



HAL
open science

Novo ciclopeptídeo citotóxico do látex de croton urucurana baillon (Euphorbiaceae) e investigação de seu mecanismo de ação *in vitro*

Priscila de Matos Cândido Bacani

► To cite this version:

Priscila de Matos Cândido Bacani. Novo ciclopeptídeo citotóxico do látex de croton urucurana baillon (Euphorbiaceae) e investigação de seu mecanismo de ação *in vitro*. Agricultural sciences. Université Rennes 1, 2016. Portuguese. NNT : 2016REN1B010 . tel-01478286

HAL Id: tel-01478286

<https://theses.hal.science/tel-01478286>

Submitted on 28 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

En Cotutelle Internationale avec
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brésil

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention: Biologie

Ecole doctorale VAS

présentée par

Priscila DE MATOS CÂNDIDO BACANI

Préparée à l'unité de recherche Inserm U1085 - IRSET
Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**Un nouveau
cyclopeptide
cytotoxique extrait du
latex de *Croton
urucurana* Baillon
(Euphorbiaceae);
étude *in vitro* de son
activité cytotoxique**

**Thèse soutenue à Campo Grande
le 18 mars 2016**

devant le jury composé de :

Dr Zaira DA ROSA GUTERRES

Professeur, UEMS, Mundo Novo / *rapporteur*

Dr Juliana Mara SERPELONI

Professeur, UEL, Londrina / *rapporteur*

Dr Nídia Cristiane YOSHIDA

Professeur, UFMS, Campo Grande / *examineur*

Dr Nathalie THERET

DR2 Inserm, U1085, Université de Rennes 1 /
examineur

Dr Susana Elisa MORENO

Professeur, UCDB, Campo Grande / *examineur*

Dr Renata Trentin PERDOMO

Professeur, UFMS, Campo Grande / *examineur*

Dr Walmir SILVA GARCEZ

Professeur, UFMS / *directeur de thèse*

Dr Georges BAFFET

DR1 Inserm, U1085 Université de Rennes
1 / *directeur de thèse*



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste

TESE DE DOUTORADO
Em cotutela internacional com
UNIVERSITÉ DE RENNES 1, Rennes, França

PRISCILA DE MATOS CÂNDIDO BACANI

**NOVO CICLOPEPTÍDEO CITOTÓXICO DO LÁTEX DE *CROTON URUCURANA*
BAILLON (EUPHORBIACEAE) E INVESTIGAÇÃO DE SEU MECANISMO DE
AÇÃO *IN VITRO*.**

CAMPO GRANDE
2016

PRISCILA DE MATOS CÂNDIDO BACANI

**NOVO CICLOPEPTÍDEO CITOTÓXICO DO LÁTEX DE *CROTON URUCURANA*
BAILLON (EUPHORBIACEAE) E INVESTIGAÇÃO DE SEU MECANISMO DE
AÇÃO *IN VITRO*.**

Tese de Doutorado em Convenção de Cotutela com a Université de Rennes 1-França apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção de título de Doutor.

Orientadores:

Prof. Dr. Walmir Silva Garcez (UFMS-BR)

Prof. Dr. Georges Baffet (Université de Rennes 1-FR)

Coorientadora: Prof^a. Dr^a Maria de Fátima Cepa Matos (UFMS-BR)

CAMPO GRANDE

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

PRISCILA DE MATOS CÂNDIDO BACANI

**NOVO CICLOPEPTÍDEO CITOTÓXICO DO LÁTEX DE *CROTON URUCURANA*
BAILLON (EUPHORBIACEAE) E INVESTIGAÇÃO DE SEU MECANISMO DE
AÇÃO *IN VITRO*.**

Tese de Doutorado em Convenção de Cotutela com a Université de Rennes 1-França apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção de título de Doutor.

Resultado:
Campo Grande (MS), 18 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Walmir Silva Garcez
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Georges Baffet
Instituição: Université de Rennes 1 - França

Profa. Dra. Zaira da Rosa Guterres
Instituição: Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Juliana Mara Serpeloni
Instituição: Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Nídia Cristiane Yoshida
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Susana Elisa Moreno
Instituição: Universidade Católica Dom Bosco

Profa. Dra. Nahalie Théret
Instituição: Université de Rennes 1 - França

Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo
Instituição: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Ao meu esposo Vitor, pelo amor, paciência, auxílio, incentivo e por estar
sempre ao meu lado.

Aos meus pais Francisco (in memórian) ***e Maurení***, grandes mestres
da minha vida, pelo amor, dedicação e por todos os ensinamentos.

Às minhas irmãs Eliane e Patricia, pelo apoio sempre presente,
amizade, amor e grandes conselhos.

Aos meus avós Clarice e José, pelo carinho e amor.

A vocês dedico esta tese. Obrigada por estarem sempre por perto.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, conquistas e graças alcançadas.

Ao Prof. Dr. Walmir Silva Garcez por me acolher no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais Bioativos (ProNaBio) e pela oportunidade de me lançar em novas descobertas na área de Química de Produtos Naturais. Obrigada pela orientação, amizade, confiança e apoio constante na realização de todas as etapas deste trabalho. Serei sempre grata.

À Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos por me acolher no Laboratório de Cultura de Células. Agradeço pela oportunidade oferecida, coorientação, amizade e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Patrícia de Oliveira Figueiredo, pela amizade, dedicação com que sempre me ajudou em todas as etapas do isolamento e elucidação estrutural do ciclopeptídeo e valiosas contribuições na redação do artigo. Obrigada por estar sempre de prontidão para colaborações e sugestões enriquecedoras. Sua contribuição foi fundamental para realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez, pela amizade, colaboração e importantes contribuições.

Ao Prof. Dr. Joaquim Corsino, pelo auxílio no HPLC, apoio e colaboração.

Às professoras Dra. Danielle Bogo, Dra. Nídia Cristiane Yoshida e Dra. Maria Elizabeth Moraes Cavalheiros Dorval, pelas importantes contribuições apresentadas durante o exame de qualificação.

Às professoras Dra. Zaira da Rosa Guterres, Dra. Juliana Mara Serpeloni, Dra. Nídia Cristiane Yoshida, Dra. Susana Elisa Moreno, Dra. Nathalie Théret e Dra. Renata Trentin Perdomo, por aceitar o convite de participar da banca de defesa da tese.

Às técnicas Me. Luciana Marçal Revaglia e Dra. Edilene Delphino Rodrigues e ao Prof. Dr. Walmir Silva Garcez, pelos experimentos de RMN.

Às amigas do Laboratório de Cultura de Células Profa. Dra. Danielle Bogo, Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo, Júlia, Laura, Marillin, Mariah e Camila pela convivência amigável e colaboração nos experimentos.

A todos os colegas do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais Bioativos (ProNaBio) pela convivência amigável, troca de experiências e auxílio.

À Katia, pela amizade, auxílio e apoio constante.

Ao Prof. Dr. Walmir Silva Garcez, Pedro, Luiz, Danillo e Juliana pela ajuda na coleta das cascas e do látex de *C. ururucana* e ao Prof. Dr. Arnildo Pott pela identificação da espécie *C. ururucana*. Agradeço também ao Sr. Deocídio, raizeiro de Campo Grande-MS por sua contribuição.

Aos professores Dr. João Ernesto de Carvalho da Universidade Estadual de Campinas e Dra. Ilce Mara de Syllos Cólus da Universidade Estadual de Londrina, pela doação das linhagens de células utilizadas neste estudo.

Ao Prof. Mário Geraldo de Carvalho da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro que gentilmente nos cedeu o reagente de Marfey e os padrões D- e L-aminoácidos.

À coordenadora Profa. Dra. Iandara Schettert Silva e as secretárias Áurea Soares Gobi e Vera Nascimento Silva do Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pela gentileza e por serem sempre tão solícitas.

À Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (FUNDECT), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (CPq-PROPP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, pelo apoio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas concedidas durante o doutorado e estágio doutoral sanduíche na França, as quais viabilizaram a realização deste trabalho.

REMERCIEMENTS

J'exprime mes sincères remerciements à le Dr. Georges Baffet de m'avoir accueillie au sein de l'équipe «Signalisation et Modélisation» de l'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (IRSET) de Rennes (France) pour la réalisation de ce travail dans le cadre d'une collaboration en convention de cotutelle internationale de thèse. Je vous remercie également pour ses encouragements, sa disponibilité permanente, sa confiance, son encadrement, et son aide apportée lors de la réalisation de ce travail de recherche.

Je tiens également à remercier le Dr. Natlalie Théret, le Dr. Sophie Langouet et le Dr. François Tiaho de m'avoir accueillie au sein de l'équipe «Signalisation et Modélisation». Je remercie également à Dr. Natlalie Théret d'avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie aussi l'ensemble de l'équipe «Signalisation et Modélisation» et tout particulièrement Frédéric Ezan. Merci pour ton soutien inconditionnel pendant mon séjour en France, de m'avoir enseigné tant de techniques, sa constante disponibilité et pour tout ce qu'il m'a appris. Un grand merci également à Jérémy Bomo pour son support et son aide précieuse à l'exécution des expériences concernant des culture cellulaires 3D dans des gels de collagène.

Je remercie également l'ensemble des collègues de bureau et tout particulièrement Manuella pour tout le soutien que tu as su m'apporter.

Je tiens également à remercier à les plates-formes technologiques de l'Université de Rennes 1: H²P² (Histo Pathologie Hight Precision), Cytométrie en flux et PIXEL.

«La diversité biologique est le socle, le soubassement de nos ressources alimentaires et c'est la source de médecine dont dépend la santé»

(Hamdallah ZEDAN, 2005)

RESUMO

CÂNDIDO-BACANI, PRISCILA DE MATOS. **Novo ciclopeptídeo citotóxico do látex de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) e investigação de seu mecanismo de ação *in vitro***. Campo Grande (MS); 2016. [Tese em cotutela (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e Ecole doctorale VAS, Université de Rennes 1, Rennes (França)].

Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae) é uma espécie arbórea conhecida popularmente no Brasil como “sangra d’água”, comumente encontrada no estado de Mato Grosso do Sul, onde seu látex tem sido utilizado na medicina popular no tratamento de vários tipos de câncer. Apesar de sua importância etnofarmacológica, não há relatos de estudos relacionados à sua composição química ou atividades anticâncer na literatura. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade citotóxica de extratos, fases, frações e da substância isolada do látex de *C. urucurana* e investigar os mecanismos celulares e moleculares *in vitro* responsáveis pela citotoxicidade da substância isolada considerando seu potencial apoptótico e influência sobre a progressão do ciclo celular em uma linhagem de hepatocarcinoma celular humano (Huh-7), bem como, os efeitos desta substância sobre a migração e viabilidade de células Huh-7 cultivadas em geis de colágeno em 3D. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* foi realizado com o corante sulforrodamina B (SRB) em seis linhagens de células neoplásicas humanas e uma linhagem de células não neoplásicas NIH/3T3 (fibroblasto murinho). Os estudos de mecanismos de ação com crouorb A1 foram conduzidos em diferentes sistemas-teste *in vitro*. O estudo fitoquímico biomonitorado da fase bioativa acetato de etila do látex de *C. urucurana* resultou no isolamento de um novo ciclopeptídeo denominado [1–9-NαC]-crouorb A1, que apresentou potente atividade citotóxica frente à linhagem de células neoplásicas NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), com a mesma potência que a doxorubicina (controle positivo), e foi inativa até a maior concentração testada ($GI_{50} = >250 \mu\text{g/mL}$) frente à linhagem de células não neoplásicas 3T3. A exposição de células Huh-7 ao crouorb A1 resultou em uma diminuição da viabilidade celular de maneira dose e tempo-dependentes. Nós observamos um aumento da atividade de caspases 3 e 7 e um aumento da expressão de proteínas próapoptóticas (Bak, Bid, Bax, Puma, Bim e Bad) e caspase 3 clivada após tratamento com crouorb A1. Além disso, observamos que a via de sinalização celular MAP/JNK foi necessária para induzir a morte celular em células Huh-7 tratadas com crouorb A1. Os efeitos de crouorb A1 foram também associados com o acúmulo de células na fase G2/M do ciclo celular. Em paralelo, as expressões da cinase dependente da ciclina (CDK1), ciclina B1 e ciclina D1 foram aumentadas após tratamento com crouorb A1. Foi demonstrado também o envolvimento de crouorb A1 na redução da migração de células Huh-7 cultivadas na presença e ausência de mitomicina C. A avaliação da viabilidade de células Huh-7 cultivadas em geis de colágeno em 3D apontou uma maior resistência destas células ao crouorb A1 quando comparadas com a cultura de células em 2D.

Palavras-chave: [1–9-NαC]-crouorb A1, citotoxicidade, seletividade, apoptose e ciclo celular

ABSTRACT

CÂNDIDO-BACANI, PRISCILA DE MATOS. **New cytotoxic cyclic peptide from the latex of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) and *in vitro* investigation of its mechanisms of action.** Campo Grande (MS); 2016. [Thesis with international joint supervision of Ph.D agreement - Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul and Ecole doctorale VAS, Université de Rennes 1, Rennes (France)].

Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae), plant species popularly known in Brazil as “sangra-d’água”, is commonly found in Mato Grosso do Sul State (midwestern Brazil), where its latex is popularly used to treat several types of cancer. Despite the ethnopharmacological significance of the species, no phytochemical or cytotoxic studies of its latex have been published. In this context, the aim of the present study was to assess the cytotoxic activity of crude extracts, fractions and isolated compound from the latex of *C. urucurana* and to investigate the effects of crouorb A1 on the viability, apoptosis, cell cycle and cell migration of human hepatocarcinoma cell lines (Huh-7). Also, we have evaluated the viability of Huh-7 cells treated with crouorb A1 in 3D collagen gels. The cytotoxicity was detected using the sulforhodamine B (SRB) assay against six human cancer cells lines and one nontumor NIH/3T3 cell line (murine fibroblast). Studies on the mechanism of cell death of crouorb A1 were conducted in different test systems *in vitro*. The bioactive ethyl acetate phase obtained from the latex of *C. urucurana* afforded a novel cyclic peptide, [1–9-NaC]-crouorb A1, that proved active against NCIADR/ RES (ovary, multidrug-resistance phenotype) cells with the same potency as doxorubicin (positive control) and inactive up to the highest concentration tested against nontumor NIH/3T3 cells ($GI_{50} = > 250 \mu\text{g/mL}$). Crouorb A1 treatment decreases the cell viability of Huh-7 at dose and time dependent manner associated with induction of apoptosis by caspase 3/7 activation and increasing expression of pro-apoptotic proteins: Bak, Bid, Bax, Puma, Bim, and Bad and clived-caspase3 protein. The JNK/MAP pathway is involved in this induced cell death. Crouorb A1 effect is also associated with G2/M phase cell cycle arrest. In parallel, we observed that crouorb A1 treatment resulted in an increase of cyclin-dependent kinase (CDK1), cyclin B1 and cyclin D1 expressions. A significant reduction of Huh-7 cells migration by crouorb A1 can be assessed and we also show that cells grown on 3D collagen gels exhibited increased resistance to crouorb A1 when compared to 2D cell culture.

Keywords: [1–9-NaC]-crouorb A1, cytotoxicity, selectivity, apoptosis and cell cycle

RÉSUMÉ

CÂNDIDO-BACANI, PRISCILA DE MATOS. **Un nouveau cyclopeptide cytotoxique extrait du latex de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae); étude *in vitro* de son activité cytotoxique.** Campo Grande (MS); 2016. [Thèse de doctorat en cotutelle - Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul et Ecole doctorale VAS, Université de Rennes 1, Rennes].

Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae), est une plante très connue et utilisée en médecine traditionnelle au Brésil, la «sangra-d'água» retrouvée dans l'État du Mato Grosso do Sul (région Centre-Ouest du Brésil). Son latex est abondamment utilisé en médecine traditionnelle dans le traitement de plusieurs types de cancer. En dépit de son importance ethnopharmacologique, on ne trouve aucune étude sur sa composition chimique ou sur sa potentielle activité anti-cancéreuse. L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'activité cytotoxique des extraits totaux, fractions d'extraits et de molécules purifiées, isolées du latex de *C. urucurana*. Nous avons étudié plus particulièrement les effets du crouorb A1 sur la viabilité, l'apoptose, le cycle cellulaire et la migration de cellules issues de carcinome hépatocellulaire humaine (Huh-7). Nous avons également évalué l'effet du crouorb A1 sur la viabilité des cellules Huh-7 cultivées dans les gels de collagène en 3D. L'activité cytotoxique ont été réalisées par le test à la sulforhodamine B sur six lignées cellulaires cancéreuses et sur une lignée cellulaire non cancéreuse de fibroblastes murins, les cellules NIH/3T3. L'étude phytochimique de la fraction 'acétate d'éthyle' du latex de *C. urucurana* bioguidé a permis d'obtenir un nouveau cyclopeptide que nous avons nommé [1-9-NaC]-crouorb A1. Le crouorb présente une cytotoxicité puissante sur la lignée cellulaire cancéreuse NCI-ADR/RES (ovaire, le phénotype de multirésistance) à un niveau équivalent à celle de la doxorubicine (témoin positif). Ce composé est de plus pratiquement inactif ($GI_{50} = >250 \mu\text{g/mL}$) sur la lignée non cancéreuse NIH/3T3. L'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* du crouorb A1 (test wst1) sur les cellules Huh-7 a démontré que la viabilité des cellules est inhibée de manière dose et temps-dépendant. Nous avons mesuré une forte activation des caspases 3 et 7 et une nette augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bak, Bid, Bax, Puma, Bim et Bad) ainsi que de la caspase 3 clivée par le crouorb A1. Nous avons également déterminé que la voie de signalisation JNK-MAPkinase semble nécessaire à l'induction de la mort cellulaire des cellules Huh-7 traitées au crouorb A1. Le crouorb A1 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G_2/M . En parallèle, les expressions de la cycline-dépendante kinase CDK1, des cyclines B1 et D1 sont augmentées après traitement au crouorb A1. De plus, le crouorb A1 a un effet inhibiteur significatif de la migration des cellules Huh-7, en présence ou absence de mitomycine C. Nous avons également confirmé, l'effet inhibiteur du crouorb A1 sur la viabilité des cellules Huh7 cultivées en 3D dans les gels de collagène 1 et démontré que les cellules cultivées en 3D semblent plus résistantes au crouorb A1 par rapport aux cultures en monocouche 2D.

Mots-clés: [1-9-NaC]-crouorb A1, cytotoxicité, sélectivité, apoptose et cycle cellulaire

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----------|
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| Figura 1 - Estruturas de algumas drogas anticâncer derivadas de plantas em uso clínico. | 23 |
| Figura 2 - Espécies de <i>Croton</i> , usos tradicionais e efeitos farmacológicos de partes das plantas e alguns compostos importantes isolados | 27 |
| Figura 3 - A) Árvore de <i>Croton urucurana</i> Baill. B) Detalhe das folhas. C) Detalhe da florescência. | 28 |
| Figura 4 - Extração do látex de “sangra d’água” | 29 |
| Figura 5 - Bancos fornecedores de linhagens celulares..... | 33 |
| Figura 6 - Cultura de células 3D como intermediária entre cultura de células 2D e modelo animal..... | 35 |
| Figura 7 - Estrutura química dos diferentes sais de tetrazólio e o aceitador de elétrons intermediário, metassulfato de fenazina (PMS) | 37 |
| Figura 8 - Estrutura da SRB | 39 |
| Figura 9 - Vias de sinalização envolvidas na apoptose: via mitocondrial e via extrínseca..... | 40 |
| | |
| CAPÍTULO I: CYTOTOXIC ORBITIDE FROM THE LATEX OF <i>CROTON URUCURANA</i>..... | 49 |
| Figure 1. [1–9-NaC]-crouorb A1 (1), the orbitide [(<i>cyclo</i>)-G _a SL _a G _b AFG _c NL _b -] isolated from the latex of <i>Croton urucurana</i> | 57 |
| SUPPORTING INFORMATION..... | 68 |
| Fig. 1S. ¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of compound 1 | 69 |
| Fig. 2S. ¹³ C NMR (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of compound 1 | 70 |
| Fig. 3S. ¹³ C NMR/DEPT 135 (300 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of compound 1 | 71 |
| Fig. 4S. HSQC (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of compound 1 | 72 |

| | |
|---|----|
| Fig. 5S. HMBC (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of compound 1 | 73 |
| Fig. 6S. COSY ¹ H- ¹ H (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of compound 1 | 74 |
| Fig. 7S. NOESY (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) spectrum of compound 1 | 75 |
| Fig. 8S. Infrared spectrum of compound 1 | 76 |
| Fig. 9S. HRESIMS of compound 1 <i>m/z</i> 817.4199 [M + H] ⁺ | 77 |
| Fig. 10S. UV spectrum of compound 1 | 78 |

CAPÍTULO II: [1—9-NAC]-CROURORB A1 ISOLATED FROM *CROTON URUCURANA* LATEX INDUCES G2/M CELL CYCLE ARREST AND APOPTOSIS IN HUMAN HEPATOCARCINOMA CELLS.....79

| | |
|---|------------|
| Figure 1. Chemical structure of [1—9-NaC]-crouorb A1 | 97 |
| Figure 2. Cell viability (%) in 2D cultures was determined by WST-1 assay | 97 |
| Figure 3. Effect of crouorb A1 on apoptosis and necrosis in 2D Huh-7 cells..... | 98 |
| Figure 4. Effects of crouorb A1 on cell cycle phase distribution in 2D Huh-7 cells... | 99 |
| Figure 5. Effect of crouorb A1 on cell signaling pathways in 2D Huh-7 cells..... | 100 |
| Figure 6. Crouorb A1 inhibits migration in 2D Huh-7 cells..... | 101 |
| Figure 7. Cell viability (%) in 3D cultures (collagen gel 0.75 and 1.5 mg/mL) was determined by WST-1 assay | 102 |
| Figure 8. Cell proliferation kinetics in 3D collagen gel cultures (collagen gel 1.5 mg/mL) | 103 |
| SUPPLEMENTARY FIGURES | 104 |
| Figure 1. Cell viability (%) in 2D cultures was determined by WST-1 assay | 104 |
| Figure 2. Cell viability (%) in 3D cultures (collagen gel 0.75 and 1.5 mg/mL) was determined by WST-1 assay | 104 |
| Figure 3. Cisplatin (20 µg/mL) was employed as positive control by DEVD-AMC fluorometric assay | 104 |

| | |
|--|------------|
| APÊNDICES | 132 |
| Figure 1 - Fracionamento biomonitorado do látex de <i>C. urucurana</i> por meio do ensaio de citotoxicidade com o corante sulforrodamina B | 134 |
| Figure 2 - Perfil cromatográfico da Fração 2 por CLAE..... | 136 |

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I: CYTOTOXIC ORBITIDE FROM THE LATEX OF *CROTON URUCURANA*.....49

Table 1. In Vitro Cytotoxicity (GI_{50}) of Latex Extracts, Phases, Fractions, and Compound 1 from *Croton urucurana* against Six Human Cancer Cell Lines.....54

Table 2. 1D and 2D NMR Data for [1–9- $N\alpha C$]-Crouorb A1 (1) in DMSO- d_6 55

Table 3. Main Fragment Ions Observed in the HRESIMS/MS Spectrum of 1 (m/z 817.4199, $[M+H]^+$, 46.3 eV).....59

CAPÍTULO II: [1—9-NAC]-CROURORB A1 ISOLATED FROM *CROTON URUCURANA* LATEX INDUCES G2/M CELL CYCLE ARREST AND APOPTOSIS IN HUMAN HEPATOCARCINOMA CELLS.....79

Table 1. IC_{50} values, given in $\mu g/mL$, for crouorb A1 on 2D Huh7 cell lines.....97

Table 2. IC_{50} values, given in $\mu g/mL$, for crouorb A1 on 3D Huh-7 cell lines.....102

APÊNDICES132

Tabela 1 - Obtenção das fases Hexânica, Acetato de Etila e Hidrometanólica a partir de 55 g do látex de *Croton urucurana* Baillon133

Tabela 2 - Frações obtidas a partir de 3 g da Fase Acetato de Etila do látex de *C. urucurana*135

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ^{13}C NMR *Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance*
- ^1H NMR *Proton Nuclear Magnetic Resonance*
- 786-0 *kidney carcinoma*
- A *Alanine*
- AcOEt *Acetato de etila*
- ATCC *American Type Culture Collection*
- CDK *Cyclin Dependente Kinases*
- c-FLIP *Cellular FLICE inhibitory proteins*
- CH_3CN e MeCN *Acetonitrile*
- CLAE *Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*
- COSY (^1H - ^1H) *Correlation Spectroscopy (^1H - ^1H)*
- DAF *Fluorescein diacetate*
- DEPT 135° *Distortionless Enhancement of Polarization Transfer using a 135 degree decoupler pulse*
- DISC *Death-inducing signaling complex*
- DMSO *Dimethyl sulfoxide*
- DMSO- d_6 *Deuterated dimethyl sulfoxide*
- DR *Death receptor*
- DSMZ *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen*
- ECACC *European Collection of Animal Cell Cultures*
- ERK *Extracellular signal-Regulated Kinases*
- EtOH *Etanol*
- F *Phenylalanine*
- G *Glycine*
- GI_{50} *Concentração que inibe 50% do crescimento celular*
- H_2O *Água*
- HCL *Hydrochloric acid*
- Hep-G2 *Hepatocellular carcinoma*
- HMBC *Heteronuclear multiple-bond correlation*
- HPLC *High Pressure Liquid Chromatography*
- HRESIMS *High-Resolution Electrospray Ionisation Mass Spectrometry*
- HSQC *Heteronuclear Single-Quantum Correlation*

HT-29 *Colon carcinoma*

Huh-7 *Hepatocellular carcinoma*

IAPs *Inhibitor of Apoptosis Protein*

IC₅₀ *Concentração que inibe 50% do crescimento celular*

INCA *Instituto Nacional do Câncer*

IR *Infrared spectrum*

JNK *Jun N-terminal Kinases*

KB *Carcinoma epidermóide de boca*

L *Leucine*

LD₅₀ *Lethal Dose*

L-FDAA *N- α -(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-L-alaninamide*

MAPK *Mitogen Associated Protein Kinases*

MCF-7 *Breast adenocarcinoma*

MeOH *Metanol*

MHz *Megahertz*

MTS *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt*

MTT *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)*

N *Asparagine*

NADPH *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*

NaHCO₃ *Sodium bicarbonate*

NCI *National Cancer Institute*

NCI-ADR/RES *Ovary adenocarcinoma, multidrug-resistance phenotype*

NIH/3T3 *Murine fibroblast*

NOESY *Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*

OMS *Organização Mundial de Saúde*

PBS *Phosphate-buffered saline*

PC-03 *Prostate carcinoma*

PI *Propidium Iodide*

PMS *Metassulfato de fenazina*

RT *Room temperature*

S *Serine*

SDS–PAGE *Sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*

SMAC *Second mitochondria derived activator of caspases*

SRB Sulforrodamina B

TBS *Tris-buffer saline*

TCA Ácido tricloroacético

TFA *Trifluoroacetic acid*

TNF *Tumor necrosis fator*

UV *Ultraviolet*

V79 fibroblasto de hamster chinês

WST-1 *2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt*

XTT *2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-carboxanilide-2H-tetrazolium, monosodium salt*

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| INTRODUÇÃO | 19 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 22 |
| 2.1 Plantas medicinais como fonte de agentes anticâncer | 23 |
| 2.2 Plantas medicinais e o gênero <i>Croton</i> | 25 |
| 2.2.1 <i>Croton urucurana</i> Baillon..... | 28 |
| 2.2.1.1 Características botânicas, farmacológicas e composição química..... | 28 |
| 2.3 Cultura de células..... | 31 |
| 2.4 Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> | 35 |
| 2.5 Morte celular - apoptose e necrose | 39 |
| 2.5.1 Via intrínseca..... | 41 |
| 2.5.2 Via extrínseca..... | 42 |
| 2.6 Ciclo celular | 43 |
| 2.6.1 Controle da progressão do ciclo celular | 45 |
| 3 OBJETIVOS | 47 |
| 3.1 Objetivo geral | 48 |
| 3.2 Objetivos específicos | 48 |
| CAPÍTULO I: CYTOTOXIC ORBITIDE FROM THE LATEX OF <i>CROTON URUCURANA</i> | 49 |
| CAPÍTULO II: [1–9-NαC]-CROURORB A1 ISOLATED FROM <i>CROTON URUCURANA</i> LATEX INDUCES G2/M CELL CYCLE ARREST AND APOPTOSIS IN HUMAN HEPATOCARCINOMA CELLS..... | 79 |
| CAPÍTULO III: RÉSUMÉ DE THÈSE | 105 |
| CONCLUSÕES | 112 |
| REFERÊNCIAS | 115 |
| APÊNDICES | 132 |

Câncer é a designação dada a um grupo de doenças caracterizadas pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que resulta na perda do controle da proliferação celular e na capacidade dessas células invadirem tecidos próximos ou migrarem para outros locais do organismo, caracterizando as metástases (HANAHAN; WEINBERG, 2011; PINTO; FELZENSWALB, 2003).

O câncer é apontado como um dos principais problemas de saúde pública no mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). De acordo com estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de mortes por câncer, em todo o mundo chegará a 13,2 milhões em 2030. No Brasil, o câncer é a segunda principal causa de morte, acometendo, anualmente, cerca de 100 mil indivíduos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2014).

Em decorrência da magnitude da doença, uma parte significativa das pesquisas de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais tem-se centrado na busca de substâncias para prevenir ou tratar o câncer (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2010; CRAGG; NEWMAN, 2013; HOUGHTON *et al.*, 2007).

As plantas medicinais têm sido sempre uma fonte promissora de substâncias antitumorais em função da diversidade de espécies vegetais disponíveis para investigação fitoquímica e por proporcionar grandes chances de obtenção de uma molécula protótipo devido à riqueza de constituintes presentes nestas espécies (YUNES; CALIXTO, 2001). Muitas substâncias em amplo uso clínico utilizadas no tratamento do câncer foram descobertas por meio de investigação de extratos de plantas em programas de triagem de novos compostos (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Nesse contexto, a medicina popular constitui uma valiosa fonte de informações que servem como ponto de partida para seleção de plantas já empregadas para fins medicinais, na busca de identificar e isolar substâncias com atividades biológicas. Associada ao conhecimento popular, uma metodologia utilizada na busca de substâncias com potencial atividade anticâncer é o estudo biomonitorado ou *screening*, o qual visa ao isolamento de compostos de interesse farmacológico a partir do fracionamento biomonitorado de um extrato que apresentar resultados positivos no teste de citotoxicidade utilizando linhagens de células tumorais humanas (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2009; YOUNES; VARELLA; SUFFREDINI, 2007).

Essas abordagens podem ser vistas como complementares e a sua utilização no Brasil, especialmente no estado de Mato Grosso do Sul, se torna uma ferramenta

importante, visto que o mesmo possui uma riqueza inestimável, representada pela biodiversidade de espécies vegetais nos Biomas Cerrado e Pantanal, muitas de uso etnofarmacológico. Dentre essas espécies, destaca-se o látex de *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) conhecida popularmente como “sangra d’água” que tem sido utilizado na medicina popular sul-mato-grossense no tratamento de vários tipos de câncer e, apesar de sua importância etnofarmacológica, não há relatos de estudos relacionados à sua composição química ou atividades anticâncer na literatura.

Reconhecendo a importância da espécie *C. urucurana* no tratamento do câncer pela população do estado e tendo em vista a ausência de critérios científicos para o uso desta planta, decidiu-se inicialmente realizar o estudo fitoquímico biomonitorado por meio da atividade citotóxica frente a linhagens de células tumorais humanas, visando ao isolamento e a identificação das substâncias com potencial atividade anticâncer. Estas etapas foram realizadas no Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais Bioativos (ProNaBio) e no Laboratório de Biologia Molecular e Culturas Celulares da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, MS. Adicionalmente, foram estudados os mecanismos celulares e moleculares implicados na atividade citotóxica da substância isolada em uma linhagem de hepatocarcinoma celular humano. Esta etapa foi realizada durante o estágio de doutoramento em Rennes (França) no Institut de Recherche Santé, Environnement & Travail (IRSET), da Université de Rennes 1, sob a orientação do Prof. Dr. Georges Baffet, responsável pela equipe Signalisation et Modélisation.

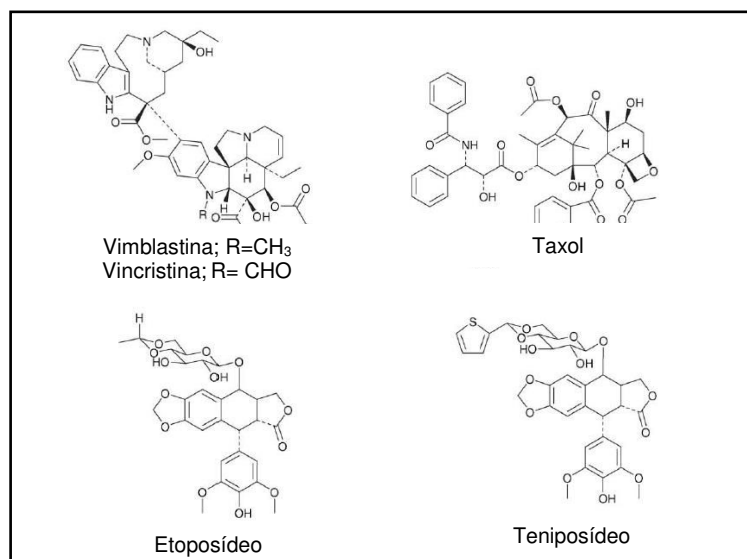
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Plantas medicinais como fonte de agentes anticancer

A descoberta de medicamentos oriundos de plantas medicinais tem desempenhado um papel importante no tratamento, cura e prevenção de um amplo espectro de doenças, especialmente do câncer (BUTLER, 2004; CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014; CRAGG; NEWMAN, 2013; ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001). Entre as substâncias utilizadas no tratamento do câncer, 60% são derivadas direta ou indiretamente de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Drogas anticancer de origem vegetal em amplo uso clínico incluem os alcaloides da vinca isolados de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (vincristina e vimblastina); etoposídeo e teniposídeo, que são derivados semissintéticos da epipodofilotoxina (um isômero da podofilotoxina) isolada de *Podophyllum peltatum* Linnaeus e *Podophyllum emodi* Wallich; o taxol derivado de *Taxus brevifolia* Nuttall (“teixo”) e os derivados da camptotecina, um alcaloide extraído de uma árvore ornamental chinesa, *Camptotheca acuminata* Decaisne. Todos estes compostos são citotóxicos e agem principalmente inibindo a proliferação celular através de mecanismos celulares distintos (CRAGG; NEWMAN, 2005; CRAGG; NEWMAN, 2013; ROCHA; LOPES; SCHWARTSMANN, 2001) (Figura 1).

