microscopia de fluorescência (Leica DM IRB-microscópio, Lecuit, LU).

Além disso, as células, tratadas com concentrações que induziram morte celular significativa, foram pré-tratadas durante 1 h com o inibidor de caspase zVAD (50 µM) e, em seguida, tratadas com DGX e CON (100 nM) ou DMSO e analisadas e coradas com o corante de DNA Hoechst 33342, conforme descrito acima

As análises morfométricas dos núcleos foram realizadas de acordo com Filippi-Chiella et al. (2012) e os protocolos estão disponíveis no website <<http://www.ufrgs.br/labsinal/nma/>>. Foram obtidas, no mínimo, 5 imagens de cada tratamento com 300 dpi e, no mínimo, 100 núcleos por tratamento foram analisados. As análises foram realizadas após instalação do *plugin* NMA no software Image J (NHI, Bethesda, MD, EUA; <<http://rsbweb.nih.gov/ij/>>). Os núcleos que estavam sobrepostos ou muito próximos uns dos outros foram excluídos da análise. Os núcleos foram circulado para avaliação morfométrica dos dados, tais como: área, aspecto, razão radial e circularidade. Durante a análise, os núcleos foram classificados como: normais, irregulares, pequenos e regulares, pequenos e irregulares, grandes e regulares e grandes e irregulares.

2.8 Avaliação da indução de morte celular apoptótica ou necrótica pela DGX e CON, em células A549, por citometria de fluxo

O ensaio da anexina V é amplamente utilizado para a detecção de apoptose, por citometria de fluxo. A anexina V é um membro da família anexina e liga-se a um fosfolípido carregado negativamente, a fosfatidilserina (PS), que reside no interior da membrana plasmática de

células saudáveis, mas que é exteriorizada nas células expostas a estímulos pró-apoptóticos (HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013). Esta avaliação foi realizada pela dupla marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de Propídeo (IP), utilizando-se um kit de detecção FITC Annexin V (BD, EUA). Assim, células A549 foram semeadas com densidade de $5,0 \times 10^5$ células/cavidade, em placas de seis cavidades e incubadas a 37 °C em estufa de CO₂ por 24 h. Após o tratamento com os compostos por 12 e 48 h, as células aderidas e suspensas foram cuidadosamente coletadas das cavidades, através de dissociação química com tripsina 0,25%, lavadas com PBS e incubadas com tampão de ligação e Anexina V-FITC, por 10 min, à temperatura ambiente e, posteriormente, com IP, conforme instruções do fabricante. As células apoptóticas e/ou necróticas marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo FACS CAnto II (BD, EUA), registrando-se 20.000 eventos para cada amostra. Os controles positivos usados nesse experimento foram: o fármaco camptotecina (Sigma) para indução de apoptose e ciclos de congelamento e descongelamento celular (-80 °C/ e 56 °C) para indução de necrose. Os dados obtidos foram analisados em software *Flowing®* tendo sido realizados, no mínimo, três experimentos independentes. Esta análise permite a quantificação de células, que são: (a) anexina V negativas e IP negativas (células vivas), (b) anexina V positivas e IP negativas (apoptose precoce), e (c) anexina V positivas e IP positivas (apoptose tardia e necrose). A anexina V-FITC (525 nm) é medida no canal verde e o IP (617 nm) é medido no canal vermelho. As amostras foram analisadas por *dotplots*, correlacionando os dois parâmetros citados acima.

2.9 Avaliação da indução da autofagia pela DGX e CON, em células A549, por citometria de fluxo

Para avaliação da indução da autofagia foi utilizada a marcação das células A549 com o corante laranja de acridina, que é um corante acidotrópico, que se acumula nos lisossomas e autolisossomas e forma agregados, que fluorescem em vermelho-alaranjado (PAGLIN et al., 2001). Para a análise qualitativa, células A549 foram semeadas $2,0 \times 10^5$ células/cavidade em placas com câmaras de oito cavidades (NUNCTM, Lab- TekTM, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) e incubadas por 24 h a 37 °C. Após este período, foi realizado o tratamento com os compostos em estudo, em diferentes concentrações por 48 h. Em seguida, a solução de 1 µg/mL de laranja de acridina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi adicionada as cavidades por 15 min, seguida de lavagens com PBS e remoção da parte destacável das placas. Após, as

células foram observadas e fotografadas em microscópio de fluorescência (Olympus BX41, Hicksville, NY, EUA). Para a análise quantitativa, células A549 foram semeadas em placas de seis cavidades e depois de 24 h de incubação, os compostos foram adicionados por mais 24 ou 48 h. Após esses períodos, as células foram removidas através de dissociação química com tripsina 0,25%, lavadas com PBS e coradas com laranja de acridina (1 µg/mL, 15 min a 37°C). O aumento da fluorescência vermelha (formação de carga autofágica) foi determinado por citômetro de fluxo (FACS Canto II, BD, EUA) e os cálculos foram realizados com o auxílio do software *Flowing*[®].

2.10 Avaliação dos efeitos da DGX e CON, em células A549, na expressão da proteína LC3B envolvida na morte celular autofágica

Como mencionado no Capítulo 1, a proteína LC3 é um marcador de autofagia, pois quando conjugada com uma fosfatidiletanolamina do autofagossoma, converte-se em LC3-II. Assim, para a visualização da proteína LC3BII, foram semeadas células A549, na densidade de $5,0 \times 10^5$ células/cavidade em placas de seis cavidades, na presença do meio MEM e 5% de SFB por 24 h, até confluência. Após este período, as células foram lavadas 2X com PBS, e no volume final de 2 mL de meio, os compostos foram adicionados, nas diferentes concentrações, bem como o veículo DMSO no controle celular. As placas foram incubadas a 37°C, em estufa de CO₂, durante 48 h. Em seguida, o meio foi aspirado e as células lavadas 2X com 2 mL de PBS, seguindo-se da adição de 150 µL de tampão de lise [137 mM NaCl; 25 mM Tris-HCl pH 8,0; 2 mM EDTA pH 8,0; 10% glicerol; 1,5% inibidor de proteases; 1% inibidor de fosfatase; 1% TritonX 100; 0,5% deoxicolato de sódio; e 0,1% dodecil sulfato de sódio (SDS)]. As amostras foram transferidas para microtubos, centrifugadas a $14.000 \times g$, por 15 min, a 4°C, e os sobrenadantes das amostras foram transferidos novamente para microtubos e fervidos durante 5 min a 99°C. As amostras foram armazenadas a -20°C e seu conteúdo protéico foi determinado (BRADFORD, 1976).

As amostras foram adicionadas ao tampão [100% 2-mercaptoetanol; 100% glicerol; 10% dodecil sulfato de sódio; 2% azul de bromofenol e 0,5% Tris-HCl pH 6,8] e as proteínas foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS a 15% (SDS-PAGE). A análise eletroforética foi realizada com tampão contendo tricina, preferencial para proteínas de baixo peso molecular (CHEN; AZAD; GIBSON, 2010). Após, foram transferidas para uma membrana de polifluoreto de

vinilideno (PVDF) (Millipore, Billerica, MA, EUA) em tampão de transferência [25 mM de Tris Base e 192 mM de tricina, dissolvidos em 100 mL de uma solução aquosa a 20% de metanol (v/v)], a 400 mA por 1 h. A análise eletroforética e a transferência foram realizadas com aparatos da marca BioRad (Hercules, CA, EUA). Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 1 h com 5% de leite em pó (Molico) em tampão de lavagem [1 M de Tris Base; 18% NaCl e 0,5 % Tween 20, dissolvidos em 1 L de água ultrapura, com pH ajustado para 7,6 e armazenado a 4°C até o uso], e lavadas 3X por 5 min (cada lavagem) com este tampão. As membranas foram, então, incubadas durante a noite, a 4°C, separadamente e sob agitação, com os anticorpos primários LC3B (diluição 1:1000; Cell Signalling Technology, Boston, MA, USA) e β -actina (diluição 1:2000; Sigma Aldrich, EUA). Após este período, as membranas foram lavadas 3X por 5 min com tampão de lavagem e incubadas com os anticorpos secundários (conjugados à peroxidase), durante 1 h, à temperatura ambiente e sob agitação, segundo a origem do anticorpo primário, IgG anti-coelho (Chemicon, Millipore) para o anticorpo LC3B e IgG anti-rato (Chemicon, Millipore) para a β -actina, todos diluídos 1:2000 em tampão de lavagem. Terminado o período de incubação, as membranas foram lavadas 3X por 5 min com o tampão de lavagem e a detecção foi feita com o kit de quimioluminescência Pierce ECL SuperSignal® Western Blotting (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), segundo especificações do fabricante, misturando-se 500 μ L de cada reagente (reagentes 1 e 2), e permanecendo em contato com a membrana por 5 min. Após este período, a membrana foi adequadamente acomodada em uma folha plástica transparente e a revelação foi realizada com o auxílio do equipamento ChemiDoc™ (BioRad, EUA).

2.11 Análise estatística

Para a avaliação da redução da viabilidade celular, foi realizado o delineamento de blocos completos casualizados (BCC) e arranjo fatorial dos tratamentos (SOKAL; ROHLF, 1995), no qual cada cavidade da placa constituiu uma unidade experimental e os tratamentos foram as diferentes concentrações dos compostos testados. Os tratamentos e os controles positivos e negativos foram distribuídos aleatoriamente entre as cavidades das placas, e as repetições foram realizadas em placas diferentes, uma vez que os ensaios foram feitos em dias subsequentes (três dias), garantindo a casualização. Cada placa correspondeu a um bloco, permitindo uma melhor avaliação das possíveis variações entre as repetições.

Para calcular os valores de CI_{50} realizou-se uma análise de regressão linear, a partir de curvas de concentração *versus* efeito, e os experimentos foram realizados em triplicata, sendo os resultados expressos como a média \pm desvio-padrão. As diferenças estatisticamente significativas ou não dos tratamentos, com relação aos controles, foram avaliadas através de análise de variância (ANOVA) e para separação de médias foi empregado o teste de Dunnett, utilizando o programa GraphPad Prism® 5, versão 5.01 para Windows (Graph Pad Software, La Jolla, CA, EUA). O intervalo de confiança adotado foi de 95% ($p < 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Ensaio de proliferação celular pelo método do XTT

Nas Tabelas 1 e 2 estão apresentados os efeitos dos dois compostos testados na proliferação celular, em linhagens celulares tumorais e uma linhagem celular não-tumoral.

A DGX apresentou efeito anti-proliferativo, em concentrações nanomolares, para todas as linhagens celulares tumorais testadas, após 48h. As células A549 mostraram ser as mais sensíveis ao tratamento com esse composto, seguidas das outras células, a saber: U937 > SH-SY5Y > SK-N-AS > Jurkat > K562 > Raji > HT-29 (Tabela 1).

Tabela 1. Efeitos anti-proliferativos da DGX em linhagens celulares tumorais e uma linhagem celular não tumoral.

Células	CI_{50} (nM)		
	24h	48h	72h
A549	24,45 \pm 7,18	8,36 \pm 2,32	ND
SK-N-AS	>200	44,48 \pm 5,62	36,53 \pm 3,95
SH-SY5Y	142,22 \pm 5,98	43,70 \pm 17,11	ND
HT-29	123,24 \pm 8,68	118,33 \pm 23,99	ND
K562	171,36 \pm 50,69	57,22 \pm 13,45	52,50 \pm 5,32
U937	126,19 \pm 25,56	31,52 \pm 9,73	26,41 \pm 6,84
Jurkat	156,23 \pm 17,83	54,85 \pm 12,21	40,25 \pm 11,83
Raji	114,39 \pm 42,16	73,18 \pm 9,83	70,22 \pm 8,96
PBMC	>1000	>1000	613,39 \pm 613,72

CI₅₀: Concentração que inibe a proliferação celular em 50%. . Os valores representam a média ± desvio-padrão de três experimentos independentes. ND: não determinado.

A CON também apresentou efeitos anti-proliferativos expressivos, em concentrações nanomolares, para todas as linhagens celulares tumorais testadas, após 48h. As células A549 também mostraram ser as mais sensíveis ao tratamento com esse composto, seguidas das outras células, a saber: U937 > Jurkat = HT-29 > SH-SY5Y > K562 > SK-N-AS = Raji (Tabela 2).

Para os dois compostos, as células A549, seguidas das células U937, foram as mais sensíveis aos tratamentos.

Uma das características fundamentais de um candidato a fármaco antitumoral eficaz é a sua capacidade de inibir o crescimento de células tumorais em concentrações que não afetam significativamente as células não malignas humanas. Idealmente, o candidato a fármaco deve eliminar todas as células tumorais dos pacientes, sem afetar significativamente suas células normais (CALDERÓN-MONTAÑO et al., 2014).

Por isso, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cell*) foram testadas. Essas são células sanguíneas com núcleo único e arredondado, tais como linfócitos, monócitos e macrófagos. A população de linfócitos consiste em células TCD4 e CD8 (~75%) e células NK e linfócitos B (~25% quando combinados). As PBMCs são obtidas de todas as demais células sanguíneas usando Ficoll®, que é uma mistura de polissacarídeos neutros hidrofílicos de alta densidade, que separa os componentes celulares do sangue periférico. A separação resulta em uma camada superior de plasma sanguíneo, seguida de outra camada, ou anel, de PBMCs, e uma camada abaixo com as demais células polimorfonucleares, tais como neutrófilos, eosinófilos e eritrócitos. As células polimorfonucleares podem ser posteriormente isoladas através da lise das células vermelhas do sangue (GRAZIANI-BOWERING; GRAHAM; FILION, 1997; KNEZEVIC; JERAS, 2003).

Os valores de CI₅₀ da DGX e CON encontrados para as PBMCs foram consideravelmente superiores aos encontrados para as células tumorais testadas (Tabelas 1 e 2). A CON, por exemplo, após 48 h de tratamento foi 171 X mais seletiva para as células A549 do que para as células não tumorais PBMCs. A DGX, por sua vez foi >119 X mais seletiva para as células A549.

Tabela 2. Efeitos anti-proliferativos da CON em linhagens celulares tumorais e uma linhagem celular não tumoral.

Células	CI ₅₀ (nM)		
	24h	48h	72h
A549	9,15±3,39	2,97±0,50	ND
SK-N-AS	>200	25,39±9,76	12,96±2,49
SH-SY5Y	28,80±8,92	13,47±2,95	ND
HT-29	18,22±7,34	10,81±4,10	ND
K562	65,28±28,23	23,70±4,05	18,39±5,80
U937	31,59±12,02	8,69±1,77	6,84±1,38
Jurkat	43,92±11,06	10,97±1,39	8,94±1,02
Raji	108,01±24,98	25,34±5,78	12,86±1,92
PBMC	>1000	510,65±137,22	448,23±94,94

CI₅₀: Concentração que inibe a proliferação celular em 50%. Os valores representam a média ± desvio-padrão de três experimentos independentes.

ND: não determinado.

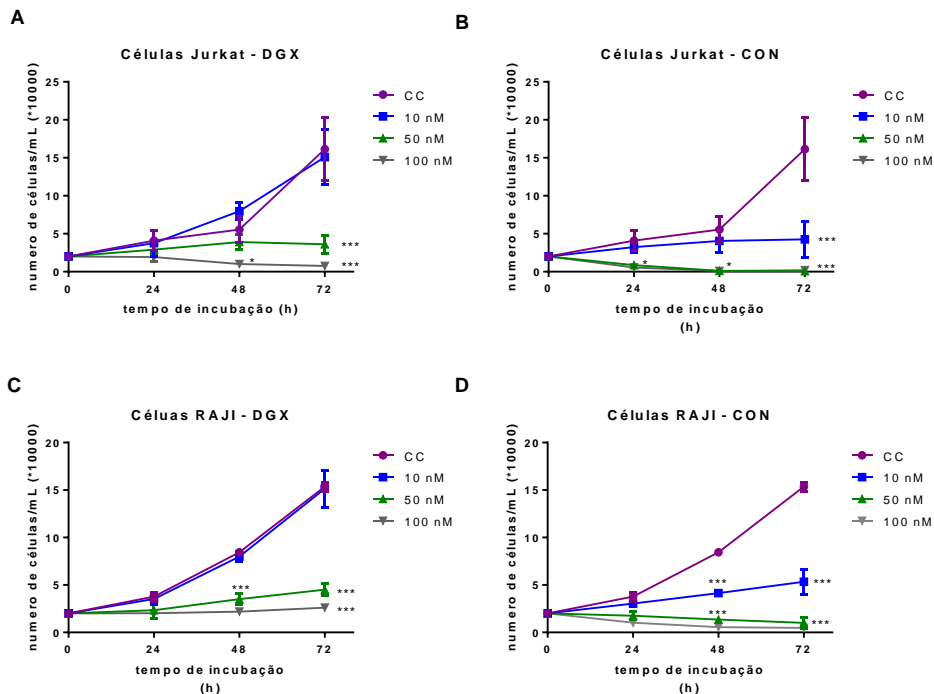
O cardenolídeo UNBS1450, quando testado frente às PBMCs, também não afetou significativamente a viabilidade dessas células. Estes resultados foram posteriormente confirmados pela quantificação de células em apoptose. Assim, pôde-se determinar que a 50 nM, o cardenolídeo UNBS1450 causou indução de apoptose em 10,8% da população celular e ao aumentar a sua concentração de UNBS1450 para 100 nM, as células em apoptose aproximaram-se de 16%. Isso foi substancialmente abaixo do obtido para células neoplásicas (por exemplo, indução de apoptose em >60% para células U937 tratadas com esse cardenolídeo a 30 nM (JUNCKER et al, 2011).