Figura 1 - Estruturas de algumas drogas anticancer derivadas de plantas em uso clínico.



Fonte: Cragg; Newman (2005).

Os alcaloides da vinca, vincristina e vimblastina, exercem suas propriedades anticâncer inibindo a mitose através da ligação com a tubulina, interrompendo, deste modo, a divisão celular na metáfase (HEINRICH *et al.*, 2004). As epipodofilotoxinas (etoposídeo e teniposídeo) se ligam a tubulina, causando quebras na cadeia de DNA durante a fase G2 do ciclo celular por inibição irreversível da topoisomerase II (GORDALIZA, 2007). O paclitaxel mais comumente conhecido como taxol, estabiliza os microtúbulos e conduz à parada mitótica (GURIB-FAKIM, 2006; WANI *et al.*, 1971). Outra adição importante ao arsenal de drogas anticâncer é a classe de agentes clinicamente ativos derivados da camptotecina, o irinotecano e topotecano, que atuam inibindo a enzima topoisomerase I resultando no rompimento da dupla fita de DNA e consequente interrupção da replicação e transcrição (GRANADA *et al.*, 2007, MANN, 2002; RAHIER; THOMAS; HECHT, 2005).

Entretanto, grande parte das drogas anticâncer disponíveis apresentam diversas limitações terapêuticas, tais como a toxicidade sistêmica, baixa especificidade para células tumorais, resistência do organismo à droga e rápido metabolismo, além de vários efeitos colaterais (JOHNSTONE; RUEFLI; LOWE, 2002). Nesse sentido, a busca de novos protótipos naturais com atividade anticâncer tem sido cada vez mais estimulada, visando à descoberta de moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo de câncer e apresentem seletividade às células tumorais, com efeitos colaterais mínimos sobre o tecido normal; ou ainda, moléculas que impeçam o avanço da doença (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Os ciclopeptídeos derivados de plantas têm emergido como uma nova classe de biomoléculas com potencial atividade anticâncer (FANG *et al.*, 2013; MISHRA *et al.*, 2014; TAN; ZHOU, 2006, YUE *et al.*, 2011). Estudos têm demonstrado que estas moléculas inibem o crescimento de células tumorais através da parada do ciclo celular e indução de apoptose (MA *et al.*, 2006;. MISHRA *et al.*, 2014;. YUE *et al.*, 2011). Dentre as espécies vegetais que produzem peptídeos cíclicos destacam-se as pertencentes às famílias: Caryophyllaceae, Linaceae, Annonaceae, Amaranthaceae, Rubiaceae e Euphorbiaceae (TAN; ZHOU, 2006).

Em 1989, o Instituto Nacional do Câncer (*National Cancer Institute-NCI*), nos Estados Unidos, desenvolveu um programa de triagem de compostos naturais e sintéticos com atividade anticâncer utilizando linhagens de células neoplásicas humanas. Ao longo dos anos, milhares de extratos vegetais foram selecionados

devido ao seu potencial anticâncer, e várias substâncias estruturalmente inéditas e biologicamente ativas foram isoladas e identificadas (SHOEMAKER, 2006).

No Brasil, apesar de existirem muitos estudos fitoquímicos e farmacológicos de plantas utilizadas pela população brasileira para diferentes fins medicinais, a maioria delas necessita de estudos científicos mais detalhados que suportem suas aplicações terapêuticas (YUNES; CALIXTO, 2001). Em relação às espécies encontradas no estado de Mato Grosso do Sul, diversas plantas ocorrentes nos Biomas Cerrado e Pantanal utilizadas na medicina tradicional vêm sendo estudadas na busca por novas substâncias bioativas, especialmente com potencial atividade anticâncer (FIGUEIREDO *et al.*, 2011; FIGUEIREDO *et al.*, 2014; GARCEZ *et al.*, 2005; GARCEZ *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2011; MATOS *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2015; SIMIONATTO *et al.*, 2009; SIMIONATTO *et al.*, 2010; SIMIONATTO *et al.*, 2011).

2.2 Plantas medicinais e o gênero *Croton*

O gênero *Croton* é um dos maiores da família Euphorbiaceae, com cerca de 1300 espécies de árvores, arbustos e ervas distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (WEBSTER, 1993; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). O gênero apresenta grande diversidade morfológica e ocupa uma grande variedade de habitats (MOTTA *et al.*, 2013); sendo classificado como o 11º maior gênero de angiospermas (FRODIN, 2004). Na América do Sul, o Brasil destaca-se por possuir a maior concentração de espécies do gênero (356 espécies) (LIMA; PIRANI, 2008).

Assim como na maioria das espécies de Euphorbiaceae, *Croton* pode conter látex, que é de cor vermelha em algumas espécies, uma característica normalmente associada a propriedades medicamentosas (RISCO *et al.*, 2003; SANDOVAL *et al.*, 2002). Espécies do gênero *Croton* são amplamente utilizadas na medicina popular. Entre as partes da planta utilizadas para fins medicinais encontram-se as folhas, cascas do caule e o látex (GUPTA; BLEAKLEY; GUPTA, 2008; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

Como constituintes químicos isolados das espécies de *Croton* é citado uma enorme diversidade de compostos biologicamente ativos como terpenos, flavonoides

e alcaloides (GUPTA; BLEAKLEY; GUPTA, 2008; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Muitas espécies de *Croton* produzem óleos essenciais ricos em mono e sesquiterpenoides, como também fenilpropanoides (PALMEIRA JÚNIOR *et al.*, 2006). Além destes metabólitos, foram isolados e caracterizados ciclopeptídeos das espécies *Croton gossypifolius* (QUINTYNE-WALCOTT; MAXWELL; REYNOLDS, 2007) e *Croton sparsiflorus* (MEHMOOD; MALIK, 2010).

O gênero é promissor em pesquisas de compostos naturais com atividades biológicas, tanto devido à diversidade de constituintes químicos, quanto pela importância farmacológica atribuída as suas espécies. Estudos realizados com espécies pertencentes a este gênero, também utilizadas na medicina popular, têm revelado resultados promissores quanto a suas atividades farmacológicas (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007) (Figura 2).

Figura 2 - Espécies de *Croton*, usos tradicionais e efeitos farmacológicos de partes das plantas e alguns compostos importantes isolados.

| Espécie | Uso tradicional | Atividades farmacológicas de diferentes partes da planta e/ou compostos relevantes isolados |
|---|--|--|
| <i>Croton arboreous</i> <i>C. cajucara</i> | Anti-inflamatório Diabetes, hipercolesterolemia, distúrbios digestivos, alterações hepáticas, perda de peso | Quatro sesquiterpenos → anti-inflamatória Óleo essencial da casca → cicatrização da úlcera gástrica, antileishmaniose; extrato aquoso da casca → redução do ganho de peso e maior sensibilidade dos adipócitos para isoprenalina e adrenalina; trans-crotonina, trans-desidrocrotonina; ácido acetilaleurítico → efeitos hipolipemidêmico e hipoglicêmico; trans-desidrocrotonina → anti-estrogênio, anticâncer; linalol → antibacteriana e antifúngica |
| <i>C. celtidifolius</i> <i>C. eluteria</i> | Inflamação, leucemia, úlceras, reumatismo Bronquite, febre, malária, digestivo, hipertensão | casca → anti-inflamatória e antioxidante Extratos da casca → estimulação da secreção gástrica |
| <i>C. kongensis</i> <i>C. lechleri</i> | Dismenorreia Hemostático, cicatrização de feridas, purgativo | Diterpenos secocauranos → citotóxica, anti-micobacteriana e anti-malarial Látex vermelho → anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana, antileucemia; SP-303 → anti-viral: vírus sincicial respiratório, herpes simplex, genital e anogenital |
| <i>C. macrostachys</i> <i>C. malambo</i> | Purgativo e diabetes Dor, reumatismo, inflamações, diarreia, diabetes, úlcera gástrica | Sementes e raízes → purgativa Extrato da casca → antinociceptiva e anti-inflamatória |
| <i>C. nepetaefolius</i> | Estomacal, flatulência, cólica intestinal, aperitivo | Óleo essencial → antiespasmódica; cineol, metileugenol → miorelaxante e antiespasmódica |
| <i>C. oblongifolius</i> | Muitas aplicações, incluindo alargamento do fígado, febre e platelmintos | Extrato → atividade antihepatotóxica; diterpenos → citotóxica |
| <i>C. palanostigma</i> | Inflamação intestinal, cicatrização de feridas, úlceras gástricas | Alcaloide taspina → citotóxica |
| <i>C. schiedeanus</i> | Hipertensão | Extrato aquoso e etanólico; quercetina-3,7-dimetil éter → vasorelaxante e anti-hipertensiva |
| <i>C. tonkinensis</i> | Dor de estômago, dispepsia, úlceras gástrica e duodenal, lepra, psoríase, urticária | Diterpenos → citotóxica |
| <i>C. sublyratus</i> | Anti-helmínticos e problemas dermatológicos | Plaunotol → atividade antiúlcera, anticâncer, antibacteriana |
| <i>C. urucurana</i> | Analgésico, inflamação, infecção cicatrização de feridas, câncer | Casca e látex vermelho → antidiarreica, antifúngica; catequina, ácido acetilaleurítico → antibacteriano; ácido acetilaleurítico → analgésica |
| <i>C. zambesicus</i> | Febre, malária, convulsões, hipertensão, infecções microbianas, disenteria | Folhas → citotóxica; diterpeno → citotóxica |
| <i>C. zehntneri</i> | Distúrbio nervoso, anorexia, distúrbio gastrointestinal, edulcorantes | Óleo essencial → relaxante muscular intestinal, efeito depressor central, antinociceptiva; anetol e estragol → relaxante muscular intestinal; anetol → anticâncer |

Fonte: Adaptado de Salatino; Salatino; Negri (2007).

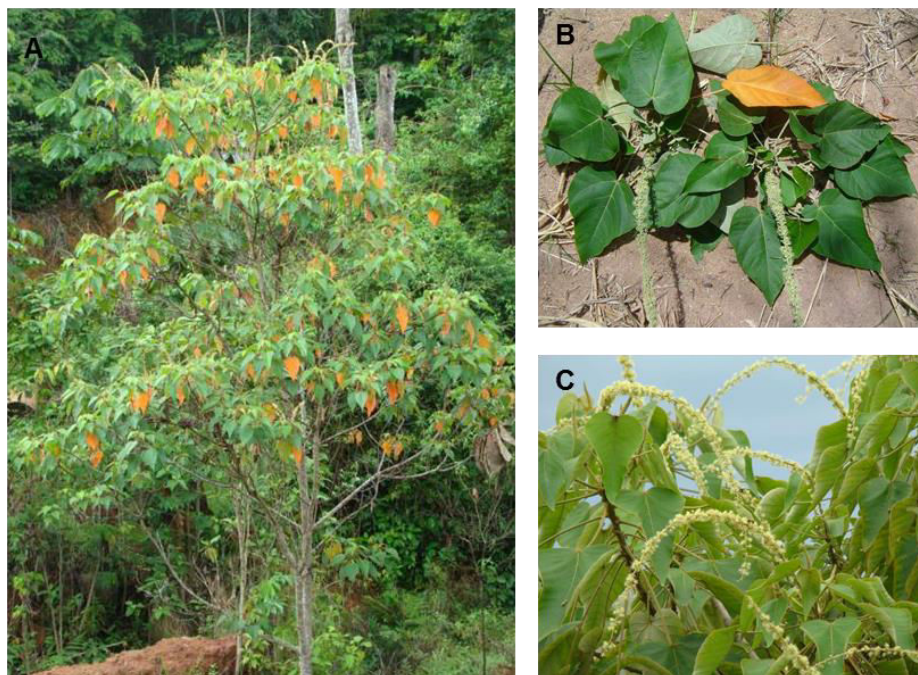
2.2.1 *Croton urucurana* Baillon

2.2.1.1 Características botânicas, farmacológicas e composição química

Croton urucurana Baillon é uma espécie arbórea nativa, pioneira, decídua, heliófita, encontrada frequentemente em matas ciliares de várias formações florestais (LORENZI, 2008). É característica de terrenos muito úmidos e pantanosos (LORENZI; MATOS, 2008), ocorrendo também em formações secundárias, como capoeiras e capoeirões (LORENZI, 2008). Esta espécie é endêmica em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul com ampla dispersão pelo Brasil, onde ocorre nos estados da Bahia, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (CORDEIRO, 1985 apud LIMA *et al.*, 2008; LORENZI, 2008).

Caracteriza-se como uma árvore de 6-8 m de altura, de copa aberta e tronco claro com cerca de 20 cm de diâmetro. Apresenta folhas em formato de coração que adquirem coloração vermelho-amarelada quando estão para cair, principalmente no outono, e flores pequenas e esbranquiçadas, dispostas em inflorescências espigadas terminais (LORENZI; MATOS, 2008) (Figura 3).

Figura 3 - A) Árvore de *Croton urucurana* Baill. B) Detalhe das folhas. C) Detalhe da florescência.



Fonte: www.arvores.brasil.nom.br/new/sangradagua/index.htm.

É uma das espécies do gênero *Croton* com casca contendo látex vermelho (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Quando seu caule é cortado ou ferido, libera uma seiva, que em contato com o ar, se torna resinosa e de cor vermelha como sangue e, por essa razão, *C. urucurana* e outras espécies do gênero são conhecidas popularmente como “sangra d’água” no Brasil (LORENZI; MATOS, 2008). Em espanhol são chamadas de “sangre de drago” ou “sangre de grado”, traduzido para inglês como “dragon’s blood” e “blood of the tree” (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007) (Figura 4).

Figura 4 - Extração do látex de “sangra d’água”. Tronco com corte “espinha de peixe”.



Foto: Cândido-Bacani, 2014.

A espécie *Croton urucurana* é usada na medicina popular devido a seus efeitos analgésico e anti-inflamatório. É usada também para tratar infecções, dor e para acelerar o processo de cicatrização de feridas e no tratamento de reumatismo, câncer e outras doenças (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007). Popularmente duas partes da planta são utilizadas, as cascas do caule e o látex (SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007; SIMIONATTO *et al.*, 2007). Esta espécie possui interessantes atividades farmacológicas descritas, incluindo cicatrizante (LORENZI, 2008; SILVA, 1999), antidiarreica (GURGEL *et al.*, 2001), antifúngica (GURGEL *et al.*, 2005), anti-hemorrágica (ESMERALDINO; SOUZA; SAMPAIO, 2005),

antioxidante (SIMIONATTO *et al.*, 2007), antinoceptiva (RAO *et al.*, 2007), antimicrobiana (PERES *et al.*, 1997; SIMIONATTO *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2008), citotóxica (SIMIONATTO *et al.*, 2009), inseticida (SILVA *et al.*, 2009), anti-inflamatória (MATTOS, 2001) e antiulcerogênica (CORDEIRO *et al.*, 2012; SILVA, 1999). Do ponto de vista da ecologia da restauração, esta espécie desempenha um papel muito importante na recuperação de áreas ciliares degradadas (LIMA *et al.*, 2008; LORENZI, 2008).

Estudos toxicológicos mostraram que o látex de *C. urucurana* apresenta alta toxicidade subcrônica por via oral em ratos Wistar (SILVA, 1999). Silva (1999) demonstrou que animais tratados com látex na dose de 1 mL/100g de peso corpóreo apresentaram insuficiência respiratória aguda e entraram em óbito 4 dias após sua administração oral. A toxicidade induzida pelo látex foi atribuída à presença do alcaloide taspina, que tem demonstrado potente atividade citotóxica para a linhagem celular neoplásica KB (carcinoma epidermóide de boca) e linhagem celular não tumoral V79 (fibroblasto de hamster chinês). Devido à alta toxicidade do látex não foi possível determinar a dose letal para 50% dos animais (DL_{50} ou LD_{50} , do inglês *Lethal Dose*) (SILVA, 1999). Entretanto, a avaliação da toxicidade aguda em camundongos albinos (*Mus musculus*) mostrou que o látex de *C. urucurana* apresentou baixa toxicidade após administração oral aguda, com uma DL_{50} de $5,20 \pm 0,13$ g/kg (GURGEL, 2000). Em teste de toxicidade subcrônica realizado por Mattos (2001), a administração oral de doses do látex entre 300 e 2000 mg/kg por 30 dias, não produziu qualquer sinal de toxicidade ou alteração nos parâmetros bioquímicos, hematológicos e nutricionais avaliados (MATTOS, 2001).

Os principais compostos biologicamente ativos destas plantas são taninos, lignanas (dimetilcedrusina) e um alcaloide denominado taspina, reconhecido com propriedades anti-inflamatória e antioxidante (LORENZI; MATOS, 2008). Muitos compostos como esteroides (β -sitosterol, β -sitosterol-3-O-glicósido, estigmasterol e campesterol), diterpenos (sonderianina) e compostos fenólicos (catequina e galocatequina) foram isolados das cascas do caule da planta. Estes apresentaram propriedades analgésicas, sendo a sonderianina ativa contra *Mycobacterium smigmatis* e *Staphylococcus aureus* (PERES *et al.*, 1997; PERES *et al.*, 1998a; PERES *et al.*, 1998b). É referido também o isolamento do ácido acetilaleuritólico e catequinas ativos contra *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhimurium* (PERES *et al.*, 1997).

A análise dos constituintes químicos do látex revelou a presença de saponinas, esteroides, alcaloides, taninos pirogálicos, taninos catequínicos, flavonoides e flavononas antocianinas e antocianidinas (GURGEL, 2000). Milo *et al.* (2002) descrevem a presença do polissacarídeo fucoarabinogalactana e da proantocianidina oligomérica SP-303 como principais constituintes do látex. Do látex de *C. urucurana* foi isolado e identificado o alcaloide taspina (MATTOS, 2001; SILVA, 1999), um composto ativo com propriedades terapêuticas (MONTOPOLI *et al.*, 2012).

A respeito da composição do óleo essencial de *C. urucurana* foram identificados como os principais constituintes do óleo das cascas do caule os monoterpenos: borneol, acetato de bornila, *o*-cimeno, terpineol e 1,8-cineol; e do óleo das folhas foi descrito a presença de sesquiterpenos, principalmente germacreno-D e biciclogermacreno. O óleo essencial das cascas do caule exibiu uma potente atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*. Essa potente atividade foi atribuída à presença de monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados, como por exemplo, o borneol encontrado em maior quantidade no óleo das cascas. Também foi relatada a atividade anticâncer dos óleos da casca e das folhas, sendo que o óleo das cascas apresentou atividade inibitória seletiva para linhagem de células leucêmicas humana (SIMIONATTO *et al.*, 2009).

As cascas de *C. urucurana* possibilitaram também o isolamento de dois diterpenos clerodânicos, sendo o clerodano 3-oxo-12-epibarbascoato de metila inédito na literatura e o diterpeno conhecido como 12-epibarbascoato de metila (PIZZOLATTI *et al.*, 2013).

2.3 Cultura de células

O cultivo celular é caracterizado por permitir a manutenção de células vivas *in vitro* a partir de explantes primários ou de suspensão de células dispersas, que podem ser cultivadas em monocamadas aderentes em um substrato sólido, ou em suspensão em meio de cultura de células, quando as células não aderem ao substrato (FRESHNEY, 2010). As culturas em suspensão são derivadas de tecidos

que não necessitam de ancoragem para proliferar e sobreviver, tais como às células hematopoiéticas, às linhagens transformadas ou às células de tecido tumoral. As células aderentes são oriundas de tecidos duros e, por isso, são dependentes de ancoragem e requerem uma superfície de contato para crescimento e proliferação (ALVEZ; GUIMARÃES, 2010).

A técnica de cultura de células foi estabelecida pela primeira vez no início do século XX com Harrison, em 1907, e Carrel, em 1912. Essa técnica foi desenvolvida como um método para estudar o comportamento de células animais livres de restrições impostas pelo ambiente que podem surgir, *in vivo*, tanto durante a homeostase normal e sob a tensão de uma experiência laboratorial (FRESHNEY, 2010). Nos anos de 1940 foi estabelecida a primeira linhagem de células normais de roedores e, em 1951, a partir dos trabalhos desenvolvidos por George Gey, a primeira linhagem de células de câncer humano contínuo (HeLa). A linhagem HeLa foi estabelecida a partir de células obtidas de câncer de colo uterino de uma mulher de mais de 50 anos (HALAMA, 2014; MASTERS, 2002).

Com o aprimoramento da cultura de células foi possível, em meados da década de 80, a manutenção de linhagens celulares oriundas de tumores humanos de diferentes órgãos (SHOEMAKER, 2006). Essas linhagens celulares são utilizadas em modelos laboratoriais e são fundamentais para estudar a biologia do câncer e para testar a terapêutica e a eficácia de compostos com atividade anticâncer (SHARMA; HABER; SETTLEMAN, 2010). Tais linhagens celulares podem ser facilmente encontradas em diversos bancos de cultura de células (Figura 5). Por exemplo, a *American Type Culture Collection* (ATCC), criada em 1962, é um dos maiores centros de recursos biológicos que oferecem linhagens celulares de mais de 150 espécies diferentes, incluindo cerca de 4000 linhagens de células humanas (HALAMA, 2014).

Figura 5 - Bancos fornecedores de linhagens celulares.

| Cell culture collection | Web site |
|---|---|
| American Type Culture Collection (ATCC) | http://www.atcc.org |
| Coriell Cell Repository | http://ccr.coriell.org |
| Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) | http://www.dsmz.de |
| European Collection of Animal Cell Cultures (ECACC) | https://www.phe-culturecollections.org.uk |
| National Institute of Biomedical Innovation JCRB Cell Bank | http://www.cellbank.nibio.go.jp |
| Innovation JCRB Cell Bank RIKEN BioResource Center | http://www.dna.brc.riken.jp/en/linken.html |
| Rio de Janeiro Cell Bank | http://www.bcrj.org.br |

Fonte: Adaptado de Halama (2014).

O método convencional de cultura de células em monocamadas, chamado de cultura em duas dimensões (2D) tem, segundo Rebello (2014) “contribuído enormemente para o conhecimento de diversos aspectos da fisiologia celular, da ação de fármacos e de hormônios e da interação com microrganismos”. O baixo custo e a rapidez na realização de diferentes testes em um reduzido intervalo de tempo fizeram da cultura de células em 2D um componente essencial dos programas de descoberta de drogas, especialmente no *screening* de compostos com potencial atividade anticâncer (GIESE *et al.*, 2002; MONKS *et al.*, 1991). As principais vantagens do uso de cultura de células incluem, o controle físico-químico do ambiente (pH, temperatura, pressão osmótica, tensão de CO₂ e O₂) e a manutenção constante das condições fisiológicas, além de reduzir o número de ensaios com animais (FRESHNEY, 2010).

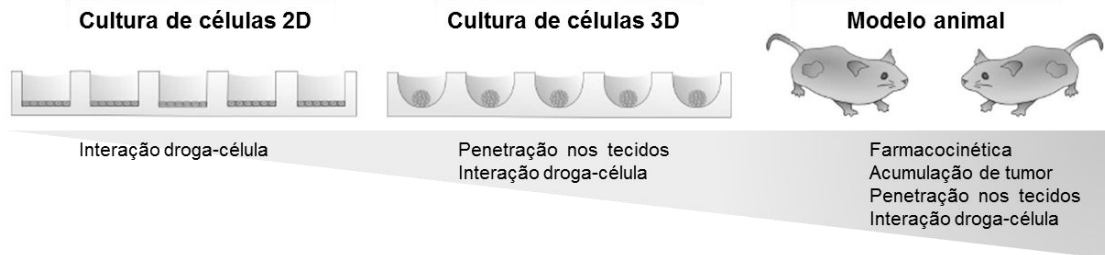
No entanto, as limitações da cultura de células em 2D tornam-se cada vez mais reconhecidas (SUN *et al.*, 2006). Nesse modelo de cultura, a adesão célula-célula e célula-matriz são reduzidas devido às restrições geométricas e mecânicas altamente antinaturais impostas sobre as células que não possuem as características (heterogeneidade e arquitetura tridimensional) de um tecido *in vivo*, uma vez que seu meio nutricional e hormonal está modificado (ALVEZ; GUIMARÃES, 2010; SUN *et al.*, 2006). Por conseguinte, as condições da cultura podem não refletir a situação *in vivo* para citotoxicidade e/ou resistência a drogas (SUN *et al.*, 2006).

Para contornar essas limitações, modelos de cultura de células cultivadas em ambiente tridimensional (3D) têm sido desenvolvidos, e as culturas em 3D podem ser uma ferramenta atraente para estudos toxicológicos mostrando a diferenciação celular elevada e a sobrevivência em longo prazo (HOWES *et al.*, 2014; MIKHAIL; EETEZADI; ALLEN, 2013; TUNG *et al.*, 2011; VINCI *et al.*, 2012). Modelos de cultura em 3D incluem sistemas de células em várias camadas, cultura celular em uma matriz em 3D, culturas tumorais *ex vivo* e esferoides tumorais multicelulares (YAMADA; CUKIERMAN, 2007). A utilização de geis de colágeno e sistemas multicomponentes mais complexos, tal como Matrigel, tornaram-se cada vez mais populares, uma vez que proporcionam às células uma matriz que representa mais precisamente a matriz extracelular (MEC) (BONNIER *et al.*, 2015).

A cultura de células em três dimensões (3D) “possibilita examinar a célula sob um aspecto morfológico e funcional que, de certo modo, se assemelha às condições existentes no tecido *in vivo*” (REBELLO, 2014). O modelo em 3D derivou-se inicialmente da cultura de células em duas dimensões (2D). As células cultivadas em plano bidimensional de plástico ou de vidro são planas e podem aderir e espalhar livremente no plano horizontal, mas não têm suporte para a propagação na dimensão vertical (BAKER; CHEN, 2012). Entretanto, o modelo em 3D permite que as células explorem as três dimensões do espaço tornando favorável a interação entre as células e o ambiente (AMARAL; MACHADO-SANTELLI, 2011).

A cultura de células em 3D, cada vez mais, está sendo reconhecida como um modelo alternativo ao modelo *in vivo* para melhor compreender a fisiopatologia de células tumorais, e para auxiliar na descoberta de novas terapias anticâncer (HOWES *et al.*, 2014; MIKHAIL; EETEZADI; ALLEN, 2013; SAHA; KHUDA-BUKHSH, 2013). Além disso, proporcionar um microambiente com adesão e proliferação adequadas permite uma investigação mais precisa da homeostase celular, diferenciação, proliferação e migração (BONNIER *et al.*, 2015; KIM, 2005). Como resultado, têm sido desenvolvidos modelos que refletem o microambiente de tumores de sólidos (HOWES *et al.*, 2014). Como representado na Figura 6 a cultura de células cultivada em 3D representa um ambiente intermediário em termos de morfologia celular e fisiologia entre a estrutura simplificada de culturas em monocamada (2D) e a natureza altamente complexa de tumores *in vivo* (MIKHAIL; EETEZADI; ALLEN, 2013).

Figura 6 - Cultura de células 3D como intermediária entre cultura de células 2D e modelo animal.



Fonte: Adaptado de Mikhail; Eetezadi; Allen (2013).

Entretanto, ensaios baseados em células cultivadas em 2D representam métodos valiosos para identificar rapidamente os compostos citotóxicos e, deste modo, desempenham cada vez mais um importante papel no processo de descoberta de drogas (GIDROL *et al.*, 2009). Adicionalmente, os modelos de cultura de células em 3D trazem um valor significativo para auxiliar na descoberta e desenvolvimento de novas terapias anticâncer e funcionam como uma ponte entre as culturas tradicionais em monocamada *in vitro* e os caros estudos com animais *in vivo* (HOWES *et al.*, 2014; PAMPALONI; REYNAUD; STELZER, 2007; WEIGELT; BISSELL, 2008; YAMADA; CUKIERMAN, 2007). Modelos animais são representantes mais precisos de ambiente tumoral, entretanto, são consideravelmente menos suscetíveis ao rastreamento em grande escala (GODUGU *et al.*, 2013).

2.4 Ensaios de citotoxicidade *in vitro*

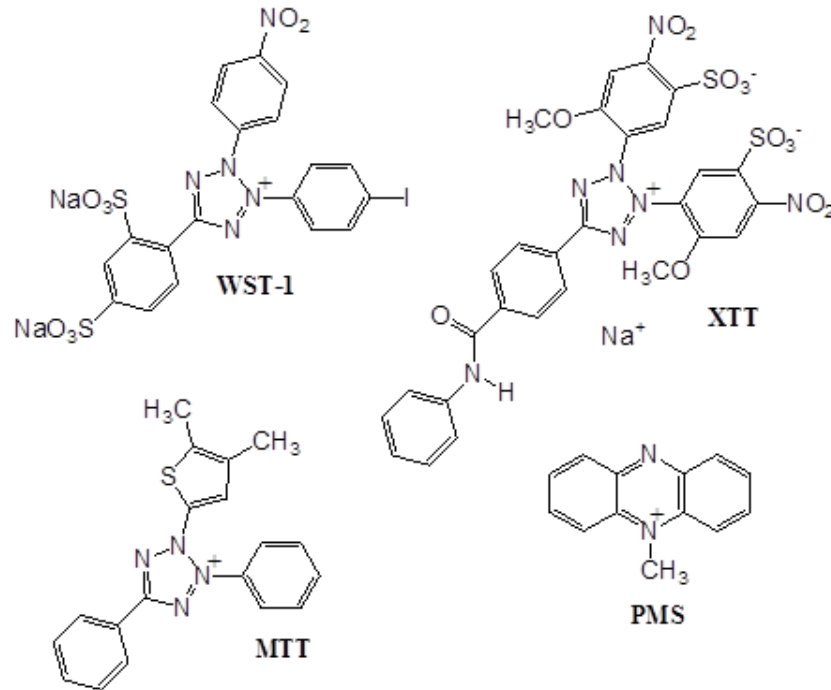
Os testes de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células são importantes para verificar a toxicidade de novos compostos, principalmente no estudo de sua aplicabilidade como agente terapêutico e, pelo menos durante a etapa de triagem, têm reduzido significativamente o número de testes *in vivo* em animais (HAMBURGER; HOSTETTMANN, 1991; MELO *et al.*, 2000).

No desenvolvimento de drogas anticâncer, um painel de linhagens celulares neoplásicas humanas é amplamente utilizado para avaliar os potenciais citotóxicos *in vitro* de um composto, sendo seus efeitos determinados por diferentes parâmetros: alterações na morfologia celular, viabilidade celular (utilizando corantes como o azul de tripan e a eosina), ensaios clonogênicos, ensaio de incorporação do vermelho neutro, medida de incorporação de nucleotídeos radioativos, marcadores de proliferação celular (Bromodeoxiuridina - BrdU) ou ensaios colorimétricos (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002; MONKS *et al.*, 1991; SUMANTRAN, 2011).

Os métodos colorimétricos *in vitro* têm sido amplamente utilizados para a triagem de compostos com atividade anticâncer, pois permitem a quantificação fácil e rápida da resposta celular (SKEHAN *et al.*, 1990). Ensaio que medem a atividade metabólica são adequados para a análise da viabilidade celular, proliferação e citotoxicidade (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; HASEN; BROSS, 2010; TSUKATANI *et al.*, 2009; VELLONEN; HONKAKOSKI; URTTI, 2004; WANG *et al.*, 2010; WANG; YU; WICKLIFFE, 2012). Uma variedade de sais de tetrazólio tem sido utilizada para medir a atividade metabólica de células viáveis, como o MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), XTT (2,3-bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-carboxanilide-2H-tetrazolium, monosodium salt), MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt) e WST-1 (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005; YIN *et al.*, 2013) (Figura 7).

Esses compostos são classificados em duas categorias básicas: 1) MTT que é carregado positivamente e penetra facilmente nas células eucarióticas viáveis e 2) aqueles, tais como o MTS, XTT e WST-1, que são carregados negativamente e não penetram facilmente nas células e, por essa razão, são utilizados em conjunto com um aceitador de elétrons intermediário, tais como o metassulfato de fenazina (PMS), (BERRIDGE; HERST; TAN, 2005).

Figura 7 - Estrutura química dos diferentes sais de tetrazólio e o aceitador de elétrons intermediário, metassulfato de fenazina (PMS).



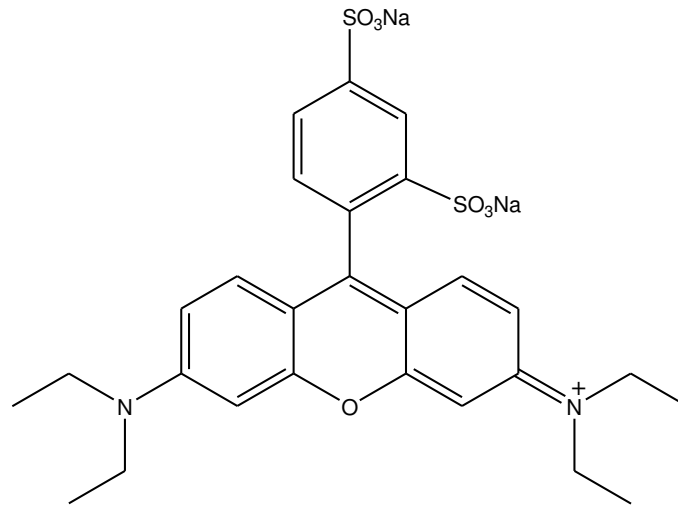
No teste do MTT, desenvolvido em 1983 por Mosmann, o sal de tetrazólio é facilmente incorporado por células viáveis (membrana permeável). O método se baseia na clivagem do sal de tetrazólio de coloração amarela em cristais de formazano de coloração roxa/púrpura por células metabolicamente ativas que reduzem este composto em suas mitocôndrias pela ação da enzima succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs (COLLIER; PRITSOS, 2003; SPINNER, 2001). O sal de tetrazólio não reage diretamente com a enzima succinato desidrogenase, mas com os produtos da reação NADH ou NADPH que reduzem o MTT em cristais de formazano (MACIEL *et al.*, 2002). Após a adição de dimetilsulfóxido (DMSO), os cristais são solubilizados e quantificados em espectrofotômetro (FISICHELLA *et al.*, 2009; SPINNER, 2001). A capacidade das células em reduzir o sal de tetrazólio MTT em cristais de formazano é interpretada como medidas de viabilidade celular e indica a atividade/integridade mitocondrial (MOSMANN, 1983).