Entre todas as linhagens testadas, algumas foram selecionadas para a realização dos experimentos com o corante vital azul de tripano

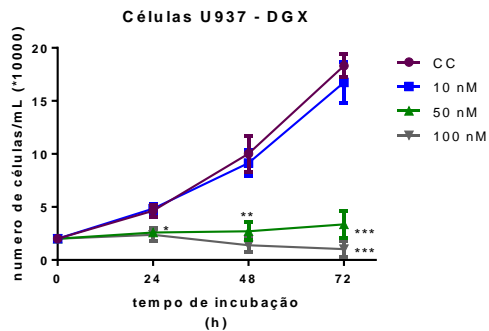
3.2 Efeitos da DIG e CON na proliferação e viabilidade das linhagens celulares selecionadas, pelo ensaio com azul de tripano

Foi avaliado o impacto dos cardenolídeos em estudo sobre a proliferação e viabilidade celular de diferentes linhagens tumorais. As células foram incubadas com várias concentrações dos compostos e após 24, 48 e 72 h foi realizada a coloração com o azul de tripano para verificar a possível redução do número de células. Para todas as linhagens testadas (A549, U937, K562, Jurkat e Raji) os dois compostos foram capazes de reduzir, de forma significativa, o número de células, após 48h de tratamento, nas maiores concentrações testadas (50 e 100 nM) (Figura 2). Já na menor concentração testada, a CON foi mais efetiva em reduzir o número de células, quando comparada à DGX após 48h. A DGX (10 nM) foi capaz de reduzir, significativamente, somente o número de células A549, em relação ao controle. Por sua vez, a CON (10 nM) reduziu, significativamente, o número de células U937, Raji e A549.

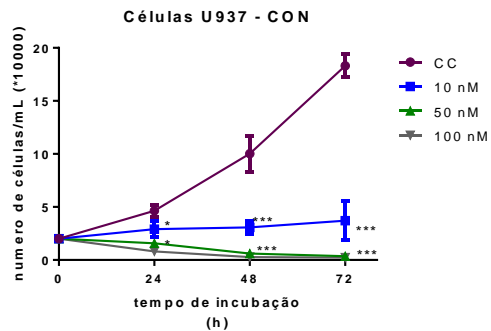
Figura 2. Efeito da DGX e CON na proliferação de linhagens tumorais.



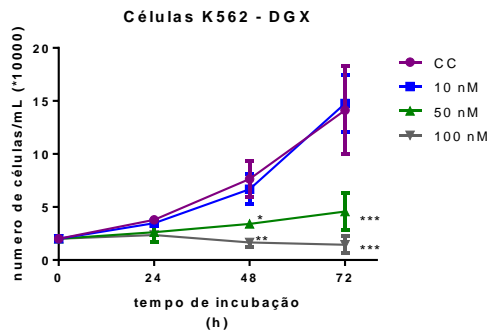
E



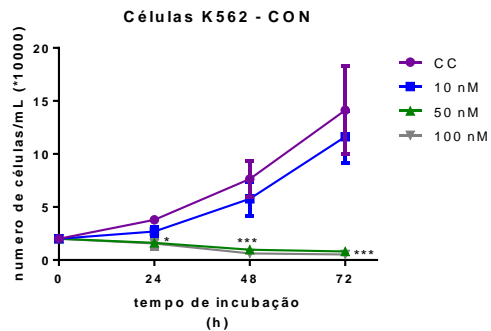
F

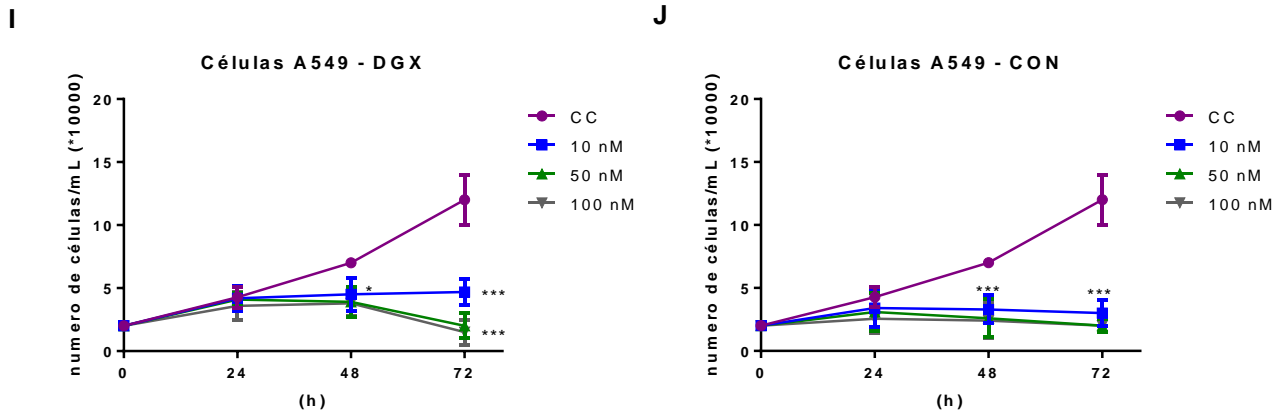


G



H





As células foram tratadas por 24, 48 e 72 h com DGX e CON coletadas e coradas com o corante marcador da integridade celular azul de tripano. Os dados representam a média \pm DP do número de células viáveis de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (ANOVA seguido do post teste de Dunnett) indicam diferenças estatísticas significativas, quando comparadas com os controles não tratados para cada tempo experimental.

A integridade da membrana celular é bem conhecida como um indicador de viabilidade celular. Assim, os efeitos da DGX e CON no rompimento da membrana plasmática foram investigados, em diferentes linhagens celulares tumorais, já que esse é um indicativo de morte celular. Os dados foram expressos em número de células viáveis até 72 h após o tratamento com os compostos, quando comparados com os controles não tratados e em porcentagens de células viáveis na população.

Para todas as células testadas, tratadas com DGX ou CON na concentração de 10 nM, não foi possível observar um aumento da permeabilidade da membrana, mesmo após 72 h de experimento (Figura 3A-J). Isto correu, especialmente, no caso da DGX, em células A549, quando houve bloqueio da proliferação celular (Figura 2J), mas não ocorreu redução do número de células, em comparação à densidade celular, no tempo zero.

No entanto, à 10 nM a proliferação celular foi afetada, principalmente, pela CON, que não apresentou redução significativa apenas na proliferação das células K562 (Figura 2H).

Para as células Jurkat, foi possível observar que a DGX reduziu a proliferação celular, a 50 e 100 nM, após 48h, assim como aumentou a porcentagem de células permeáveis ao azul de tripano, 100 nM, após 48 e 72 h (Figura 3A). Já para a CON, nas primeiras 24h, foi possível observar uma redução do número de células a 50 nM (Figura 2B). Esse efeito foi acompanhado de um aumento significativo da porcentagem de células azul de tripano positivas, a 50 e 100 nM, após 48h, sendo que na concentração de 100 nM, esse efeito já foi observado nas primeiras 24h (Figura 3B).

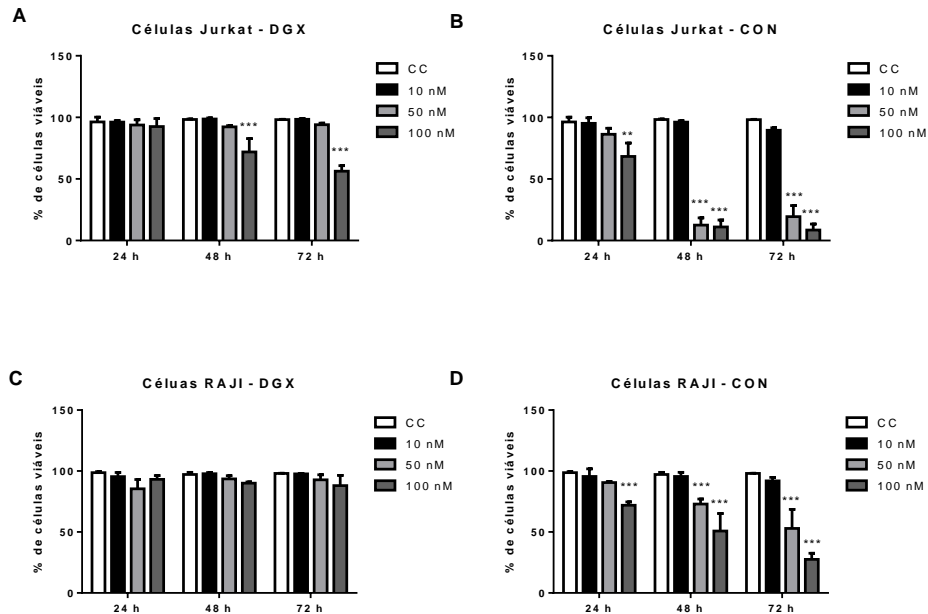
Para as células Raji, o efeito da DGX não afetou a viabilidade das células (Figura 3C), porém reduziu a proliferação das mesmas, em 48h, nas concentrações de 50 e 100 nM (Figura 2C).

Nas células U937, foi observada uma redução da proliferação celular, nas primeiras 24 h, tanto para a DGX (50 nM) quanto para a CON (10nM) (Figura 2E). Além disso, a viabilidade dessas células foi afetada também nas primeiras 24 h pela CON (100 nM), seguida de um aumento da porcentagem de células azul de tripano positivas concentração e tempo-dependentes. Para a DGX, o efeito foi tempo-dependente, na concentração de 10 nM (Figura 3E).

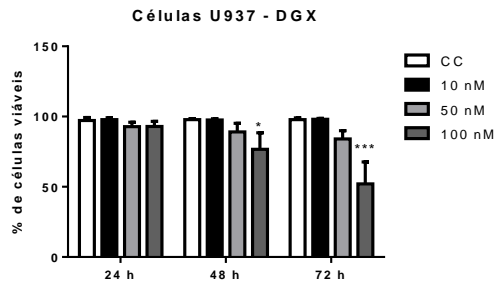
A análise da proliferação de células, na presença da DGX e da CON, em células A549, revelou que esses compostos são capazes de afetar a proliferação celular, geralmente, em concentrações inferiores às requeridas para induzir morte celular (Figura 2I-J e Figura 3I-J). Esses

resultados estão de acordo com os resultados encontrados para outros cardenolídeos (MIJATOVIC et al., 2007; JUNCKER, 2011) e pode-se considerar que esse potencial citostático pode também implicar na determinação do efeito citotóxico.

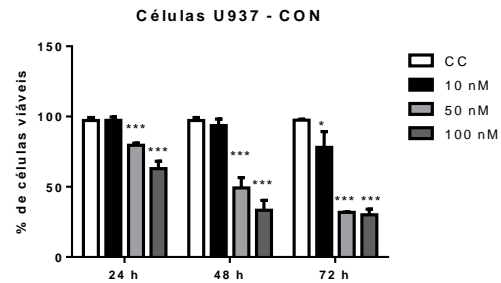
Na concentração de 10 nM, após 48 h de tratamento, a CON apresentou uma taxa de regressão de aproximadamente 50% da proliferação celular, para células A549, U937 e Raji. Para a DGX, foi possível observar uma redução significativa da proliferação celular a 10 nM, somente em células A549, após 48h.

Figura 3. Efeito da DGX e CON na viabilidade de células tumorais.

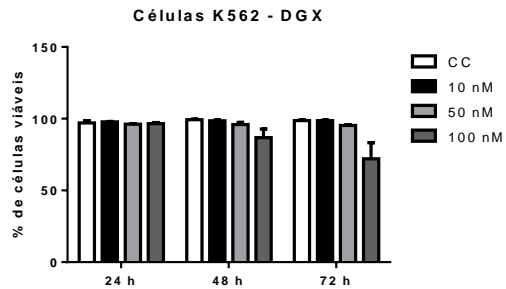
E



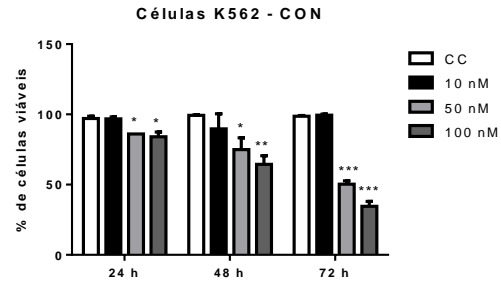
F

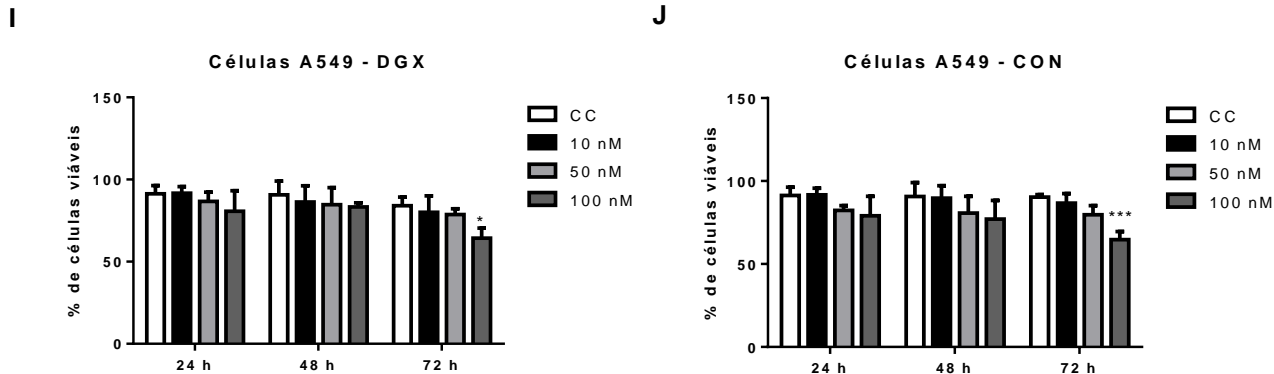


G



H





As células foram tratadas por 24, 48 e 72 h com DGX e CON coletadas e coradas com o corante marcador da integridade celular azul de tripano. Os dados representam a média \pm DP da porcentagem de células viáveis de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (ANOVA seguido do post-teste de Dunnett) indicam diferenças estatísticas significativas, quando comparadas com os controles não tratados para cada tempo experimental.

Nos próximos itens serão apresentadas as diferentes estratégias experimentais utilizadas para elucidar os mecanismos de morte celular causadas pelos cardenolídeos em estudo, nas células A549. Para isso, foram utilizadas duas concentrações desses compostos (10 e 100 nM), visto que o comportamento diferenciado dos cardenolídeos, dependendo da concentração usada é uma característica conhecida dos mesmos (JUNCKER et al., 2011).

3.3 Efeitos da DGX e CON na formação de colônias, em células A549

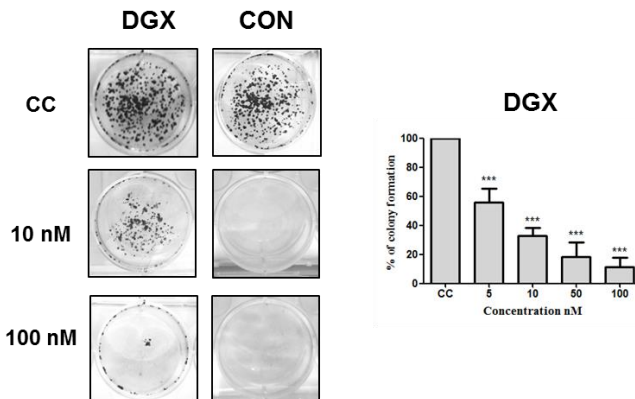
O ensaio de sobrevivência da célula clonogênica determina a capacidade da mesma proliferar indefinidamente, retendo assim sua capacidade de reprodução, de modo a formar uma grande colônia de células ou um clone. Esta célula é, então, considerada clonogênica. Uma curva de sobrevivência celular, por conseguinte, é definida como uma relação entre a concentração do agente utilizado para a produção de um efeito e a habilidade de uma fração de células se manter e reproduzir. Embora os ensaios de sobrevivência de células clonogênicas tenham sido inicialmente descritos para estudar os efeitos da radiação sobre as células, o que desempenhou um papel essencial na radiologia oncológica, eles são agora amplamente utilizados para examinar os efeitos de compostos com aplicações potenciais na quimioterapia (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005).

Vários mecanismos têm sido descritos para explicar a morte celular; no entanto, a perda da capacidade de reprodução e proliferação é a característica mais comum. Assim, uma célula que mantém a sua capacidade de sintetizar proteínas e DNA, através de uma ou duas mitoses, mas não é capaz de se dividir e produzir um grande número de células, é considerada morta. Isto é muito frequentemente referido como perda de “integridade reprodutora” ou “morte de reprodução”. Por outro lado, uma célula que não é reprodutivamente morta e detém a capacidade de se dividir e proliferar indefinidamente pode produzir um grande número de clones ou uma grande colônia de células e é chamada de “clonogênica” (MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005), conforme já explicado acima.