Em princípio, o XTT, MTS e WST-1 funcionam de forma semelhante ao MTT. O WST-1 apresenta algumas vantagens. Em contraste ao teste do MTT, o formazano derivado do sal de tetrazólio WST-1 é solúvel em água, o que simplifica o tempo dos experimentos, uma vez que os resultados podem ser quantificados em até 2 horas após a adição do reagente WST-1, sem a necessidade de um passo adicional de solubilização por meio de solventes orgânicos (NGAMWONGSATIT *et al.*, 2008). O reagente WST-1 é sensível à luz e à temperatura e, por isso, deve-se tomar cuidado para reduzir a exposição à luz e manter a uma temperatura de 37° C durante as etapas de manipulação (FRANCOEUR; ASSALIAN, 1996).

Além dos sais de tetrazólio, destaca-se o teste da sulforrodamina B (SRB) amplamente utilizado pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) em sua rotina de triagem de substâncias com atividade anticâncer em larga escala, para medir a citotoxicidade e proliferação celular induzida por estas substâncias (HOUGHTON *et al.*, 2007; MONKS *et al.*, 1991; RUBINSTEIN; SHOEMAKER; PAULL, 1990; SKEHAN *et al.*, 1990). É um método simples, sensível, reprodutível, rápido e estável, o que faz com que não necessite de medições sensíveis ao tempo, tais como o MTT e WST-1 (HOUGHTON *et al.*, 2007). No teste SRB o corante utilizado é uma aminoxantina de coloração rosa-brilhante com dois grupos sulfônicos que se ligam aos resíduos básicos de aminoácidos sob condições ácidas, e dissociam-se sob condições básicas (VICHAI; KIRTIKARA, 2006) (Figura 8).

O princípio do teste SRB baseia-se na capacidade do corante sulforrodamina B se ligar eletrostaticamente aos resíduos de aminoácidos básicos de células fixadas com ácido tricloroacético (TCA). O corante fixado é solubilizado e quantificado em espectrofotômetro e a intensidade da coloração é proporcional à massa total de proteína e, portanto, correlacionada com o número de células vivas. Assim, o aumento ou diminuição da absorbância indica aumento ou inibição da proliferação celular. Quanto maior o número de células viáveis, maior a captação do corante e maior é o valor da absorbância (HOUGHTON *et al.*, 2007; SKEHAN *et al.*, 1990; VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

Figura 8 - Estrutura da SRB.



2.5 Morte celular - apoptose e necrose

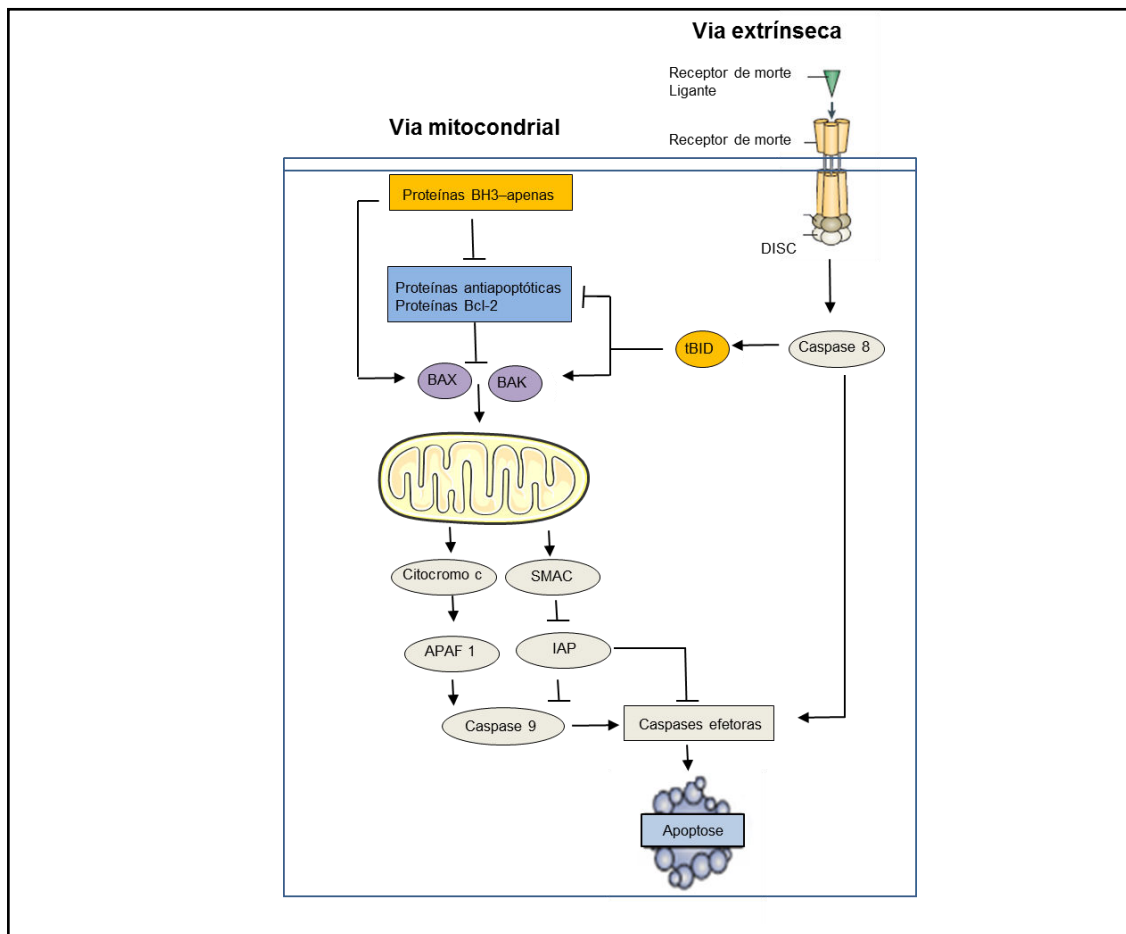
A apoptose e a necrose são processos de morte celular que apresentam características morfológicas e bioquímicas distintas (HENSON; TUNDE, 2008). Morfologicamente, a necrose é caracterizada pela vacuolização do citoplasma, perda da integridade da membrana plasmática, aumento do volume celular e consequente ruptura celular. Na necrose, o conteúdo celular é liberado para o espaço extracelular, resultando em uma resposta inflamatória e efeitos negativos para as células vizinhas (BRUIN; MEDEMA, 2008; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Diferentemente, a apoptose é uma forma de morte celular programada que desempenha um papel essencial tanto na manutenção de tecidos adultos como no desenvolvimento embrionário (COOPER; HAUSMAN, 2007). Durante a apoptose a célula sofre alterações morfológicas específicas, que são geneticamente reguladas por um conjunto de genes (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Tipicamente ocorre a retração da célula, alteração da integridade da membrana plasmática, perda de aderência com a matriz extracelular e células vizinhas, condensação da cromatina, fragmentação internucleossômica do DNA, formação dos corpos apoptóticos (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007; HASSAN *et al.*, 2014; REYNOLDS, 2014) e, eventual fagocitose das células apoptóticas por células

vizinhas e por macrófagos, sendo desta forma, efetivamente removidas dos tecidos (COOPER; HAUSMAN, 2007; REYNOLDS, 2014).

As duas principais vias de sinalização envolvidas no processo de apoptose em células animais são chamadas de via extrínseca (citoplasmática) e via intrínseca (mitocondrial), e são ativadas, respectivamente, por receptores de morte na superfície celular e da mitocôndria (HENGARTNER, 2000; ZHAO *et al.*, 2013). Ambas as vias apoptóticas levam à ativação de caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*), denominadas de caspases iniciadoras e caspases executoras (ou efectoras), tais como caspases -3, -6 e -7 responsáveis pela execução de eventos intracelulares que resultarão na morte celular por apoptose (GUPTA *et al.*, 2009; HAJRA; LIU, 2004; ZHANG; ONG; SHEN, 2004) (Figura 9).

Figura 9 - Vias de sinalização envolvidas na apoptose: via mitocondrial e via extrínseca.



Fonte: Adaptado e Traduzido com permissão de Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews|Molecular Cell Biology]. Czabotar *et al.*, (2014).

2.5.1 Via intrínseca

A via intrínseca pode ser desencadeada por sinais de “stress” intracelulares, incluindo danos no DNA, o estresse oxidativo ou ativação de oncogenes que conduzem a expressão de vários genes mitocondriais e consequente liberação do citocromo c (um componente da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais), do espaço intermembrana mitocondrial para o citosol (BRUIN; MEDEMA, 2008; GALLUZZI *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013).

A propagação do sinal apoptótico é regulada pelos membros da família de proteínas Bcl-2, o qual consiste em proteínas pró e antiapoptóticas (BRUIN; MEDEMA, 2008). Algumas proteínas Bcl-2 promovem a apoptose pelo aumento da liberação de proteínas próapoptóticas, enquanto as proteínas antiapoptóticas bloqueiam essa liberação e, conseqüentemente, inibem a apoptose. O balanço entre as atividades dessas duas classes de proteínas Bcl-2 é importante para determinar se células de mamíferos vivem ou morrem pela via intrínseca da apoptose (ALBERTS *et al.*, 2010).

Proteínas Bcl-2 proapoptóticas consistem em duas subfamílias - as proteínas BH123 e as proteínas BH3-*apenas* (como Bid, Bim, Bad, Noxa e Puma). As principais proteínas BH123 são Bax e Bak (ALBERTS *et al.*, 2010; CERTO *et al.*, 2006). Na presença de um estímulo apoptótico, proteínas BH3-*apenas* são ativadas e inibem a função das proteínas Bcl-2 antiapoptóticas (tais como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w e Mcl-1), permitindo assim, a ativação de proteínas próapoptóticas Bax e/ou Bak (BRUIN; MEDEMA, 2008; CERTO *et al.*, 2006; CZABOTAR *et al.*, 2014).

As proteínas próapoptóticas Bax e Bak são essenciais reguladores principalmente no controle da liberação do citocromo c e são conhecidas por induzir a permeabilização externa da mitocôndria através da formação de poros por oligomerização (KUWANA *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2001). Quando liberado no citosol, o citocromo c liga-se à proteína adaptadora de ativação da procaspase Apaf1 e conduz a formação de um complexo de subunidades múltiplas, conhecido como apoptossomo (PETROS; OLEJNICZAK; FESIK, 2004; RUPNARAIN *et al.*, 2004).

As proteínas Apaf1 no apoptossomo recrutam então proteínas procaspases iniciadoras (procaspase-9), as quais são ativadas por proximidade ao apoptossomo

(ALBERTS *et al.*, 2010; CZABOTAR *et al.*, 2014). Quando ativada, a prócaspase-9 ativa outras caspases executoras em cascata, tais como caspase-3 para induzir apoptose (CERTO *et al.*, 2006; ZHAO *et al.*, 2013).

Juntamente com a liberação do citocromo c, a proteína SMAC (*second mitochondria derived activator of caspases*) é liberada do espaço intermembrana mitocondrial para o citosol, ligando-se às proteínas inibidoras da apoptose ou IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Protein*) impedindo, desse modo, que estas exerçam seus papéis antiapoptóticos através da capacidade de inibir a atividade da caspase iniciadora -9 e das caspases efetoras -3 e -7 e portanto, permitindo a progressão da apoptose (CZABOTAR *et al.*, 2014; REUTER *et al.*, 2008).

2.5.2 Via extrínseca

A via extrínseca desempenha um papel fundamental na manutenção da homeostase dos tecidos, especialmente no sistema imune. Esta via é ativada através da ligação das proteínas de sinalização extracelular aos receptores de morte (DR, *Death receptor*) presentes na superfície da célula (VERMEULEN, van BOCKSTAELE, BERNEMAN, 2005).

Receptores de morte são proteínas transmembranas que contem um domínio extracelular de ligação ao ligante, um domínio transmembrana único e um domínio de morte intracelular, o qual é essencial para amplificar o sinal apoptótico. Os receptores são ativados pelos seus ligantes e pertencem à família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis factor*), da qual fazem parte, um receptor para o próprio TNF e o receptor de morte Fas (ALBERTS *et al.*, 2010; KRUEGER *et al.*, 2001).

Quando ativados pela ligação do ligante Fas, os domínios de morte nas caudas citosólicas dos receptores de morte Fas recrutam proteínas adaptadoras intracelulares, as quais por sua vez induzem a ativação de caspases iniciadoras (como por exemplo, caspase-8 e caspase-10) e formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC, *death-inducing signaling complex*). Quando ativadas, as caspases iniciadoras ativam caspases executoras para induzirem apoptose (ALBERTS *et al.*, 2010; BRUIN; MEDEMA, 2008). Além disso, em algumas

células, como por exemplo, os hepatócitos (tipo II), após formação do complexo DISC, a caspase-8 cliva a proteína pró-apoptótica BID presente no citosol gerando um fragmento truncado dessa proteína (tBid), que por sua vez amplifica o sinal apoptótico por meio da via mitocondrial (CZABOTAR *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2009).

Esta ativação é controlada pela proteína bloqueadora como c-FLIP (*cellular FLICE inhibitory proteins*) (BRUIN; MEDEMA, 2008; SAFA; DAY; WU, 2008). Essas proteínas se assemelham as caspases iniciadoras e têm a capacidade de competir com as caspases-8 e caspases-10 pelos sítios de ligação no complexo DISC, impedindo a ativação das caspases iniciadoras (ALBERTS *et al.*, 2010; KRUEGER *et al.*, 2001; SAFA; DAY; WU, 2008). Esse mecanismo é essencial na regulação da via extrínica da apoptose e ajuda a impedir a sua ativação inapropriada (ALBERTS *et al.*, 2010).

2.6 Ciclo celular

O ciclo celular representa uma série de eventos celulares sequenciais que permitem que a célula cresça e se prolifere. Em eucariotos, o ciclo celular é dividido em quatro fases sequenciais: G1 (G=intervalo 1, do inglês *gap*), S (S=síntese de DNA), G2 (G=intervalo 2) e M (M=mitose). As fases G1, S e G2 em conjunto são chamadas de interfase (ALBERTS *et al.*, 2010; SCHWARTZ; SHAH, 2005).

A fase G1 caracteriza-se pela síntese de proteínas reguladoras necessárias para a replicação do DNA. Quando a fase G1 é completada, a célula entra na fase S onde o DNA é duplicado. No final desta etapa a célula atinge a fase G2, durante a qual as proteínas do fuso mitótico e outros componentes celulares necessários para a mitose são sintetizados (COOPER; HAUSMAN, 2007). A mitose compreende dois eventos principais: a divisão nuclear, ou mitose, durante a qual ocorre a duplicação dos cromossomos e a sua distribuição aos núcleos-filhos; e a divisão citoplasmática, ou citocinese, que corresponde à divisão da célula em duas (ALBERTS *et al.*, 2010). Na ausência de proliferação, as células entram em estado fisiológico de quiescência, denominado de G0 (ROBBINS *et al.*, 2005).

A progressão apropriada através do ciclo celular é um processo altamente regulado em eucariotos por mecanismos denominados de pontos de verificação (*checkpoints*) (ALBERTS *et al.*, 2010; KHODJAKOV; RIEDER, 2009). Em cada ponto de verificação, numerosas proteínas envolvem-se em uma série de reações bioquímicas cuidadosamente coordenadas. Essa complexidade permite uma regulação precisa de todas as fases do ciclo celular e é essencial para garantir que a fase anterior seja completada sem erros (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008; KHODJAKOV; RIEDER, 2009).

Na maioria das células eucarióticas, três principais pontos de verificação estão envolvidos no controle da progressão do ciclo celular: (1) o ponto de verificação que ocorre no final da fase G1 é regulado principalmente por fatores de crescimento extracelulares e sinalizam se o ambiente é favorável para a proliferação celular antes de se comprometer com a fase S, (2) o ponto de verificação G2/M impede a entrada na mitose até que o DNA danificado seja reparado e a replicação do DNA seja concluída livre de erros, e (3) o ponto de verificação funciona durante a mitose entre a metáfase e anáfase e assegura a fixação adequada dos cromossomos replicados para os fusos mitóticos levando à conclusão da mitose e da citocinese (ALBERTS *et al.*, 2010; COOPER; HAUSMAN, 2007; KASTAN; BARTEK, 2004).

O sistema de controle responde a vários sinais intracelulares e extracelulares e interrompe o ciclo quando a célula encontra condições ambientais ou intracelulares desfavoráveis ou a célula falha em completar um processo essencial do ciclo celular como, por exemplo, a replicação do DNA (ALBERTS *et al.*, 2010; MALUMBRES; BARBACID, 2009). Nesse momento, ocorre a transcrição de genes que facilitam o processo de reparo (ELLEDDGE, 1996).

2.6.1 Controle da progressão do ciclo celular

Das muitas proteínas envolvidas na regulação da progressão do ciclo celular, as cinases dependentes de ciclina (CDK, *Cyclin Dependente Kinases*) estão entre as mais importantes. CDKs são enzimas multifuncionais que requerem a associação com uma subunidade reguladora, a ciclina, para a sua ativação (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008; MALUMBRES; BARBACID, 2009; SCHWARTZ; SHAH, 2005). O complexo ciclina-CDK é regulado tanto positiva quanto negativamente por fosforilação (ELLEGE, 1996).

As CDKs em associação com as ciclinas tendem a atuar em etapas específicas do ciclo celular. As CDKs existem em quantidades semelhantes ao longo das fases do ciclo, enquanto que a expressão das diferentes ciclinas varia em função da fase do ciclo celular, e a progressão do ciclo é dependente da síntese de novas moléculas de ciclina (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008; O'CONNOR; ADAMS, 2010; SCHWARTZ; SHAH, 2005). Quando os níveis de ciclinas diminuem, as CDKs correspondentes tornam-se inativas. A degradação das ciclinas é igualmente importante para que a progressão através do ciclo celular ocorra, e este processo ocorre pela ação de enzimas específicas que quebram as ciclinas em momentos definidos no ciclo celular (O'CONNOR; ADAMS, 2010).

Em eucariotos existem três classes de ciclinas, cada uma definida pelo estágio do ciclo celular no qual se ligam às Cdk e em que funcionam.

1. As **G1/S-ciclinas** ativam Cdk no final de G1 e, com isso, ajudam a desencadear a progressão ao Início, resultando no comprometimento à entrada no ciclo celular. Seus níveis caem na fase S.
2. As **S-ciclinas** se ligam a Cdk logo após a progressão ao Início e ajudam estimular a duplicação dos cromossomos. Os níveis das S-ciclinas permanecem elevados até a mitose, e essas ciclinas também contribuem ao controle de alguns eventos mitóticos iniciais.
3. As **M-ciclinas** ativam Cdk que estimulam a entrada na mitose no ponto de verificação G2/M (ALBERTS *et al.*, 2010, p.1062).

As células eucarióticas contêm diferentes tipos e números de CDKs. Por exemplo, as leveduras tem apenas uma única CDK, enquanto que nos vertebrados quatro CDKs (CDK1, CDK2, CDK4 e CDK6) são consideradas como sendo as principais reguladoras do ciclo celular e contribuem para a indução e ou progressão

das fases G1/S (CDKs 4 e 6), S (CDK2) e G2/M (CDK1) (DAVIDSON; NIEHRS, 2010; HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008).

Em resposta a estímulos mitóticos ou fatores de crescimento extracelulares, a expressão das ciclinas D (ciclinas D1, D2 e D3) é aumentada. Estas ciclinas associam-se as CDK4 e CDK6 e formam complexos ativos que promovem a entrada no ciclo celular em G1 (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Posteriormente, a entrada na fase S é regulada pelo complexo ciclina E-CDK2 (HOCHEGGER; TAKEDA; HUNT, 2008; POEHLMANN; ROESSNER, 2010). Durante esta etapa ocorre um aumento da expressão da ciclina A, que em conjunto com CDK2 permite que a síntese de DNA ocorra. O complexo ciclina A-CDK2 é então responsável pela progressão através da fase S (PINTO; FELZENSZWALB, 2003; POEHLMANN; ROESSNER, 2010).

A progressão de G2 para mitose requer a atividade de CDK 1. Durante o final da fase S e ao longo da fase G2, as células se preparam para entrar na mitose, aumentando desse modo, os níveis de ciclinas A e B (SCHWARTZ; SHAH, 2005). Com o aumento dos níveis das ciclinas A e B, formam-se os complexos ciclina A-Cdk1 e ciclina B-Cdk1, que são responsáveis pela fosforilação de substratos, tais como o citoesqueleto, histonas e proteínas do envelope nuclear (KARP, 2010; SCHWARTZ; SHAH, 2005).

Ao final da mitose, vários mecanismos são responsáveis por suprimir a atividade das Cdk, resultando em um período estável de G1 (ALBERTS *et al.*, 2010). Além disso, as Cdk são ainda reguladas por ligação aos inibidores de CDKs (CKIs), que modificam a sua especificidade, bloqueando, desse modo, sua atividade de cinase (ELLEDEGE, 1996).

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade citotóxica de extratos, frações e da substância isolada da espécie *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) - “sangra d’água” e investigar o mecanismo de ação de morte celular *in vitro* para a substância isolada.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* de extratos da casca do caule e do látex em seis linhagens de células neoplásicas humanas;
- Selecionar o extrato que apresentar resultados significativos na triagem inicial e submetê-lo ao estudo fitoquímico guiado pela atividade citotóxica frente a seis linhagens de células neoplásicas humanas, a fim de isolar e identificar a substância ativa presente no extrato de interesse;
- Avaliar a seletividade da substância isolada em uma linhagem de células não neoplásicas;
- Avaliar os mecanismos celulares *in vitro* responsáveis pela citotoxicidade da substância isolada considerando seu potencial apoptótico e influência sobre a progressão do ciclo celular em uma linhagem de hepatocarcinoma celular humano (Huh-7), bem como, os efeitos desta substância sobre a migração e viabilidade de células Huh-7 cultivadas em geis de colágeno em 3D.

CAPÍTULO I:
CYTOTOXIC ORBITIDE FROM THE LATEX OF *CROTON*
URUCURANA

Artigo publicado na Journal of Natural Products, 78: 2754–2760, 2015
DOI:10.1021/acs.jnatprod.5b00724

Cytotoxic Orbitide from the Latex of *Croton urucurana*

Priscila de M. Cândido-Bacani,^{†,‡} Patrícia de O. Figueiredo,[†] Maria de F. C. Matos,[‡]
Fernanda R. Garcez,[†] and Walmir S. Garcez,^{*,†}

[†]Instituto de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande,
MS 79074-460, Brazil

[‡]Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso
do Sul, Campo Grande, MS 79070-900, Brazil

ABSTRACT: The bioactive ethyl acetate phase obtained from the latex of *Croton urucurana* Baillon afforded a novel orbitide (**1**), [1–9-N_αC]-crouorb A1, that proved active against NCI-ADR/RES (ovary, multidrug-resistance phenotype) cells with the same potency as doxorubicin (positive control) and inactive up to the highest concentration tested against nontumor NIH/3T3 cells. The structure elucidation was based on 1D and 2D NMR spectroscopy, further supported by HRESIMS data and by application of Marfey's method for determination of the absolute configuration of its amino acid residues. This is the first orbitide obtained from *C. urucurana*.

The genus *Croton* (Euphorbiaceae) comprises about 1300 species of herbs, shrubs, and trees found in tropical and subtropical regions.^{1,2} Some of these species have red-colored latex, popularly associated with having therapeutic properties,^{3,4} a feature that may have led to its popular names of “dragon’s blood”, “sangre de drago”, and, in Brazil, “sangra-d’água”.⁵ Phytochemical studies from the latex of some Euphorbiaceae species have led to the isolation of a large number of biologically active constituents, namely, caryophyllaceae-type cyclopeptides.^{6,7} This class of compounds was recently redefined as orbitides^{8,9} and has attracted much attention due to their important biological activities, such as cytotoxic activity against several human cancer cell lines,^{6,7} thus making them a class of promising therapeutic molecules.

Croton urucurana Baillon, one of the “sangra-d’água”, exhibits a wide range of pharmacological and biological properties.^{5,10-15} This plant is commonly found in Mato Grosso do Sul State (midwestern Brazil), where its latex is popularly used to treat several types of cancer. Despite the ethnopharmacological significance of the species, no phytochemical or cytotoxic studies of its latex have been published.

As part of an ongoing research program to discover potential anticancer compounds from plants of midwestern Brazil (Cerrado and Pantanal biomes), this article reports the isolation of a novel orbitide (**1**) from the latex of a specimen of *C. urucurana*, as well as the determination of its cytotoxicity against a panel of human cancer cell lines using the sulforhodamine B (SRB) assay.

RESULTS AND DISCUSSION

The phytochemical investigation of *C. urucurana* was guided by the cytotoxic activity (detected using the SRB assay) exhibited against 786-0 (kidney carcinoma), HT-29 (colon carcinoma), NCI-ADR/RES (ovary adenocarcinoma, multidrug-resistance phenotype), MCF-7 (breast adenocarcinoma), PC-03 (prostate carcinoma), and Hep-G2 (hepatocellular carcinoma).

We initially examined the EtOH extract obtained from bark, which proved inactive ($GI_{50} > 250 \mu\text{g mL}^{-1}$), and also the latex, which proved cytotoxic against all the cancer cell lines investigated (Table 1). The latex was therefore selected for further cytotoxicity-guided isolation and phase-partitioned between MeOH-H₂O and hexane and subsequently between MeOH-H₂O and EtOAc. Of the six fractions partitioned from the bioactive EtOAc phase, fraction 2 (F2) was the most active

against 786-0 ($GI_{50} = 5.42 \mu\text{g mL}^{-1}$) and NCI-ADR/RES ($GI_{50} = 3.93 \mu\text{g mL}^{-1}$) cells (Table 1). Further fractionation of F2 led to isolation and structure elucidation of cytotoxic compound **1**, its major constituent. Table 1 depicts the cytotoxicity results obtained for **1** and the foregoing extracts, phases, and fractions.

HRESIMS of **1** showed an $[M+H]^+$ ion at m/z 817.4199, compatible with the molecular formula $C_{37}H_{57}N_{10}O_{11}$ (calcd for $C_{37}H_{57}N_{10}O_{11}$, m/z 817.4203). ^{13}C NMR data revealed four signals for a benzene ring [δ_{C} 126.6, 128.3 ($\times 2$), 129.4 ($\times 2$), 137.2], in addition to signals between δ_{C} 60.1 and 15.9 and 10 signals between δ_{C} 174.4 and 169.2. These 10 signals, attributable to amide carbonyl resonances, suggested that **1** is a peptide. The ^1H NMR spectrum was consistent with this possibility, based on resonances between δ_{H} 5.05 and 0.82 and on a group of signals between δ_{H} 8.84 and 7.00, characteristic of hydrogens linked to amide nitrogens (or peptide linkages) and of aromatic hydrogens (Table 2).

2D NMR experiments not only corroborated the foregoing inference, but also led to identification of nine amino acid residues: three glycines (G_a , G_b , G_c), two leucines (L_a , L_b), one phenylalanine (F), one asparagine (N), one alanine (A), and one serine (S) (Table 2).

The absolute configurations of the A, F, L, and S residues were identified as L(S) using Marfey's method.¹⁶ On the basis of NOE data, the configuration of the N residue was determined to be L(S). This finding is in agreement with studies showing that all cyclic peptides isolated from *Croton* species,^{17,18} and likewise from other Euphorbiaceae,¹⁹⁻³¹ consist exclusively of L amino acids.

On the basis of correlations observed in the COSY ^1H - ^1H and NOESY spectra, the cyclic nature of this peptide and its amino acid residue sequence were identified (Figure 1). Noteworthy in the former experiment were the correlations observed between the amino acid H_{α} and its NH group, which permitted all hydrogens of each amino acid residue to be assigned. Likewise, the NOESY correlations among NH groups facilitated definition of the other amino acids immediately preceding or succeeding each residue. A detailed analysis of these data (Table 2) revealed the amino acid sequence in **1** as being (cyclo)- $G_aSL_aG_bAFG_cNL_b^-$.

Table 1. In Vitro Cytotoxicity (GI₅₀) of Latex Extracts, Phases, Fractions, and Compound 1 from *Croton urucurana* against Six Human Cancer Cell Lines.^a

| | | cell line and GI ₅₀ (μg/mL ⁻¹) | | | | | |
|--------------------|-----------------------------------|---|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|
| sample | | 786-0 | HT-29 | MCF-7 | ADR/RES | Hep-G2 | PC-03 |
| bark | EtOH extract | >250 | >250 | NT ^b | NT | >250 | >250 |
| latex | latex | 34.92±1.39 | 29.04±2.26 | 21.28±1.27 | 25.82±6.72 | 26.80±7.57 | 39.59±3.52 |
| | hexane phase | 30.17±7.42 | 39.76±4.92 | 20.83±1.75 | 33.01±5.30 | 207.17±6.33 | 41.92±1.67 |
| | EtOAc phase | 30.54±4.48 | 27.64±4.31 | 19.35±2.41 | 22.68±7.00 | 38.19±4.14 | 28.84±3.10 |
| | MeOH-H ₂ O phase | 20.55±2.17 | 29.87±5.56 | 24.07±3.49 | 23.68±3.27 | 28.56±7.71 | 32.58±6.40 |
| EtOAc phase | F1 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 | >250 |
| | F2 | 5.42 ±0.34 | 42.89 ±1.76 | 48.79 ±0.94 | 3.74±0.14 | 82.95±1.40 | 36.69 ±5.21 |
| | F3 | 38.92±5.59 | >250 | 36.54±7.96 | 41.78±6.68 | >250 | >250 |
| | F4 | 55.51 ±3.25 | 37.18 ±5.01 | 18.23 ±4.20 | 14.79±1.10 | 38.33±4.09 | 35.56 ±4.87 |
| | F5 | 51.65 ±2.89 | 27.84 ±0.11 | 23.90 ±3.99 | 22.29±6.02 | 34.98±1.89 | 33.29 ±0.42 |
| | F6 | 59.61 ±3.34 | 29.90 ±3.21 | 21.34 ±1.72 | 38.67 ±0.65 | 39.43±0.52 | 35.47 ±2.84 |
| F2 | [1—9-NαC]-crouorb A1 (1) | 18.69±0.82 | 37.28±0.57 | 35.49±2.59 | 3.98±0.20 | 41.31±2.70 | 29.80±0.34 |
| | doxorubicin ^b | 0.15±0.12 | 0.85±1.01 | 0.07±0.06 | 3.00±0.43 | 0.25±0.01 | 0.22±0.03 |

^aGI₅₀: concentration that inhibits cell growth by 50%. Cancer cell lines: 786-0 (kidney), HT-29 (colon), MCF-7 (breast), NCI-ADR/RES (ovary, multidrug-resistance phenotype), Hep-G2 (hepatocellular), and PC-03 (prostate). NT: not tested. Doxorubicin was the positive control. Values represent means obtained from three independent experiments, each run in triplicate.