Na Figura 4 pode ser observado o efeito da DGX na redução da formação de colônias, em células A549. Na concentração de 5 nM, foi possível observar uma redução de aproximadamente 30% na formação das colônias, enquanto que a 100 nM ocorreu uma redução de aproximadamente 85% ($p < 0,0001$).

Para a CON (Figura 4) não foi possível calcular a porcentagem de redução da formação de colônias, pois o referido composto, na concentração de 5 nM, inibiu 100% tal efeito. Esta diferença de comportamento entre os dois cardenólídeos já foi observada nos ensaios anteriores e tudo indica que a CON é mais potente do que a DGX.

Figura 4. Efeitos da DGX e CON na formação de colônias.



Células A549 foram tratadas por 24 h, lavadas com PBS, receberam meio fresco e cresceram por 10 dias. As colônias das células A549 foram medidas pela coloração com cristal violeta. Os dados representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$ (ANOVA seguido do post teste de Dunnett), quando comparados com os controles não tratados.

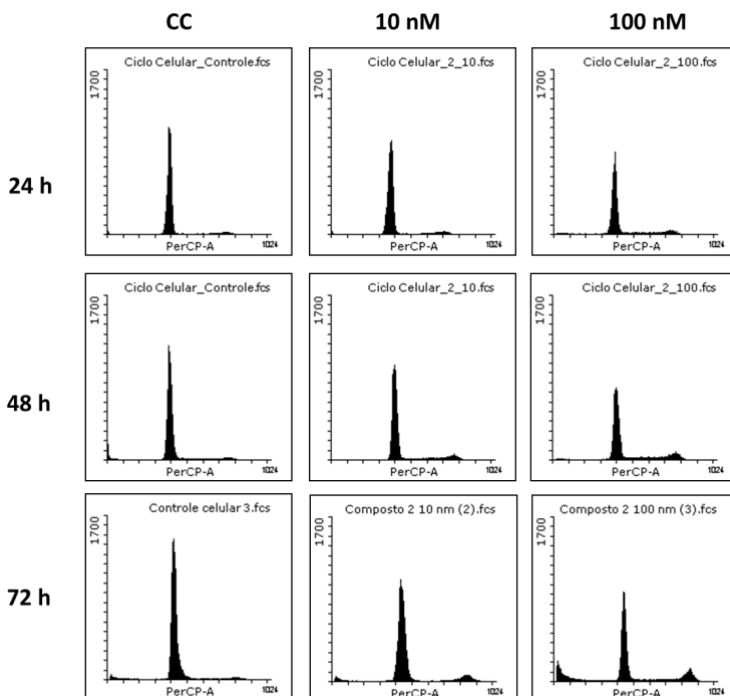
3.4 Efeitos da DGX e CON no ciclo celular, por citometria de fluxo

A divisão celular consiste de dois processos consecutivos, principalmente caracterizados pela replicação do DNA e segregação de cromossomas em duas células diferentes. Originalmente, a divisão celular foi dividida em dois estágios: mitose (M), que é o processo de divisão nuclear, e interfase, o intervalo entre duas fases M. Os estágios da mitose incluem a prófase, metáfase e telófase. Através de microscopia, por exemplo, pode-se observar que as células em interfase simplesmente crescem em tamanho, mas outras técnicas revelaram que a interfase inclui as fases G1, S, e G2. A replicação do DNA ocorre em um ponto específico na interfase chamada fase S, que é precedida pela fase chamada de G1 durante a qual as células se preparam para sintetizar o DNA, e seguir para a fase G2, durante a qual as células se preparam

para a mitose. As fases G1, S, G2 e M são as subdivisões tradicionais do padrão do ciclo celular. As células em G1 podem, antes de realizarem a replicação do DNA, entrar em repouso em um estágio chamado fase G0. As células em G0 indicam células que não estão crescendo e nem proliferando (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

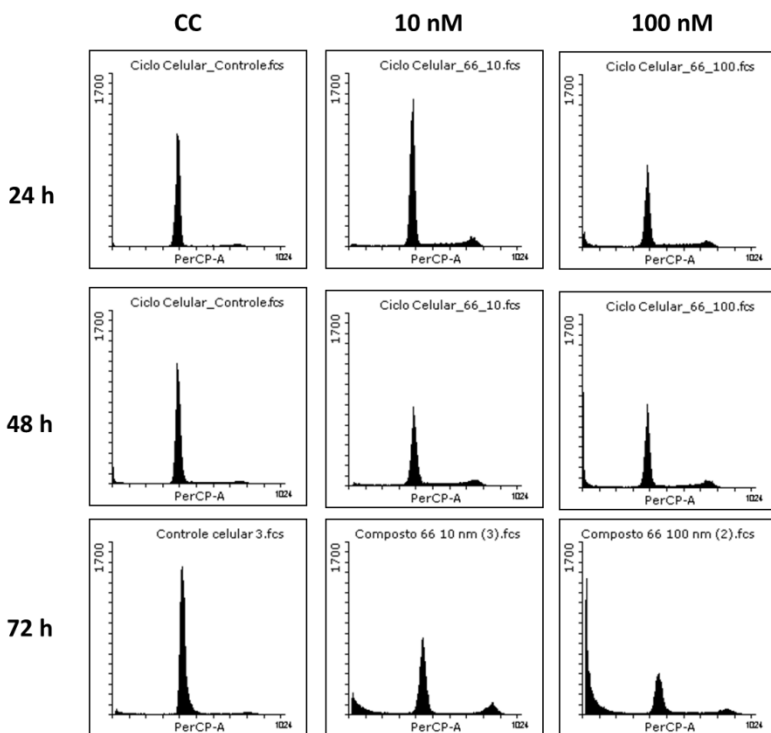
Tendo em vista a citotoxicidade apresentada pelos cardenolídeos testados, os efeitos dos mesmos na progressão do ciclo das células A549 foram investigados. Após o período de tratamento de 24 h, as células foram marcadas com iodeto de propídeo (IP), já que este fluoróforo intercala nos pares de bases da dupla fita de DNA, e resulta em uma intensidade de fluorescência diretamente proporcional ao conteúdo de DNA celular. Os histogramas gerados relacionam o conteúdo de DNA com o número de eventos celulares e podem ser observados na Figuras 5 e 6, quando as células foram tratadas com a DGX e com a CON, respectivamente.

Figura 5. Histogramas da determinação do conteúdo de DNA em células A549.



As células foram incubadas por 24, 48 e 72 h sem tratamento (controle celular) ou tratadas com a DGX, nas concentrações de 10 e 100 nM. Posteriormente, as células foram coletadas e marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. Cada histograma é representativo de dois experimentos.

Figura 6. Histogramas da determinação do conteúdo de DNA em células A549.

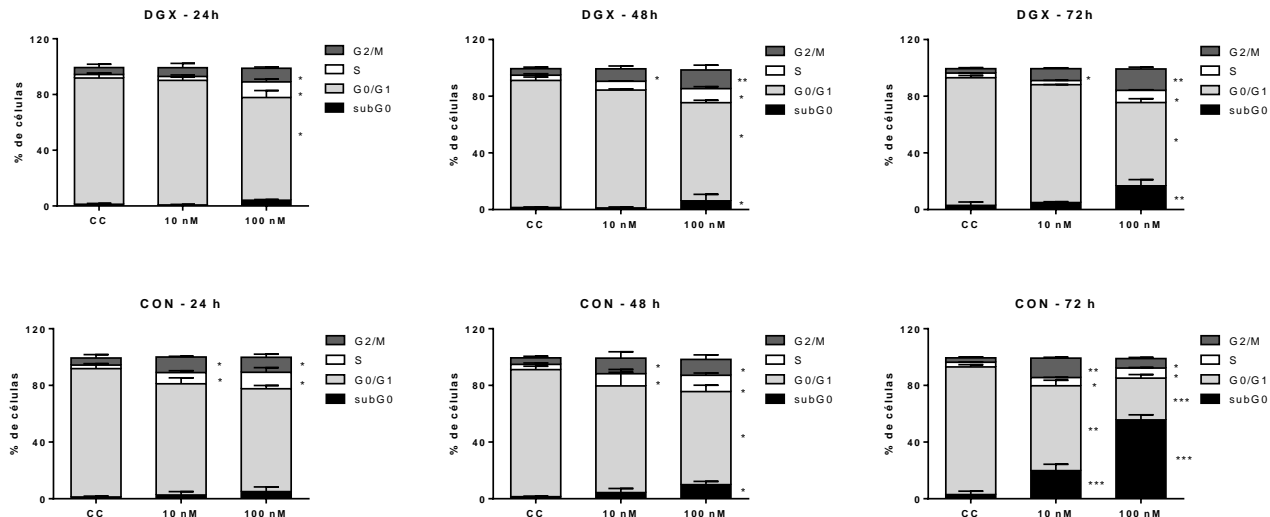


As células foram incubadas por 24, 48 e 72 h sem tratamento (controle celular) ou tratadas com a CON, nas concentrações de 10 e 100 nM. Posteriormente, as células foram coletadas e marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. Cada histograma é representativo de dois experimentos.

Como demonstrado na Figura 7, após 24 h de tratamento com a DGX, a 100 nM, ocorreu bloqueio do ciclo celular na fase G2/M. Na concentração de 10 nM, o estado geral da população celular permaneceu praticamente inalterado após 24h. Após 48 e 72h, foi possível observar um aumento significativo de células na fase G2/M. Na concentração de 100 nM, foi possível observar um efeito tempo- dependente, já que na

subG0 e na fase G2/M houve aumento do número de células. Com a CON, observou-se aumento do número das células, nas fases S e G2/M. Após 72 h, a 100 nM, observou-se que mais de 40% da população celular se encontrava na fase subG0.

Figura 7. Determinação do conteúdo de DNA nas células A549.



As células foram incubadas por 24, 48 ou 72 h sem tratamento (CC= controle celular) ou tratadas com DGX e CON, nas concentrações de 10 e 100 nM. Posteriormente, as células foram coletadas e marcadas com iodeto de propídeo e analisadas por citometria de fluxo. As barras representam a média \pm DP de dois experimentos independentes. Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significantes, sendo * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ (ANOVA, post teste de Dunnett).

Muitas publicações documentam os efeitos dos cardenolídeos na progressão do ciclo celular, um evento que pode preceder o aparecimento da morte (ver revisão de CERELLA; DICATO; DIEDERICH, 2013), e foi observado que esses compostos acumulam-se, principalmente, na fase G2/M (FENG et al., 2010), como também foi constatado neste trabalho para a DGX e a CON. Embora menos relatado, o acúmulo na fase S também já foi descrito (XU et al., 2011). Em outro estudo, o efeito citotóxico não foi acompanhado por um acúmulo específico em qualquer fase do ciclo celular (JUNCKER et al., 2011). Com relação ao estudo realizado com outros cardenolídeos para avaliar seus efeitos na progressão do ciclo, também em células A549, Wang e colaboradores (2012) avaliaram a digoxina e a ouabaína, sendo que nenhuma delas provocou alterações significativas nas fases G1, S e G2/M, com relação aos controles não tratados, embora os autores tenham relatado um ligeiro aumento da porcentagem de células na fase G2/M.

Os resultados obtidos neste trabalho com a DGX sugerem que o bloqueio do ciclo celular não representa um efeito de ação direta, pois tanto os resultados obtidos com outros cardenolídeos, como por exemplo, UNBS1450 (JUNCKER et al., 2011) e ouabaína (TAILLER et al., 2012), como os aqui obtidos, não indicaram o surgimento de alterações significativas no ciclo celular, após 18-24 h de tratamento.

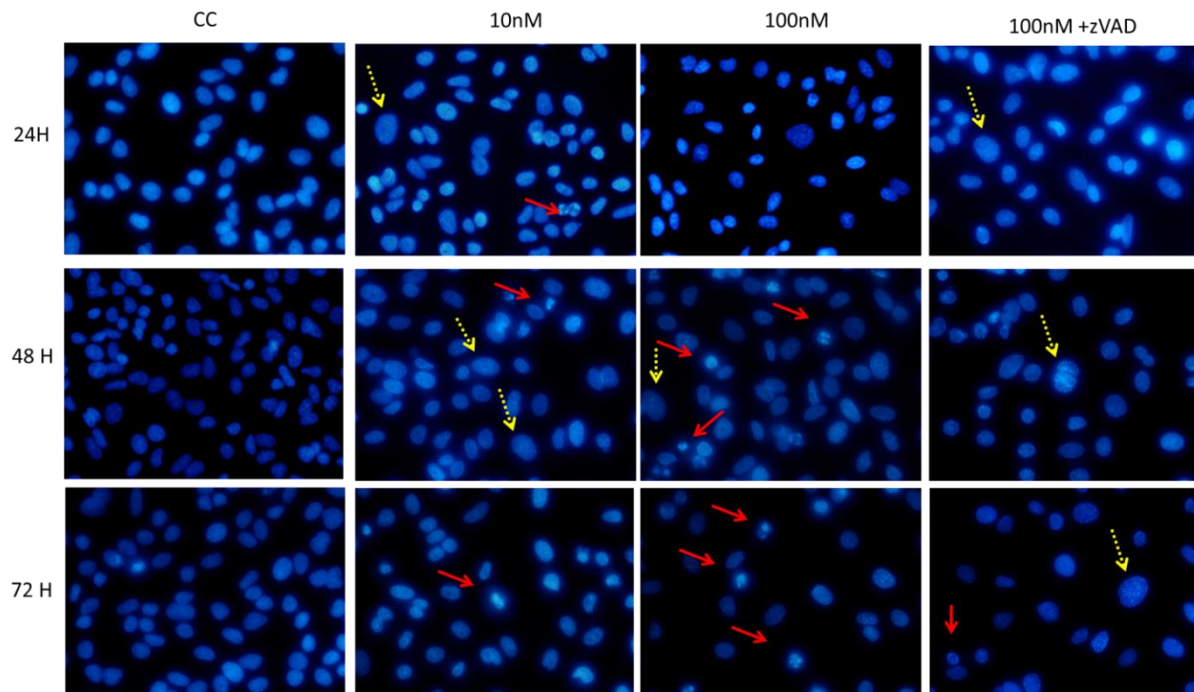
3.5 Identificação das alterações morfológicas nucleares causadas pela DGX e CON

As alterações na morfologia nuclear ocorrem em situações fisiológicas, como durante a mitose, e em diversos processos associados à morte celular. Na apoptose, por exemplo, tais modificações incluem a condensação da cromatina, e fragmentação do DNA, seguida de rompimento nuclear. Na senescência pode ser observado aumento no tamanho dos núcleos. Em outras diversas condições, tais como estresse físico e químico, defeitos na ativação ou inativação do ponto de verificação do ciclo celular, ou presença de agentes que afetam a dinâmica dos microtúbulos ou a remodelação da cromatina. Também pode ser observado aumento das irregularidades nucleares (FILIPPI-CHIELA et al., 2012, HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013).

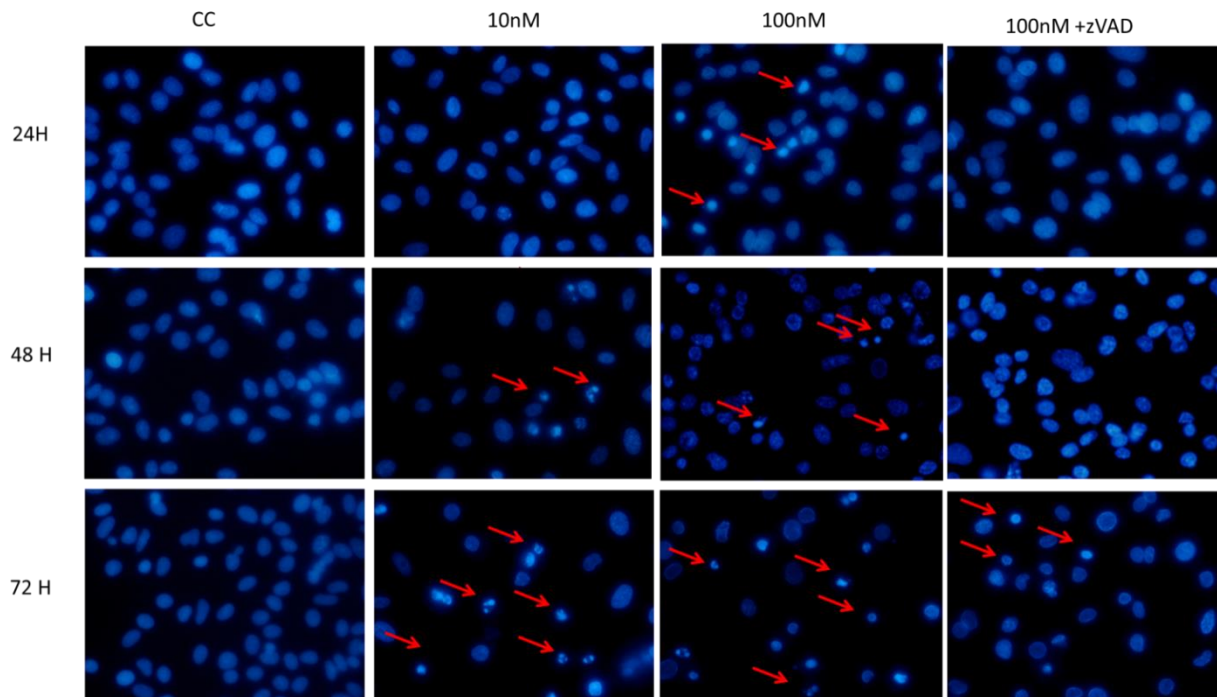
Para melhor caracterizar os efeitos dos cardenolídeos DGX e CON na morfologia nuclear foram obtidas imagens dos núcleos, com o corante Hoechst, por microscopia de fluorescência, utilizando uma ferramenta de análise de imagens dos núcleos. A avaliação consistiu em verificar o tamanho e as irregularidades dos núcleos das células

aderentes em cultura. A partir de diversas medidas, um índice de irregularidade nuclear (em inglês, *Nuclear Irregularity Index* NII) foi criado. Núcleos normais foram usados para definir os parâmetros para um determinado tipo de célula (FILIPPI-CHIELA et al., 2012).