Table 2. 1D and 2D NMR Data for [1–9-NaC]-Crouorb A1 (1) in DMSO-*d*₆.^a

| C/H | δ_C | δ_H | HMBC H-C | NOE | COSY ¹ H- ¹ H |
|----------------------------------|------------|--|--|--|--|
| Glycine A (G_a) | | | | | |
| NH | | 8.57, br s | | 8.84 SNH , 3.88 Sα , 3.59 G_aα' , 3.76 G_aα , 7.22 LB2 | 3.59 G_aα' , 3.76 G_aα |
| α α' | 42.81 | 3.76 overlapped 3.59 dd, <i>J</i> 17.0, 4.6 Hz | 169.19 G_aCO | 8.57 G_aNH , 7.22 LB NH 7.22 LB NH | 8.57 G_aNH , 3.59 G_aα' 8.57 G_aNH , 3.76 G_aα |
| CO | 169.19 | | | | |
| Serine (S) | | | | | |
| NH | | 8.84, br s | | 4.55 L_aα , 8.57 G_aNH , 3.88 Sα , 7.33 L_aNH | 3.88 Sα |
| OH | | 5.05, t <i>J</i> 6.0 Hz | | | 3.69 Sβ , Sβ' |
| β , β' | 60.12 | 3.69 (2H), m | 174.71 SCO | | 5.05 SOH , |
| α | 58.11 | 3.88, t <i>J</i> 6.0 Hz | 174.71 SCO | 8.84 SNH | 8.84 SNH |
| CO | 174.41 | | | | |
| Leucine A (L_a) | | | | | |
| NH | | 7.33, br s | | 1.75 L_aβ , 1.45 L_aβ' , 1.53 L_aγ , 4.55 L_aα , 3.82 G_bα , 3.43 G_bα' , 7.97 G_bNH , 8.84 S NH | 4.55 L_aα |
| δ | 23.16 | 0.90, <i>d</i> , <i>J</i> 6.5 Hz | 21.39 L_aδ' , 39.80 L_aβ | 0.82 L_aδ' , 1.53 L_aγ | 1.53 L_aγ |
| δ' | 21.39 | 0.82, <i>d</i> , <i>J</i> 6.5 Hz | 23.16 L_aδ , 39.80 L_aβ | 0.90 L_aδ , 4.55 L_aα | 1.53 L_aγ |
| γ | 24.10 | 1.53, m | | 0.90 L_aδ | 0.90 L_aδ , 0.82 L_aδ' |
| β | | 1.75, br t <i>J</i> 12.0 Hz | 170.97 L_aCO , 50.35 L_aα | 7.33 L_aNH , 1.45 L_aβ' , 4.55 L_aα | 4.55 L_aα , 1.45 L_aβ' |
| β' | 39.80 | 1.45, br dd <i>J</i> 12.0, 8.4 Hz | 170.97 L_aCO , 50.35 L_aα | 7.33 L_aNH , 1.75 L_aβ α , 4.55 L_aα | 4.55 L_aα , 1.75 L_aβ |
| α | 50.35 | 4.55 ddd <i>J</i> 11.4, 8.4, 2.8 Hz | 170.97 L_aCO | 1.45 L_aβ' , 1.75 L_aβ , 0.82 L_aδ' , 7.33 L_aNH , 8.84 SNH | 7.33 L_aNH , 1.75 L_aβ , 1.45 L_aβ' |
| CO | 170.97 | | | | |
| Glycine B (G_b) | | | | | |
| NH | | 7.97, t <i>J</i> 5.9 Hz | | 3.82 G_bα , 3.43 G_bα' , 7.33 L_aNH , 8.52 ANH , 1.22 Aβ | 3.82 G_bα , 3.43 G_bα' |
| α α' | 43.08 | 3.82, overlapped 3.43, dd <i>J</i> 17.5, 5.9 Hz | 169.22 G_bCO 169.22 G_bCO | 7.97 G_bNH , 7.33 L_aNH 7.97 G_bNH , 7.33 L_aNH | 7.97 G_b NH , 3.43 G_bα' 7.97 G_bNH , 3.82 G_bα |
| CO | 169.22 | | | | |
| Alanine (A) | | | | | |
| NH | | 8.52, br s | | 4.24 Fα , 3.80 Aα , | 3.80 Aα |

| | | | | | | |
|-------------------------------------|----------|------------------------------|---------------------------|---|--|-------------------------------|
| Phenylalanine (F) | β | 15.89 | 1.22, d J 7.1 Hz | 49.60 $A\alpha$, 171.93 ACO | 7.97 G_bNH , 7.58 FNH , 1.22 $A\beta$ 8.52 ANH , 7.97 G_bNH , 3.80 $A\alpha$ | 3.80 $A\alpha$ |
| | α | 49.60 | 3.80, overlapped | 171.93 ACO | 1.22 $A\beta$ | 8.52 ANH , 1.22 $A\beta$ |
| | CO | 171.93 | | 3.80 2 | | |
| | NH | | 7.58, d 6.0 Hz | | 8.31 G_cNH , 8.52 ANH , 3.08 $F\beta$, 3.03 $F\beta'$, 4.24 $F\alpha$, 3.93 $G_c\alpha$, 3.19 $G_c\alpha'$ | 4.24 $F\alpha$ |
| | 4' | 126.65 | 7.22 overlapped | 129.39 $F2',6'$ | | |
| | 3',5' | 128.32 | 7.28 overlapped | 137.24 $F1'$, 129.39 $F2',6'$ | | |
| | 2',6' | 129.39 | 7.28 overlapped | 126.55 $F4'$, 128.32 $F3',5'$, 137.24 $F1'$ | | |
| | 1' | 137.24 | | | | |
| | β | 35.99 | 3.08, dd J 13.5, 7.2 Hz | 129.39 $F2',6'$, 137.25 $F1'$ | 4.24 $F\alpha$, 7.58 FNH | 4.24 $F\alpha$ |
| | β' | | 3.03, dd J 13.5, 8.4 Hz | 129.39 $F2',6'$, 137.25 $F1'$ | 4.24 $F\alpha$, 7.58 FNH | 4.24 $F\alpha$ |
| α | 56.03 | 4.24, br q J 7.2 Hz | 173.06 $F1$ | 7,58 FNH , 8.52 ANH , 3.08 $F\beta$, 3.03 $F\beta'$ | 7.58 FNH , 3.08 $F\beta$, 3.03 $F\beta'$ | |
| CO | 173.06 | | | | | |
| Glycine C (G_c) | | | | | | |
| NH | | 8.31, m | | 7.58 FNH , 4.28 $N\alpha$, 3.93 $G_c\alpha$, 3.19 $G_c\alpha'$ | 3.93 $G_c\alpha$, 3.19 $G_c\alpha'$ | |
| α | | 3.93 dd J 16.8, 7.4 Hz | 170.27 G_cCO | 3.19 $G_c\alpha'$, 8.31 G_cNH , 7.58 FNH | 8.31 G_cNH , 3.19 $G_c\alpha'$ | |
| α' | 42.91 | 3.19, dd J 16.8, 3.4 Hz | | 3.93 $G_c\alpha$, 8.31 G_cNH , 7.58 FNH | 8.31 G_cNH , 3.93 $G_c\alpha$ | |
| CO | 170.27 | | | | | |
| Asparagine (N) | | | | | | |
| NH | | 8.22, brd J 6.3 Hz | | 4.28 $N\alpha$, 4.40 $L_b\alpha$, 7.22 L_bNH | 4.28 $N\alpha$ | |
| NHa | | 7.00, br s | 172.67 $N\gamma CO$ | 7.52 $NNHb$, 2.62 $N\beta'$, 2.85 $N\beta$ | 7.52 $NNHb$ | |
| NHb | | 7.52, br s | 172.67 $N\gamma CO$ | 7.00 $NNHa$, 2.62 $N\beta'$, 2.85 $N\beta$ | 7.00 $NNHa$ | |
| γCO | 172.67 | | | | | |
| β | | 2.85, br dd J 15.9, 5.9 Hz | 172.37 NCO | 4.28 $N\alpha$, 8.22 NNH , 7.00 $NNHa$, 7.52 $NNHb$ | 4.28 $N\alpha$, 2.62 $N\beta'$ | |
| β' | 35.59 | 2.62, dd J 15.9, 7.0 Hz | 172.37 NCO | 4.28 $N\alpha$, 8.22 NNH , 7.00 $NNHa$, 7.52 $NNHb$, | 4.28 $N\alpha$, 2.85 $N\beta$ | |
| α | 51.05 | 4.28, br q J 6.5 Hz | 172.37 NCO | 8.22 NNH , 2.85 $N\beta$, 2.62 $N\beta'$, 8.31 G_cNH | 8.22 NNH , 2.62 $N\beta'$, 2.85 $N\beta$ | |

| | | | | | |
|----------------------------------|--------|---------------------------|--------------------------|---|--|
| CO | 172.37 | | | | |
| Leucine B (L_b) | | | | | |
| NH | | 7.22 overlapped | | 8.22 NNH, 8.57 G _a NH, 4.40 L _b α, 3.76 G _a αα, 3.59 G _a α' | 4.40 L _b α |
| δ | 23.42 | 0.85, <i>d</i> , J 6.6 Hz | 21.16 L _b δ', | 1.60 L _b γ, 4.40 L _b α, 4.55 Nα | 1.60 L _b γ |
| δ' | 21.29 | 0.84, <i>d</i> , J 6.6 Hz | 23.42 L _b δ | 1.60 L _b γ, 4.40 L _b α | 1.60 L _b γ |
| γ | 23.60 | 1.60, <i>m</i> | | 0.85 L _b δ, 0.84 L _b δ' | 0.85 L _b δ, 0.84 L _b δ' |
| β, β' | 39.20 | 1.67, <i>m</i> | | 4.40 L _b 2 | 4.40 L _b 2 |
| α | 51.12 | 4.40, <i>m</i> | 172.66 L _b CO | 7.22 L _b NH, 8.22 NNH, 1.67 L _b β,β', 0.84 L _b δ' | 7.22 L _b NH, 1.67 L _b β,β' |
| CO | 172.66 | | | | |

^a Recorded at 300.13/75.47 MHz. Chemical shifts referenced to residual DMSO.

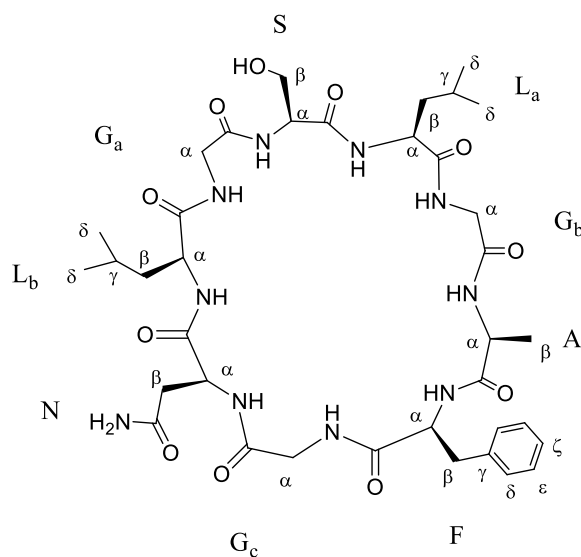


Figure 1. [1–9-NaC]-crouororb A1 (1), the orbitide [(cyclo)-G_aSL_aG_bAFG_cNL_b-] isolated from the latex of *Croton urucurana*.

Characterization of **1** was also confirmed by its HRESIMS/MS data, which showed fragments consistent with the proposed sequence of amino acid residues (Table 3). The fragmentations of cyclic peptides are dominated by the b_x-y_z pathway, in which ring opening takes place via oxazolone formation, resulting in linear peptide ions having a free N-terminus and an oxazolone ring at the C-terminus.³² These linear ions can give rise to lower b fragments by the b_x-b_{x-1} pathway, in addition to undergoing other possible fragmentations, such as CO loss via the b_x-a_x pathway,

subsequent losses of amino acid residues by the b_x - y_z pathway, and common neutral losses (H_2O , NH_3).^{32,33} Although no data are available on the loss of ammonia from the N-terminal amino group of a linear ion, this loss does occur from the side chain of asparagine, glutamine, aspartic acid, and arginine residues.³²

Table 3. Main Fragment Ions Observed in the HRESIMS/MS Spectrum of 1 (m/z 817.4199, $[M+H]^+$, 46.3 eV).

| m/z | Fragment | |
|----------|--|--|
| 839.3985 | $[M+Na]^+$ | |
| 817.4199 | $[M+H]^+$ | |
| 799.4091 | $[M+H-H_2O]^+$ | |
| 772.4084 | $[M+H-CO-NH_3]^+$ | |
| 704.3419 | [b8 G _b L _a]; [b8 G _a L _b] | |
| 687.3116 | [b8 G _b L _a -NH ₃]; [b8 G _a L _b -NH ₃] | |
| 686.3282 | [b8 G _b L _a -H ₂ O]; [b8 G _a L _b -H ₂ O] | |
| 676.3497 | [a8 G _b L _a]; [a8 G _a L _b] | |
| 670.3350 | [b8 G _c F], | |
| 669.3091 | [b8 G _b L _a -NH ₃ -H ₂ O]; [b8 G _a L _b -NH ₃ -H ₂ O] | |
| 659.3217 | [a8 G _b L _a -NH ₃]; [a8 G _a L _b -NH ₃] | |
| 630.2931 | [b7 AG _b -NH ₃]; [b7 SG _a -NH ₃] | |
| 599.3031 | [b7 G _c F] | |
| 560.2641 | [b6 AG _b]; [b6 L _a S]; [b6 G _b L _a] | |
| 559.2562 | [b6 FA-NH ₃] | |
| 543.2638 | [b6 AG _b -NH ₃]; [b6 L _a S-NH ₃]; [b6 G _b L _a -NH ₃] | |
| 542.2701 | [b6 G _c F] | |
| 532.2674 | [a6 AG _b]; [a6 L _a S]; [a6 G _b L _a] | |
| 525.2542 | [b6 G _c F-NH ₃] | |
| 515.2630 | [a6 AG _b -NH ₃]; [a6 L _a S-NH ₃]; [a6 G _b L _a -NH ₃] | |
| 497.2744 | [a6 G _c F-NH ₃] | |
| 429.2131 | [b5 G _c F] | |
| 418.2484 | [a5 L _a S] | |
| 412.1892 | [b5 G _c F-NH ₃] | |
| 400.2494 | [a5 L _b N] | |
| 390.1758 | [b4 AG _b] | |
| 386.2050 | [b5 G _a L _b] | |
| 372.1922 | [b4 NG _c] | |
| 358.2068 | [a5 G _a L _b] | |
| 342.1798 | [b4 G _c F] | |
| 333.1611 | [b4 G _b L _a] | |
| 329.1745 | [b4 SG _a] | |
| 319.1432 | [b3 FA] | |
| 285.1549 | [b3 NG _c] | |
| 276.1370 | [b3 AG _b]; [b3 G _b L _a] | |
| 258.1437 | [b3 SG _a]; [b3 G _a L _b]; [b3 L _b N] | |
| 172.0717 | [b2 G _c F] | |

Nomenclature in accordance with Ngoka and Gross,³⁴ whereby a fragment ion is labeled with the four-part descriptor “ xn_{JZ} ,” where x stands for the ion (e.g., lowercase ‘a’ or ‘b’, as used for peptide fragments) and n is the number of amino acid residues in the ion. A ‘b’ ion is the usual oxazolone ion or isomeric equivalent consisting of n amino acid residues. This ion can lose carbon monoxide to form an ‘a’ ion. The symbol J is for the N-terminal amino acid residue and Z designates the C-terminal amino acid residue, both of which result from bond cleavage.

On the basis of its skeleton, this compound can be classified as a caryophyllaceae-type cyclopeptide⁶ recently redefined as an orbitide.^{8,9} According to Shim, Young, Arnison, Gilding, and Reaney,⁹ compound **1** can be designated as [1–9-NαC]-crouorb A1.

A range of biological properties have been reported for orbitides, including immunomodulatory,^{19,20} antimalarial,^{21,24,28,29,31} antifungal,²³ and antibacterial activities.³⁵ In recent years, considerable attention has been devoted to the anticancer activity of natural cyclic peptides,^{6,27,36-38} which have been considered a new class of therapeutic molecules, due to their chemical versatility and specificity for biological targets.³⁹

Evaluated against six human cancer cell lines, compound **1** proved almost as potent against NCI-ADR/RES cells ($GI_{50} = 4.8 \mu\text{M}$) as doxorubicin, the positive control ($GI_{50} = 5.1 \mu\text{M}$) (Table 1), suggesting that **1** is the component responsible for toxicity against this cell line in the preceding fraction F2. When tested against 786-0 cells, however, F2 exhibited lower GI_{50} value than **1**, suggesting that the cytotoxic activity of this fraction against this cell line stems from other active minor compounds or from synergistic interactions lost during fractionation. Evaluated against NIH/3T3 nontumor cells, **1** remained inactive up to the highest concentration tested ($GI_{50} > 305.8 \mu\text{M}$), thus demonstrating selective inhibition against NCI-ADR/RES cells. In addition, doxorubicin proved cytotoxic against NIH/3T3 cells ($GI_{50} = 4.0 \mu\text{M}$), emphasizing a possible advantage in the cytotoxic potential of **1**, which would have a reduced adverse effect in normal tissues. Orbitides have been reported to have potent cytotoxic activity and may exhibit differences in responsiveness/sensitivity to different cancer cells lines.^{6,7} Nevertheless, further studies are necessary to determine the cytotoxic effects on nontumor cells and the limitations of this class of compounds.

Before the present study, the first of its kind reporting the isolation of a cyclopeptide from *C. urucurana* latex, this class of compounds had been identified in other Euphorbiaceae.¹⁹⁻³¹ Cyclopeptides had also been found in *C. gossypifolius*¹⁷ and *C. sparsiflorus*,¹⁸ but their cytotoxic activities against cancer cell lines were not evaluated. These cyclopeptides are characterized by the presence of nine amino acid residues, of which phenylalanine, asparagine, alanine, glycine, and leucine occur in both chains and three glycine residues occupy the same positions.

The present results indicate therapeutic anticancer potential for *Croton urucurana* latex, corroborating its popular use in anticancer therapy. However, further studies are necessary to elucidate the mechanisms of action underlying the cytotoxic effects of compound **1** against human cancer cell lines.

EXPERIMENTAL SECTION

General Experimental Procedures

Optical rotation was determined on a PerkinElmer 341 polarimeter (Na filter, $\lambda = 589$ nm). UV spectra were obtained on a USB4000 UV/vis spectrophotometer (Ocean Optics). IR spectra were recorded on a Nicolet iS5 FT-IR spectrometer (Thermo Scientific). NMR spectra were obtained in DMSO- d_6 (Cambridge Isotope Laboratories) on a Bruker DPX-300 spectrometer operating at 300.13 MHz (^1H)/75.47 MHz (^{13}C). HRESIMS data were acquired in the positive ion mode on a micrOTOF-Q II instrument (Bruker Daltonics). Sephadex LH-20 was used for column chromatography. Reversed-phase semipreparative HPLC separation was performed with a Shimadzu LC-6AD pump using RP-18 silica gel (5 μm , 21.6 \times 250 mm) in a Shim-Pack column at a flow rate of 14 mL min^{-1} , with monitoring at 270 nm.

Plant Material

Bark and red latex of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) was collected from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil (20°25'13"S/ 54°39'31"W) in March 2012. The specimen was identified by Prof. Arnildo Pott (Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil) and a voucher specimen (no. 30924) deposited at the CGMS Herbarium of the Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Cyclopeptide Extraction and Isolation

Bark material (2500 g) was powdered and extracted in 95% EtOH at room temperature (RT) and subsequently concentrated under reduced pressure. The latex (55 g) was suspended in MeOH-H₂O (9:1), and the mixture extracted successively with hexane and EtOAc. Of the resultant fractions, the bioactive EtOAc phase was selected for further bioactivity-guided fractionation. A 3.0 g aliquot of this phase was introduced into a Sephadex LH-20 chromatography column (5 \times 36 cm, MeOH), to give six fractions (F1-F6).

Compound **1** (27.2 mg) was obtained as the major component of the bioactive F2 fraction (100.8 mg) after isocratic semi-preparative HPLC using an RP-C₁₈ column (MeCN-H₂O, 37:63, v/v), at a flow rate of 14 mL min⁻¹.

[1-9-NaC]-Crouorb A1 (1): white, amorphous solid (H₂O-MeCN); $[\alpha]_D^{23} = -163$ (c 3 × 10⁻², H₂O-MeCN 37%); UV (MeOH) λ_{\max} (log ϵ) 203 (3.32), 245 (2.71) nm. IR (KBr) ν_{\max} 3300, 3051, 2950, 1652, 1548; ¹H and ¹³C NMR data, see Table 2; positive HRESIMS m/z 817.4199 [M+H]⁺ (calcd for C₃₇H₅₇N₁₀O₁₁, m/z 817.4203); positive HRESIMS/MS data, see Table 3.

Marfey's Analysis of the Absolute Configuration of Amino Acid^{16,40}

Compound **1** (1 mg) was hydrolyzed in 1 mL of 6 N HCl at 95 °C for 16 h. The hydrolysate was evaporated to dryness under a N₂ stream to remove traces of HCl and redissolved in 900 μ L of acetone and 1 M NaHCO₃ (20 μ L). A solution of N- α -(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-L-alaninamide (L-FDAA, Marfey's reagent, Sigma, 100 μ L) was added and the mixture heated at 40 °C for 1 h. The reaction mixture was cooled to RT, quenched by adding 2 N HCl (10 μ L), dried, and dissolved in 50% aqueous CH₃CN (600 μ L). Five microliters of the FDAA derivative was subjected to HPLC using a C₁₈ column at RT (20 °C). Aqueous CH₃CN containing 4% TFA was used as the mobile phase, with linear gradient elution (20-35%, 40 min) for L- and D-serine retention time analysis and with isocratic elution (45% ACN) for L- and D-alanine, phenylalanine, and leucine retention time analysis at a flow rate of 1 mL min⁻¹. FDAA-derived amino acids were detected by UV absorption at 340 nm.

From each separate 50 mM aqueous solution of D- or L-configurations of A, S, F, or L, 50 μ L aliquots were taken (totaling eight different samples) and 1 M NaHCO₃ (20 μ L) and a 1% solution of L-FDAA in acetone (100 μ L) were added. The mixtures were separately heated at 40 °C for 1 h, then cooled to RT, quenched by adding 2 N HCl (10 μ L), dried, and dissolved in 50% aqueous CH₃CN (600 μ L). Subsequently, 5 μ L of each FDAA derivative was analyzed by HPLC. The following retention times (min) were observed for the L-FDAA derivatives of the standard amino acids and for the residual Marfey's reagent, respectively: L-Ala (7.5 and 9.4), D-Ala (8.4 and 9.4), L-Leu (13.1 and 9.4), D-Leu (18.9 and 9.4), L-Phe (12.5 and 9.4), D-Phe (16.6 and 9.4), L-Ser (8.8 and 15.1), and D-Ser (9.2 and 15.0). The retention times (min) observed for L-FDAA derivatives of acid hydrolysates of compound **1** and for the

residual Marfey's reagent were as follows: L-Ala (7.4 and 9.7, respectively), L-Leu (13.0 and 9.7), L-Phe (12.4 and 9.7), and L-Ser (8.6 and 15.3).

In Vitro Cytotoxicity Assay

The cytotoxic activities of the extract, phases, fractions, and compound **1** were evaluated against six human cancer cell lines—namely, 786-0 (ATCC-CRL-1932, human kidney carcinoma), HT-29 (ATCC-HTB-38, human colon carcinoma), MCF-7 (ATCC-HTB-22, breast adenocarcinoma), NCI-ADR/RES (ovary adenocarcinoma, multidrug-resistance phenotype), and PC-03 (ATCC-CRL-1435, human prostate carcinoma), all provided by Prof. João Ernesto de Carvalho (CPQBA, Universidade Estadual de Campinas), and Hep-G2 (ATCC-HB-8065, hepatocellular carcinoma), provided by Prof. Ilce Mara de Syllos Cólus (Universidade Estadual de Londrina)—and using the sulforhodamine B assay (purity \geq 97%; Sigma), as described by Skehan et al.⁴¹ NIH/3T3 (murine fibroblast; ATCC CRL-1658) nontumoral cells were purchased from the Rio de Janeiro Cell Bank.

Briefly, the cells were seeded in 96-well plates at a density of 7.5×10^3 cells/well and each sample was tested in triplicate at four concentrations (0.25, 2.5, 25, and $250 \mu\text{g mL}^{-1}$) at 37 °C and 5% of CO₂ for 48 h. The samples were dissolved in DMSO, aliquoted, and stored at -20 °C. Final DMSO concentration did not affect cell viability (0.25%). Doxorubicin hydrochloride (2 mg/mL, Libbs) was used as the positive control. Growth inhibition by 50% (GI₅₀) was determined by nonlinear regression analysis using Origin 6.0 software (OriginLab).^{42,43} Samples were considered inactive when GI₅₀ values exceeded $250 \mu\text{g mL}^{-1}$.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00724.

1D and 2D NMR, HRESIMS, HRESIMS/MS, UV, and IR spectra of compound **1** (PDF).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Tel (W. S. Garcez): 0055-67-3345-3599. Fax: 0055-67-3345-3552. E-mail: walmir.garcez@ufms.br.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fundect-MS PRONEM 0088/12, CNPq, CPq-PROPP-UFMS and CAPES for the doctoral grants awarded to P.M. C.-B. Thanks are also extended to Prof. M. G. Carvalho, who kindly provided us with Marfey's reagent and the D- and L-amino acid standards; Prof. J. E. Carvalho and Prof. I. M. S Cólus, for providing the cell lines; and Prof. A. Pott, for his assistance in plant identification.

REFERENCES

- (1) Webster, G. L. *Taxon* **1993**, *42*, 793-823.
- (2) Salatino, A.; Salatino, M. L. F.; Negri, G. *J. Braz. Chem. Soc.* **2007**, *18*, 11-33.
- (3) Sandoval, M.; Okuhama, N. N.; Clark, M.; Angeles, F. M.; Lao, J.; Bustamante, S.; Miller, M. J. S. *J. Ethnopharmacol.* **2002**, *80*, 121-129.
- (4) Risco, E.; Ghia, F.; Vila, R.; Iglesias, J.; Álvarez, E.; Cañigueral, S. *Planta Med.* **2003**, *69*, 785-794.
- (5) Peres, M. T. L. P.; Pizzolatti, M. G.; Yunes, R. A.; Delle Monache, F. *Phytochemistry* **1998**, *49*, 171-174.
- (6) Tan, N.-H.; Zhou, J. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 840-895.
- (7) Sabandar, C. W.; Ahmat, N.; Jaafar, F. M.; Sahidin, I. *Phytochemistry* **2013**, *85*, 7-29.
- (8) Arnison, P. G.; Bibb, M. J.; Bierbaum, G.; Bowers, A. A.; Bugni, T. S.; Bulaj, G.; Camarero, J. A.; Campopiano, D. J.; Challis, G. L.; Clardy, J.; Cotter, P. D.; Craik, D. J.; Dawson, M.; Dittmann, E.; Donadio, S.; Dorrestein, P. C.; Entian, K.-D.; Fischbach, M. A.; Garavelli, J. S.; Göransson, U.; Gruber, C. W.; Haft, D. H.; Hemscheidt, T. K.; Hertweck, C.; Hill, C.; Horswill, A. R.; Jaspars, M.; Kelly, W. L.; Klinman, J. P.; Kuipers, O. P.; Link, A. J.; Liu, W.; Marahiel, M. A.; Mitchell, D. A.; Moll, G. N.; Moore, B. S.; Müller, R.; Nair, S. K.; Nes, I. F.; Norris, G. E.; Olivera, B. M.; Onaka, H.; Patchett, M. L.; Piel, J.; Reaney, M. J. T.; Rebuffat, S.; Ross, R. P.;

- Sahl, H.-G.; Schmidt, E. W.; Selsted, M. E.; Severinov, K.; Shen, B.; Sivonen, K.; Smith, L.; Stein, T.; Süßmuth, R. D.; Tagg, J. R.; Tang, G.-L.; Truman, A. W.; Vederas, J. C.; Walsh, C. T.; Walton, J. D.; Wenzel, S. C.; Willey, J. M.; van der Donk, W. *Nat. Prod. Rep.* **2013**, *30*, 108-160.
- (9) Shim, Y. Y.; Young, L. W.; Arnison, P. G.; Gilding, E.; Reaney, M. J. T. *J. Nat. Prod.* **2015**, *78*, 645-652.
- (10) Peres, M.T.L.P.; Monache, F.D.; Cruz, A.B.; Pizzolatti, M.G.; Yunes, R.A. *J Ethnopharmacol.* **1997**, *56*, 223-226.
- (11) Gurgel, L. A.; Silva, R. M.; Santos, F. A.; Martins, D. T. O.; Mattos, P. O.; Rao, V. S. N. *Phytother. Res.* **2001**, *15*, 319–322.
- (12) Gurgel, L. A.; Sidrim, J. J.; Martins, D. T.; Filho, C. V.; Rao, V. S. *J Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 409-412.
- (13) Esmeraldino, L. E.; Souza, A. M.; Sampaio, S. V. *Phytomedicine* **2005**, *12*, 570–576.
- (14) Oliveira, I. S.; Lima, J. C. S.; Silva, R. M.; Martins, D. T. O. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2008**, *18*, 587–593.
- (15) Cordeiro, K. W.; Pinto L. A.; Formagio, A. S. N.; Andrade, S. F. de; Kassuya, C. A. L.; Freitas, K. de C. *J. Ethnopharmacol.* **2012**, *143*, 331-337.
- (16) Bhushan, R.; Brückner, H. *Amino Acids* **2004**, *27*, 231-247.
- (17) Quintyne-Walcott, S.; Maxwell, A. R.; Reynolds, W. F. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1374-1376.
- (18) Mehmood, R.; Malik, A. *Nat. Prod. Commun.* **2010**, *5*, 1885-1888.
- (19) Kosasi, S.; van der Sluis, W. G.; Boelens, R.; Hart, L. A. T.; Labadie, R. P. *FEBS Lett.* **1989**, *256*, 91-96.
- (20) van den Berg, A. J. J.; Horsten, S. F. A. J.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; Kroes, B. H.; Beukelman, C. J.; Leeftang, B. R.; Labadie, R. P. *FEBS Lett.* **1995**, *358*, 215–218.
- (21) Auvin, C.; Baraguey, C.; Blond, A.; Lezenven, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 2845-2848.
- (22) Altei, W. F.; Picchi, D. G.; Abissi, B. M.; Giesel, G. M.; Flausino, O., Jr.; Reboud-Ravaux, M.; Verli, H.; Crusca, E., Jr.; Silveira, E. R.; Cilli, E. M. *Phytochemistry* **2014**, *107*, 91-96.

- (23) (23) Altei, W. F.; Picchi, D. G.; Torres, L. B.; Bolzani, V. S.; Cilli, E. M.; Giannini, M. J.; Giesel, G. M.; Verli, H. *Annual Meeting of the Brazilian Society on Biochemistry and Molecular Biology*; **2009**, 41.
- (24) Baraguey, C.; Auvin-Guette, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Lezenven, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B. *J. Chem. Soc.* **1998**, 18, 3033-3040.
- (25) Horsten, S. F. A. J.; van den Berg, A. J. J.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; Leeftang, B. R.; Labadie, R. P. *Planta Med.* **1996**, 62, 46–50.
- (26) Auvin-Guette, C.; Baraguey, C.; Blond, A.; Pousset, J.-L.; Bodo, B. *J. Nat. Prod.* **1997**, 60, 1155-1157.
- (27) Mongkolvisut, W.; Sutthivaiyakit, S.; Leutbecher, H.; Mika, S.; Klaiber, I.; Möller, W.; Rösner, H.; Beifuss, U.; Conrad, J. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 1435-1441.
- (28) Baraguey, C.; Blond, A.; Cavelier, F.; Pousset, J.-L.; Bodo, B.; Auvin-Guette, C. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* **2001**, 2098-2103.
- (29) Baraguey, C.; Blond, A.; Correia, I.; Pousset, J.-L.; Bodo, B.; Auvin-Guette, C. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 325-329.
- (30) van den Berg, A. J. J.; Horsten, S. F. A. J.; Kettenes-van den Bosch, J. J.; Beukelman, C. J.; Kroes, B. H.; Leeftang, B. R.; Labadie, R. P. *Phytochemistry* **1996**, 42, 129–133.
- (31) Auvin-Guette, C.; Baraguey, C.; Blond, A.; Xavier, H. S.; Pousset, J.-L.; Bodo, B. *Tetrahedron* **1999**, 55, 11495-11510.
- (32) Paizs, B.; Suhai, S. *Mass Spectrom. Rev.* **2005**, 24, 508-548.
- (33) Harrison, A. G.; Young, A. B.; Bleiholder, C.; Suhai, S.; Paizs, B. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 10364-10365.
- (34) Ngoka, L. C. M.; Gross, M. L. *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* **1999**, 10, 360-363.
- (35) Barbosa, S. C.; Cilli, E. M.; Dias, L. G.; Stabeli, R. G.; Ciancaglini, P. *Amino Acids* **2011**, 40, 135-144.
- (36) Colombo, G.; Curnis, F.; De Mori, G. M. S.; Gasparri, A.; Longoni, C.; Sacchi, A.; Longhi, R.; Corti, A. *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 47891–47897.
- (37) Yue, G. G. L.; Fan, J.-T.; Lee, J. K. M.; Zeng, G. Z.; Ho, T. W. F.; Fung, K.-P.; Leung, P.-C.; Tan, N.-H.; Lau, C. B. S. *Br. J. Pharmacol.* **2011**, 164, 1883–1898.
- (38) Fang, X.-W.; Chen, W.; Fan, J.-T.; Song, R.; Wang, L.; Gu, Y.-H.; Zeng, G.-Z.; Shen, Y.; Wu, X.-F.; Tan, N.-H.; Xu, Q.; Sun, Y. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **2013**, 267, 95–103.

- (39) Jallouk, A. P.; Palekar, R. U.; Pan, H.; Schlesinger, P. H.; Wickline, S. A. *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* **2015**, *98*, 57-91.
- (40) Fan, J.-T.; Su, J.; Peng, Y.-M.; Li, Y.; Li, J.; Zhou, Y.-B.; Zeng, G.-Z.; Yan, H.; Tan, N.-H. *Bioorg. Med. Chem.* **2010**, *18*, 8226-8234.
- (41) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M.R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, *82*, 1107-1112.
- (42) Monks, A.; Scudiero, D.; Skehan, P.; Shoemaker, R.; Paull, K.; Vistica, D.; Hose, C.; Langley, J.; Cronise, P.; Vaigro-Wolff, A.; Gray-Goodrich, M.; Campbell, H.; Mayo, J.; Boyd, M. *J. Natl. Cancer Inst.* **1991**, *83*, 757-766.
- (43) Shoemaker, R. H. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6*, 813-823.

SUPPORTING INFORMATION

Fig. 1S. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) spectrum of compound 1.

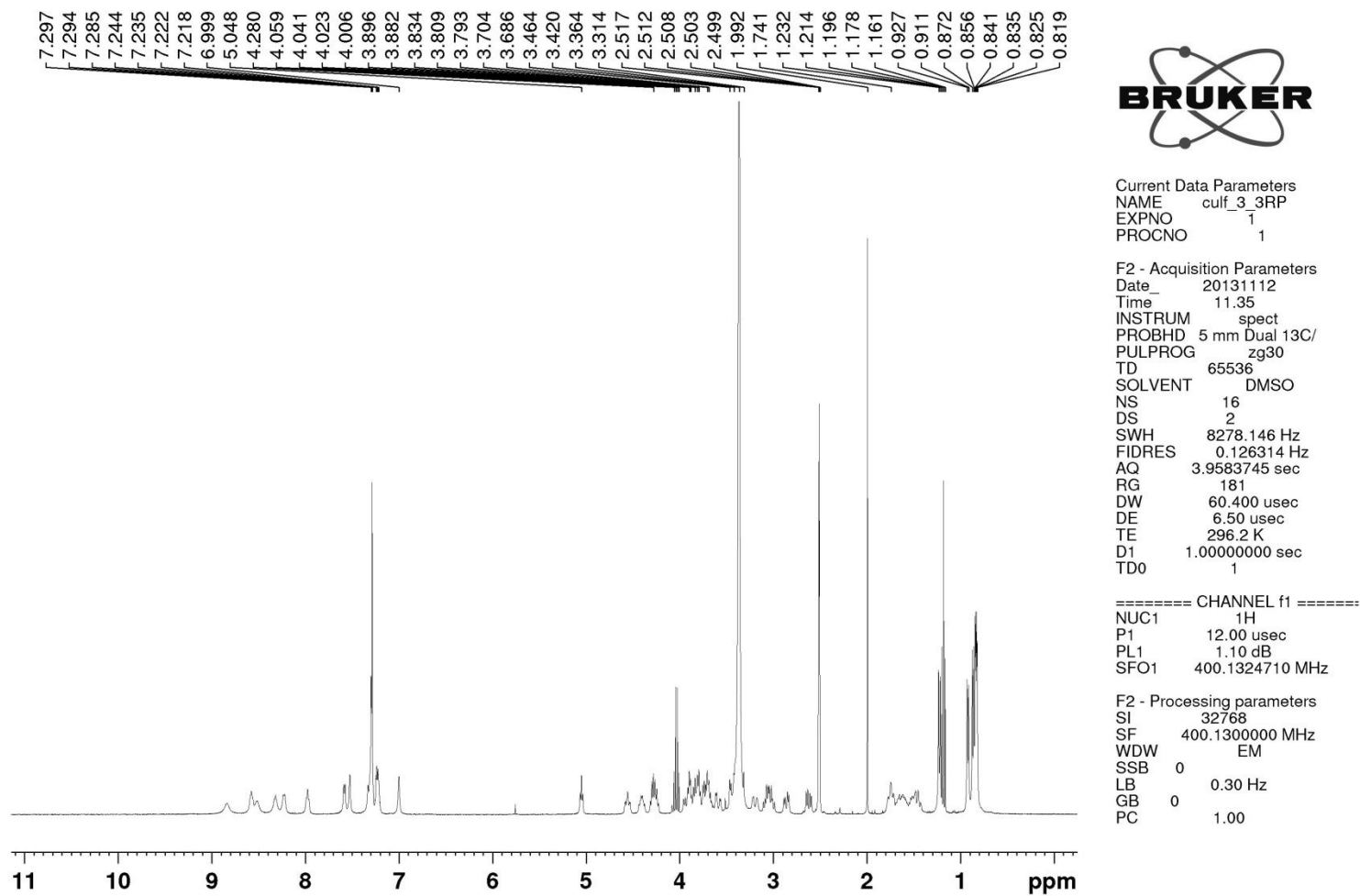


Fig. 2S. ^{13}C NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) spectrum of compound 1.

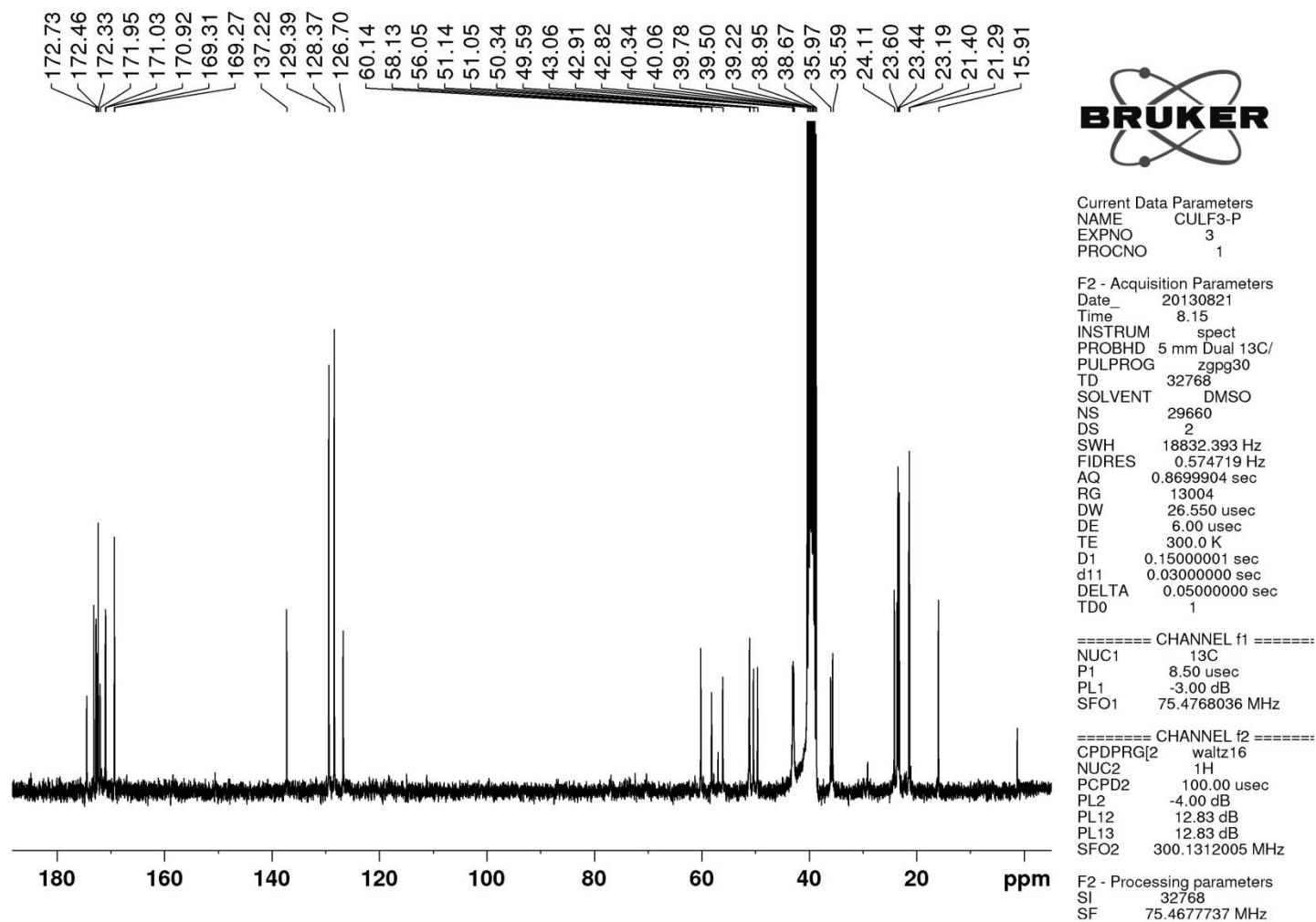


Fig. 3S. ^{13}C NMR/DEPT 135 (300 MHz, DMSO-d_6) spectrum of compound 1.

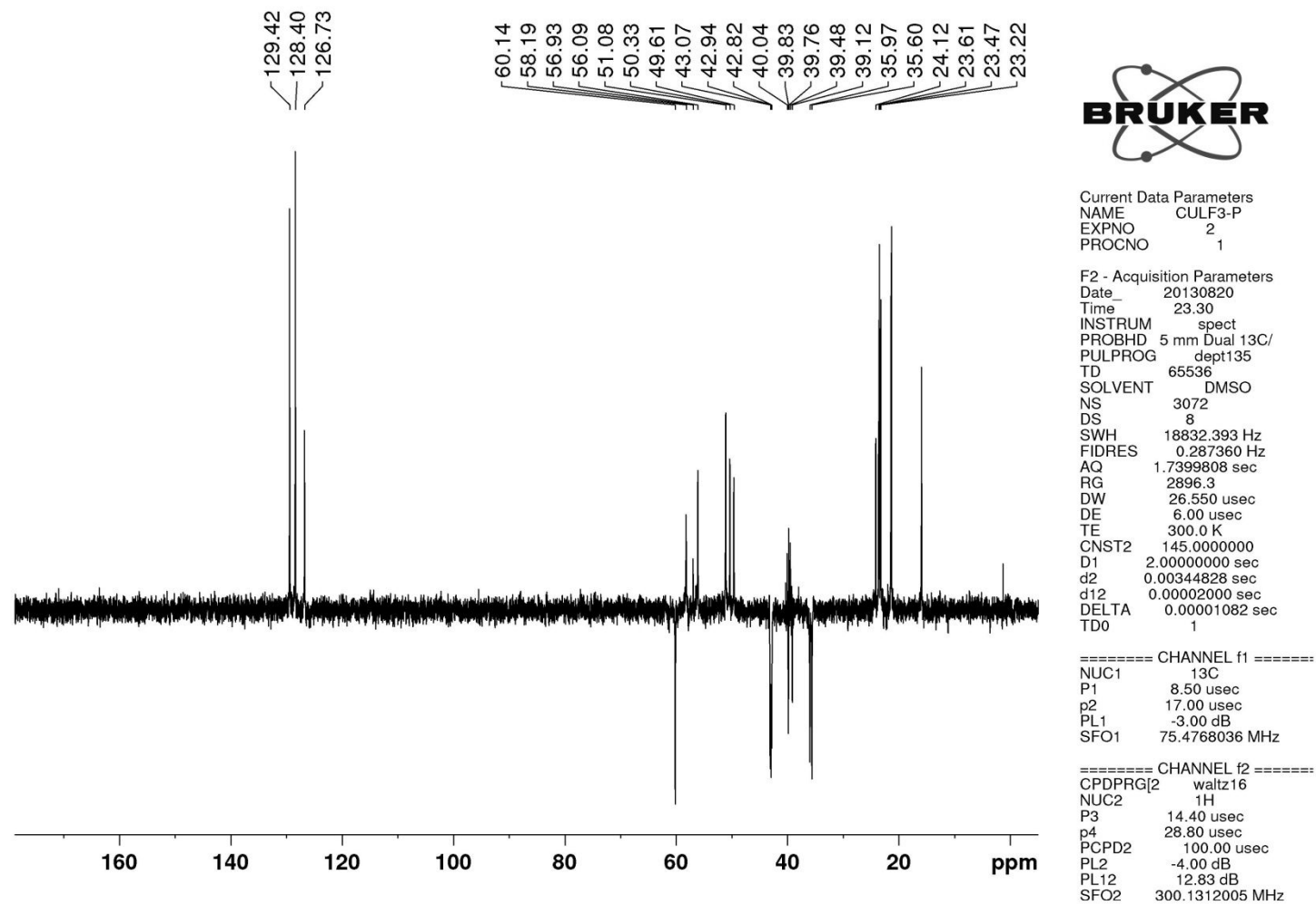


Fig. 4S. HSQC (400 MHz, DMSO-d₆) spectrum of compound 1.

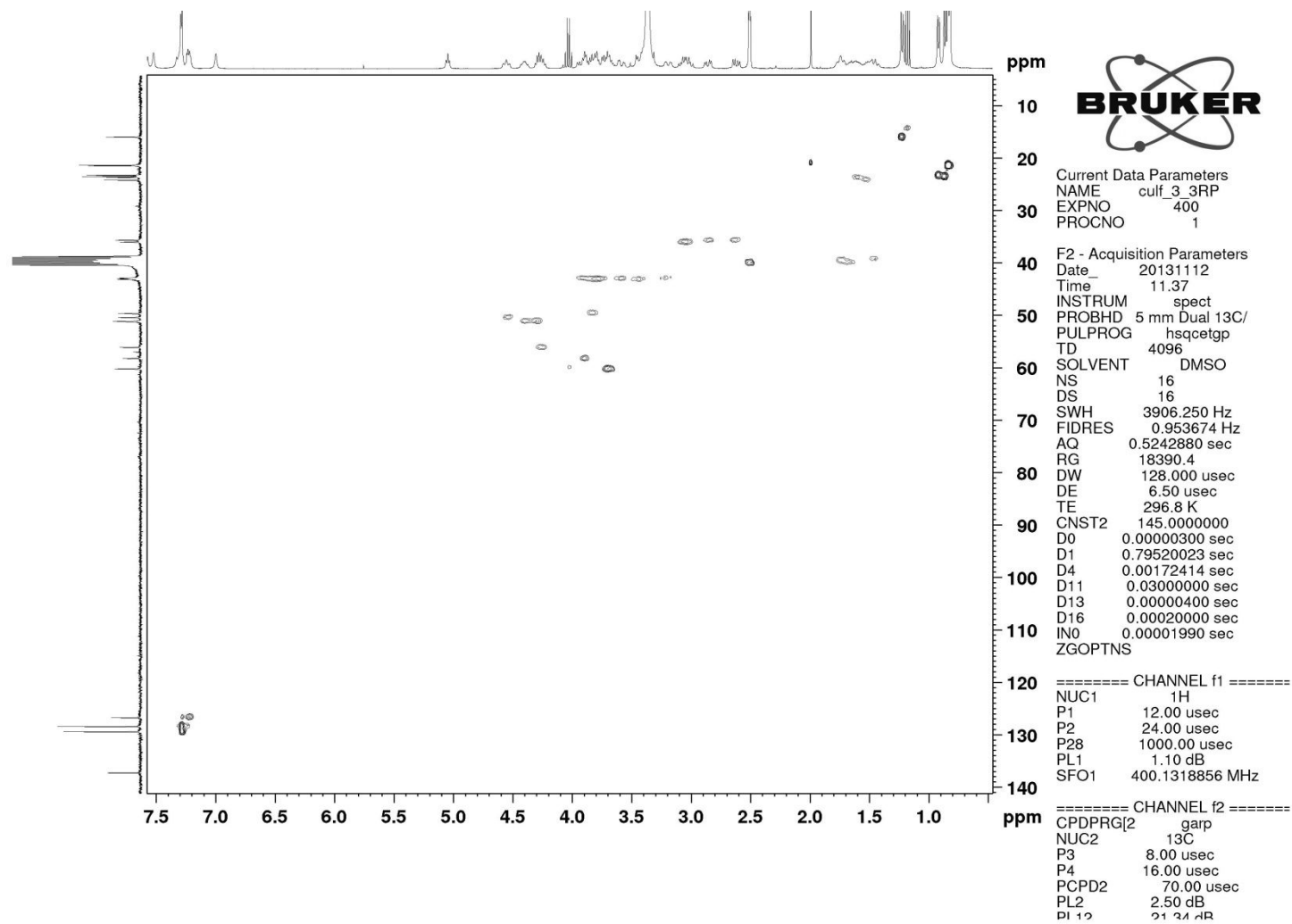


Fig. 5S. HMBC (400 MHz, DMSO-d₆) spectrum of compound 1.

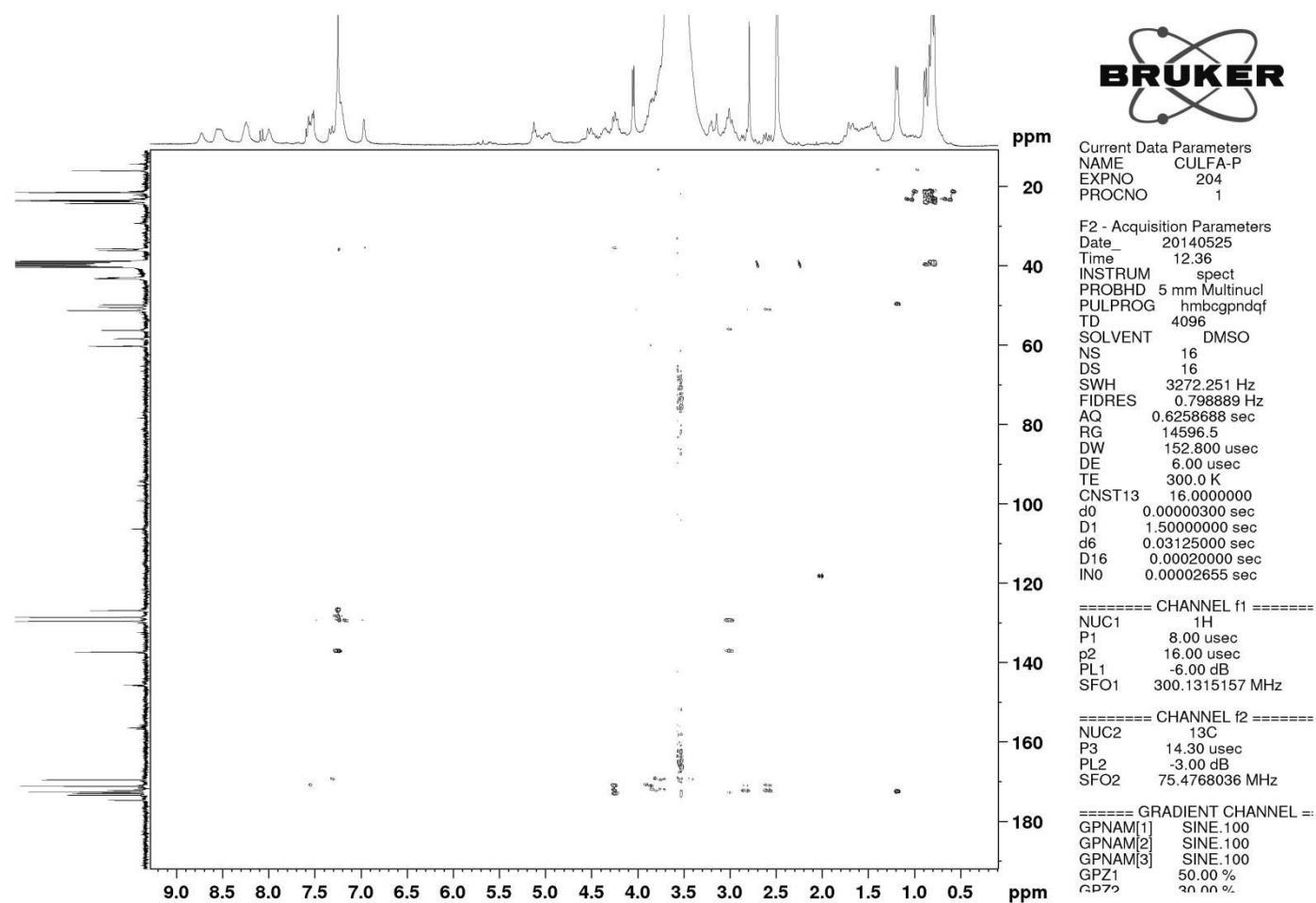


Fig. 6S. COSY¹H-¹H (400 MHz, DMSO-d₆) spectrum of compound 1.

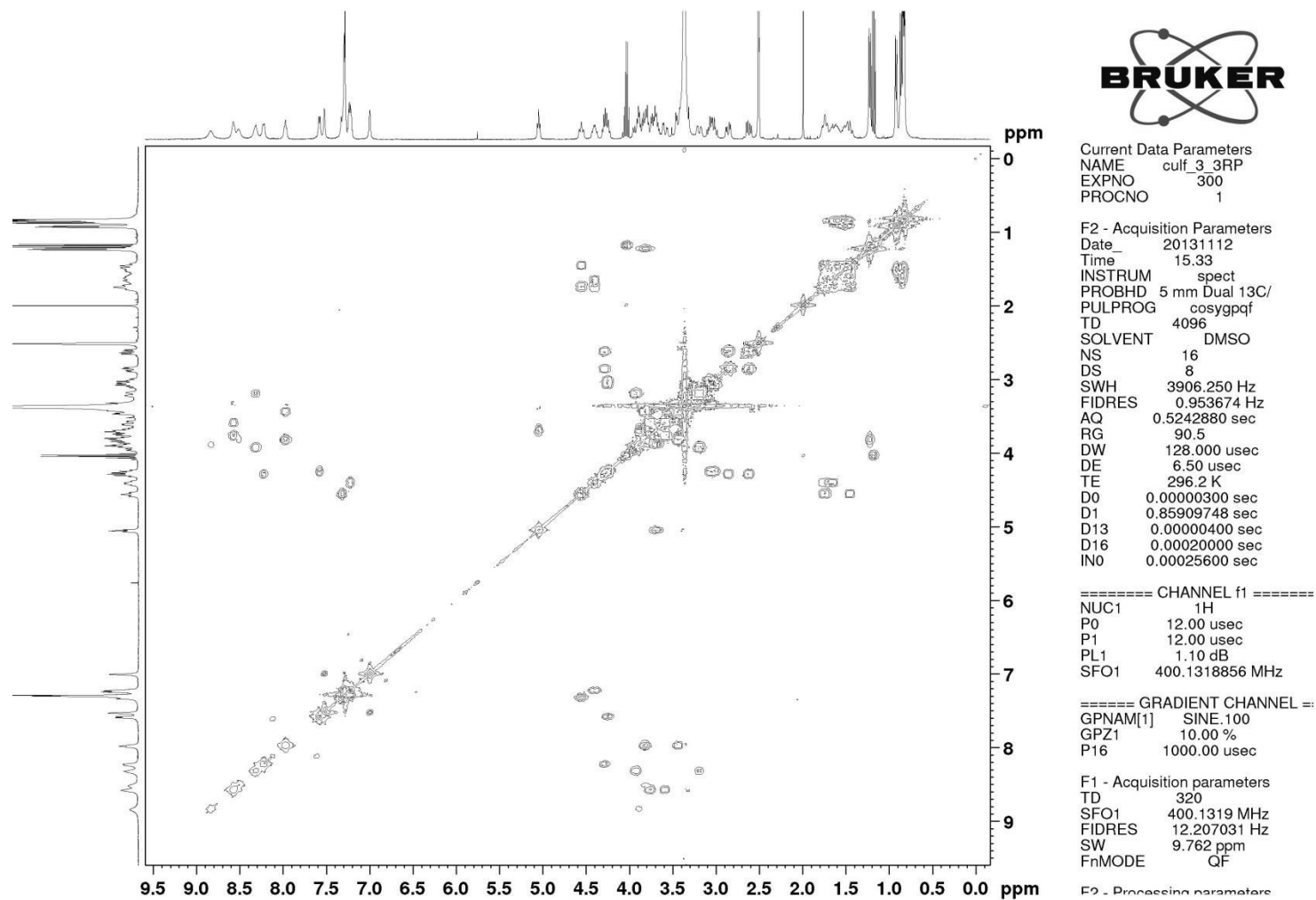


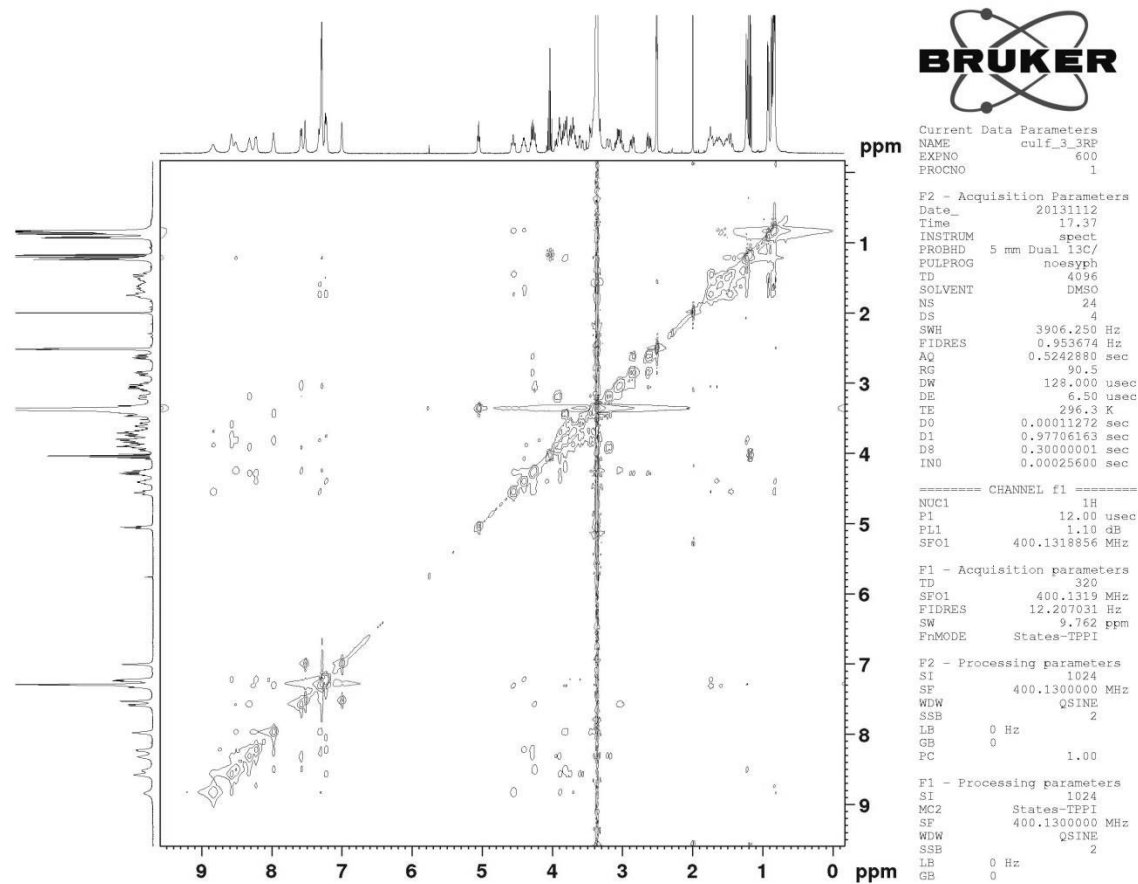
Fig. 7S. NOESY (400 MHz, DMSO-*d*₆) spectrum of compound 1.

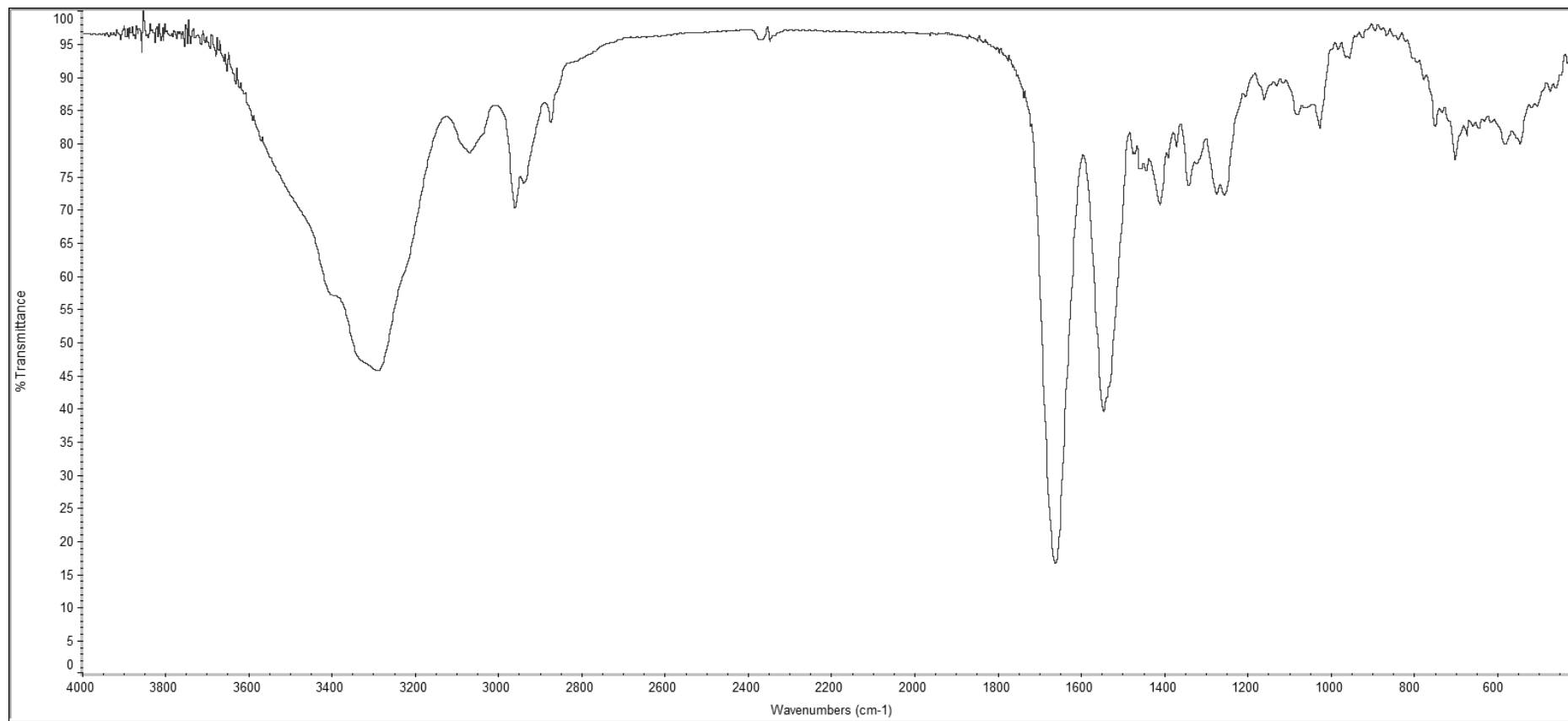
Fig. 8S. Infrared spectrum of compound 1.

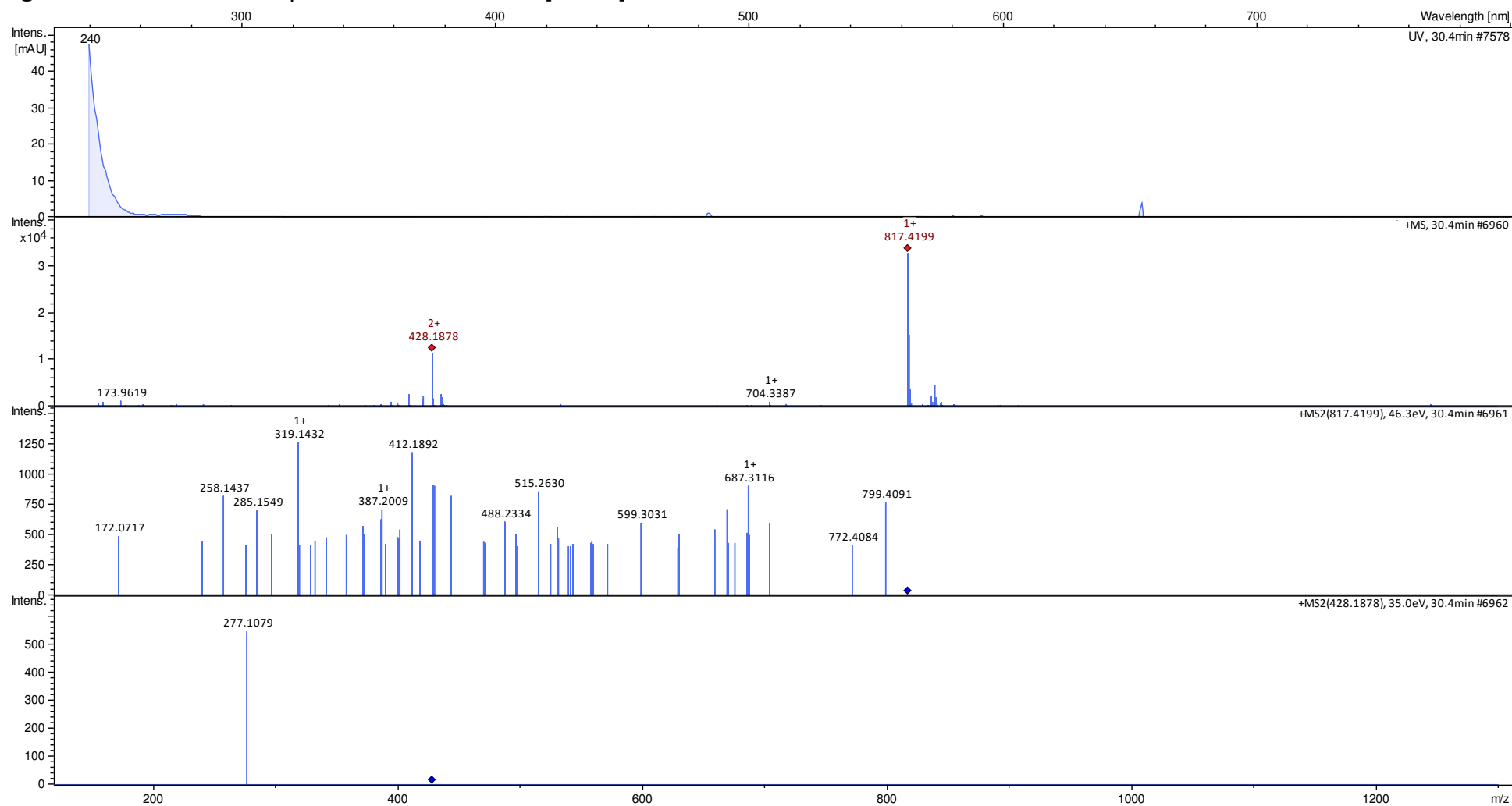
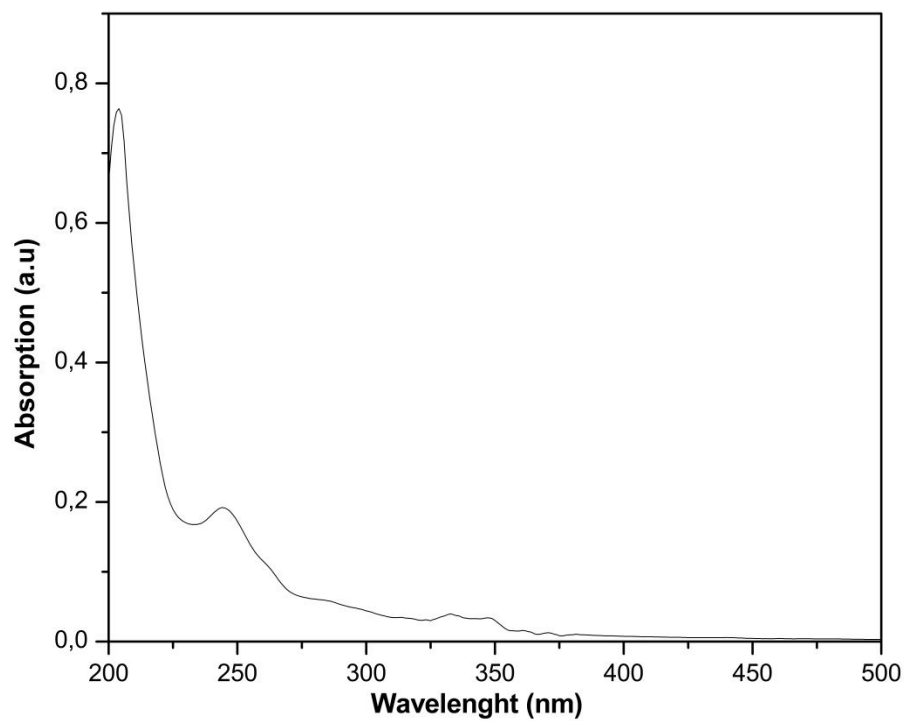
Fig. 9S. HRESIMS of compound **1** m/z 817.4199 $[M + H]^+$ 

Fig. 10S. UV spectrum of compound 1.