Nas Figuras 8 e 9 podem ser observados os núcleos das células A549, tratadas com os compostos em estudo, por 24, 48 e 72 h, a 10 e 100 nM, além do pré-tratamento com zVAD, na maior concentração testada. Na Figura 8, constam os resultados obtidos em células tratadas com a DGX, e pode-se observar os núcleos picnóticos e fragmentados, principalmente, a 100 nM, após 72 h (indicados pelas setas vermelhas); porém, também foram visualizados núcleos maiores e regulares, principalmente, nas concentrações de 10 nM e 100nM, quando as células foram pré-tratadas com o inibidor de caspases zVAD (indicados pelas setas amarelas pontilhadas). Na Figura 9 são apresentados os núcleos após o tratamento com a CON, e pode-se constatar que houve um aumento gradativo e concentração-dependente no número de núcleos picnóticos. Quando as células foram pré-tratadas com zVAD, foi possível observar uma proteção parcial desse efeito.

Figura 8. Efeitos da DGX na morfologia do núcleo de células A549

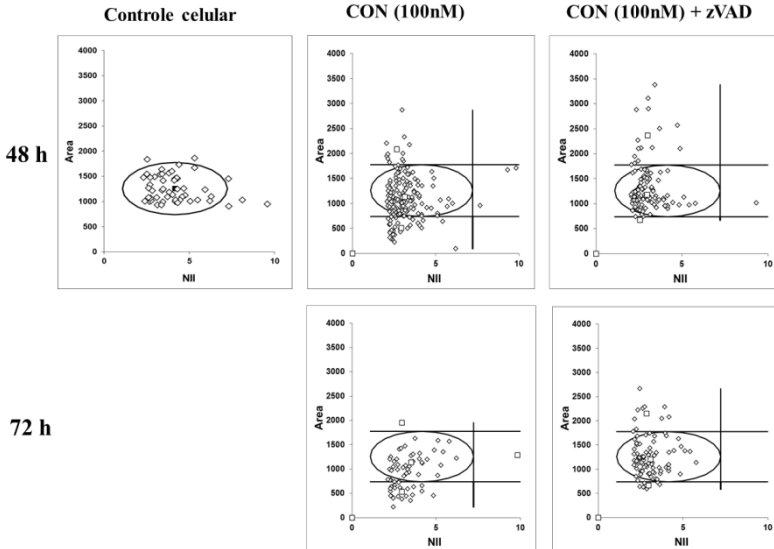
As imagens obtidas por microscopia de fluorescência das células A549 tratadas por 24, 48 e 72 h com DGX e coradas com Hoechst 33342. Aumento de 400 X.

Figura 9. Efeitos da CON na morfologia do núcleo de células A549.

As imagens obtidas por microscopia de fluorescência das células A549 tratadas por 24, 48 e 72 h com CON e coradas com Hoechst 33342. Aumento de 400 X.

De forma ilustrativa, também são apresentados os gráficos de área X índice de irregularidade (Figura 10), sendo que os núcleos normais para as células A549 apresentam-se dentro da área circular no gráfico. Os núcleos menores e regulares ficam abaixo dessa região circular e os núcleos maiores e regulares ficam acima dessa região circular

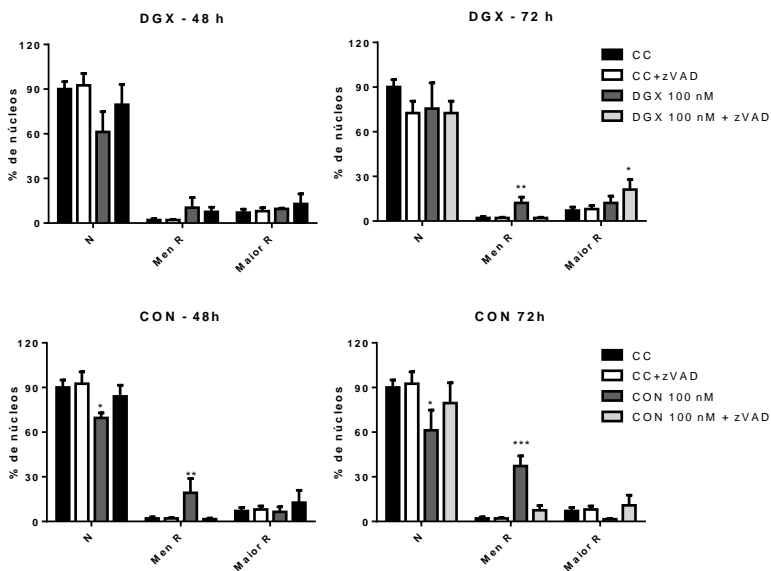
Figura 10. Análise da área e índice de irregularidade nuclear das células A549 tratadas com CON.



Os gráficos foram obtidos pela análise morfométrica dos núcleos das células A549 tratadas por 48 e 72 h com CON e inibidor de caspases zVAD.

Os núcleos das células A549 tratadas com DGX e CON, após 48 e 72h, a 100 nM, foram quantificados e os resultados estão apresentados na Figura 11.

Figura 11. Análise morfométrica dos núcleos das células A549 corados com o corante Hoechst 33342, sob tratamento com DGX e CON (100 nM).



As células foram pré-tratadas com zVAD e incubadas por 48 e 72 h. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes. Os símbolos indicam diferenças estatisticamente significantes, sendo * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$ (ANOVA, post teste Dunnett).

Com base nas imagens apresentadas nas Figuras 8 e 9, foi possível observar que a CON provocou um aumento da porcentagem de núcleos menores e regulares, característicos de células em apoptose. Após 48 h, $19,3 \pm 9,0$ % deles estavam em apoptose e esse percentual aumentou para $37,3 \pm 6,8$ %, após 72h. Importante ressaltar que o inibidor de caspases zVAD foi capaz de proteger significativamente essas alterações morfológicas nucleares, sugerindo morte celular apoptótica. Para a DGX (100 nM), somente após 72 h, foram observadas alterações significativas, em comparação com os controles. A porcentagem de núcleos em apoptose foi de $12,2 \pm 4,5$ %. Quando tratadas concomitantemente com zVAD, esse percentual foi reduzido para $2,1 \pm 0,4$ % e ocorreu um aumento significativo no número de núcleos

maiores e regulares, reconhecidos durante a senescência. A presença de núcleos característicos de células em senescência foi observado, principalmente, quando as células foram tratadas com a DGX, na concentração de 10 nM, em todos os tempos experimentais (~ 20%) e quando co-tratadas com zVAD.

3.6 Avaliação da indução de morte celular apoptótica ou necrótica pela DGX e CON, em células A549, por citometria de fluxo

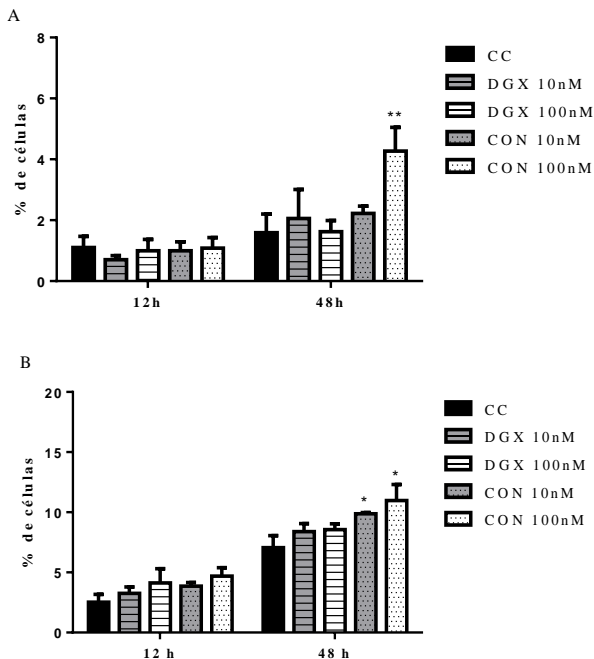
Para auxiliar na determinação do tipo de morte celular provocada pelos cardenólídeos em estudo, foi usado o kit FITC-Anexina V, que determina quantitativamente a porcentagem de células em uma população, que podem sofrer apoptose. Este comportamento se deve a propriedade que as células têm de perder a assimetria de membrana quando estão próximas de sofrer apoptose. Nessa fase, o fosfolípido fosfatidilserina (PS) é deslocado indicando as células que devem ser fagocitadas pelo sistema imunológico. A anexina V é uma proteína recombinante, que se liga a fosfatidilserina e interage forte e especificamente com resíduos deste fosfolípido de membrana, através de suas cargas negativas, em presença de cálcio (HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013). O iodeto de propídeo (IP) é um padrão usado para distinguir células viáveis das não viáveis. Células viáveis excluem o IP da membrana, enquanto que a membrana de células mortas ou danificadas pode ser penetrada pelo IP. Células que são positivas para FITC-Anexina V e negativas para IP estão em estágio inicial de apoptose. Células que são positivas para FITC-Anexina V e IP estão em estágio final de apoptose, em necrose ou estão completamente mortas. Células que são negativas para FITC-Anexina V e IP estão viáveis ou não sofreram alterações na membrana celular.

Como pode ser visualizado na Figura 12, o tratamento com os cardenólídeos em estudo não resultou em um aumento significativo de células em apoptose, quando comparado ao controle não tratado por 12 h. O mesmo comportamento foi observado após 48 h de tratamento para a DGX. Para a CON, ocorreu um aumento das células em apoptose inicial e tardia em torno de 17%.

O fármaco usado como indutor de apoptose, a camptotecina (5 μ M) apresentou $18,57 \pm 2,5\%$ e $19,72 \pm 2,3\%$ de células apoptóticas, em 12 e 48 h, respectivamente (dados não mostrados). Da mesma forma, o controle positivo para a necrose (ciclos de congelamento e descongelamento consecutivos da população de células) mostrou a

eficiência do método pela ligação do IP ao DNA fragmentado das células necróticas, representando 65 a 99% da população celular.

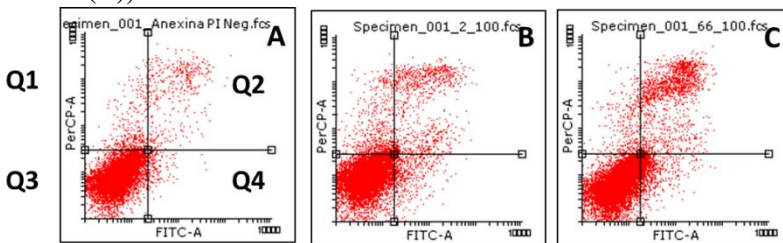
Figura 12. Avaliação do tipo de morte celular, através da marcação com Anexina V-FITC e Iodeto de propídeo (IP)



As células foram incubadas por 12 h e 48 h sem tratamento (controle negativo) ou tratadas com os compostos DGX e CON, nas concentrações de 10 e 100 nM. Posteriormente, as células foram coletadas e marcadas com os fluoróforos Anexina V-FITC e IP e analisadas por citometria de fluxo. Os gráficos representam em (A) as porcentagens de células apoptóticas, e em (B) as porcentagens de células em apoptose tardia e/ou necrose. As barras representam a média \pm DP de três experimentos independentes.

A título ilustrativo, a Figura 13 apresenta os *dot-plots* dos compostos DGX e CON, na maior concentração testada, após 48 h

Figura 13. As células foram incubadas por 48 h sem tratamento (controle negativo) (A) ou tratadas com a DGX 100 nM (B) e CON 100 nM (C),



Q1 - células mortas (Anexina V-, IP+); Q2 - células em estágio de apoptose tardia e necróticas (Anexina V+, IP+); Q3 - células não apoptóticas ou viáveis (Anexina V-, IP-); Q4 - células em estágios iniciais de apoptose (Anexina V+, IP-).

Com base nos resultados apresentados nos itens 3.5 a 3.6, que foram obtidos através de ensaios frequentemente recomendados para definir o processo de morte apoptótica de uma célula (HENRY; HOLLVILLE; MARTIN, 2013) pode-se concluir que os compostos DGX e CON induziram apoptose em células A549, em baixas proporções, até mesmo nas maiores concentrações e tempos experimentais testados.

Em virtude dos achados, até o momento, e da possibilidade estar ocorrendo indução de outro tipo de morte celular programada, a do tipo II, já apresentado por outros cardenolídeos (MIJATOVIC et al., 2006; NEWMAN et al., 2007; WANG et al., 2012), os tópicos 3.7 e 3.8 apresentam os resultados obtidos, quando da avaliação da potencial morte celular autofágica causada por esses compostos, assim como foi apresentado no Capítulo 3 para outro cardenolídeo estudado, o glucoevatomonosídeo (GEV).

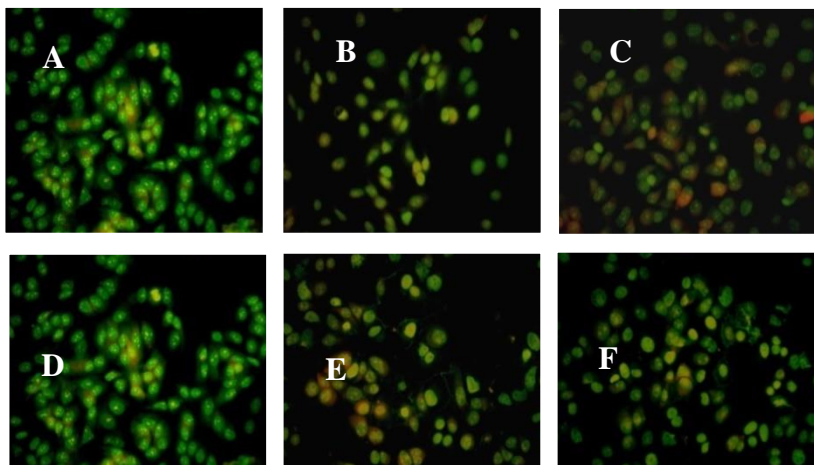
3.7 Avaliação da indução de morte celular autofágica pela DGX e CON, em células A549, por citometria de fluxo

A autofagia é um processo catabólico conservado, que envolve o sequestro de organelas e proteínas de longa vida no citoplasma, dentro de uma única organela, o autofagossoma. Os autofagossomas por sua vez maturam e fundem-se com o lisossoma. Os componentes englobados, bem como a membrana interna do autofagossoma são

degradados por hidrolases lisossômicas. No autofagolisossoma, as organelas vesiculares ácidas (em inglês, *Acidic Vesicular Organelles* - AVOs) podem ser marcadas com um corante fluorogênico acidotrópico, tal como o laranja de acridina, para marcar esses compartimentos (BARTH; GLICK; MACLEOD, 2010; CHEN; AZAD; GIBSON, 2010).

Na Figura 14 pode-se visualizar as AVOs, decorrentes do tratamento com os compostos DGX e CON, coradas com laranja de acridina. Com auxílio de um microscópio de fluorescência, as células foram fotografadas nos filtros verde (células) e vermelho (compartimentos ácidos), seguido da sobreposição das imagens para reconhecimento desses compartimentos.

Para a DGX (100 nM) e para a CON (10 nM), foi possível observar as maiores porcentagens de vacúolos ácidos, em relação aos demais tratamentos. Similarmente, outros cardenolídeos (digoxina e ouabaína) sugerem morte celular através da indução de autofagia, conforme demonstrado também pela coloração com laranja de acridina, em células A549 (WANG et al., 2012).



(A) e (D) Controle celular por 48 h, (B) DGX 10 nM e (C) DGX 100 nM, (E) CON 10 nM e (F) CON 100 nM. As imagens foram obtidas com microscópio de fluorescência, com aumento de 400x.

Após visualização das células, as AVOs foram quantificadas em citometria de fluxo por 24 e 48 h (Figura 15). Após 24 h de tratamento, apenas para a DGX, a 100 nM, foram detectadas diferenças estatísticas significativas na formação de AVOs, com relação ao controle ($p < 0,005$). Após 48 h de tratamento, o mesmo comportamento foi observado para a CON, que apesar de apresentar um ligeiro aumento na formação de AVOs, esses valores não foram estatisticamente diferentes, em relação ao controle não tratado ($p > 0,005$). Para a DGX foi possível observar um aumento na produção de AVOs, nas duas concentrações testadas.

Dessa forma, os resultados obtidos das análises qualitativas e quantitativas realizadas com o corante laranja de acridina sugerem que a DGX aumentou, de forma significativa, o número de AVOs, em células A549.

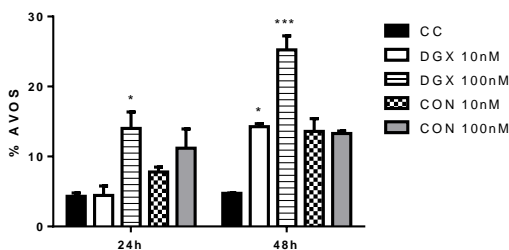


Figura 15. Percentuais de formação de organelas vesiculares acídicas (AVOs) em células A549, coradas com laranja de acridina e analisadas por citometria de fluxo, após 24 e 48h de tratamento com a DGX e a CON. Os valores representam a média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0,005$ e *** $p < 0,0001$ (ANOVA, post teste de Dunnett), quando comparados aos controles não tratados.

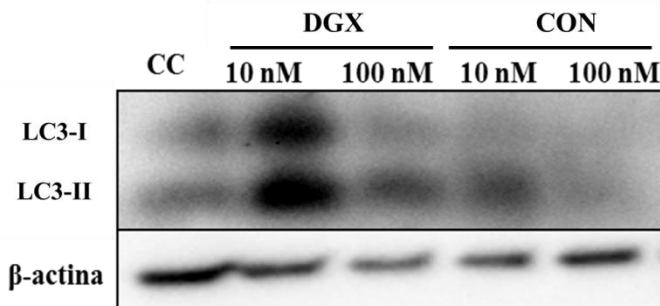
3.8 Avaliação dos efeitos da DGX e CON na expressão da proteína LC3B, envolvida na morte celular autofágica, em células A549

Durante a autofagia, a proteína LC3 passa da sua forma solúvel para uma forma ligada à membrana (LC3-II) e é incorporada no interior da membrana do autofagossoma. A existência da forma LC3-II pode ser detectada bioquimicamente ou microscopicamente. Porém, quando os autofagossomas se fundem com os lisossomas, a proteína LC3, assim

como a carga autofágica formada, são eliminadas pela ação das hidrolases ácidas (BARTH; GLICK; MACLEOD, 2010).

Como observado na Figura 16, a DGX (10 nM) apresentou maior formação de LC3B-I, bem como alta conversão e acúmulo da proteína LC3B-II. Ainda, foi observado para este composto (100 nM) e também para a CON (10 nM) um aumento da formação de LC3B-II, porém não foram detectadas diferenças significativas com relação aos controles não tratados (48 h de *starvation*, jejum). No entanto, a CON, a 100 nM, parece inibir o processo de autofagia, já que ocorreu uma redução das proteínas LC3B-I e LC3B-II.

Figura 16. Análise de Western blott da proteína LC3B (conversão e acumulação de LC3B-I em LC3B-II) nas células A549, tratadas com o veículo (DMSO = CC, controle celular) ou com a digitoxigenina monodigitoxosídeo (DGX) ou a convalotoxina (CON), nas concentrações de 10 e 100 nM, por 48 h



. A imagem é representativa de dois experimentos independentes.

Estudos realizados com outros cardenolídeos mostraram a conversão de LC3B-I em LC3B-II, entre 6 e 72 h de tratamento, em diferentes linhagens celulares. A digoxina e a ouabaína induziram autofagia em células de câncer de pulmão (A549 e H460), em 24 h (WANG et al., 2012), enquanto que o cardenolídeo UNBS1450 e a oleandrina induziram autofagia, em células de glioblastoma e células pancreáticas, em 24 e 72 h (LEFRANC, 2008; NEWMAN et al., 2007).

Os resultados apresentados e discutidos nos itens 3.7 e 3.8 sugerem que a DGX, na concentração de 10 nM, em células A549, aumentou o fluxo autofágico. Porém, as diferenças observadas na concentração de 100 nM, nos experimentos utilizando o corante acidotrópico laranja de acridina e o marcador LC3B, não indicam necessariamente resultados

controversos, já que a proteína LC3B-II é degradada quando ocorre a degradação do autofagossoma. Assim, quando o corante acidotrópico intensifica a coloração vermelha devido à alta formação de agregados nos autofagolisossomas, provavelmente as proteínas LC3B-II formadas já estarão sendo degradadas. Para confirmação, faz-se necessário utilizar um inibidor da fusão dos autofagossomas com lisossomas (ex. cloroquina), reduzindo assim a degradação desse marcador, em diferentes tempos experimentais, que será realizado oportunamente.

Para a CON, não foi possível identificar se a autofagia tem um papel importante na morte celular causada por esse composto, após 48 h de experimento, nas concentrações testadas. Seus efeitos citotóxicos já foram avaliados para as linhagens de cânceres de cólon e reto (FELTH et al., 2009) e de pulmão (linhagem NIH-H460) (LIU et al., 2013), porém esses estudos não avaliaram o tipo de morte que o composto induzia nessas linhagens. No entanto, em células HELA, foi demonstrado um aumento do número de vacúolos autofágicos, concomitantemente com morte celular apoptótica (YANG et al., 2014). Não obstante, neste trabalho, ainda não ficou claro qual o papel da autofagia nos efeitos causados pela DGX nas células A549.

REFERÊNCIAS

BARTH, S.; GLICK, D.; MACLEOD, K. F. Autophagy : assays and artifacts. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. 2, p. 117-124, 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976.

CALDERÓN-MONTAÑO, J.M. et al. Evaluating the cancer therapeutic potential of cardiac glycosides. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

CERELLA, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. **Mitochondrion**, v. 13, n. 3, p. 225-234, 2013.

CHEN, Y.; AZAD, M. B.; GIBSON, S. B. Methods for detecting autophagy and determining autophagy-induced cell death. **Canadian**

Journal of Physiology and Pharmacology, v. 88, n. 3, p. 285-295, 2010.

FELTH, J. et al. J. Cytotoxic effects of cardiac glycosides in colon cancer cells, alone and in combination with standard chemotherapeutic drugs. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 11, p. 1969-1974, 2009.

FENG, B. et al. 2'-epi-2'-O-Acetylthevetin B extracted from seeds of *Cerbera manghas* L. induces cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 183, n. 1, p. 142-153, 2010.

FILIPPI-CHIELA, Eduardo C. et al. Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e4522, 2012.

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

GRAZIANI-BOWERING, G. M.; GRAHAM, J. M.; FILION, L. G. A quick, easy and inexpensive method for the isolation of human peripheral blood monocytes. **Journal of immunological methods**, v. 207, n. 2, p. 157-168, 1997.

HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 7, p. 345-356, 2013.

HENRY, C. M.; HOLLVILLE, E.; MARTIN, S. J. Measuring apoptosis by microscopy and flow cytometry. **Methods**, v. 61, n. 2, p. 90-97, 2013.

JUNCKER, T. et al. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, n. 1, p. 13-23, 2011.

KNEZEVIC, M.; JERAS, M. Simple and cost-effective isolation of monocytes from buffy coats. **Journal of immunological methods**, v. 278, n. 1-2, p. 283-292, 2003.

LEFRANC, F. La pompe à sodium pourrait représenter une nouvelle cible pour le traitement des glioblastomes. **Bulletin du Cancer**, v. 95, n. 3, p. 271-281, 2008.

LIU, Q. et al. Antiproliferative Cardiac Glycosides from the Latex of *Antiaris toxicaria*. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1771–1780, 2013.

LORIN, S. et al. Autophagy regulation and its role in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 23, n. 5, p. 361-379, 2013.

MIJATOVIC, T. et al. Cardenolide-induced lysosomal membrane permeabilization demonstrates therapeutic benefits in experimental human non-small cell lung cancers. **Neoplasia**, v. 8, n. 5, p. 402-412, 2006.

MIJATOVIC, T. et al. Cardiotoxic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1776, n. 1, p. 32-57, 2007.

MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic cell survival assay. **Methods in Molecular Medicine**, v. 110, p. 21-8, 2005.

NEWMAN, R. et al. Autophagic cell death of human pancreatic tumor cells mediated by oleandrin, a lipid-soluble cardiac glycoside. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, n. 4, p. 354-364, 2007.

PAGLIN, S. et al. A novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles advances in brief a novel response of cancer cells to radiation involves autophagy and formation of acidic vesicles 1. **Cancer Research**, v. 61, p. 439-444, 2001.

RICCARDI, C.; NICOLETTI, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. New York: W. H. Freeman: 1995. p. 887

TAILLER, M. et al. Antineoplastic activity of ouabain and pyrithione zinc in acute myeloid leukemia. **Oncogene**, v. 31, n. 30, p. 3536–3546, 26 jul. 2012.

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

WANG, Y. et al. Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through regulation of dual signaling pathways. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 44, n. 11, p. 1813-1824, 2012.

XU, Z.-W. et al. Cardiotonic steroids attenuate ERK phosphorylation and generate cell cycle arrest to block human hepatoma cell growth. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, n. 3-5, p. 181-1891, 2011.

YANG, S. Y. et al. Convallatoxin, a dual inducer of autophagy and apoptosis, inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. **PloS one**, v. 9, n. 3, p. e91094, 2014.

CAPÍTULO 6:
ESTUDO *IN VITRO* DA AÇÃO
ANTIMETASTÁTICA DOS
CARDENOLÍDEOS DIGITOXIGENINA
MONODIGITOXOSÍDEO E
CONVALOTOXINA EM CÉLULAS A549

CAPÍTULO 6 - Estudo *in vitro* da ação antimetastática dos cardenolídeos digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina em células A549

Neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos através dos ensaios de inibição da migração e invasão das células A549, quando tratadas com a digitoxigenina monodigitoxosídeo e a convalotoxina que foram apresentados no Capítulo V desta tese (*Estudo dos efeitos citotóxicos dos cardenolídeos digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina em células tumorais*). Esses resultados estão compilados na forma de artigo aceito para publicação no *Journal of Natural Products Research*.

SHORT COMMUNICATION

Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by the cardenolides digitoxigenin monodigitoxoside and convallatoxin in human lung cancer cell line

Naira F.Z. Schneider^a, Fabiana C. Geller^a, Lara Persich^a, Lucas L. Marostica^a, Rodrigo M. Pádua^b, Wolfgang Kreis^c, Fernão C. Braga^b and Cláudia M.O. Simões^d

^aDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil; ^bFaculdade de Farmácia, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ^cDepartment of Biology, Friedrich-Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg, Germany

ABSTRACT

Cardiac glycosides consist of a large family of naturally derived compounds that are clinically used to treat congestive heart failure, and also present anticancer properties. In this study, the cytotoxic effects of two cardenolides, digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) and convallatoxin (CON) were screened in four human tumour cell lines. Both compounds showed anti-proliferative effects in all tumour cells, at nanomolar concentrations. Since the human lung cancer cell line A549 was the most sensitive, we investigated the anti-proliferative, anti-migratory and anti-invasive effects of these cardenolides. DGX and CON reduced A549 cell migration, being able to reduce more than 90% of cell invasion. Their effects on the expression of key regulators of metastatic mechanism showed decreased levels of MMP-2, MMP-9 and p-FAK. Both compounds also presented low toxicity for healthy cells. Finally, this work provides the first insights into the effects of these cardenolides on key steps of lung cancer metastasis.

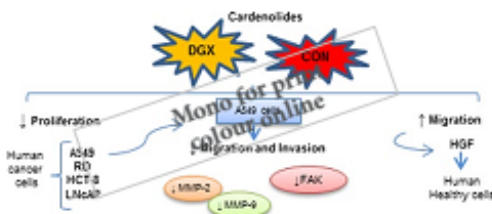
ARTICLE HISTORY

Received 17 March 2015
Accepted 20 May 2015

KEYWORDS

Convallatoxin; digitoxigenin monodigitoxoside; proliferation; migration; invasion; A549 cell line; lung cancer

GRAPHICAL ABSTRACT



Short communication

Natural Product Research

Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by the cardenolides digitoxigenin monodigitoxoside and convallatoxin in human lung cancer cell line

Naira F. Z. Schneider¹, Fabiana C. Geller¹, Lara Persich¹, Lucas L. Marostica¹, Rodrigo M. Pádua², Wolfgang Kreis³, Fernão C. Braga² and Cláudia M. O. Simões^{1,*}

Affiliation

¹ *Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil*

² *Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

³ *Department of Biology, Friedrich-Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg, Germany*

*Corresponding author: Cláudia M. O. Simões, Mailing address: Departamento de Ciências Farmacêuticas, CIF, CCS, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus Universitário Trindade, Florianópolis, 88040-900, SC, Brazil. Tel.: +55-48-3721-5207; fax: +55-48-3721-9258.

E-mail address: claudia.simoes@ufsc.br (Cláudia M. O. Simões).

Abstract

Cardiac glycosides consist of a large family of naturally derived compounds that are clinically used to treat congestive heart failure, and also present anticancer properties. In this study, the cytotoxic effects of two cardenolides, digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) and convallatoxin (CON) were screened in four human tumor cell lines. Both compounds showed anti-proliferative effects in all tumor cells, at nanomolar concentrations. Since the human lung cancer cell line A549 was the most sensitive, we investigated the anti-proliferative, anti-migratory and anti-invasive effects of these cardenolides. DGX and CON reduced A549 cell migration, being able to reduce more than 90% of cell invasion. Their effects on the expression of key regulators of metastatic mechanism showed decreased levels of MMP-2, MMP-9 and p-FAK. Both compounds also presented low toxicity for healthy cells. Finally, this work provides the first insights into the effects of these cardenolides on key steps of lung cancer metastasis.

Keywords: convallatoxin, digitoxigenin monodigitoxoside, proliferation, migration, invasion, A549 cell line, lung cancer.

1. Introduction

Natural compounds play a dominant role in the development of anticancer and anti-infectious agents, and several plant-derived compounds are currently employed in cancer therapy (Unnati et al., 2013). Cardiac glycosides belong to a class of natural products that includes cardenolides and bufadenolides, which are clinically used for the treatment of congestive heart failure and atrial arrhythmia (Rahimtoola and Tak, 1996). In the last few decades, several studies have demonstrated other biological activities for cardenolides, including anticancer (Cerella et al., 2013; Wang et al., 2012) and antiviral effects (Bertol et al., 2011; Su et al., 2008). Based on these findings, extensive experiments have been conducted to determine the action mechanism of cardenolides, demonstrating the ability of these compounds to inhibit cell growth, arrest cell cycle, and induce apoptosis and/or autophagy in different cancer cells (Cerella et al., 2013; Juncker et al., 2011; Wang et al., 2012). Additionally, cardenolides such as ouabain have been reported to reduce the migration and invasive characteristics of some cancer cell lines (Pongrakhananon et al., 2013).

However, only a few studies have evaluated the migration and invasion potential of cardenolides by *in vitro* assays (Klausmeyer et al., 2009, Pongrakhananon et al., 2013, Yang et al., 2014). Thus, further studies

are needed, to elucidate their metastatic potential. In this study, we evaluated digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) and convallatoxin (CON) (Figure S1A and S1B, respectively) for their cytotoxic activity, and the anti-migratory and anti-invasive effects on non-small cell lung cancer (NSCLC, A549 cells).

2. Results and discussion

2.1 DGX and CON reduced cancer cells proliferation

In a preliminary screening, DGX and CON showed more effectiveness in reducing the proliferation of two cancer cell lines among 64 cardenolides, especially in A549 cells (Carvalho, 2012). DGX, found in *Digitalis lanata* Ehrh. (Braga et al., 1996) was evaluated for the first time in this study. CON, isolated from *Convallaria majalis* L., has been reported to possess cytotoxic effects against several cancer cells (Juncker et al., 2011; Yang et al., 2014). In order to investigate the cytotoxic effects of these compounds in other cancer cells, human non-small cell lung cancer (NSCLC, A549), human rhabdomyosarcoma RD, human colon carcinoma HCT-8, and human prostate carcinoma LNCaP cell lines were selected. The antiproliferative/cytotoxic activity of these compounds on normal human gingival fibroblasts (HGF) was also tested. Cancer cells were treated with various concentrations (160, 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 and 1.25 nM) of DGX and CON for 48 h, and stained with SRB (Tables S1 and S2). The results revealed that these compounds and the positive control paclitaxel, inhibited the proliferation of these four cell lines at nanomolar concentrations. In A549 cell line the most sensitive cell line for both compounds, the IC₅₀ values were 12.34 and 11.03 nM, respectively, after 48 h. CON was identified as a potent cardenolide in different reports, with IC₅₀ values at nM concentrations, as herein observed. Its anti-proliferative effects were evaluated in colorectal cancer (HT29, HCT116 and CC20) (Felth et al., 2009), non-small cell lung cancer (NIH-H460 and A549) (Liu et al., 2013b; Yang et al., 2014), glioblastoma (U87MG), cervical cancer (HeLa), liver carcinoma (HepG2), and fibrosarcoma (HT1080) (Yang et al., 2014) human cell lines. It was also shown that CON caused a dual induction of apoptosis and autophagy in HeLa cells (Yang et al., 2014). The anticancer agents used as positive controls (paclitaxel, cisplatin and irinotecan) showed a high impact on A549 cell proliferation, with IC₅₀ values ranging from 0.194 to 8.77 μM after 48 h of treatment (Table S1) Nevertheless, CON and DGX showed the strongest effects compared to the positive controls, with IC₅₀ values at nM concentrations.

2.2 DGX and CON reduced migration of A549 cells

The treatment of tumor metastasis is one of the aims of cancer therapy, particularly in lung cancer, due to the high degree of metastasis, resulting in high mortality rates (Ferlay et al., 2010; Perlikos et al., 2013). This hallmarks of cancer involve complex processes; two of them, cell migration and invasion, require various coordinated cellular activities. To mimic this complex phenomenon, several assays have been developed. One of these, the scratch assay - performed in this study - is used to assess directional cell migration or proliferation *in vitro* (Menon et al., 2009).