CAPÍTULO II:
[1–9-N α C]-CROURORB A1 ISOLATED FROM *CROTON*
URUCURANA LATEX INDUCES G2/M CELL CYCLE ARREST AND
APOPTOSIS IN HUMAN HEPATOCARCINOMA CELLS

Artigo a ser submetido à revista especializada

**[1–9-NαC]-crouorb A1 isolated from *Croton urucuana* latex induces
G2/M cell cycle arrest and apoptosis in human hepatocarcinoma cells**

ABSTRACT

[1–9-NαC]-crouorb A1 is a cyclic peptide isolated from *Croton urucuana* Baillon latex (midwestern Brazil) and have been shown to exert cytotoxic effects against a panel of cancer cell lines. However, the underlying mechanisms responsible for crouorb A1-induced cytotoxicity on cancer cell remain unknown. In this study, the effects of crouorb A1 on the viability, apoptosis, cell cycle and cell migration of Huh-7 (human hepatocarcinoma) cells were investigated. Also, we have evaluated the viability of Huh-7 cells treated with crouorb A1 in 3D collagen culture. Crouorb A1 treatment decreases the cell viability of Huh-7 at dose and time dependent manner associated with induction of apoptosis by caspase 3/7 activation and increasing expression of pro-apoptotic proteins: Bak, Bid, Bax, Puma, Bim, and Bad. The JNK/MAP pathway is involved in this induced cell death. Crouorb A1 effect is also associated with G2/M phase cell cycle arrest and increase of cyclin-dependent kinase (CDK1) and cyclin B1 expression pattern. A significant reduction of Huh-7 cells migration by crouorb A1 can be assessed and we also show that cells grown on 3D collagen gels exhibited increased resistance to crouorb A1 when compared to 2D cell culture (IC₅₀: 62 µg/ml versus 35.75 µg/ml).

Key-words: Peptide, *Croton urucurana*, Cell cycle arrest, Apoptosis and Huh-7 cells

Introduction

Medicinal plants play an important role in discovery novel bioactive compounds for drug development, especially for anticancer therapy (Pan et al., 2012; Cragg and Newman, 2013). Recently, plant-derived cyclic peptides have emerged as therapeutically potent anticancer biomolecules (Yue et al., 2011; Fang et al., 2013; Mishra et al. 2014).

Studies have shown that cyclic peptides from plants exhibit high cytotoxic activity through cell cycle arrest and inducing apoptosis in cancer cell lines (Ma et al., 2006; Mishra et al. 2014; Yeu et al., 2011). In addition, they have also exhibits a wide range of pharmacological properties including immunomodulatory, antimalarial, antifungal, antibacterial, antiplasmodial, insecticidal and sedative (Tan and Zhou, 2006).

Cyclic peptides have been discovered from medicinal plants species of the families Compositae, Caryophyllaceae, Labiatae, Linaceae, Annonaceae, Amaranthaceae, Rubiaceae and Euphorbiaceae (Tan and Zhou, 2006). Among Euphorbiaceae species it is highlighted *Croton urucurana* Baillon, which is common plants found in Mato Grosso do Sul state (midwestern Brazil) and its latex has been used in folk medicine for treating cancer (Cândido-Bacani et al., 2015).

Based in our research program which aims to the discovery of potential anticancer compounds from plants of midwestern of Brazil (Cerrado and Pantanal biomes), we previously isolated a novel cyclic peptide, designated as [1–9-N α C]-crouorb A1, as major component from *Croton urucurana* latex and demonstrated its cytotoxic activity against a panel of cancer cell lines (Cândido Bacani et al., 2015). However, the involved underlying mechanisms in the crouorb A1-cytotoxicity against cancer cells remain unknown.

Considering the potential therapeutic of crouorb A1 and due to lack of information on the cellular and molecular mechanisms underlying responsible for crouorb A1-induced cytotoxicity on cancer cell lines, in the present study we investigated the effects of crouorb A1 on the viability, apoptosis, cell cycle and cell migration of Huh-7 cells. Finally, we evaluated the role crouorb A1 on the viability of Huh7 cells in 3D collagen culture.

Materials and Methods

Cell lines and culture

The human hepatocarcinoma cell lines Huh-7D12 was obtained from Health Protection Agency Culture Collections (ECACC, European Collection of Cell Cultures n° 01042712). Cells were cultured in DMEM medium (Gibco, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics (penicillin 100 IU/ml and streptomycin 100µg/ml). The cells were grown in plastic Petri dishes (100 mm, Corning, NY) in humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37° C.

Materials

Cell proliferation Reagent WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) was from Roche (Meylan, France) and SensoLyte Homogeneous AMC Caspase-3/7 Assay' kit was from Anaspec (Le-Perray-en-Yvelines, France). Propidium Iodide (PI), Hoechst and Dimethyl sulfoxide (DMSO) were from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France). Antibodies against phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182), phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), phospho-p70 S6 Kinase (Thr389), phospho-Akt (Ser473), Bad, Puma, Bid, Bax, Bak, Bim, cyclin B1, CDK1 and cyclin D1 were purchased from Cell Signaling Technology (Ozymz, Saint-Quentin-en-Yveline, France). Polyclonal antibodies against clived-caspase 3 and hsc-70 (sc-7298) were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-bio, Le-Perray-en-Yvelines, France). The MEK inhibitor U0126 was from Promega (Charbonnières, France), Wotmannin inhibitor was from Sigma-Aldrich (St-Quentin-Fallavier, France) and JNK inhibitor II was from Calbiochem (VWR, Fontenaysous-Bois, France). Secondary antibodies conjugated to horse-radish peroxidase were obtained from Dako (Trappes, France). Secondary antibodies coupled with Alexa Fluor were from Becton Dickinson (BD Biosciences, San Jose, CA). The Cisplatin was obtained from Mylan (Saint-Priest, France) and was used as a positive control. [1-9-NaC]-crouorb A1 was isolated and identified from *Croton urucurana* Baillon latex at Institute of Chemistry, Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande, Brazil (Cândido-Bacani et al., 2015). Crouorb A1 was initially diluted in DMSO, aliquoted and stored at -20°C. The concentration of DMSO in culture medium was kept below 0.2% (v/v), a concentration known not to affect cell viability.

3D Collagen Culture

Huh-7 cells were seeded into type I collagen gels (Sigma-Aldrich, St-Quentin-Fallavier, France) diluted with culture medium to obtain a collagen solution of 0.75mg/ml and 1.5mg/ml. The pH of solution was adjusted to 7.4 by NaOH 0.1N and cell suspension was mixed to this solution to give a final cell density of $40 \cdot 10^3$ cells/ml. Collagen gels were then distributed into 96-well plates (100 μ L) or 48-well plates (250 μ L) and incubated at 37°C. After polymerization (10 min at 37°C), gels were covered with an equal volume of culture medium.

Cell viability assay

The cell viability of Huh-7 cells was evaluated by colorimetric WST-1 assay (Roche, Germany). The assay is based on the ability of viable cells to cleave the sulfonated tetrazolium salt WST-1 (4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate) by mitochondrial dehydrogenases. Briefly, cells were seeded in 96-well plates in 2D (8×10^3) or 3D collagen gels (4×10^3) and treated with increasing concentrations of crouorb A1 (0.35-200 μ g/ml) or 0.2% DMSO as control for 24h, 48h, and 72h (2D) or (10-100 μ g/ml) or 0.1% DMSO for 24h after, 6 days of cultures (3D). After treatments, 100 μ L of the WST-1 reagent solution (10% in culture medium) was added to each well and incubated for 2h at 37°C (2D) or for 1h at 37°C (3D). The absorbance was measured at 430nm on SPECTROstar Nano (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France) and percentage of viability was calculated as the absorbance ratio of treated to untreated cells. The concentration that inhibited 50% cell growth (IC_{50}) was determined through non-linear regression analysis.

Necrosis study

Huh-7 cells were plated on 35 mm petri dish and treated with crouorb A1 (36 μ g/ml) or 0.036% DMSO as control for 24 and 48 h. At the indicated times the medium was removed, and the cells were washed twice with PBS and stained with Hoechst 5 μ g/ml and Propidium Iodide 5 μ g/ml at 37° C for 30 min in the dark. After washing with PBS was added 3 drops fluorescein diacetate (DAF) and the petri dish were covered with coverslips and observed in fluorescent microscopy (ZEISS Axio Scope.A1). The doubled stained nucleus corresponding to necrosis cells were counted and the results are shown as the mean percentages of necrosis cells.

Caspase-3/7 activity

Caspase-3/7 activity was measured using Sensolyte Homogeneous AMC Caspase-3/7 Assay kit (Anaspec, Le-Perray-en-Yvelines, France) following manufacturer's instructions. Briefly, Huh-7 cells were seeded in 96-well plates in 2D at density of 8×10^3 cells/well and treated with increasing concentrations of crourorb A1 (10-50 $\mu\text{g/ml}$) or 0.05% DMSO as control for 24h. At indicated time, cells were lysed on the plate and the caspase-3/7 substrate solution was incubated with the cell lysates for 1h at 37°C. AMC cleavage was monitored by spectrofluorometry (Vmax). WST-1 assays were performed in parallel to assess the approximate number of viable cells in each well. Cisplatin was used as positive control (20 $\mu\text{g/ml}$).

Cell cycle analysis

Huh-7 cells (3×10^5) were seeded at 6-well culture plates and incubated overnight. The next day, cells were treated with crourorb A1 at 36 or 50 $\mu\text{g/ml}$ or 0.05% DMSO as control for 24 h. Cells were fixed with 70% ice-cold ethanol for 1h and incubated for 30 min at 37°C with 0.5U of RNase A (Sigma-Aldrich). DNA was then stained for 10 min with 50 $\mu\text{g/ml}$ of PI in the dark and subjected to flow cytometric analysis using a FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Paris, France). The percentage of cells in G0/G1, S and G2/M phases was determined using the KALUZA 1.3 analysis software (Beckman Coulter).

Western blot analysis

Huh-7 cells were treated with crourorb A1 at 36 $\mu\text{g/ml}$ or 0.036% DMSO as control at different times. Cells were washed with ice-cold PBS, scrapped and frozen at -20°C. The protein lysates were separated by electrophoresis on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred to nitrocellulose membranes. The membranes were blocked with 5% low fat milk in tris-buffer saline (TBS) (65mM Tris pH 7.4, 150mM NaCl) for 1h at room temperature, incubated with primary antibodies overnight at 4°C and then incubated with appropriate secondary antibodies linked to horseradish peroxidase in 5% low fat milk in TBS for 1h at room temperature. Proteins were visualized with Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (VWR) and scanned with the Fujifilm LAS- 3000 imager (Fujifilm, Tokyo, Japan). Densitometric analyses of the bands were carried out with the MultiGauge software (Fujifilm).

Wound healing assay

Huh-7 cells were seeded in 12-well plates at density of 1×10^5 cells/well and grown until 90% confluence at 37°C. The culture medium was discarded and scratch-wound was performed using a sterile 200 μ l pipet tip and cells were washed twice with PBS to remove the scratched cells. Huh-7 cells were cultured in the absence or presence of mitomycin C (1 μ g/ml) and treated with crouorb A1 (36 μ g/ml) or with 0.036% DMSO as control for 24, 48 and 72h after the scratching. The initial wounding and subsequent migration of the cells in the scratched area were photographed in four different fields under microscope (AXIOVERT 40 C Zeiss). The results are presented as percentage width of the gap against the value of the negative control at 0 h of crouorb A1 treatment.

Cells staining

Huh-7 cells (2D) were seeded in 12-well plates and treated with 50 μ g/ml of crouorb A1 or 0.050% DMSO as control for 24h. The culture medium was removed, and the cells were washed twice with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, rewashed, and permeabilized in 0.1% Triton X-100/PBS for 10 min, and blocked in PBS 2%/BSA for 1h at room temperature. The slides were stained with Phalloidin-Fluoprobes 457H (Interchim) 66nmol/L and Hoechst 5 μ g/ml and observed by fluorescence microscopy (Nikon Eclipse Ni).

Growth kinetics of the spheroids (3D) were followed after 4 days of cultures, for 48h after treatment with crouorb A1 (62 μ g/ml) or 0.062% DMSO as control and morphological changes were assessed by fluorescent dye labeling. The culture medium was removed, and the cells were washed twice with PBS, fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min, then rewashed and incubated with PBS containing 50 μ M of RS19 for 20 minutes and observed with Leica TCS SP2 confocal scanning head coupled to a DMIRB inverted microscope (Leica Microsystems, Mannheim, Germany).

In addition, collagen gels were dehydrated with successive increasing concentration of alcohol and Xylene baths before being impregnated with paraffin using EXCELSIOR ES tools (Thermo Scientific, Waltham, USA) overnight. After impregnation, gels were include in paraffin and bloc 4- μ m-thick sections were cut and stained with hematoxylin and eosin.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard deviation. Data were analyzed with two-tailed Student's t-test. Differences were considered significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***). All experiments were performed at least three times.

Results

Effect of crouorb A1 on hepatic cells viability

In vitro cytotoxicity of the crouorb A1 against Huh-7 cells was assessed by WST-1 assay. Crouorb A1 decreased the cell viability of Huh-7 at dose- and time dependent manner and the cell viability decreased with increasing concentration and incubation duration (24, 48 and 72h). As shown in Figure 2A, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ of crouorb A1 led to a great inhibition in cell viability already after 24 h of treatment ($p < 0.01$). The effects were maintained and more pronounced after 48 and 72h of treatment. With lower crouorb A1 concentrations (0.35, 3 and 12.5 $\mu\text{g/ml}$) no or little influence on the cell viability was observed.

Crouorb A1 was also tested in a wide range of concentrations, from 10 $\mu\text{g/ml}$ to 70 $\mu\text{g/ml}$ for 24h. The concentrations of 30, 40, 50 and 70 $\mu\text{g/ml}$ reduced the cell viability to 80%, 20%, 13% and 8% after 24h treatment, respectively ($p < 0.01$) (Figure 2 B).

The dose–response curve was used to determine crouorb A1 concentrations required to inhibit the growth of cancer cells by 50% (IC_{50}). The IC_{50} values at 24, 48 and 72 h were estimated at 35.75 ± 1.00 , 30.41 ± 2.14 and 20.07 ± 3.40 $\mu\text{g/ml}$, respectively (Table 1). IC_{50} value for 24h of the treatment with crouorb A1 was used as an effective concentration for subsequent assays.

Crouorb A1 induces apoptosis and G2/M cell cycle phase arrest

Morphological alterations of nucleus after treatment with 50 $\mu\text{g/ml}$ of crouorb A1 for 24h exhibited apoptotic bodies after Hoechst staining, as compared to control cells (Figure 3 A). Figure 3 B shows the percentage of necrotic cells after 24h and 48h of treatment with crouorb A1 at the IC_{50} (36 $\mu\text{g/ml}$). As shown in Figure 3B there were no significant differences compared to the DMSO control and only basal levels of necrotic cells can be observed.

To evaluate if the inhibition of the cell viability in response to crouorb A1 was due to the induction of apoptosis, caspase 3/7 activity was measured. Treatment of Huh-7 cells with crouorb A1 at 30, 40 and 50 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h resulted in significant increased caspase 3/7 activity compared to control cells (Figure 3C) ($p < 0.05$; $p < 0.001$). At higher concentrations (70 $\mu\text{g/ml}$), crouorb A1 did not show significant caspase 3/7 activity increasing because of its high cytotoxicity leading to considerable cell death (data not shown).

Since the pro-apoptotic Bcl-2 family is the principal pathway involved in apoptosis, the levels of Bak, Bad, Puma, Bax, Bim, Bid and the cleaved-caspase-3 protein were analyzed by Western blot after 10, 24 and 48 h of treatment with crouorb A1. The results showed that the levels of all the pro-apoptotic proteins analysed increased in crouorb A1-treated cells. Similar results were also observed in the levels of cleaved caspase-3 in crouorb A1-treated cells after 24 and 48h of treatment (Figure 3D).

To determine the influence of crouorb A1 on cell cycle progression, flow cytometry analysis was performed and G₀/G₁, S and G₂/M cell cycle phases were detected by PI staining. Our results showed a dose-dependent increase in G₂/M phase in cells treated with 36 and 50 $\mu\text{g/ml}$ of crouorb A1 for 24h (Figure 4 A and B), while the percentage of cells in G₀/G₁ phase was significantly decreased ($p < 0.01$) (Figure 4 B).

To better understand the mechanisms of crouorb A1-induced G₂/M arrest, we examined G₂/M and G₁ phases related regulatory proteins by Western blot. As shown in Figure 4 C, the expression level of CDK1 (cyclin-dependent kinase 1), cyclin B and cyclin D1 increased in Huh-7 cells in a time-dependent manner. A slight decrease of CDK1 can be observed after 48h of treatment.

JNK pathway, but not MEK/ERK and AKT, is involved in the mortality induced by Crouorb A1.

The phosphorylation level of MAP kinases ERK1/2, JNK and p38 and proteins AKT and p-70 were analyzed in Huh-7 cells treated with crouorb A1 at 36 $\mu\text{g/ml}$ for 10min, 30min, 3h, 6h, 10h, 24h and 48h. As shown in Figure 5 A, crouorb A1 stimulated the phosphorylation of AKT after 3h of treatment with a slow increase thereafter until 48h. Early phosphorylations of ERK1/2 are obtained in control (DMSO) and crouorb A1 treated cells whereas ERK1/2 activation after 10h is

specific to the crouorb A1 treated cells. This activation lasted until 48 h in a time dependent manner compared to the control. Interestingly, phosphorylation of JNK peaked at 30 min and decreased until 10 h (Figure 5 A). Thereafter, no JNK phosphorylation could be detected. Phospho-70 and of phospho-38 were not greatly influenced by crouorb A1 during the time course analysed as compared to the control cells.

In order to study role of the phospho-ERK1/2, phospho-AKT and phospho-JNK in crouorb A1 survival/cytotoxicity, we analysed the effect of these pathways inhibitions on cell viability by WST-1 assay. As shown in Figure 5 B, after 24 h of treatment there was a blockage of crouorb A1 toxicity in cells treated with the JNK inhibitor. In contrast, no significant changes were detected after treatment with the MEK inhibitor U0126 or Wortmannin, a PI3K/AKT inhibitor ($p > 0.05$). These results indicated that the JNK pathway is involved in the crouorb A1-induced cell mortality (Figure 5 C).

Then, the effects of crouorb A1 in cell motility, was examined using a monolayer wound healing assay. As shown in Figure 6, wound closure was markedly delayed in crouorb A1-treated cells compared to control DMSO-treated cells, whether the cells are cultured in presence or absence of mitomycin C (Figures 6 A-C). These results revealed that crouorb A1 could inhibit the migration of Huh-7 cells in a time-dependent manner ($p < 0.05$) independently to its cell cycle inhibitory effect.

Crouorb A1 inhibits viability of Huh-7 cells in 3D cultures

Mechanical forces could greatly influence the cells viability of hepatoma cells. *In vitro*, 3D collagen gels provide valuable flexible model for studying cells in a 3D environment and the response to variations of stiffness. This approach allowed us to establish that rigidity could influence the phenotype of hepatoma cells embedded in the matrix (Bomo et al., 2015). In this work, we show that 3D environment in collagen gels can also influence the response of the cells to crouorb A1 and an increase of cell viability in 3D gels was observed following treatments with 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ of crouorb-A1 (Figure 7). The IC_{50} values at 24h were 62.10 ± 4.70 $\mu\text{g/ml}$ and 62.52 ± 3.12 $\mu\text{g/ml}$ in collagen gels at 0.75mg/ml (1Pa) and 1.5mg/ml (3.5Pa), respectively (Table 2), which are 1.8-fold higher than in 2D culture.

In order to observe at the cluster organization of crouorb A1-treated Huh7 spheroids, we performed 3D confocal imaging and Hematoxylin-Eosin staining of

spheroids. Z-stack reconstructions of crouorb A1-treated spheroids in three dimensions (xyz) exhibited dramatic changes in cell morphology and in size of spheroids. After 48 h of treatment these morphological changes showed highly disorganized spheroids with more or less connected cells (Figure 8A-B). These results were confirmed by Hematoxylin-Eosin staining (Figure 8C-D). Changes of cell areas were measured in crouorb A1-treated cells after 8, 24, 32 and 48 h of treatment in 1.5mg/ml collagen gels. The results indicated that spheroids surface area decreased by 45% after 48h of treatment with crouorb A1 as compared to control DMSO-treated cells (Figure 8 E).

Discussion

Crouorb A1, a novel cyclic peptide identified from the medicinal *Croton urucurana* Baillon latex (Brazil), has previously been demonstrated as a candidate anticancer agent due its potential cytotoxic effects against a panel of human cancer cell lines (Cândido-Bacani et al., 2015). However, the cellular and molecular mechanisms underlying responsible for crouorb A1-induced cytotoxicity on cancer cell lines have not been investigated. In the present study, we determined the cytotoxic effects of crouorb A1 on Huh-7 cells and we demonstrated that treatment of Huh-7 cells with crouorb A1 induced apoptosis, cell cycle arrest in G2/M and inhibited cell motility. We also demonstrated the effect of crouorb A1 on the viability Huh-7 cells grown in 3D collagen gels.

The cytotoxicity of crouorb A1 in Huh-7 cells was detected by WST-1 assay, and results indicated that crouorb A1 decreased cell viability in a dose dependent and time-dependent manner. Crouorb A1 concentrations in the range of 50–200 µg/ml reduced the cell viability; however no alteration in the viability was observed with lower crouorb A1 concentrations (0.35 and 12.5 µg/ml) after 24, 48 and 72 h of exposure. The IC_{50} value of crouorb A1-treated Huh-7 cells at 48 hours (30.41µg/ml) corroborate with the results reported in our previous study (Cândido-Bacani, 2015) which showed that concentrations ranging from 29 to 41µg/ml inhibited by 50% the viability of HT-29 (colon carcinoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma), Hep-G2 (hepatocellular carcinoma) and PC-03 (prostate carcinoma) human cancer cells. In contrast, crouorb A1 presented potent cytotoxic activity against adriamycin-resistant ovarian (NCI-ADR/RES) cancer cells (IC_{50} =3.98 µg/ml) and moderate cytotoxicity against human kidney (786-0) cancer cells (IC_{50} =18.69 µg/ml). Also, it was shown

that crouorb A1 had no effect on non-tumor cell viability (NIH/3T3 murine fibroblast cells) ($IC_{50} = >250\mu\text{g/ml}$) (Cândido-Bacani et al., 2015). These results suggest that crouorb A1 may selectively inhibit the viability of cancer cells with differences in responsiveness/sensitivity depending to the cancer cell lines whereas immortalized cells are not/or less sensitive to crouorb A1.

Since apoptosis have a central role to limit the uncontrolled proliferation of cancer cells (Elmore 2007; Ziegler and Kung, 2008) we investigated apoptotic effect of crouorb A1 in the highly proliferative hepatocarcinoma cell line Huh-7. Apoptosis is characterized by characteristics morphological changes which include cell shrinkage, membrane blebbing, DNA fragmentation, chromatin condensation and apoptotic bodies. These changes requiring activation of several signaling cascades which are regulated by various cellular proteins (Sprick and Walczak, 2004; Elmore, 2007; Bruin and Medema, 2008; Estaquier et al., 2012), including the Bcl-2 family proteins. Indeed, it has been shown that this family included pro- apoptotic (Bax, Bak, Bcl-XS, Bid...) and anti- apoptotic (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, A1, Bcl-W...) which play an essential role in this mechanism (Burlacu, 2003; Chipuk and Green, 2008; Song et al., 2013). These proteins regulate the mitochondrial membrane permeability and promote the activation of different classes of caspases (initiators and effectors) leading to apoptotic cell death (Chipuk and Green, 2008, Song et al., 2013; Czabotar et al., 2014). The caspase family plays a crucial role in the implementation of apoptosis and caspases activations appear to be linked to molecular and structural changes that occur during apoptosis. Among the identified caspases, caspase-3 is known to be the major executioner caspase of the apoptotic cell death program (Elmore, 2007). In this study, we observed by fluorescent dye labeling of Huh-7 that crouorb A1 caused a morphological changes characteristic of apoptosis. Crouorb A1 induce-apoptosis was confirmed by an increase of caspase-3/7 activities in a dose dependent manner, accompanied by the up-regulation of clived-caspase3 protein and expressions of pro-apoptotic proteins such as Bak, Bid, Bax, Puma, Bim, and Bad. Taken together, our data show that crouorb A1-induced cytotoxicity could be strongly mediated through a caspase-3-dependent pathway and pro-apoptotic proteins up-regulation. Apoptotic effect of natural cyclic peptides, such as jasplakinolide was also demonstrated in human leukemia Jurkat T cells by Odaka et al. (2000). Jasplakinolide-induced apoptosis was associated with an increased of caspase-3 activity and Bax levels accompanied by a decrease in the expression of

Bcl-2 in Jurkat T cells (Odaka et al., 2000). Jasplakinolide was also capable of inducing apoptosis in various murine transformed lines, including T-cell lymphoma EL-4 cells, myeloma SP-2/0 cells, macrophage-like J774.1 cells and fibroblast L cells (Odaka et al., 2000). Cozzolino et al. (2005) have demonstrated that Astis, a family of cyclopentapeptides isolated from the roots of a medicinal plant, *Aster tataricus* (Compositae), exhibits potent caspases-dependent pro-apoptotic activity in human papillary thyroid carcinoma cells (NPA cell line). Recently, a new cyclic octapeptide, named cyclosaplin showed antiproliferative activity against human breast cancer cells (MDA-MB-231) by inhibition of cell viability and induction of apoptosis by caspase 3 activation (Mishra et al. 2014).

Additionally, we investigated the effect of crouorb A1 on cell cycle progression. In the present study, we shown that crouorb A1 induced a blockage of cell cycle progression of the Huh-7 cells by accumulation of cells in G2/M phases. In parallel, we observed that crouorb A1 treatment resulted in an increase of CDK1 and cyclin B1 expressions. Since the Cdk1/cyclin B1 complex play an important role in the transition from G2 to M phase (Murray, 2004), here we suggest that crouorb A1 could increase the proportion of cells in G2/M phase by blocking cells in late G2 and/or beginning of M phase expression related to an increase of the CDK1 and cyclin B1 expression pattern. Indeed, natural cyclic peptides have been reported to inhibit cancer cell growth mediated by cell cycle arrest in the G2/M phase in cancer cell lines (Yeu et al., 2011; Du et al., 2014), a feature regarded as an effective strategy for inhibiting cancer cell growth (Zhang et al., 2005). Cell migration is an essential step in cancer progression, leading to invasion and metastasis (Pasco et al., 2004). In our study, we also demonstrated the effects of crouorb A1 on cell migration of Huh-7 cells cultivated in the absence and presence of mitomycin C. Mitomycin C is an antibiotic highly effective against various types of human cancer, as it is capable to block mitosis and inhibit cancer cell growth. In this regard, it becomes possible to analyze cell migration in the absence of cell proliferation (Mao et al., 1999; Gen et al., 2009). Crouorb A1 treatment was shown to inhibit the migration potential of Huh-7 cells by wound healing analysis both in absence and presence of mitomycin C excluding the possibility that its effect on cell migration could be consequence of the crouorb A1-induced inhibition of cell proliferation.

PI3-AKT, p70S6K and MAPK pathways play a key role in the cell migration, survival/apoptosis and proliferation (Chang et al., 2003; Le et al., 2003; Dhillon et al.,

2007; Zang et al., 2011; Hein et al., 2014). Thus, we analyzed the phosphorylation state of the MAP kinases p38, ERK, JNK, AKT and p-70S6K in response to crouorb A1. We showed that JNK, ERK1/2 and AKT pathways were activated after crouorb A1 exposure in a time-dependent manner whereas the phosphorylation levels of p38 and p70S6K were not affected as compared to the control cells with solvent (DMSO). Moreover, we determined that the JNK pathway was necessary for crouorb A1-induced cell death as evidenced by protection of crouorb-apoptosis induction by the JNK inhibitor II. On the other hand, although crouorb A1-activated ERK1/2 and AKT pathways, the inhibitors U0126 and Wortmanin were not effective in preventing induced cell death, showing that ERK1/2 and AKT activations seem to be not involved in the cytotoxicity of crouorb A1 in Huh-7 cells.

On the basis on the knowledge that 3D cultures better approximate the *in vivo* environment and can lead to divergent results when compared to 2D cultures (Mikhail et al., 2013; Eicheler et al., 2014), we quantified the viability of 3D cells, in stiff and soft matrix, after crouorb A1 treatment. Huh-7 cells in these matrices exhibit changes in morphology and proliferation. In soft collagen gels (collagen 0.75mg/ml), Huh-7 cells appear well-spread and form monolayer-like structures with flattened shapes while in rigid gels (collagen 1.5mg/ml) cells are non-spread and form rapidly spherical clusters along the culture time (Bomo et al., 2015). In our study, we showed that cells grown in 3D collagen gels exhibited increasing resistance to crouorb A1 when compared to 2D cell culture; however no difference was observed for both 3D culture models. IC₅₀ values were 1.8-fold higher in both 3D models compared to conventional 2D monolayer cultures. Similar results were obtained for the positive control cisplatin. Moreover, 3D reconstruction of spheroids treated with crouorb A1 showed significant morphological alterations and cell surface decreasing when compared to untreated cells. These data are in accordance with previous studies that showed also a greater resistance to the anti-cancer drug in 3D cultures in comparison to 2D-cultured cells (Yip and Cho, 2013; Godugo et al., 2013; Mikhail et al., 2013; Eicheler et al., 2014; Lauer et a.,2014). This resistance to anticancer drugs in 3D models has been attributed to several mechanisms, including a “decreased penetration of anticancer drugs, increased pro-survival signaling, and/or upregulation of genes conferring drug resistance” (Godugo et al., 2013). In regards the spheroids has the “ability to block the diffusion of the drug to all the cells as cells on the outer layers of the spheroid provide a natural barrier” (Yip and Cho, 2013). However, the

Huh-7 spheroids appear as acini-like structures with hollow lumen reducing the drug accessibility hypothesis (Bomo et al, 2015).

In conclusion, our data suggest that exposure of Huh-7 cells to crouorb A1, a cyclic peptide, resulted in decreased cell viability mediated by G2/M cell cycle arrest and consequent induction of apoptosis. Furthermore, crouorb A1 inhibited the cell migration. We also demonstrated that the JNK pathway is involved in the mechanism of crouorb A1-induced cell death in Huh-7 cells.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors wish to thank Fundect-MS, CNPq, and CPq-PROPP-UFMS for their financial support and CAPES for the doctoral grants awarded to P.M. Cândido-Bacani (Proc. nº 99999.002264/2014-05). Thanks are also extended to Dr M. Blanchard-Desce (UMR CNRS 5255, University of Bordeaux, France) who kindly provided us with fluorescent dye RS19 and platforms PIXEL, Flow cytometry and H₂P₂ (SFR Biosit, UMS CNRS 3480 /US INSERM 018, Rennes).

References

- Bomo, J., Ezan, F., Tiaho, F., Bellamri, M., Langouët, A., Theret, N., Baffet, G., 2015. Increasing 3D Matrix Rigidity Strengthens Proliferation and Spheroid Development of Human Liver Cells in a Constant Growth Factor Environment. *Journal of Cellular Biochemistry* 9999, 1–13.
- Bruin, E. C., Medema, J. P., 2008. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. *Cancer Treatment Reviews* 34, 737– 749.
- Cândido-Bacani, P. M., Figueiredo, P. O., Matos, M. F. C., Garcez, F. R., Garcez, W. S., 2015. Cytotoxic orbitide from the latex of *Croton urucurana*. *Journal of Natural Products* 78, 2754–2760.
- Chang, F., Steelman, L. S., Lee, J. T., Shelton, J. G., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., Franklin, R. A., McCubrey, J. A., 2003. Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention. *Leukemia* 17, 1263–1293.

- Chipuk, J. E., Green, D. R. 2008. How do Bcl-2 proteins induce mitochondrial outer membrane permeabilization? *Trends Cell Biol* 18, 157-164.
- Cozzolino, R., Palladino, P., Rossi, F., Cali, G., Benedetti, E., Laccetti, P., 2005. Antineoplastic cyclic astin analogues kill tumour cells via caspase-mediated induction of apoptosis. *Carcinogenesis* 26, 733—739.
- Cragg, G. M., Newman, D. J., 2013. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3670–3695.
- Czabotar, P. E., Lessene, G., Strasser, A., Adams, J. M., 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15, 49-63.
- Dhillon, A. S., Hagan, S., Rath, O., Kolch, W., 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279–3290.
- Du, L., Risinger, A. L., King, J. B., Powell, D. R., Cichewicz, R. H., 2014. A Potent HDAC Inhibitor, 1-Alaninechlamydocin, from a *Tolypocladium* sp. Induces G2/M Cell Cycle Arrest and Apoptosis in MIA PaCa-2 Cells. *Journal of Natural Products* 77, 1753–1757.
- Eichler, M., Jahnke, E.-G., Krinke, D., Müller, A., Schmidt, S., Azendorf, R., Robitzki, A. A., 2014. A novel 96-well multi electrode array based impedimetric monitoring platform for comparative drug efficacy analysis on 2D and 3D brain tumor cultures. *Biosensors and Bioelectronics* 15, 582-589.
- Elmore, S., 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 35, 495–516.
- Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L., Mignotte, B., 2012. The mitochondrial pathways of apoptosis. *Adv Exp Med Biol.* 942, 157-183.
- Fang, X.-W., Chen, W., Fan, J.-T., Song, R., Wang, L., Gu, Y.- H., Zeng, G.- Z., Shen, Y., Wu, X.-F., Tan, N.- H., Xu, Q., Sun, Y., 2013. Plant cyclopeptide RA-V kills human breast cancer cells by inducing mitochondria-mediated apoptosis through blocking PDK1–AKT interaction. *Toxicol. Appl. Pharm.* 267, 95–103.
- Gen, Y., Yasui, K., Zen, K., Nakajima, T., Tsuji, K., Endo, M., Mitsuyoshi, H., Minami, M., Itoh, Y., Tanaka, S., Taniwaki, M., Arij, S., Okanoue, T., Yoshikawa, T., 2009. A novel amplification target, ARHGAP5, promotes cell spreading and migration by negatively regulating RhoA in Huh-7 hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Letters* 275, 27–34.
- Godugu, C., Patel, A. R., Desai, U., Andey, T., Sams, A., Singh, M., 2013. AlgiMatrix™ Based 3D Cell Culture System as an In-Vitro Tumor Model for Anticancer Studies. *PLOS ONE* 8, e53708.