In order to exclude the growth inhibitory effect of DGX and CON on cell migration, A549 cells were exposed to 0, 10, and 50 nM of these compounds. The highest tested concentration of both compounds (50 nM) did not affect the growth of cancer cells for 16 h (data not shown). As shown in Figure S2A and B, DGX and CON at 10 nM reduced the migration and/or proliferation of A549 cells by $65\pm 6.26\%$ and $63.40\pm 7.35\%$, respectively, after 16 h. The cardenolide percentages of inhibition were similar to that of paclitaxel at 100 nM, a drug commonly used for the chemotherapy of NSCLC, but no significant statistical differences were detected. Paclitaxel at 10 nM was not able to reduce cell migration.

2.3 DGX and CON reduced invasion of A549 cells

In cell invasion, tumor cells must cross the extracellular matrix (ECM) layer and penetrate the underlying stroma in order to invade the tissue and generate distant metastasis. For this approach, the invasion Transwell[®] assay uses the Matrigel[®] layer to mimic the ECM layer, thereby allowing the cell invasive matrix degradation, similarly to what occurs *in vivo* (Valster et al., 2005). As shown in Figure S2C, DGX and CON demonstrated anti-invasive potential. After 48 h, the highest concentration tested (50 nM) of DGX and CON were able to reduce more than 90% of cell invasion. Interestingly, CON showed similar results at the two tested concentrations, being able to reduce cell invasion by approximately 97% at 10 nM. These results are similar to that of paclitaxel, which showed $85.4\pm 8.6\%$ of inhibition at 100 nM. At the lowest concentration, DGX showed no anti-invasive profile. A recent study revealed that CON was able to inhibit invasion in HeLa cells (Yang et al., 2014). CON also reduced vascular endothelial growth factor (VEGF) levels in human glioma cells (Klausmeyer et al., 2009), and inhibited VEGF in healthy cells (HUVEC) (Yang et al., 2014).

2.4 DGX and CON downregulated FAK, MMP-2 and MMP-9 in A549 cells

Western blotting was used to verify the expression of key regulators that play an important role in cell migration, invasion and angiogenesis. Both cardenolides decreased the levels of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) and p-FAK in A549 cells, especially at 50 nM after 48 h of treatment (Figure S2D). In addition, CON elicited a strong downregulation of MMP-2 expression. These findings suggest that the inhibition of cell invasion and migration by these cardenolides could be mediated by a reduction of the proteolytic action of MMPs. In addition, MMP-2 has been reported to be a more sensitive marker of progression, metastasis and survival of non-small cell lung cancer, than MMP-9 (Duffy et al., 2008; Gupta and Massague, 2006). Nevertheless, p-FAK was also downregulated by CON and DGX. In line with these results, ouabain, another well-known cardiac glycoside, inhibited cancer cell migratory behavior by suppression of FAK activation (Pongrakhananon et al., 2013) and decreased MMP-2 and MMP-9 expression (Liu et al., 2013a) on lung cancer cells.

2.5 DGX and CON induced migration in HGF cells

Concerning the specificity of these compounds for cancer cells, their effects on HGF cells were further investigated. The SRB assay was previously performed in order to assess the concentrations of these compounds that were not cytotoxic for HGF. The IC_{50} values obtained after 16 h of treatment with DGX and CON were higher than 250 μ M. After

48 h, it was possible to calculate the IC_{50} for both compounds, at a range of μ M (Table S3). In this experiment, the selective indices (SI), which correspond to the ratio of CC_{50} and IC_{50} obtained with HGF and A549 cells, respectively, were also calculated for both compounds. It was found that DGX is 2,325 times more selective to A549 cells than to HGF, whereas CON was less selective than DGX to cancer cells with a SI of 442. According to the obtained IC_{50} values, the non-cytotoxic concentrations of both compounds were used for wound healing migration assay. Figure S3A and B shows that CON and DGX were able to induce cell migration in HGF at 10 and 50 nM. At the highest tested concentration (50 nM), DGX and CON induced 26 and 44% of cell migration and/or proliferation, respectively. CON showed pro-migration effects at a concentration-dependent manner ($p < 0.05$). Furthermore, PDGF was used as positive control, and the number of cells in the wound area increased by 55% after 16 h of incubation (Figure S3B).

PDGF is characterized as a stimulating agent of cell proliferation at different concentrations, as described by Fronza et al (2009).

3. Conclusion

In summary, these cardenolides showed anti-proliferative activity, decreasing migration and invasion of lung cancer cells by suppressing MMP-2, MMP-9 and p-FAK expression. Taken together, our findings suggest that DGX and CON might work as anticancer agents to decrease metastasis in lung cancer. Further *in vivo* studies of cancer metastasis are required, to confirm these effects and to clarify the mechanism of action, as well as to define the doses required to reduce lung cancer progression.

Supplementary material

Supplementary material relating to this article is available online, together with Tables S1-S3, and Figure S1-S3.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Ariadne Cristiane Cabral da Cruz for providing the human gingival fibroblasts. This work was supported by funding from the Brazilian agency CNPq/MCTI [grants number 472544/2013-6 and 490057/2011-0] as well as from the Marie Curie Foundation, IRSES, and the European Community [grant number 2011-IRSES- 295251]. The Brazilian authors thank CNPq and CAPES (MEC) for their research fellowships.

Conflict of interest

The Authors declare that there are no actual or potential conflicts of interest in this work.

REFERENCES

- Bertol JW, Rigotto C, de Padua RM, Kreis W, Barardi CR, Braga FC, Simoes CM. 2011. Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. *Antiviral Res* 92:73-80.
- Braga FC, Kreis W, Braga de Oliveira A. 1996. Isolation of cardenolides from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata* by rotation locular counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 756:287-291.
- Carvalho A. 2012. Avaliação dos efeitos citotóxicos de cardenolídeos em células tumorais.[dissertation]. Florianopolis (BR): Federal University of Santa Catarina. p. 126.
- Cerella C, Dicato M, Diederich M. 2013. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. *Mitochondrion* 13:225-234.

- Duffy MJ, McGowan PM, Gallagher WM. 2008. Cancer invasion and metastasis: changing views. *J Pathol* 214:283-293.
- Felth J, Rickardson L, Rosen J, Wickstrom M, Fryknas M, Lindskog M, Bohlin L, Gullbo J. 2009. Cytotoxic effects of cardiac glycosides in colon cancer cells, alone and in combination with standard chemotherapeutic drugs. *J Nat Prod* 72:1969-1974.
- Ferlay J, Shin H, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin D. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127:2893-2917.
- Fronza M, Heinzmann B, Hamburger M, Laufer S, Merfort I. 2009. Determination of the wound healing effect of *Calendula* extracts using the scratch assay with 3T3 fibroblasts. *J Ethnopharmacol* 126:463-467.
- Gupta GP, Massague J. 2006. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127:679-695.
- Juncker T, Cerella C, Teiten MH, Morceau F, Schumacher M, Ghelfi J, Gaascht F, Schnekenburger M, Henry E, Dicato M, Diederich M. 2011. UNBS1450, a steroid cardiac glycoside inducing apoptotic cell death in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 81:13-23.
- Klausmeyer P, Zhou Q, Scudiero DA, Uranchimeg B, Melillo G, Cardellina JH, Shoemaker RH, Chang CJ, McCloud TG. 2009. Cytotoxic and HIF-1 α inhibitory compounds from *Crossosoma bigelovii*. *J Nat Prod* 72:805-812.
- Liu N, Li Y, Su S, Wang N, Wang H, Li J. 2013a. Inhibition of cell migration by ouabain in the A549 human lung cancer cell line. *Oncol Let* 6:475-479.
- Liu Q, Tang JS, Hu MJ, Liu J, Chen HF, Gao H, Wang GH, Li SL, Hao XJ, Yao XS. 2013b. Antiproliferative cardiac glycosides from the latex of *Antiaris toxicaria*. *J Nat Prod* 76:1771-1780.
- Menon MB, Ronkina N, Schwermann J, Kotlyarov A, Gaestel M. 2009. Fluorescence-based quantitative scratch wound healing assay demonstrating the role of MAPKAPK-2/3 in fibroblast migration. *Cell Motil Cytoskeleton* 66:1041-1047.
- Perlikos F, Harrington KJ, Syrigos KN. 2013. Key molecular mechanisms in lung cancer invasion and metastasis: a comprehensive review. *Critical reviews in oncology/hematology* 87:1-11.
- Pongrakhananon V, Chunchacha P, Chanvorachote P. 2013. Ouabain suppresses the migratory behavior of lung cancer cells. *PloS one* 8:e68623.
- Rahimtoola SH, Tak T. 1996. The use of digitalis in heart failure. *Curr Probl Cardiol* 21:781-853.

Su CT, Hsu JT, Hsieh HP, Lin PH, Chen TC, Kao CL, Lee CN, Chang SY. 2008. Anti-HSV activity of digitoxin and its possible mechanisms. *Antiviral Res* 79:62-70.

Unnati S, Ripal S, Sanjeev A, Niyati A. 2013. Novel anticancer agents from plant sources. *Chinese J Nat Med* 11:16-23.

Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M. 2005. Cell migration and invasion assays. *Methods* 37:208-215.

Wang Y, Qiu Q, Shen JJ, Li DD, Jiang XJ, Si SY, Shao RG, Wang Z. 2012. Cardiac glycosides induce autophagy in human non-small cell lung cancer cells through regulation of dual signaling pathways. *Int J Biochem Cell B* 44:1813-1824.

Yang SY, Kim NH, Cho YS, Lee H, Kwon HJ. 2014. Convallatoxin, a dual inducer of autophagy and apoptosis, inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *PloS one* 9:e91094.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Inhibition of cell proliferation, invasion and migration by the cardenolides digitoxigenin monodigitoxoside and convallatoxin in human lung cancer cell line

Naira F. Z. Schneider¹, Fabiana C. Geller¹, Lara Persich¹, Lucas Marostica¹, Rodrigo M. Pádua², Wolfgang Kreis³, Fernão C. Braga² and Cláudia M. O. Simões^{1,*}

Affiliation

¹ *Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil*

² *Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil*

³ *Department of Biology, Friedrich-Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg, Germany*

*Corresponding author: Email adress: claudia.simoes@ufsc.br (Cláudia M. O. Simões).

ABSTRACT

Cardiac glycosides consist of a large family of naturally derived compounds that are clinically used to treat congestive heart failure, and also present

anticancer properties. In this study, the cytotoxic effects of two cardenolides, digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) and convallatoxin (CON) were screened in four human tumor cell lines. Both compounds showed anti-proliferative effects in all tumor cells, at nanomolar concentrations. Since the human lung cancer cell line A549 was the most sensitive, we investigated the anti-proliferative, anti-migratory and anti-invasive effects of these cardenolides. DGX and CON reduced A549 cell migration, being able to reduce more than 90% of cell invasion. Their effects on the expression of key regulators of metastatic mechanism showed decreased levels of MMP-2, MMP-9 and p-FAK. Both compounds also presented low toxicity for healthy cells. Finally, this work provides the first insights into the effects of these cardenolides on key steps of lung cancer metastasis.

Experimental

Cardenolides, anticancer drugs and cell lines

Digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) was isolated from *Digitalis lanata* Ehrh. leaves. In summary, a methanolic extract from *D. lanata* leaves was pre-purified by filtration over activated charcoal. The obtained residue was dissolved in dichloromethane and filtered over a silica gel column. Further elution of this column with a gradient of chloroform and ethyl acetate led to the isolation of DGX (yield = 1.5 % w/w), recovered in the fraction eluted with chloroform / ethyl acetate (3:7). The identification of DGX was accomplished by comparison with an authentic compound, employing TLC and UPLC-MS analyses. The purity of the isolated compound (> 98%) was checked by HPLC-DAD and UPLC-MS data (Braga et al., 1996). Convallatoxin (CON) and the anticancer drugs used as positive controls (irinotecan, cisplatin and paclitaxel) were purchased from Sigma-Aldrich, USA. Human non-small cell lung cancer (NSCLC, A549 cells, ATCC: CCL185) and human rhabdomyosarcoma RD (Adolfo Lutz Institute, SP, Brazil) were grown in Minimal Essential Medium (MEM; Cultilab, Brazil). Human colon carcinoma cells HCT-8 (Texas A&M University System, USA) and human prostate carcinoma cells LNCaP (ATCC: CRL-1740) were grown in RPMI 1640 medium (Gibco, USA). All the cell lines were maintained in medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) at 37°C in a humidified incubator under 5% CO₂/95% air.

Human gingival fibroblasts (HGF), obtained from human gingival primary cell culture (process approved by the Ethics Committee on Human Research, UFSC, authorization number 062, process number

021/09), were grown in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Cultilab) supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine (Cultilab) and 1% nonessential amino acids (Gibco).

Screening for cytotoxic effects

The screening of cell viability was performed by sulforhodamine B assay (SRB) (Vichai and Kirtikara, 2006). Briefly, A549, LNCaP, HCT-8, RD, and HGF cells were cultured in 96-well plates (1×10^4 cells/well), and after 24 h the cells were exposed to DGX and CON at various concentrations and experimental times. A549 and HGF cells were exposed to paclitaxel, irinotecan and cisplatin as positive controls. After incubation, 10% trichloroacetic acid (TCA) was added to each well to fix the cells and then washed and stained with SRB. The protein-bound dye was dissolved in 10 mM Tris-Base [(tris(hydroxymethyl)aminomethane)] solution and optical densities (OD) were read at 510 nm on a spectrophotometer Spectra Max M2 (Molecular Devices, USA). The inhibitory concentration (IC_{50}) of each compound was calculated as the concentration that inhibited cell proliferation of cancerous cells (A549, LNCaP, HCT-8, RD) by 50%, when compared to untreated controls. In order to differentiate the cytotoxic effects for cancerous and non-cancerous cells, the cytotoxic concentration (CC_{50}) was used to calculate the concentration that inhibited cell proliferation of non-cancerous cells (HGF).

A549 cell migration assay

Cell migration was assessed by examining the ability of the cells to move into a cellular space in an *in vitro* wound healing assay known as scratch assay (Valster et al., 2005). Briefly, A549 cells were grown to confluence in 12-well plates with MEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS) and incubated for 24 h and an artificial wound was generated by scratching the cell monolayer. Cells were washed and then incubated in medium, in the absence or presence of DGX and CON (10 and 50 nM) or 0.5% DMSO and paclitaxel (PAC) (10, 100 and 1000 nM) as controls for 16 h. The cells were fixed with paraformaldehyde, stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and subsequently photographed in an inverted fluorescence microscope BX-41 (Olympus, USA). Six representative images from each well of the scratched areas were photographed in order to determine the width of the scratch. The zero scratch well was fixed immediately after the generation of the artificial wound. The quantification of the migration percentages was performed using the free CellC[®] Software (Selinummi et al., 2005).

Healthy human gingival fibroblasts migration assay

This assay was carried out as described above (Section experiments: A549 cell migration assay) to evaluate the selectivity of both cardenolides in healthy cell lines. The fibroblasts were seeded into 12-well plates with DMEM supplemented with 10% FBS and incubated for 24 h. Further, a wound was created by scratching a line and the treatments were added: DGX and CON (10 and 50 nM), 0.5% DMSO and 2 ng/ml of platelet-derived growth factor (PDGF) (Gibco) as controls. The plates were incubated for 16 h, and the cells were fixed, stained, photographed and counted as described above.

A549 cell invasion assay

The assay was conducted using Transwell[®] inserts (8 μ m pore size polycarbonate membrane, Millipore Corporation, Germany) coated with Matrigel[®]. The cells placed in the invasion chambers were rehydrated with MEM, and were seeded in 24-well plates. The lower chamber received MEM without serum, and they were incubated for 24 h to achieve cell confluence. After, in the upper chambers, both cardenolides and DMSO (control) diluted in serum-free medium were added. The basolateral compartments received MEM with 10% FBS (used here as a chemoattractant) and were incubated for 48 h. After this time, non-invading cells were removed and cells that invaded the membrane but do not arrived in the lower compartments were trypsinized and fixed with paraformaldehyde and stained with DAPI. Images were obtained with a fluorescence microscope BX-41 (Olympus) and the quantification was performed using the free CellC[®] Software (Selinummi et al., 2005).

Western blotting analysis

A549 cells were treated with both cardenolides at different concentrations or the vehicle (DMSO) for 24 h and 48 h. Whole cells were lysated and centrifuged at $10,000 \times g$ for 15 min, at 4 °C. Protein concentration was determined by using Bradford assay (kit from Bio-Rad, Hercules, USA). Equivalent amounts of protein were separated on a 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) followed by electron transfer to PVDF membranes (Millipore). After blocking with 5% nonfat milk in PBS, membranes were incubated overnight at 4 °C with the appropriate primary antibodies. After incubation with the corresponding secondary antibodies conjugated to horseradish peroxidase, protein bands were revealed by using Pierce Enhanced Chemiluminescence ECL substrate (Thermo Scientific, USA). Protein bands were quantified using the ChemiDoc MP equipment (Bio-Rad, Hercules, USA). The following antibodies were used: MMP-2, MMP-9, p-FAK and FAK (Cell Signaling Technology, USA). An

antibody against β -actin (Sigma-Aldrich) was used as control for equal loading.

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SD of three or two independent experiments. Statistical analyses were performed by one-way ANOVA followed by Dunnet's post test ($p < 0.05$). GraphPad Prism 5 Software (GraphPad, USA) was used to calculate IC₅₀ values and the confidence intervals.

Table S1: Values of growth inhibition of human non-small cell lung cancer A549 by digitoxigenin monodigitoxoside, convallatoxin and chemotherapy drugs after 24 and 48 h of treatment obtained by sulforhodamine B assay.

Cardenolides	24h	Confidence Interval (95%)	48h	Confidence Interval (95%)
IC₅₀ (nM)				
DGX	67.16	45.04 to 90.1	12.34	9.10 to 16.74
CON	76.23	30.01 to 113.7	11.03	4.80 to 23.44
Positive controls				
IC₅₀ (μM)				
CIS	94.76	43.31 to 207.30	8.77	6.47 to 11.90
IRI	45.89	34.61 to 60.86	3.33	2.49 to 4.47
PAC	0.266	0.097 to 0.320	0.194	0.083 to 0.286

The data represent the mean of three independent experiments and 95% confidence interval. IC₅₀: concentration that inhibits 50% of cell growth of cancerous cells. DGX: digitoxigenin monodigitoxoside; CON: convallatoxin; CIS: cisplatin; IRI: irinotecan; PAC: paclitaxel

Table S2: Values of growth inhibition of different human cancer cell lines by digitoxigenin monodigitoxoside, convallatoxin and paclitaxel after 48 h of treatment obtained by sulforhodamine B assay.

Cell lines	Samples					
	DGX		CON		PAC	
	IC ₅₀ (nM)	Confidence Interval (95%)	IC ₅₀ (nM)	Confidence Interval (95%)	IC ₅₀ (nM)	Confidence Interval (95%)
HCT-8	71.62	59.7 to 85.9	13.71	12.4 to 15.2	20.8	13.5 to 31.9
RD	22.20	14.3 to 34.3	15.83	9.4 to 26.3	46.1	28.3 to 55.4
LNCaP	20.80	17.9 to 24.2	16.84	9.7 to 29.3	10.5	6.3 to 14.7

The data represent the mean of three independent experiments and 95% confidence interval. IC₅₀: concentration that inhibits 50% of cell growth of cancerous cells.

DGX: digitoxigenin monodigitoxoside; CON: convallatoxin; PAC: paclitaxel (used as positive control) HCT-8: human colon carcinoma cell line; RD: human rhabdomyosarcoma cell line; LNCaP: human prostate carcinoma cell line.

Table S3: Values of growth inhibition of healthy human gingival fibroblasts by digitoxigenin monodigitoxoside, convallatoxin and paclitaxel obtained by sulforhodamine B assay.

Samples	CC ₅₀	CC ₅₀	95%	SI
	(μ M)	(μ M)	Confidence Interval	(CC ₅₀ /IC ₅₀)
	16 h	48 h	48 h	48 h
DGX	>250	28.70	16.92 to 48.66	2,325x
CON	>250	4.879	2.381 to 10.23	442x
PAC	>250	>250	-	>2500x

Values represent the mean of three independent experiments; CC₅₀ is the concentration that showed cytotoxic effects in 50% non-malignant HGF cells after 16 and 48 h of treatment; IC₅₀: concentration that inhibits 50% of cell growth in cancerous cells; SI=Selectivity Index: calculated as CC₅₀ HGF cells/IC₅₀ A549 cells, after 48 h of treatment. DGX: digitoxigenin monodigitoxoside; CON: convallatoxin; PAC: paclitaxel (used as positive control).

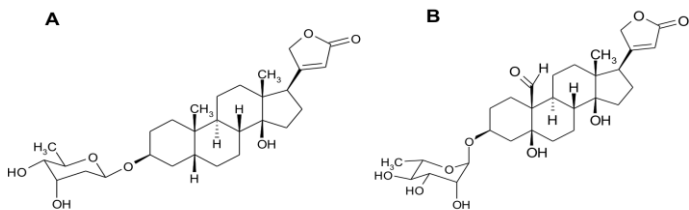


Figure S1. Chemical structures of **(A)** digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) and **(B)** convallatoxin (CON).

Figure S2. Digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) and convallatoxin (CON) inhibited A549 cell migration and invasion. **(A)** Fluorescent microscope images employed for the evaluation of wound healing activity by the scratch assay. Cell migration into the wound was observed in response to an artificial injury. **(B)** Effects of DGX and CON on A549 cell migration after 16 h of incubation. Data are expressed as percentages of cells in the wounded area, when compared to the control DMSO (0.5%). Data represent the mean \pm SD of two independent experiments. * $p < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett's test) indicate statistically significant differences when compared to paclitaxel 100 nM. **(C)** Inhibitory effects of both cardenolides and paclitaxel on A549 cell invasion using Transwell® assay after 48 h of incubation. A549 cells that penetrated through the Matrigel® and went to the lower chambers were stained and photographed under a fluorescent microscope. Data represent the percentages of cells that have invaded the inserts, when compared to the control DMSO (0.5%). Data represent the mean \pm SD of three independent experiments. * $p < 0.05$ indicates statistically significant differences between DGX/CON and paclitaxel treatments (ANOVA followed by Dunnett's test). **(D)** Effects of DGX and CON treatments on MMP-2, MMP-9 and FAK proteins expression. A549 cells were treated with the compounds for 24 and 48 h and the samples were assayed by Western blotting. Expression levels of MMP-2, MMP-9 and p-FAK were quantified by using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Numbers below western blot signal represent quantification of proteins signals using β -actin for normalization of the sample input.

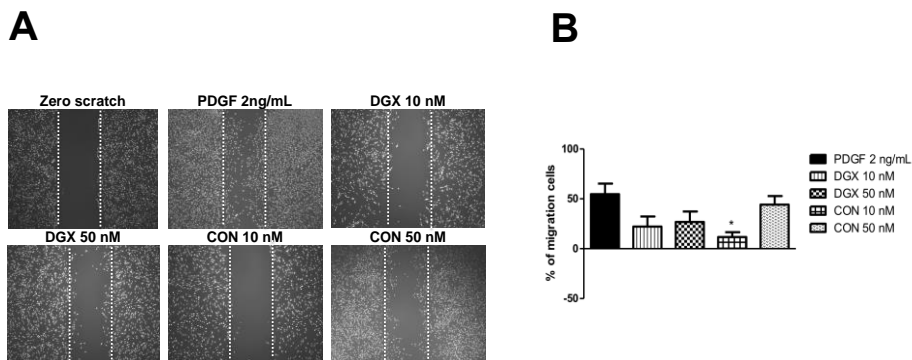


Figure S3. Comparative effects of digitoxigenin monodigitoxoside (DGX) and convallatoxin (CON) in healthy cells (human gingival fibroblasts – HGF) in order to demonstrate selectivity. **(A)** Fluorescent microscope images employed for the evaluation of wound healing activity by the scratch assay, using a confluent monolayer of HGF. Cell migration into the wound was observed in response to an artificial injury. **(B)** Effects of DGX and CON on HGF migration and proliferation using the scratch assay after 16 h of incubation. Data are expressed as percentages of cells in the wounded area when compared to the control DMSO (0.5%). Data represent the mean \pm SD of two independent experiments. * $p < 0.05$ (ANOVA followed by Dunnett's post-test) indicate statistically significant differences when compared to PDGF positive control.

References

- Braga FC, Kreis W, Braga de Oliveira A. 1996. Isolation of cardenolides from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata* by rotation locular counter-current chromatography. *J Chromatogr A* 756:287-291.
- Florento L, Matias R, Tũaño E, Santiago K, Dela Crz F, Tuazon A. (2012) Comparison of Cytotoxic Activity of Anticancer Drugs against Various Human Tumor Cell Lines Using In Vitro Cell-Based Approach. *Int J Biom Sci* 8:76-80.
- Fornelli F, Minervini F, Logrieco A. 2004. Cytotoxicity of fungal metabolites to lepidopteran (*Spodoptera frugiperda*) cell line (SF-9). *J Invert Pat* 85:74-79.
- Selinummi J, Seppala J, Yli-Harja O, Puhakka JA. 2005. Software for quantification of labeled bacteria from digital microscope images by automated image analysis. *BioTechniques* 39:859-863.
- Valster A, Tran NL, Nakada M, Berens ME, Chan AY, Symons M. 2005. Cell migration and invasion assays. *Methods* 37:208-215.
- Vichai V, Kirtikara K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat protoc* 1:1112-1116.

DISCUSSÃO GERAL

Os produtos naturais, obtidos de diferentes fontes, tais como plantas, fungos, organismos marinhos e microorganismos, são fontes de potenciais fármacos com as mais distintas atividades farmacológicas: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitária, anti-inflamatória e antitumoral, apenas para citar algumas. Muitas substâncias naturais são conhecidas por seus efeitos citotóxicos e já são utilizadas na quimioterapia, há muitos anos. Como exemplos, pode-se citar: vinblastina e vincristina, ambas isoladas de *Catharanthus roseus*, camptotecina isolada de *Camptotheca acuminata* (OBERLIE, KROLL, 2004) e paclitaxel de *Taxus brevifolia* (WANI, WALL, 1996).

Neste contexto, o crescente interesse em uma classe de compostos naturais, os glicosídeos cardiotônicos, como potenciais agentes quimioterápicos, provavelmente originou-se dos estudos epidemiológicos realizados por Stenkvis e colaboradores (2001). Eles mostraram que poucos pacientes que estavam sob tratamento com cardenólídeos para insuficiência cardíaca, morreram por causa de câncer. A letalidade do câncer de mama, por exemplo, encontrou-se bastante reduzida (de 34% para 6%) em pacientes sob tratamento com digitálicos (STENKVIST, 2001). Em um contexto semelhante, foi demonstrado que o aparecimento da leucemia foi significativamente menos frequente numa população de pacientes com insuficiência cardíaca submetidos a terapia com glicosídeos cardiotônicos.

Seguindo essa linha, muitos estudos foram realizados desde então e têm demonstrado efeitos antitumorais para estes glicosídeos cardiotônicos (MIJATOVIC et al., 2007; PRASSAS, DIAMANDIS, 2008; THERIEN, BLOSTEIN, 2000). Entre os resultados em destaque, constatou-se que esses compostos são capazes de bloquear a proliferação das células tumorais, principalmente, na fase G2/M do ciclo celular. Weidemann e colaboradores (2005) estabeleceram uma hipótese de que este fato estaria condicionado a ocorrência de alterações, não só no metabolismo de substâncias endógenas, mas também ao nível das interações entre essas e as Na^+/K^+ ATPases (WEIDEMANN et al., 2005), o que foi após confirmado por Mijatovic e colaboradores (MIJATOVIC et al., 2007).

Tendo em vista as crescentes pesquisas realizadas com a estratégia de estudar novas ações farmacológicas para fármacos já em uso clínico sedimentado, no Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC, nos últimos anos, foram dedicados esforços no estudo dos efeitos antivirais, citotóxicos e antitumorais de um grupo de glicosídeos cardíacos

denominados cardenolídeos. Desde então, os efeitos de 65 cardenolídeos já foram avaliados contra o vírus herpéticos dos tipos 1 e 2, sendo que um desses cardenolídeos foi selecionado para avaliação do seu mecanismo anti-herpético, cujos resultados já foram publicados (BERTOL et al., 2011). Considerando os avanços dessa classe de compostos frente a diferentes linhagens tumorais humanas, esses mesmos 65 cardenolídeos foram também avaliados contra duas linhagens tumorais: RD (rabdomiossarcoma) e A549 (câncer de pulmão), tendo sido demonstrado resultados relevantes (CARVALHO, 2012). A partir deste trabalho, três compostos que se destacaram pela sua potente ação citotóxica, em concentrações nanomolares (glucoevatromonosídeo, digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina) foram selecionados para a realização desta tese de doutorado.

Inicialmente, para estes três cardenolídeos, foi realizada a avaliação da atividade antiproliferativa, em outras sete linhagens tumorais, entre elas, células de neuroblastoma (SK-N-AS e SH-SY5Y), de câncer de colón (HT-29), linfoma de Burkitt (Raji), leucemia linfoblástica de células T (Jurkat) e leucemia mieloide (K562 e U937), sendo que os mesmos demonstraram uma potente ação, também em concentrações nanomolares, frente a todas as linhagens testadas, especialmente, as células U937 e A549 (Capítulos II e V). Essa última linhagem foi, então, selecionada para a continuação dos experimentos visando identificar o tipo de morte celular ocorrido, visto que o câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC, células A549) ainda continua a ser um problema de saúde mundial. A desregulação das principais vias de transdução de sinal nesse tipo de câncer, os defeitos na progressão do ciclo celular, e a resistência à apoptose, em grande parte, têm sido atribuídos à proliferação descontrolada observada em células de tumor do pulmão, aumentando a necessidade de se buscar novos agentes, que possam efetivamente induzir as células tumorais à morte celular por outras vias (CHEN et al., 2014).

A digitoxigenina monodigitoxosídeo (DGX) e a convalotoxina (CON) também foram testadas em outras linhagens tumorais, tais como rabdomiossarcoma humano (RD), carcinoma de cólon (HCT-8) e carcinoma de próstata (LNCaP) (Capítulo VI) apresentando resultados promissores. Conclui-se, dessa forma, que os três cardenolídeos testados afetam drasticamente a proliferação tanto em tumores sólidos quanto em linhagens hematopoiéticas.

O glucoevatromonosídeo (GEV) apresentou os resultados mais encorajadores e, por isso, também foi investigado em células U937.

Os cardenólídeos GEV e DGX causaram bloqueio da fase G2/M, em células A549, enquanto que a CON aumentou o número de células em sub G0, alterando várias etapas do ciclo celular. O GEV foi capaz de inibir a expressão de importantes proteínas relacionadas ao ciclo celular, como ciclina B1 e p53. Em células U937, o perfil do GEV foi completamente diferente daquele observado em células A549, causando um efeito, principalmente, na fase sub G0 do ciclo celular.

O capítulo II desta tese mostra os efeitos na morte celular do cardenólídeo GEV, em duas linhagens tumorais. Pode-se destacar que esse cardenólídeo provocou efeitos diferentes nessas linhagens, demonstrando efeitos caspase-dependente e -independente. Em células U937, foi possível observar uma alta porcentagem de morte celular, dependente da clivagem da caspase-3, com aumento de núcleos fragmentados, após tratamento com GEV, mas foi observada uma redução desse número, quando o tratamento foi concomitante com zVAD (inibidor de caspases). A identificação da morte em células A549 se deu pelo aumento do número de núcleos picnóticos e também pela alta permeabilidade da membrana plasmática visualizada pelo método do azul de tripano. Posteriormente, com o intuito de verificar a natureza da morte celular implicada nesse processo, diferentes moduladores de morte celular foram avaliados, e verificou-se que esse processo de morte, muito provavelmente, é independente de caspases, calpaína, RIP-1, PARP e não ocorreu por autofagia (Figura 1).

Entendendo a complexidade dos mecanismos que envolvem a morte celular e as possibilidades de morte desencadeada pelo GEV, algumas probabilidades serão discutidas a seguir.

Embora uma importante ativação de caspases seja frequentemente encontrada na apoptose, o circuito do sistema é muitas vezes complicado. Por exemplo, a ativação das caspases 2 e 8 é geralmente insuficiente para estimular a ativação direta das caspases efetoras de morte celular (caspases 3, 6 e 7), e essa reação requer um passo de amplificação mitocondrial com formação do apoptossoma, dependente do citocromo *c*. Assim, a caspase 8 cliva e ativa proteínas da família Bcl-2, como Bid, a qual catalisa a permeabilização da membrana externa mitocondrial e libera o citocromo *c* (KROEMER, MARTIN, 2005). De fato, a inibição de caspases não necessariamente mantém a viabilidade celular, podendo apresentar alterações morfológicas de morte semelhantes as de vias de morte não apoptóticas.

Seguindo essa linha de raciocínio, o envolvimento da autofagia na morte celular desencadeada pelo GEV foi avaliado e está descrito no capítulo III desta tese. Com base nestes resultados, pode-se afirmar que

não há indícios suficientes para relacionar a morte das células A549 por esse processo. Embora diferentes cardenolídeos, relatados na literatura, tenham demonstrado indução de morte celular autofágica, em células A549, principalmente pelo fato de aumentarem o nível de cálcio intracelular, já que esse íon está intimamente relacionado com o aumento do fluxo autofágico (HUNDESHAGEN et al., 2011).

Também pode ser considerado que as células que, por algum motivo, sofreram inibição da apoptose ou da autofagia não conseguem superar o estresse metabólico e sofrem catástrofe metabólica, morrendo por necrose. O que desencadeia, especificamente, a necrose é desconhecido, mas é altamente provável que esteja relacionado à produção insuficiente de ATP para manter a integridade da membrana plasmática resultante da catástrofe metabólica, e à lise das células (JIN et al., 2007).