- Hein, A. L., Ouellette, M. I. M., Yan, Y., 2014. Radiation-induced signaling pathways that promote cancer cell survival (Review). *International Journal of Oncology* 45, 1813-1819.
- Lauer, F. M., Kaemmerer, E., Meckel, T., 2014. Single molecule microscopy in 3D cell cultures and tissues. *Advanced Drug Delivery Reviews* 79-80, 79-94.
- Le, X.-F., Hittelman, W. N., Liu, J., Watters, A. M., Li, C., Mills, G. B., Bast Jr, R. C., 2003. Paclitaxel induces inactivation of p70 S6 kinase and phosphorylation of Thr421 and Ser424 via multiple signaling pathways in mitosis. *Oncogene* 22, 484–497.
- Ma, X., Wu, C., Wang, W., Li, X., 2006. Peptides from Plants: A New Source for Antitumor Drug Research. *Asian Journal of Traditional Medicines* 1 (2) 85-90.
- Mao, Y., Varoglu, M., Sherman, D. H., 1999. Genetic Localization and Molecular Characterization of Two Key Genes (mitAB) Required for Biosynthesis of the Antitumor Antibiotic Mitomycin C. *Journal of Bacteriology* 181, 2199–2208.
- Mikhail, A. S., Eetezadi, S., Allen, C., 2013. Multicellular Tumor Spheroids for Evaluation of Cytotoxicity and Tumor Growth Inhibitory Effects of Nanomedicines In Vitro: A Comparison of Docetaxel- Loaded Block Copolymer Micelles and Taxotere *PLOS ONE* 8, e62630.
- Mishra, A., Gauri, S. S., Mukhopadhyay, S. K., Chatterjee, S., Das, S. S., Mandal, S. M., Dey, S., 2014. Identification and structural characterization of a new pro-apoptotic cyclic octapeptide cyclosaplin from somatic seedlings of *Santalum album* L. *Peptides* 54, 148–158.
- Murray, A. W., 2004. Recycling the Cell Cycle: Review Cyclins Revisited. *Cell* 116, 221–234.
- Odaka, C., Sanders, M. L., Crews, P., 2000. Jasplakinolide Induces Apoptosis in Various Transformed Cell Lines by a Caspase-3-Like Protease-Dependent Pathway. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 7, 947–952.
- Pan, L., Chai, H.-B., Kinghorn, A. D., 2012. Discovery of new anticancer agents from higher plants. *Front Biosci (Schol Ed)* 4, 142–156.
- Pasco, S., Ramont, K., Maquart, F.-X., Monboisse, J. C., 2004. Control of melanoma progression by various matrikines from basement membrane macromolecules. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 49, 221–233.
- Song, J., Hou, L., Ju, C., Zhang, J., Ge, Y., Yue, W., 2013. Isatin inhibits proliferation and induces apoptosis of SH-SY5Y neuroblastoma cells in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmacology* 702, 235–241.
- Sprick, M. R., Walczak, H., 2004. The interplay between the Bcl-2 family and death receptor-mediated apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1644, 125–132.
- Tan, N.-H., Zhou, J., 2006. Plant cyclopeptides. *Chemical reviews* 106, 840-895.

Watters, D. J., Beamish, H. J., Marshall, K. A., Gardiner, R. A., Seymour, G. J., Lavin, M. F., 1994. Accumulation of HL-60 leukemia cells in G2/M and inhibition of cytokinesis caused by two marine compounds, bistratene A and cyclozoline. *Cancer Chemother. Pharmacol* 33, 399–409.

Yip, D., Cho, C. H., 2013. A multicellular 3D heterospheroid model of liver tumor and stromal cells in collagen gel for anti-cancer drug testing. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 433, 327–332.

Yue, G. G. L., Fan, J. T., Lee, J. K. M., Zeng, G. Z., Ho, T. W. F., Fung, K. P., Leung, P. C., Tan, N.-H., Lau, C. B. S., 2011. Cyclopeptide RA-V inhibits angiogenesis by down-regulating ERK1/2 phosphorylation in HUVEC and HMEC-1 endothelial cells. *British. J. Pharm.* 164, 1883–1898.

Zhang, M., Chen, H., Huang, J., Zhong, L., Zhu, C. P., Zhang, S. H., 2005. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sciences* 76, 2115–2124.

Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J., Rishi, A. R., 2011. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1813, 1978–1986.

Ziegler, D. S., Kung, A. L., 2008. Therapeutic targeting of apoptosis pathways in cancer. *Current Opinion in Oncology* 20, 97–103.

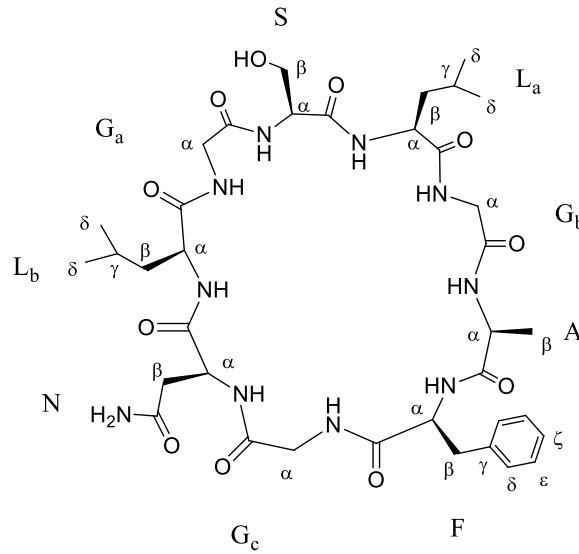


Figure 1. Chemical structure of [1–9-NaC]-crouorb A1.

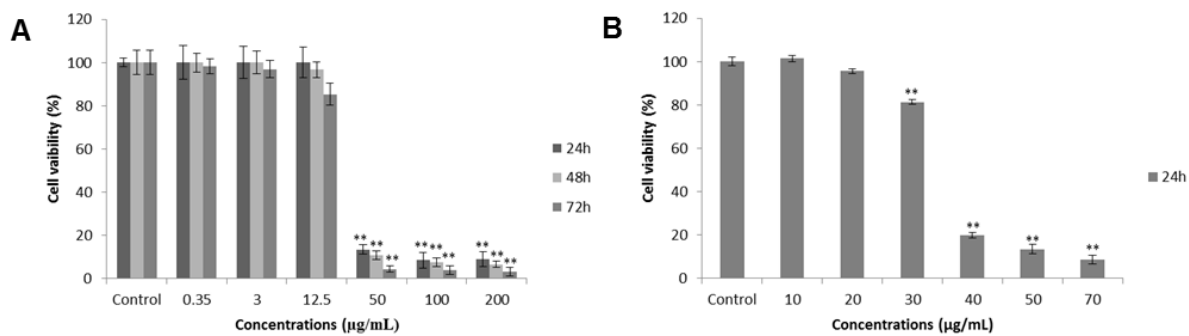


Figure 2. Cell viability (%) in 2D cultures was determined by WST-1 assay. (A) Huh-7 cells were treated with increasing concentrations of crouorb A1 (0.35-200 µg/mL) or with 0.2% DMSO as control for 24, 48 and 72h. (B) Huh-7 cells were treated with increasing concentrations of crouorb A1 (10-70 µg/mL) or with 0.07% DMSO as control for 24h. Results are expressed as percentage change compared to the control (* $p < 0.01$; significantly different from the control).

Table 1. IC_{50} values, given in µg/mL, for crouorb A1 on 2D Huh7 cell lines.

| | IC_{50} (µg/mL) \pm SD | | |
|-------------------|----------------------------|------------------|------------------|
| | 24h | 48h | 72h |
| Crouorb A1 | 35.75 \pm 1.00 | 30.41 \pm 2.14 | 20.07 \pm 3.40 |
| Cisplatin | 23.19 \pm 0.21 | 4.26 \pm 1.44 | 2.26 \pm 0.24 |

* IC_{50} values were expressed as the concentration that inhibited the growth of cells by 50%. Results are expressed as the mean of three independent experiments \pm SD. Cisplatin was employed as positive control.

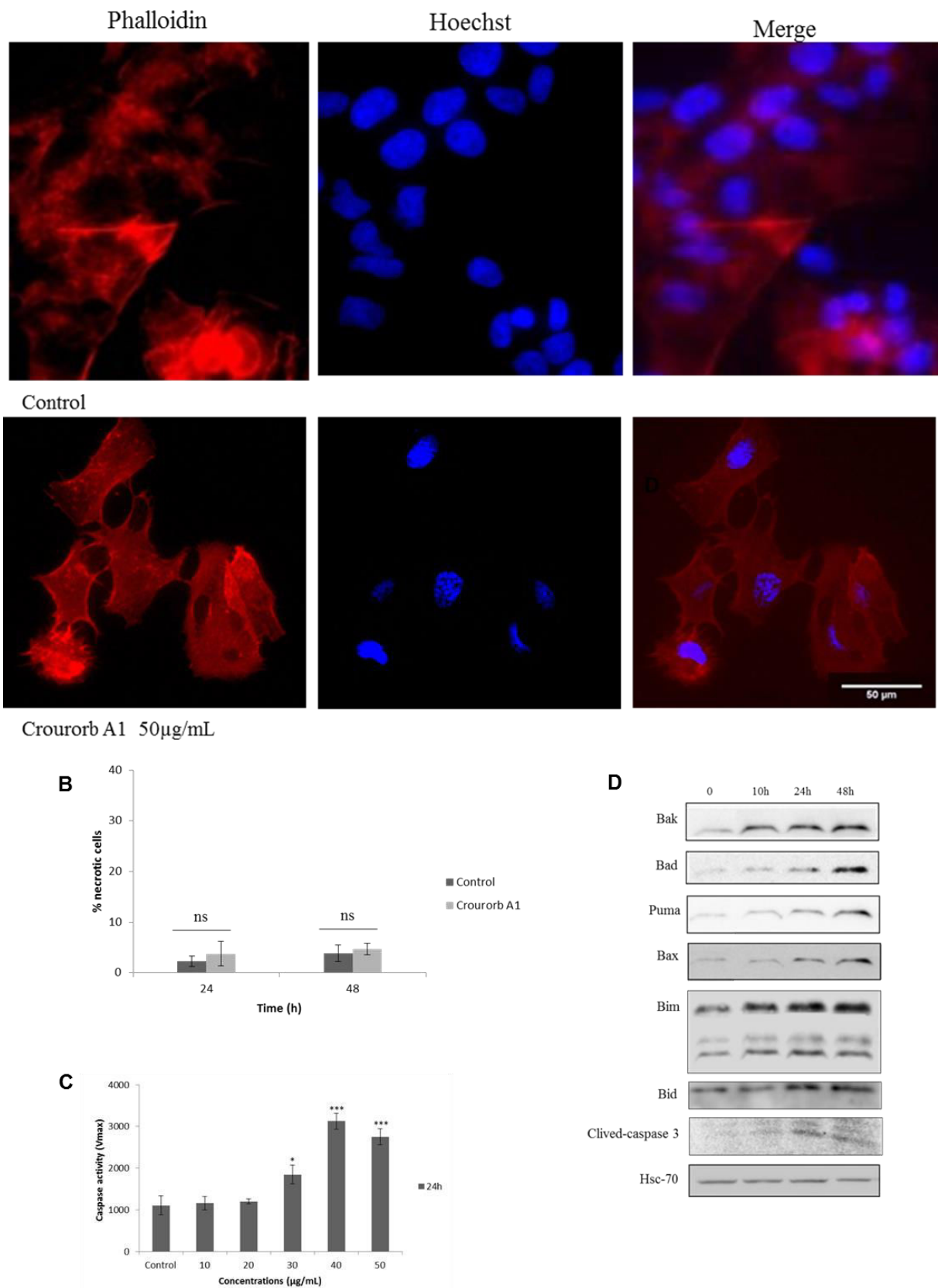


Figure 3. Effects of crouorb A1 on apoptosis and necrosis in 2D Huh-7 cells. (A) Morphological changes of Huh-7 cells in the presence or absence of crouorb A1. Huh-7 cells were treated with 50µg/ml of crouorb A1 or with 0.05% DMSO as control

for 24 h (magnification x40, scale bar = 50 μ m). (B) Study of Huh-7 necrosis: cells are stained with Hoechst and Propidium Iodide, after 24h and 48h of treatment with crouorb A1 (36 μ g/mL) or with 0.036% DMSO as control. (C) Apoptosis of Huh7 was determined by Caspase-3/7 activities by DEVD-AMC fluorometric assay after 24h treatment with different concentrations of crouorb A1 (10-50 μ g/mL) or with 0.05% DMSO as control. (D) For apoptosis-related proteins levels, Huh-7 cells were treated with 36 μ g/mL of crouorb A1 for 10, 24 and 48h and subjected to Western blotting with different proapoptotic antibodies, with Hsc-70 as an internal control. Results are expressed as the mean of three independent experiments (mean \pm SD; * p <0.05; *** p <0.001).

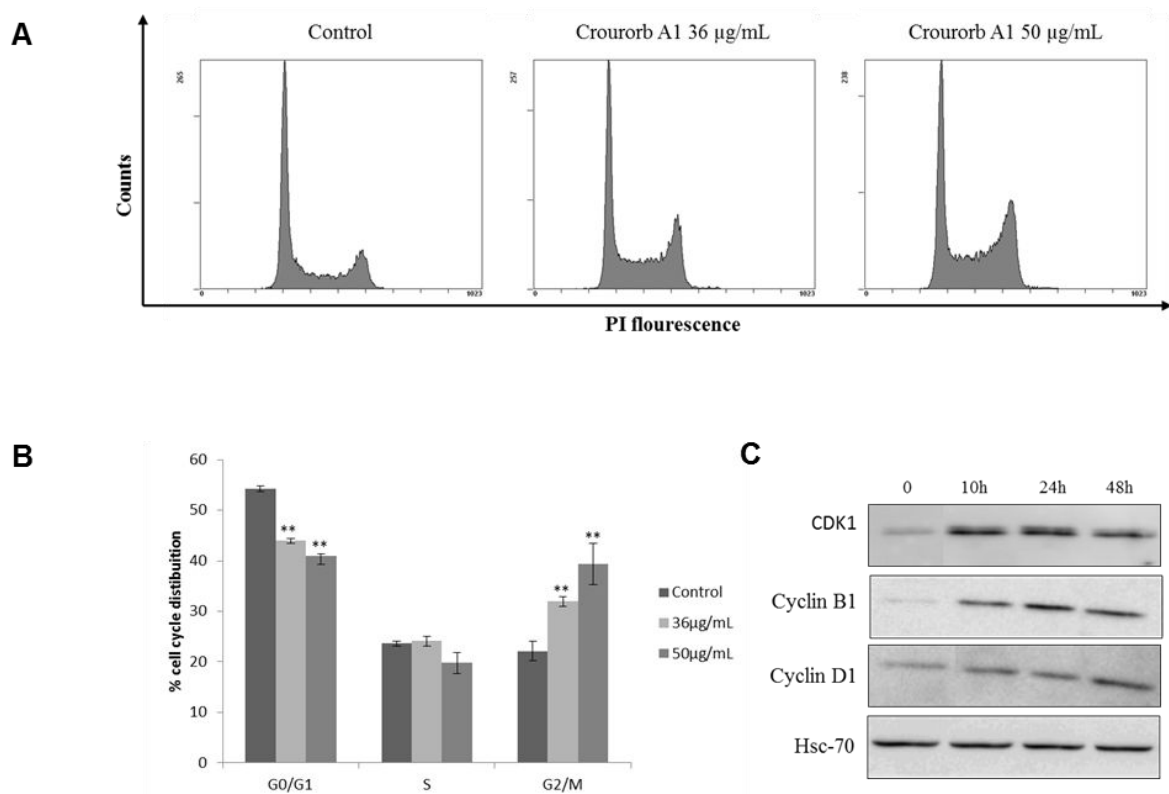


Figure 4. Effects of crouorb A1 on cell cycle phase distribution in 2D Huh-7 cells. (A) Representative histograms depicting cell cycle distribution in Huh-7 cells treated with crouorb A1 (36 or 50 μ g/mL) or with 0.05% DMSO as control for 24h and the cell-cycle distribution was analyzed by flow cytometry. (B) The percentage of cells in the G0/G1, S, and G2/M phases of the cell cycle are shown. (C) For protein levels, cells were subjected to Western blot for analysis of the expression of CDK-1 and cyclin B1

together with Hsc-70 as an internal control. The data are represented as mean \pm SD of three independent experiments (** $p < 0.01$).

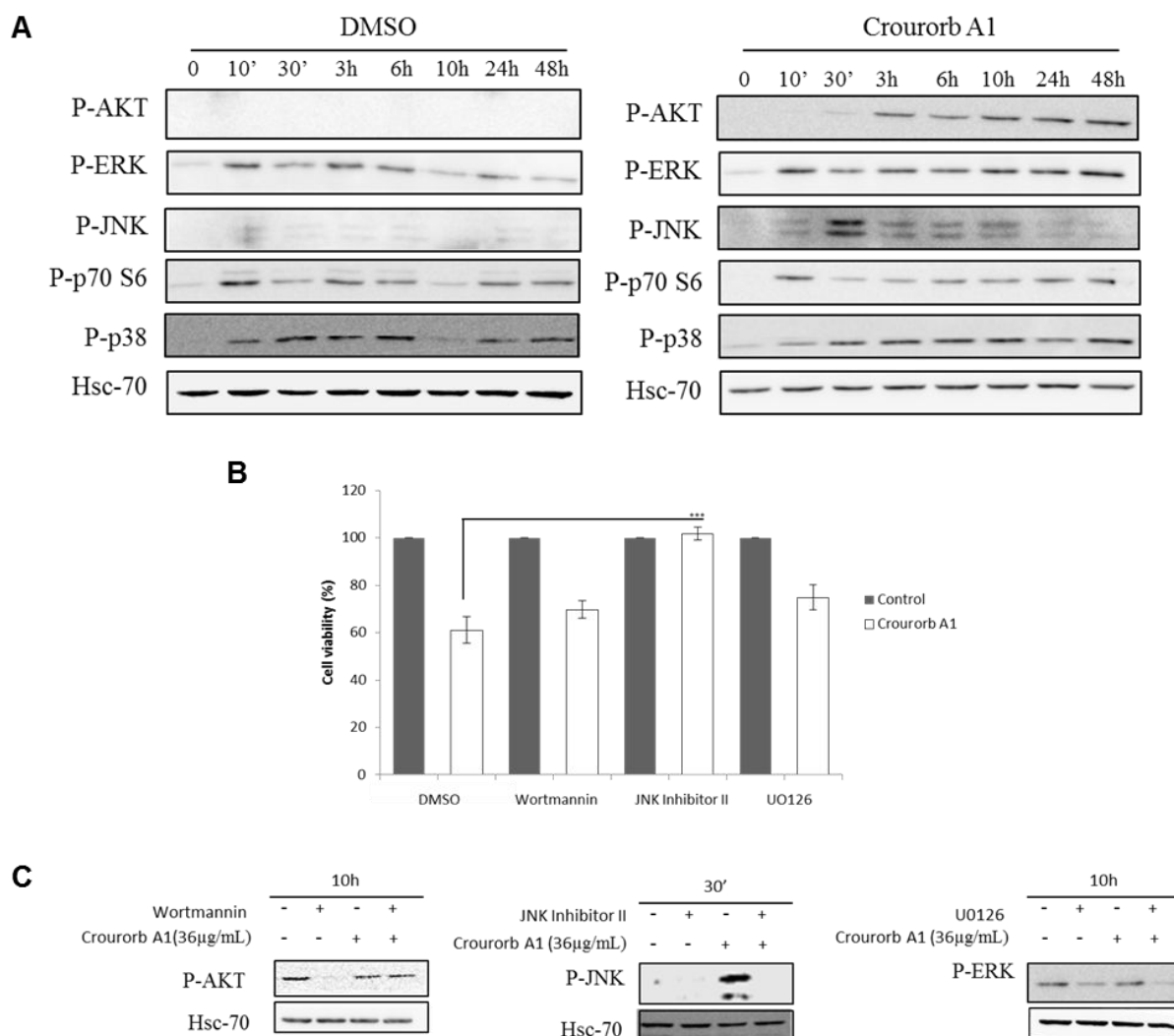


Figure 5. Effects of crouorb A1 on cell signaling pathways in 2D Huh-7 cells. (A) Huh-7 cells were treated with 36 μ g/mL of crouorb A1 or with 0.036% DMSO as control and arrested at the indicated times to analyze phosphorylated AKT, ERK1/2, JNK, p70S6 and p38 protein levels by Western Blot. Hsc-70 served as an internal control. (B and C) Cells were pretreated for 1 h with dimethyl sulfoxide or with the MEK inhibitor U0126 or wortmannin or JNK inhibitor II (and then exposed to 36 μ g/mL of peptide). (B) WST-1 assays were performed after 24 h of cotreatment with U0126 or wortmannin or JNK inhibitor II and crouorb A1. (C) AKT, ERK1/2 and JNK phosphorylations were monitored by western blot and Hsc-70 was used as an internal control. The data are represented as mean \pm SD of three independent experiments (*** $p < 0.001$).

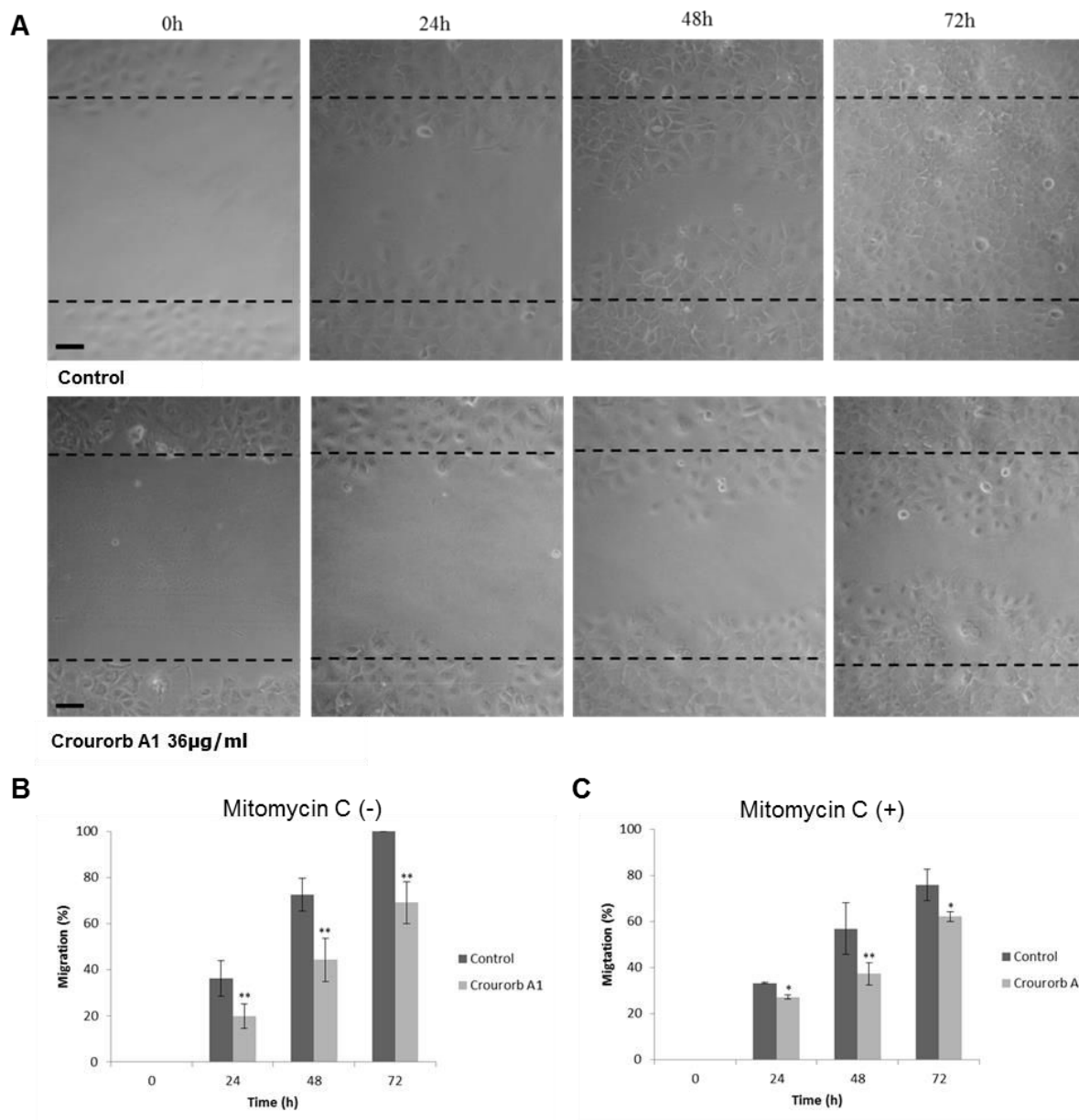


Figure 6. Crouorb A1 inhibits migration in 2D Huh-7 cells. Cells were cultured in the absence (A-B) or presence (C) of mitomycin C and treated with crouorb A1 (36 µg/mL) or with 0.036% DMSO as control for 24, 48 and 72h. The rate of migration was measured by quantifying the total distance that the cells moved from the edge of the scratch toward the center. Values are represented as mean±SD of three independent experiments (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, relative to those of the control group). Scale bar = 100µm.

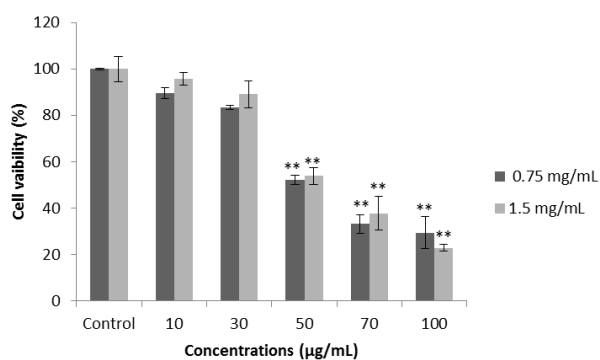


Figure 7. Cell viability (%) in 3D cultures (collagen gel 0.75 and 1.5 mg/mL) was determined by WST-1 assay. Huh-7 cells were treated with increasing concentrations of crouorb A1 (10-100 µg/mL) or with 0.1% DMSO as control for 24h after, 6 days of cultures. Results are expressed as percentage change compared to the control (** p<0.01; significantly different from the control).

Table 2. IC₅₀ values, given in µg/mL, for crouorb A1 on 3D Huh-7 cell lines.

| Days of cultures | Collagen gel (mg/mL) | IC ₅₀ (µg/mL)±SD* | |
|------------------|----------------------|------------------------------|------------|
| | | Crouorb A1 | Cisplatin |
| 6 | 0.75 | 62.10±4.70 | 42.50±6.30 |
| | 1.5 | 62.52±3.12 | 36.48±0.77 |

*IC₅₀ values were expressed as the concentration that inhibited the growth of cells by 50%. Results are expressed as the mean of three independent experiments ± SD. Cisplatin was employed as positive control.

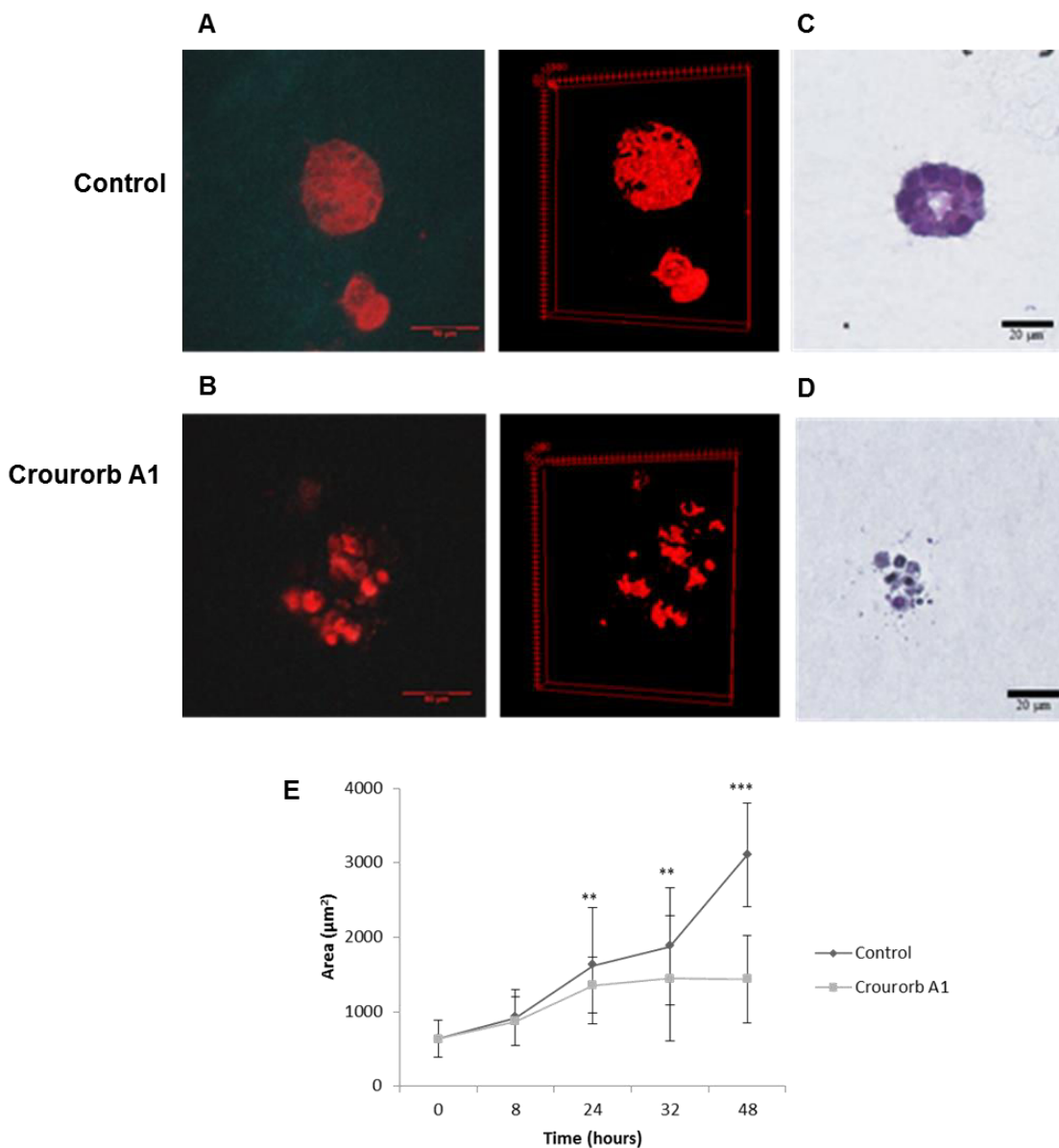


Figure 8. Cell proliferation kinetics in 3D collagen gel cultures (collagen gel 1.5 mg/mL). (A) 3D reconstruction of Huh-7 cells treated with 0.062% DMSO as control or (B) 62 μg/mL of crouorb A1 for 48h after, 4 days of cultures in 1.5 mg/mL collagen gel. For fluorescent dye labeling, cells were incubated with PBS containing 50 μM of RS19 for 20 minutes. (C) Hematoxylin and Eosin staining after paraffin inclusion and observation with slide scanner of Huh-7 spheroids treated for 48h with 0.062% DMSO as control or (D) 62 μg/mL of crouorb A1 for 48h after, 4 days of cultures in 1.5 mg/mL collagen gel. (E) Huh-7 cells were treated with 62 μg/mL of crouorb A1 or with 0.062% DMSO as control for 8h, 24h, 32h and 48h after, 4 days of cultures and cell surface (area) was measured (* p<0.01, *** p<0.001; significantly different from the control).

SUPPLEMENTARY FIGURES

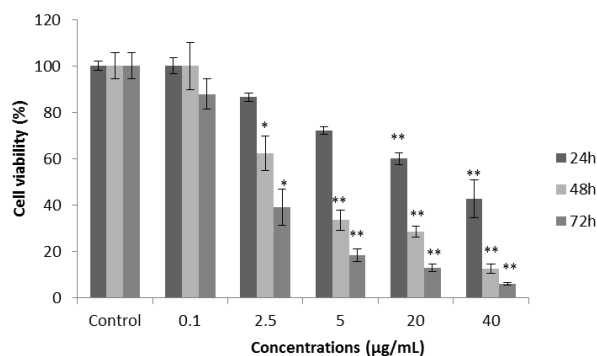


Figure 1. Cell viability (%) in 2D cultures was determined by WST-1 assay. Cisplatin (0.1-40 µg/mL) was employed as positive control. Results are expressed as percentage change compared to the control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; significantly different from the control).