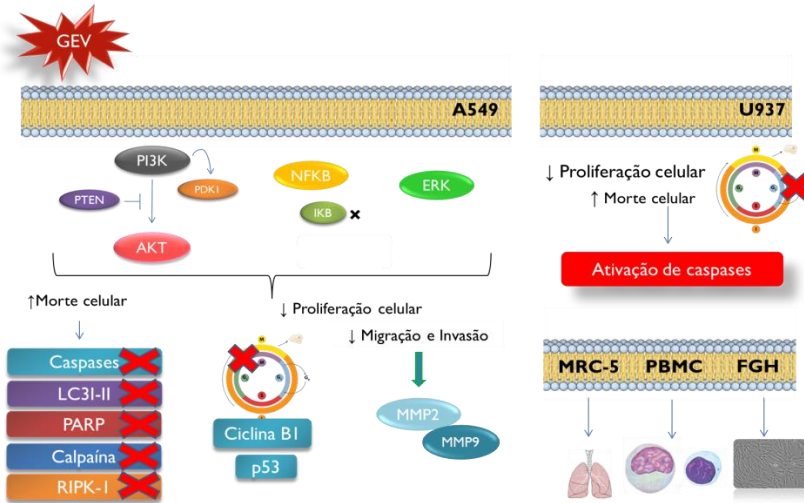
Nesse contexto, sabe-se que a necroptose pode ser ativada por RIP1-RIP-3, e que a RIP1, assim como caspases e calpaína não foram ativadas durante o processo de morte causada pelo GEV. Porém, já foi relatado na literatura que RIP1 é o ativador *upstream* de RIP3 e, na maioria dos casos, a necroptose pode prosseguir de uma forma independente de RIP1 (CHO, 2011). Se após o tratamento com GEV, RIP3 age sozinha ou em conjunto com outro fator *RIP1-like* isso é desconhecido e estas situações serão objeto de uma investigação mais aprofundada.

Em segundo lugar, é evidente, até certo ponto, que várias características morfológicas e bioquímicas de cada um dos modos descritos da morte celular são sobrepostas. Isso faz com que a distinção entre os diferentes modos de morte celular seja mais difícil (ORLIKOVA et al., 2013).

Também pode se pensar na possível participação dos lisossomas e das hidrolases lisossomais na morte celular. Devido à potente capacidade hidrolítica dessas hidrolases, definidas como "sacos suicidas", elas podem causar a morte celular e provocar danos nos tecidos, em caso de ruptura e libertação subsequente no citosol. Esse tipo de morte celular poderá ser investigado futuramente, visto que, em diferentes tempos experimentais, ocorreu um aumento do número de organelas vesiculares ácidas nas células A549 tratadas com GEV (dados não mostrados), já que alguns estudos mostraram agentes que diretamente rompem a integridade do lisossoma e isso pode ser desencadeado para necrose, apoptose ou apoptose-like (AIJA, JAATTELA, NYLANDSTED 2015).

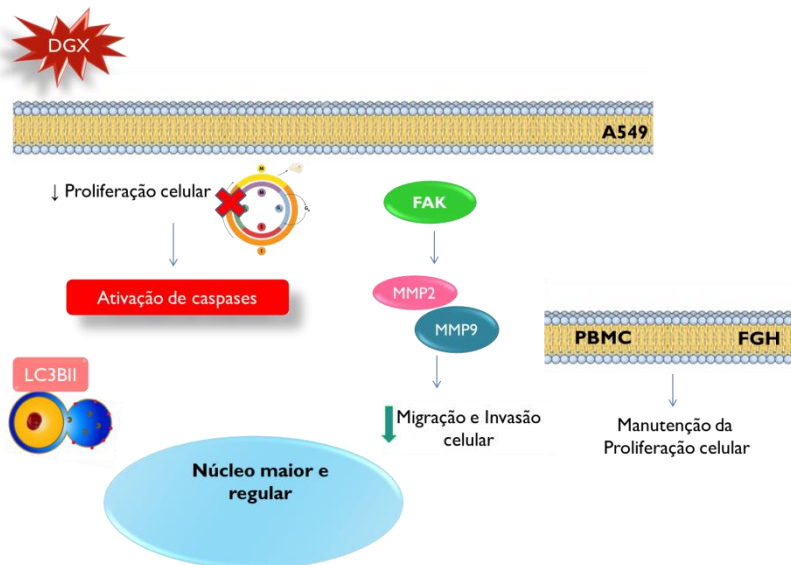
Posteriormente, no capítulo V desta tese, foram apresentados os dados referentes aos efeitos citotóxicos obtidos para os cardenolídeos DGX e CON, em células A549.

Figura 1. Esquema representativo dos efeitos do GEV nas linhagens tumorais e não-tumorais.



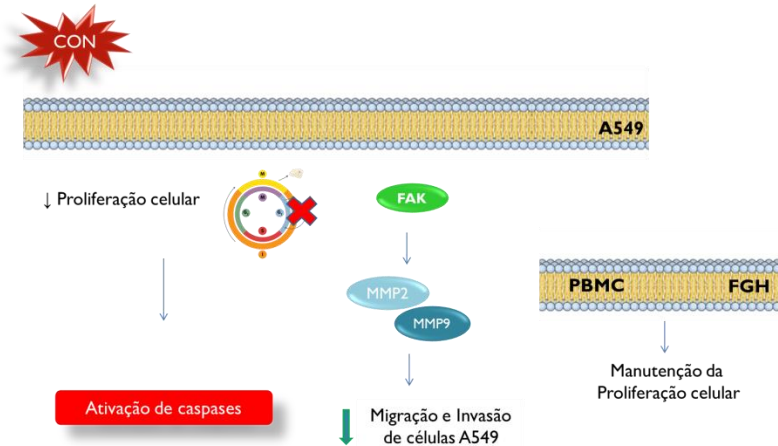
Para a DGX, os efeitos causados, a 10 nM, após 24, 48 e 72 h, apenas indicaram a redução da proliferação celular, sem indicativos de aumento significativo de morte celular, com base nos ensaios realizados, embora um aumento do fluxo autofágico tenha sido constatado (48h) e o aparecimento de aproximadamente 20% de núcleos maiores, característicos de células senescentes também foram observados. Na concentração de 100 nM, foi possível observar, após 72 h, um aumento de células não viáveis, bem como núcleos picnóticos sugestivos de morte celular apoptótica (Figura 2)

Figura 2. Esquema representativo dos efeitos da DGX nas linhagens tumorais e não-tumorais.



Efeitos significativamente diferentes foram observados para a CON, que apresentou aumento no número de células não viáveis, características de células em apoptose tardia ou necrose, bem como núcleos picnóticos. Ainda, esse composto não promoveu aumento significativo da formação de AVOs, bem como não houve formação da proteína LC3B-II, indicando que esse composto não induz autofagia (Figura 3).

Figura 3. Esquema representativo dos efeitos da CON nas linhagens tumorais e não-tumorais.



A partir do exposto, pode-se afirmar que a relação entre a autofagia e apoptose é complexa, e exatamente o que determina se uma célula morre por apoptose ou por outros mecanismos ainda não está bem esclarecido. Em alguns tipos celulares, a autofagia é declaradamente indutora de morte quando a apoptose é inibida, atuando como um mecanismo de apoio para executar o processo de morte. Em contraste, se durante a falta de nutrientes, as funções adaptativas de autofagia forem bloqueadas, o resultado de morte por apoptose é acelerado. Em células tumorais expostas a fármacos citotóxicos, a autofagia supostamente evita a apoptose, bem como a senescência celular (VICENCIO et al., 2008).

Como a senescência, a apoptose é uma resposta extrema ao estresse celular e representa um mecanismo de supressão tumoral importante. Ainda não está claro o que determina se uma célula sofre senescência ou apoptose, embora a maioria das células seja capaz de induzir os dois. O tipo celular parece ser determinante, já que células epiteliais e fibroblastos danificados tendem a sofrer senescência, enquanto que linfócitos danificados tendem a sofrer apoptose. Além disso, tem sido relatado que os níveis de expressão da Bcl-2 ou a inibição de caspases podem causar células alternativamente em senescência, já que normalmente ocorreria indução de apoptose. Estes estudos apontam claramente para um *cross-talk* entre os processos de apoptose e senescência celular, por exemplo, ao nível da proteína supressora de tumor p53. No entanto, o *cross-talk* entre a apoptose e a senescência

celular está longe de ser compreendido e mais estudos são necessários para esclarecer a sua relação (VICENCIO et al., 2008).

Por exemplo, não está claro qual é o gatilho final que impulsiona uma célula a morrer por apoptose ou, alternativamente, por senescência. Vários estudos têm enfatizado a importância da gravidade dos estímulos. No entanto, muito pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares e as vias de sinalização, que determinam a ocorrência de apoptose ou de senescência. Os danos diretos no DNA, causados por irradiação ou por tratamento com agentes que causam esse dano, podem induzir as células ao processo de senescência, bem como à apoptose, dependendo da concentração, da natureza do tratamento ou do tipo de célula (LECHEL et al., 2005).

Alem disso, nos capítulos III e VI foram apresentados os resultados obtidos dos efeitos antimetastáticos *in vitro* dos três cardenolídeos testados. Eles foram capazes de inibir a migração e a invasão celulares, através dos ensaios de *scratch* e Transwell[®], respectivamente, em células A549, bem como de reduzir a expressão das proteínas MMP2, MMP9 e FAK (proteína de adesão focal), essenciais no processo de metástase.

O GEV foi capaz de inibir a expressão de importantes cinases, geralmente, superexpressas em células tumorais, entre elas PI3K/Akt, Erk, NFκB e seus intermediários moleculares. Muitos desses efeitos já foram demonstrados para outros cardenolídeos. Porém, sabe-se que os glicosídeos cardiotônicos desencadeiam respostas celulares heterogêneas, que dificultam a identificação de uma via de sinalização celular específica. Não há provas definitivas de que a bomba Na⁺/K⁺-ATPase possa estar implicada em todos os efeitos causados por essa classe de compostos, ou possa ser o alvo, que permite integrar todos os efeitos antitumorais, até agora descritos. Finalmente, o sensor intracelular/transdutor ligando esse potencial alvo para a ativação de vias celulares secundárias permanece obscuro (CERELLA et al., 2013).

Por fim, é importante ressaltar que um bom candidato a fármaco antitumoral deve ser eficaz em eliminar ou inibir a proliferação de células tumorais humanas, em concentrações que não afetem significativamente as células não tumorais, conforme foi demonstrado *in vitro* para os cardenolídeos aqui testados.

Os efeitos relatados nessa tese para os três cardenolídeos aqui testados são inéditos, sendo que dois deles (GEV e DGX) foram avaliados pela primeira vez, em células tumorais.

REFERÊNCIAS

AITTS, S.; JÄÄTTELÄ, M.; NYLANDSTED, M. Methods for the quantification of lysosomal membrane permeabilization : A hallmark of lysosomal cell death. **Mehtods in Cell Biology**, v. 126, p.261-285, 2015.

BERTOL, J. W. et al. Antiherpes activity of glucoevatromonoside, a cardenolide isolated from a Brazilian cultivar of *Digitalis lanata*. **Antiviral Research**, v. 92, n. 1, p. 73-80, 2011.

CARVALHO, A. DE. **Avaliação dos efeitos citotóxicos de cardenólídeos em células tumorais**. 2012. 112 p. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Curso de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC, 2012.

CERELLA, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Assembling the puzzle of anti-cancer mechanisms triggered by cardiac glycosides. **Mitochondrion**, v. 13, n. 3, p. 225-234, 2013.

CHEN, Zhao et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, n. 8, p. 535-546, 2014.

CHIN, Y. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS journal**, v. 8, n. 2, p. E239-E253, 2006.

CHO, Y.; et al., RIP-1-dependent and independent effects of necrostatin-1 in Necrosis and T Cell Activation. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23209, 2011.

HUNDESHAGEN, P. et al. Concurrent detection of autolysosome formation and lysosomal degradation by flow cytometry in a high-content screen for inducers of autophagy. **BMC biology**, v. 9, n. 1, p. 38, 2011.

KROEMER, G.; MARTIN, S. J. Caspase-independent cell death. **Nature medicine**, v. 11, n. 7, p. 725-730, 2005.

LECHEL, A. et al. The cellular level of telomere dysfunction determines induction of senescence or apoptosis in vivo. **EMBO Reports**, v. 6, n. 3, p. 275-281, 2005.

MIJATOVIC, et al., Cardiostonic steroids on the road to anti-cancer therapy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1776, n.1, p. 32-57, 2007.

OBERLIES, N.; KROLL, D. Camptothecin and Taxol: Historic Achievements in Natural Products Research. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 2, p. 129-135, 2004.

ORLIKOVA, B.; DICATO, M.; DIEDERICH, M.. 1,000 Ways to die: natural compounds modulate non-canonical cell death pathways in cancer cells. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 1, p. 277-293, 2013.

PRASSAS, I.; DIAMANDIS, E. P. Novel therapeutic applications of cardiac glycosides. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 11, p. 926-935, 2008

STENKVIST, B. Cardenolides and cancer. **Anticancer Drugs**, v. 12, n. 7, p. 635-638, 2001.

THERIEN, A.G.; BLOSTEIN, R. Mechanisms of sodium pump regulation. **The American Journal of Physiology cell Physiology**, v. 279, n. 3, p. C541-566.

VICENCIO, J. M. et al. Senescence , Apoptosis or Autophagy ? When a damaged cell must decide its pathway. **Gerontology**, v. 54, n. 2, p. 92-99, 2008.

WANI, M. E.; WALL, M. C. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. **Journal of Ethnopharmacology**, v.51, n.1-2, p. 239-253.

WEIDEMANN, H. Na/K-ATPase, endogenous digitalis like compounds and cancer development -- a hypothesis. **Frontiers Bioscience**, v. 10, p. 2165-2176, 2005.

CONCLUSÕES

- Na triagem citotóxica dos 64 cardenolídeos testados, três deles se destacaram (glucoevatromonosídeo, digitoxigenina monodigitoxosídeo e convalotoxina) pela sua potente ação citotóxica, frente a células A549;
- Os três cardenolídeos citados acima foram selecionados para identificar o tipo de morte celular que eles causam, em células A549;
- Os compostos testados reduziram significativamente a proliferação de linhagens humanas de tumores sólidos e hematopoiéticas;
- Os cardenolídeos digitoxigenina monodigitoxosídeo e glucoevatromonosídeo causaram bloqueio da fase G2/M, enquanto que a convalotoxina aumentou o número de células na fase subG0 do ciclo de células A549. O glucoevatromonosídeo causou bloqueio em subG0 nas células U937.
- O glucoevatromonosídeo causou morte celular dependente do tipo celular, e dependente da ação de caspases, nas células U937, e independente da ação de caspases, nas células A549;
- A digitoxigenina monodigitoxosídeo induziu morte celular apoptótica, na maior concentração testada, enquanto na menor concentração, houve aumento do fluxo autofágico e do número de núcleos característicos de senescência, em células A549;
- A convalotoxina induziu morte celular apoptótica dependente de ação de caspases em células A549;
- A convalotoxina não promoveu aumento significativo da formação de AVOs, bem como não houve formação da proteína LC3B-II, indicando que esse composto não autofagia.

- Os três compostos foram capazes de inibir a migração e invasão celulares, em células A549, bem como de reduzir a expressão das proteínas FAK, MMP2 e MMP9, essenciais no processo de metástase.
- Os três compostos apresentaram efeitos seletivos para células tumorais, quando comparados com células não tumorais (PBMC, fibroblastos de gengiva e/ou células de pulmão humano MRC-5).

PERSPECTIVAS

À partir dos dados aqui apresentados, várias perspectivas foram geradas para a complementação desse trabalho, que tem por objetivo elucidar o mecanismo de ação desses compostos:

- Avaliar o efeito do GEV em outras proteínas envolvidas no processo de migração e invasão de células tumorais, tais como e-caderina e cofilina, e a possível inibição de filopódias.
- Investigar a dependência de EROS nos efeitos causados por esses cardenolídeos, em células A549.
- Verificar o efeito da DGX na indução de senescência, em células A549, através da marcação com a β -galactosidase.

APÊNDICE 1 - Outros artigos correspondentes às atividades realizados no período desta tese de doutoramento

1. Francini Yatsu, Jadel Muller Kratz, **Naira Fernanda Zanchett Schneider**, Claudia Maria Oliveira Simões, Letícia Koester, Valquiria Bassani "*In vitro intestinal permeability of a soy isoflavones aglycones fraction and derived cyclodextrin complexes*" Carbohydrate polymers (under review).
2. Vanya Petrova, **Naira Fernanda Zanchett Schneider**, Claudia Maria Oliveira Simões, Edward Kennelly. *Tentative identification of anti-HSV compounds from selected Vaccinium corymbosum cultivars and fractions by alignment of the bioactivity and chemical profile variation using LC-MS chemometrics and OPLS-DA statistical model.* - Journal of Agricultural and Food Chemistry (JAFC) (in draft).
3. Vanya Petrova, **Naira Fernanda Zanchett Schneider**, Claudia Maria Oliveira Simões, Edward Kennelly *Comparison of the polyphenolic profile relative to the anti-herpetic activities of Vaccinium, Sambucus and Aronia temperate berry crops.* - Journal of Agricultural and Food Chemistry (JAFC) (in draft).
4. Jadel Muller Kratz, J. ; **Naira Fernanda Zanchett Schneider**, Thiago Caon, Marina Teixeira ; Alessandra Mascarello, Letícia Koester; Claudia Maria Oliveira Simões. *In vitro intestinal and cutaneous permeability of pentyl gallate.* Latin American Journal of Pharmacy, v. 32, p. 1508-1515, 2013.