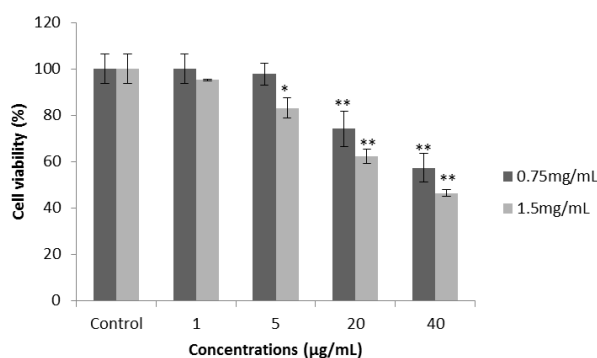


Figure 2. Cell viability (%) in 3D cultures (collagen gel 0.75 and 1.5 mg/mL) was determined by WST-1 assay. Cisplatin (1-40 µg/mL) was employed as positive control for 24h after, 6 days of cultures. Results are expressed as percentage change compared to the control (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; significantly different from the control).

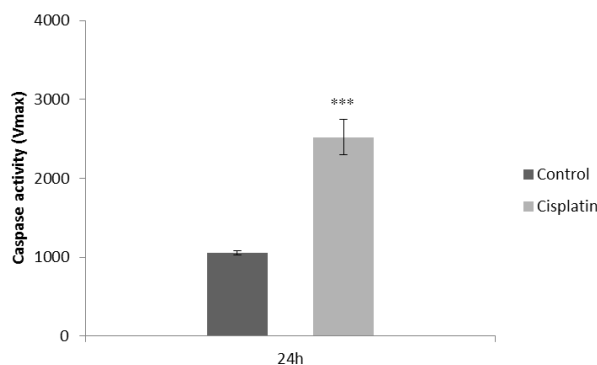


Figure 3. Cisplatin (20 µg/mL) was employed as positive control by DEVD-AMC fluorometric assay (***) $p < 0.001$; significantly different from the control).

CAPÍTULO III:
UN NOUVEAU CYCLOPEPTIDE CYTOTOXIQUE EXTRAIT DU
LATEX DE *CROTON URUCURANA* BAILLON (EUPHORBIACEAE);
ETUDE *IN VITRO* DE SON ACTIVITE CYTOTOXIQUE
Résumé de Thèse

PRÉSENTATION DU TRAVAIL DE RECHERCHE

Cette thèse a été réalisée dans le cadre d'une collaboration en convention de cotutelle entre l'Université de Rennes 1 (France) au sein de l'équipe «Signalisation et Modélisation» de l'Institut de Recherche en Santé, Environnement et Travail (IRSET, UMR Inserm 1085) de Rennes sous la direction de Dr. Georges Baffet et l'Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (Brésil) au sein du «Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais Bioativos (ProNaBio)» de l'Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) sous la direction de Dr. Walmir Silva Garcez. Les travaux ont porté sur le fractionnement du latex de *Croton urucurana* Baillon visant à isoler un composé cytotoxique et à étudier son effet sur des lignées cellulaires cancéreuses. L'isolement et la détermination de la structure d'un nouveau composé, nommé [1–9-NαC]-crouorb A1 ont été réalisés à l'UFMS (Brésil) tandis que l'étude de son activité cytotoxique a été réalisée à l'IRSET (France) sur une lignée d'hépatocarcinome humain.

INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Croton urucurana Baillon (Euphorbiaceae), est une plante très connue et utilisée en médecine traditionnelle au Brésil, la «sangra-d'água» retrouvée dans l'État du Mato Grosso do Sul (région Centre-Ouest du Brésil). Son latex est abondamment utilisé en médecine traditionnelle dans le traitement de plusieurs types de cancer. En dépit de son importance ethnopharmacologique, on ne trouve aucune étude sur sa composition chimique ou sur sa potentielle activité anti-cancéreuse.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'activité cytotoxique des extraits totaux, fractions d'extraits et de molécules purifiées, isolées du latex de *C. urucurana*. Nous avons étudié plus particulièrement les effets du crouorb A1 sur la viabilité, l'apoptose, le cycle cellulaire et la migration de cellules issues de carcinome hépatocellulaire humaine (Huh-7). Nous avons également évalué l'effet du crouorb A1 sur la viabilité des cellules Huh-7 cultivées dans les gels de collagène en 3D.

Le premier chapitre de cette thèse est consacré à l'isolement et à la détermination de la structure chimique d'un nouveau cyclopeptide isolé à partir du fractionnement chromatographique du latex de *C. urucurana* Baillon par des tests de cytotoxicité à la sulforhodamine B (SRB) sur six lignées cellulaires cancéreuses humaines. Cette nouvelle molécule a montré une activité cytotoxique importante sur ces cellules cancéreuses.

Le second chapitre expose les résultats obtenus concernant les effets et l'évaluation du mécanisme d'action impliqué dans l'activité cytotoxique de [1-9-N α C]-crouorb A1 sur les cellules de carcinome hépatocellulaire humain (Huh-7).

RÉSULTATS

CHAPITRE 1: Un nouvel orbitide cytotoxique extrait du latex de *Croton urucurana*

Le latex de *C. urucurana* a été collecté dans l'habitat naturel de la plante durant le mois de Mars 2012 à Campo Grande, Brésil. La détermination botanique de cette espèce a été réalisée par le Pr. Arnildo Pott du Centre des Sciences Biologiques de la Santé de l'Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Brésil.

L'étude phytochimique du latex de *C. urucurana* bioguidé et de son activité cytotoxique ont été réalisées par le test à la sulforhodamine B sur six lignées cellulaires cancéreuses : 786-0 (carcinome du rein), HT-29 (carcinome du colon), NCI-ADR/RES (adénocarcinome ovarien, phénotype de multirésistance), MCF-7 (adénocarcinome mammaire), PC-03 (carcinome de la prostate) et Hep-G2 (carcinome hépatocellulaire). L'évaluation de l'effet cytotoxique de la molécule isolée à partir de latex a été également réalisée sur une lignée cellulaire non cancéreuse de fibroblastes murins, les cellules NIH/3T3. Les résultats de cytotoxicité ont été exprimés en concentration inhibitrice médiane inhibant 50% de la viabilité/croissance cellulaire (CI₅₀).

La fraction 'acétate d'éthyle' du latex a été fractionnée sur une colonne de Séphadex LH-20 et éluée par du MeOH en six fractions : de F1 à F6. La fraction F2 est la plus active sur les lignées cellulaires 786-0 (CI₅₀ = 5,42 µg ml⁻¹) et NCI-ADR/RES (CI₅₀ = 3,93 µg ml⁻¹). Cette fraction a été analysée par HPLC semi préparative en mode isocratique qui a permis d'obtenir un composé majeur, le composé 1 dont l'identification et la structure moléculaire ont été déterminées par spectrométrie de masse.

Le composé 1 a été obtenu sous forme d'un composé solide blanc amorphe. Son analyse par spectrométrie de masse haute résolution a montré la présence d'un ion pseudomoléculaire [M+H]⁺ ayant un m/z 817,4199 correspond à un composé de formule moléculaire C₃₇H₅₇N₁₀O₁₁ (calcul pour C₃₇H₅₇N₁₀O₁₁, m/z = 817,4203). Les spectres de résonance magnétique nucléaire (RMN) 1D ¹³C et ¹H ont montré la présence de signaux caractéristiques d'un polypeptide.

La détermination de la séquence d'acides aminés du composé 1 a été réalisée par utilisation de méthodes de spectrométrie de résonance magnétique nucléaire à deux dimensions (¹H et ¹³C) et de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS).

L'analyse des spectres RMN 2D a permis d'identifier la présence de neuf résidus acides aminés: trois glycines (Ga, Gb et Gc), deux leucines (La, Lb), une phénylalanine (F), une asparagine (N), une alanine (A) et une sérine (S). Les corrélations observées dans les spectres COSY ^1H - ^1H et NOESY ont permis de confirmer la nature cyclique de ce peptide et de déterminer la séquence des acides aminés, un cyclo -GaSLaGbAFGcNLb-. La caractérisation du composé 1 a été également confirmée par les données de spectrométrie de masse en tandem (MS/MS), montrant des fragments compatibles avec la séquence des résidus d'acides aminés identifiés.

Ce composé 1, isolé pour la première fois du latex de *C. urucurana*, est un cyclononapeptide que nous avons nommé [1-9-NaC]-crouorb A1. Basé sur son squelette, il peut être classé comme un cyclopeptide de type Caryophyllaceae récemment redéfini comme un orbitide.

L'activité de [1-9-NaC]-crouorb A1 a été évaluée dans six lignées cellulaires cancéreuses humaines. Le composé présente une cytotoxicité puissante sur la lignée cellulaire cancéreuse NCI-ADR/RES (ovaire, le phénotype de multirésistance) ($\text{CI}_{50} = 4,8 \mu\text{M}$) à un niveau équivalent à celle de la doxorubicine (témoin positif) ($\text{CI}_{50} = 5,1 \mu\text{M}$), montrant que le composé 1 de la fraction 2 est en partie responsable de l'effet cytotoxique sur cette lignée cellulaire. Cependant, ce composé a une activité plus modérée sur les cellules 786-0 avec une CI_{50} supérieure à la fraction 2. Ce composé ne peut donc porter en totalité l'activité cytotoxique observée pour le fraction 2 des cellules 786-0. Le composé 1 est de plus pratiquement inactif ($\text{CI}_{50} \Rightarrow 305,8 \mu\text{M}$) sur la lignée non cancéreuse NIH/3T3, montrant une inhibition qui pourrait être sélective contre les cellules cancéreuses analysées.

Nos résultats indiquent un potentiel thérapeutique anticancéreux du latex de *C. urucurana*. Cependant, des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer les mécanismes d'action impliqués dans la cytotoxicité cellulaire du crouorb A1 sur des lignées de cellules cancéreuses humaines.

CHAPITRE 2: Le [1–9-NaC]-crouorb A1 isolé du latex de *Croton urucurana* induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose des cellules issues de carcinome hépatocellulaire humain

Nous avons isolé et identifié un cyclononapeptide, nommé [1–9-NaC]-crouorb A1, à partir du latex de *Croton urucurana*. Dans ce travail, l'activité cytotoxique et les mécanismes d'action du crouorb A1 ont été analysés dans les cellules issues d'un carcinome hépatocellulaire humain, Huh-7.

L'évaluation de la cytotoxicité *in vitro* du crouorb A1 (test wst1) sur les cellules Huh-7 a démontré que la viabilité des cellules est inhibée de manière dose et temps-dépendant : CI_{50} de $35,75 \pm 1,00$, $30,41 \pm 2,14$ et $20,07 \pm 3,40$ $\mu\text{g/mL}$, respectivement après 24, 48 et 72h de traitement.

Le Crouorb A1 induit des altérations morphologiques liées à l'apoptose après observation au microscope à fluorescence et marquage de l'ADN (Hoechst). Nous avons mesuré une forte activation des caspases 3 et 7 par le crouorb A1, sans progression nécrotique. Afin de déterminer les mécanismes possibles responsables de la mort cellulaire apoptotique induite par le crouorb A1, l'expression des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 a été analysée par Western blot. Nos résultats indiquent que le crouorb A1 provoque une nette augmentation de l'expression des protéines pro-apoptotiques (Bak, Bid, Bax, Puma, Bim et Bad) ainsi que de la caspase 3 clivée. L'ensemble de ces résultats démontrent que le crouorb A1 exerce un effet cytotoxique en induisant une apoptose caspase-dépendante. Nous avons également déterminé que la voie de signalisation JNK-MAPkinase semble nécessaire à l'induction de la mort cellulaire des cellules Huh-7 traitées au crouorb A1.

L'analyse de la distribution des cellules Huh-7 dans les différentes phases du cycle cellulaire (marquage à l'iodure de propidium et analyse par cytométrie de flux) montre que le Crouorb A1 induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G_2/M . Simultanément, nous avons observé une diminution du nombre des cellules Huh-7 en phase G_0/G_1 . En parallèle, les expressions de la cycline-dépendante kinase CDK1, des cyclines B1 et D1 sont augmentées après traitement au crouorb A1.

De plus, le Crouorb A1 a un effet inhibiteur significatif de la migration des cellules Huh-7, en présence ou absence de mitomycine C.

Nous avons également confirmé, l'effet inhibiteur du crourob A1 sur la viabilité des cellules Huh7 cultivées en 3D dans les gels de collagène 1 et démontré que les cellules cultivées en 3D semblent plus résistantes au crouorb A1 par rapport aux cultures en monocouche 2D. Des IC_{50} de $62,10 \pm 4,70 \mu\text{g/mL}$ et $62,52 \pm 3,12 \mu\text{g/mL}$ (après 24h de traitement) ont été obtenues respectivement avec les cellules cultivées dans des gels de collagène à $0,75 \text{ mg/mL}$ (1Pa) et $1,5 \text{ mg/mL}$ (3.5Pa) démontrant une plus forte résistance des cellules Huh7 au crourob A1 en culture 3D par rapport aux cultures 2D.

A partir dos resultados obtidos no estudo fitoquímico guiado pela atividade citotóxica frente a linhagens de células neoplásicas humanas, podemos concluir que:

1) O extrato etanólico das cascas do caule de *Croton urucurana* Baillon foi inativo até a maior concentração testada ($GI_{50} = >250 \mu\text{g/mL}$) em todas as linhagens de células neoplásicas humanas;

2) O látex de *C. urucurana* foi ativo em todas as linhagens de células neoplásicas humanas testadas e foi selecionado para a continuidade ao estudo fitoquímico biomonitorado;

3) O estudo fitoquímico biomonitorado da fase acetato de etila do látex por meio da atividade citotóxica frente a linhagens de células neoplásicas humanas levou ao isolamento de um composto majoritário, o ciclopeptídeo [1–9-N α C]-crouorb A1, inédito na literatura;

4) [1–9-N α C]-crouorb A1 se mostrou potente para a linhagem celular de adenocarcinoma de ovário resistente (NCI/ADR-RES) com um valor de $GI_{50}=3,98 \mu\text{g/mL}$ e foi tão potente quanto a doxorrubicina (controle positivo), e inativo para a linhagem de células não neoplásicas de fibroblasto murino (NIH/3T3) até a maior concentração testada ($GI_{50} = >250 \mu\text{g/mL}$) sendo seletivo para a linhagem NCI/ADR-RES;

A partir dos resultados obtidos nos diferentes sistemas-teste para elucidar os mecanismos responsáveis pela citotoxicidade induzida por [1–9-N α C]-crouorb A1 em células de hepatocarcinoma celular humano (Huh-7), podemos concluir que:

1) A citotoxicidade de [1–9-N α C]-crouorb A1 em células Huh-7 se mostrou dose e tempo dependentes;

2) [1–9-N α C]-crouorb A1 induziu apoptose em células Huh-7 e estes efeitos foram atribuídos ao aumento da atividade de caspases 3/7 e aumento da expressão de proteínas próapoptóticas. A presença de células com alterações morfológicas características da apoptose pôde ser visualizada quando observadas por microscopia de fluorescência e não foi observado nenhum efeito na necrose em células Huh-7;

4) [1–9-N α C]-crouorb A1 induziu o acúmulo de células na fase G2/M do ciclo celular e interferiu na expressão de proteínas que participam do ciclo celular,

aumentando o nível da expressão da cinase dependente de ciclina (CDK1), Ciclina B1 e Ciclina D1.

5) [1–9-N α C]-crouorb A1 inibiu a migração de células Huh-7 tempo dependente.

6) [1–9-N α C]-crouorb A1 estimulou a fosforilação da ERK1/2, JNK e AKT de maneira tempo-dependente e não influenciou nos níveis de fosforilação da p38 e p70S. A via JNK está envolvida no mecanismo de morte celular induzida por [1–9-N α C]-crouorb A1 em células Huh-7.

7) As células cultivadas em geis de colágeno em 3D apresentaram maior resistência ao [1–9-N α C]-crouorb A1 quando comparada com a cultura de células em 2D; no entanto não foi observada diferença para ambos os modelos de cultura em 3D.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2010. 1268 p.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular. In: MOLINARO, E.; CAPUTO, L.; AMENDOEIRA, R. (Org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Volume 2. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010. cap. 5, p. 215-254.

AMARAL, J. B.; MACHADO-SANTELLI, G. M. Cultura de células em 3 dimensões e a sua aplicação em estudos relacionados a formação do lúmen. **Naturalia**, v. 34, p. 1-20, 2011.

BAKER, B. M.; CHEN, C. S. Deconstructing the third dimension – how 3D culture microenvironments alter cellular cues. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 13, p. 3015-3024, 2012.

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

BONNIER, F.; KEATING, M. E.; WRÓBEL, T. P.; MAJZNER, K.; BARANSKA, M.; GARCIA-MUNOZ, A.; BLANCO, A.; BYRNE, A. J. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: a comparison of 2D and 3D cell culture models. **Toxicology in Vitro**, v. 29, p. 124–133, 2015.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p.1359-1369, 2010.

BRUIN, E. C.; MEDEMA, J. P. Apoptosis and non-apoptotic deaths in cancer development and treatment response. **Cancer Treatment Reviews**, v. 34, p. 737–749, 2008.

BUTLER, M.S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141– 2153, 2004.

CERTO, M.; MOORE, V. D. G.; NISHINO, M.; WEI, G.; KORSMEYER, S.; ARMSTRONG, S. A.; LETAI, A. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. **Cancer Cell**, v. 9, n. 5, p. 351–365, 2006.

COLLIER, A. C.; PRITSOS, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochemistry e Pharmacy**, n. 66, p. 281-287, 2003.

COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **A Célula**: uma abordagem molecular. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 716 p.

CORDEIRO, K. W.; PINTO, L. A.; FORMAGIO, A. S. N.; ANDRADE, S. F.; KASSUYA, C. A. L.; FREITAS, K. C. Antiulcerogenic effect of *Croton urucurana* Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 30, n. 1, p. 331-337, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N.; MADEIRA, S. V. F.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. A. Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 47-58, 2010.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. Impact of natural products on developing new anti-cancer agents. **Chemical Reviews**, v. 109, p. 3012–3043, 2009.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p.703–723, 2014.

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

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 72–79, 2005.

CZABOTAR, P. E.; LESSENE, G.; STRASSER, A.; ADAMS, J. M. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nature Reviews, Molecular Cell Biology**, v. 15, p. 49-63, 2014.

DAVIDSON, G.; NIEHRS, C. Emerging links between CDK cell cycle regulators and Wnt signaling. **Trends in Cell Biology**, v. 20, n. 8, p. 453-460, 2010.

ELLEDGE, S. J. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science**, v. 274, p. 1664-1672, 1996.

ESMERALDINO, E., SOUZA, A. M.; SAMPAIO, S. V. Evaluation of the effect of aqueous extract of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) on the hemorrhagic activity induced by the venom of *Bothrops jararaca*, using new techniques to quantify hemorrhagic activity in rats skin. **Phytomedicine**, v. 8, p. 570–576, 2005.

FANG, X.-W.; CHEN, W.; FAN, J.-T.; SONG, R.; WANG, L.; GU, Y.- H.; ZENG, G.-Z.; SHEN, Y.; WU, X.- F.; TAN, N.- H.; XU, Q.; SUN, Y. Plant cyclopeptide RA-V kills human breast cancer cells by inducing mitochondria-mediated apoptosis through blocking PDK1–AKT interaction. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 267, p. 95–103, 2013.

FIGUEIREDO, P. O.; GARCEZ, F. R.; MATOS, M. F. C.; PERDOMO, R. T.; QUEIROZ, L. M. M.; POTT, A.; GARCEZ, A. J. S.; GARCEZ, W. S. A new cytotoxic β -carboline alkaloid from *Galianthe thalictroides*. **Planta Medica**, v. 77, p. 1852-1854, 2011.

FIGUEIREDO, P. O.; PERDOMO, R. T.; GARCEZ, F. R.; MATOS, M. F. C.; CARVALHO, J. E.; GARCEZ, W. S. Further constituents of *Galianthe thalictroides* (Rubiaceae) and inhibition of DNA topoisomerases I and II α by its cytotoxic β -carboline alkaloids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 1358-1361, 2014.

FISICHELLA, M.; DABBOUE, H.; BHATTACHARYYA, S.; SABOUNGI, M.-L.; SALVETAT, J.-P.; HEVOR, T.; GUERIN, M. Mesoporous silica nanoparticles enhance MTT formazan exocytosis in HeLa cells and astrocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 23, p. 697–703, 2009.

FRANCOEUR, A.-M.; ASSALIAN, A. Microcat: a novel cell proliferation and cytotoxicity assay based on WST-1. **Biochemica**, n. 3, p. 19-25, 1996.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6 ed. A John Wiley & Sons, Inc., Publication, 2010. 732 p.

FRODIN, D.G. History and concepts of big plant genera. **Taxon**, v. 53, p. 753–776, 2004.

GALLUZZI, L.; VITALE, I.; ABRAMS, J. M.; ALNEMRI, E. E.; BAEHRECKE, E. K. BLAGOSKLONNY, M. V.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EL-DEIRY, W. S.; FULDA, S.; GOTTLIEB, E.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M. O.; KEPP, O.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; LU, X.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MEHLEN, P.; NUNEZ, G.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; RUBINSZTEIN, D. C.; SHI, Y.; SIMON, H. Y.; VANDENABEELE, P.; WHITE, E.; YUAN, J.; ZHIVOTOVSKY,

B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on cell death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, p. 107–120, 2012.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; MATOS, M. F. C.; GUTERRES, Z. R.; MANTOVANI, M. S.; MISU, C. K.; NAKASHITA, S. T. Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. **Planta Medica**, v. 71, n.10, p. 923-927, 2005.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SANTANA, A. L. B. D.; ALVES, M. M.; MATOS, M. F. C.; SCALIANTE, A. M. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia* (Combretaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, p. 1223-1228, 2006.

GARCEZ, F. R.; SILVA, A. F. G.; GARCEZ, W. S.; LINCK, G.; MATOS, M. F. C.; SANTOS, E. C. S.; QUEIROZ, L. M. M. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. **Planta Medica**, v. 77, p. 383-387, 2011.

GIDROL, X.; FOUQUE, B.; GHENIM, L.; HAGUET, V.; PICOLLET-D'HAHAN, N.; SCHAACK, B. 2D and 3D cell microarrays in pharmacology. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 664–668, 2009.

GIESE, K.; KAUFMANN, J.; PRONK, G. J.; KLIPPEL, A. Unraveling novel intracellular pathways in cell-based assays. **Drug Discovery Today**, v. 7, p. 179–186, 2002.

GODUGU, C.; PATEL, A.R.; DESAI, U.; ANDEY, T.; SAMS, A.; SINGH, M. AlgiMatrix™ based 3D cell culture system as an in-vitro tumor model for anticancer studies. **Plos One**, v. 8, n, 1, 2013.

GORDALIZA, M. Natural products as leads to anticancer drugs. **Clinical and Translational Oncology**, v. 9, p. 767-776, 2007.

GRANADA, A.; NEMEN, D.; DORA, C.L.; NECKEL, G.L.; LEMOS-SENNA, E. Emprego de sistemas de liberação como estratégia para melhorar as propriedades terapêuticas de fármacos de origem natural: o exemplo da camptotecina e seus derivados. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p.129-139, 2007.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

GUPTA, D.; BLEAKLEY, B.; GUPTA, R. K. Dragon's blood: botany, chemistry and therapeutic uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 361–380, 2008.

GUPTA, S.; KASS, G. E. N.; SZEGEZDI, E.; JOSEPH, B. The mitochondrial death pathway: a promising therapeutic target in diseases. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 13, n. 6, p. 1004-1033, 2009.

GURGEL, L. A. **Avaliação experimental da atividade antidiarréica do látex do *Croton urucurana* Baill.** 2000. 146f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.

GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J.; MARTINS, D. T.; FILHO, C. V.; RAO, V. S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 409-412, 2005.

GURGEL, L.A.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; MARTINS, D.T.; MATTOS, P.O.; RAO, V.S. Studies on the antidiarrhoeal effect of dragon's blood from *Croton urucurana*. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 4, p. 319-322, 2001.

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

HAJRA, K. M.; LIU, J. R. Apoptosome dysfunction in human cancer. **Apoptosis**, v. 9, p. 691-704, 2004.

HALAMA, A. Metabolomics in cell culture—A strategy to study crucial metabolic pathways in cancer development and the response to treatment. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 564, p. 100–109, 2014.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

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

HASEN, J.; BROSS, P. A cellular viability assay to monitor drug toxicity. **Methods in Molecular Biology**, v. 648, p. 303–311, 2010.

HASSAN, M.; WATARI, H.; ABUALMAATY, A.; OHBA, Y.; SAKURAGI, N. Apoptosis and molecular targeting therapy in cancer. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

HEINRICH, M.; BARNES, J.; GIBBONS, S.; WILLIAMSON, E.M. **Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy**. 2.ed. London: Churchill Livingstone, 2004. 309 p.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, p. 770–776, 2000.

HENSON, P. M.; TUDER, R. M. Apoptosis in the lung: induction, clearance and detection. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 294, p. 601–611, 2008.

HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? **Nature reviews - Molecular cell biology**, v. 9, p. 910-916, 2008.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P.J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v. 42, p. 377–387, 2007.

HOWES, A. L.; RICHARDSON, R. D.; FINLAY, D.; VUORI, K. 3-Dimensional culture systems for anti-cancer compound profiling and high-throughput screening reveal increases in EGFR inhibitor-mediated cytotoxicity compared to monolayer culture systems. **Plos One**, v. 9, n.9, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA. **Estimativa/2014: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014. 124p.

JOHNSTONE, R. W.; RUEFLI, A. A.; LOWE, S. W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v. 108, p. 153-164, 2002.

KARP, G. **Biologie cellulaire et moléculaire**. 3. ed. Editeur: De Boeck Supérieur, 2010. 840 p.

KASTAN, M. B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. **Nature**, v. 432, 2004.

KHODJAKOV, A.; RIEDER, C. L. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. **Journal of Biology**, v. 8, n. 10, 2009.

KIM, J. B. Three-dimensional tissue culture models in cancer biology. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, p. 365–377, 2005.

KRUEGER, A.; BAUMANN, S.; KRAMMER, P. H.; KIRCHHOFF, S. Flice-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 21, p. 8247–8254, 2001.

KUWANA, T.; MACKEY, M. R.; PERKINS, G.; ELLISMAN, M. H.; LATTERICH, M.; SCHNEITER, R.; GREEN, D. R.; NEWMAYER, D. D. Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. **Cell**, v. 111, p. 331-342, 2002.

LIMA, E. C.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; SOARES, F. P.; EMRICH, E. B.; SILVA, A. A. N. Indução de calos em segmentos foliares de sangra d água (*Croton urucurana* Baill.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 17-22, 2008.

LIMA, L. R. de; PIRANI, J. R. Revisão taxonômica de *Croton* sect. Lamprocroton (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.). **Biota Neotropica**, v. 8, n. 2, p. 177-231, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5 ed. Vol. 1. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 384 p.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 2ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

MA, X.; WU, C.; WANG, W.; LI, X. Peptides from plants: a new source for antitumor drug research. **Asian Journal of Traditional Medicines**, v. 1, p. 85-90, 2006.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; VEIGA, V. E. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 23, p. 429-438, 2002.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153-66, 2009.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2 p. 143-148, 2002.

MASTERS, J. R. HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, p. 315-319, 2002.

MATOS, M. F. C.; LEITE, L. I. S. P.; BRUSTOLIM, D.; SIQUEIRA, J. M. de; CAROLLO, C. A.; HELLMANN, A. R.; PEREIRA, N. F.; SILVA, D. B. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 3, p. 227-229, 2006.

MATTOS, P. E. O. **Validação pré-clínica das atividades antinociceptiva, antiinflamatória, cicatrizante e antiespasmódica do latex de *Croton urucurana* Baillon (Sangra Dagua)**. 2001. 131 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2001.

MEHMOOD, R.; MALIK, A. Isolation and characterization of Crotosparsamide, a new cyclic nonapeptide from *Croton sparsiflorus*. **Natural Product Communications**, v. 5, n. 12, p. 1885 – 1888, 2010.

MELO, P. S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In vitro Cellular & Developmental Biology: Animal**, v. 36, p. 639-543, 2000.

MIKHAIL, A. S.; EETEZADI, S.; ALLEN, C. Multicellular tumor spheroids for evaluation of cytotoxicity and tumor growth inhibitory effects of nanomedicines in vitro: a comparison of docetaxel-loaded block copolymer micelles and Taxotere(R). **Plos One**, v. 8, n. 4, 2013.

MILO, B. A.; RISCO, E.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; CANIGUERAL, S. Characterization of a fucoarabinogalactan, the main polysaccharide from the gum exudate of *Croton urucurana*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1143-1146, 2002.

MISHRA, A.; GAURI, S. S.; MUKHOPADHYAY, S. K.; CHATTERJEE, S.; DAS, S. S.; MANDAL, S. M.; DEY, S. Identification and structural characterization of a new pro-apoptotic cyclic octapeptide cyclosaplin from somatic seedlings of *Santalum album* L. **Peptides**, v. 54, p. 148–158, 2014.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; RAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of National Cancer Institute**, v.83, n.11, p.757-766, 1991.

MONTOPOLI, M.; BERTIN, R.; CHEN, Z.; BOLCATO, J.; CAPARROTTA, L.; FROLDI, G. Croton lechleri sap and isolated alkaloid taspine exhibit inhibition against human melanoma SK23 and colon cancer HT29 cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 747-753, 2012.

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

MOTTA, L. B.; FURLANA, C. M.; SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G.; CARVALHO, J. E. de; MONTEIRO, P. A.; RUIZ, A. L. T. G.; CARUZO, M. B.; SALATINO, A. Antiproliferative activity and constituents of leaf extracts of *Croton sphaerogynus* Baill. (Euphorbiaceae). **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 661- 665, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NGAMWONGSATIT, P.; BANADA, P. P.; PANBANGRED, W.; BHUNIA, A. K. WST-1-based cell cytotoxicity assay as a substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line. **Journal of Microbiological Methods**, v. 73, p. 211-215, 2008.

O'CONNOR, C. M.; ADAMS, J. U. **Essentials of Cell Biology**. Cambridge: NPG Education, 2010. Disponível em: Scitable, Nature Genetics <<http://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-cell-biology-14749010>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

OLIVEIRA, I. S.; LIMA, J. C. S.; SILVA, R. M.; MARTINS, D. T. O. Triagem da atividade antibacteriana *in vitro* do látex e extratos de *Croton urucurana* Baillon. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 587-593, 2008.

PALMEIRA JÚNIOR, S. F.; ALVES, V. L.; MOURA, F. S.; VIEIRA, L. F. A.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Constituintes químicos das folhas de *Croton*

sellowii (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.397-402, 2006.

PAMPALONI, F.; REYNAUD, E. G.; STELZER, E. H. The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, p. 839–845, 2007.

PERES, M. T. L. P.; MONACHE, F. D.; CRUZ, A. B.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A. Chemical and antimicrobial activity of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Ethnofarmacology**, v. 56, p. 223-226, 1997.

PERES, M. T. L. P.; MONACHE, F. D.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. S.; BEIRITH, A.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. Analgesic compounds of *Croton urucurana* Baillon. Pharmacological criteria used in their isolation. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 209-211, 1998a.

PERES, M. T. L. P.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; MONACHE, F. D. Clerodane diterpenes of *Croton urucurana*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 171-174, 1998b.

PETROS, A. M.; OLEJNICZAK, E. T.; FESIK, S. W. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, p. 83-94, 2004.

PINTO, L. F. R.; FELZENSZWALB, I. Genética do câncer humano. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K (Org). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. da Ulbra, 2003. cap. 2, p. 29-44.

PIZZOLATTI, M. G.; BORTOLUZZI, A. J.; BRIGHENTE, I. M. C.; ZUCHINALLI, A.; CARVALHO, F. K.; CANDIDO, A. C. S.; PERES, M. T. L. P. Clerodane diterpenes from bark of *Croton urucurana* Baillon. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 4, p. 1-6, 2013.

POEHLMANN, A.; ROESSNER, A. Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. **Pathology – Research and Practice**, v. 206, p. 591–601, 2010.

QUINTYNE-WALCOTT, S.; MAXWELL, A. R.; REYNOLDS, W. F. Crotogossamide, a cyclic nonapeptide from the latex of *Croton gossypifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1374-1376, 2007.

RAHIER, N. J.; THOMAS, C. J.; HECHT, S. M. Camptothecin and its analogs. In: CRAGG, G. M.; KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. (Eds.). **Anticancer Agents from Natural Products**. 1. ed. Brunner-Routledge Psychology Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, 2005. cap. 2, p. 5–22.

RAO, V.S.; GURGEL, L.A.; LIMA-JÚNIOR, R.C.P.; MARTINS, D.T.O.; CECHINEL-FILHO, V.; SANTOS, F.A. Dragon's blood from *Croton urucurana* (Baill.) attenuates visceral nociception in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 357–360, 2007.

REBELLO, M. A. **Fundamentos da Cultura de Tecido e Células Animais**. Rio de Janeiro: Rubio, 2014. 181p.

REUTER, S.; EIFES, S.; DICATO, M.; AGGARWAL, B. B.; DIEDERICH, M. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 76, p.1340–1351, 2008.

REYNOLDS, A. S. The deaths of a cell: How language and metaphor influence the science of cell death. **Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences**, p. 1-10, 2014.

RISCO, E.; GHIA, F.; VILA, R.; IGLESIAS, J.; ÁLVAREZ, E.; CANIGUERAL, S. Immunomodulatory activity and chemical characterisation of sangre de drago (dragon's blood) from *Croton lechleri*. **Planta Medica**, v. 69, n. 9, p. 785-794, 2003.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Patologia: bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 364-369, 2001.

RUBINSTEIN, L. V.; SHOEMAKER, K. D.; PAULL, R. M. In vitro anticancer-drug-screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1113-1118, 1990.

RUPNARAIN, C.; DLAMINI, Z.; NAICKER, S.; BHOOLA, K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 385, p. 449-464, 2004.

SAFA, A. R.; DAY, T. W.; WU, C.-H. Cellular FLICE-Like Inhibitory Protein (C-FLIP): a novel target for cancer therapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 8, p. 37-46, 2008.

SAHA, S. K.; KHUDA-BUKHS, A. R. Molecular approaches towards development of purified natural products and their structurally known derivatives as efficient anti-cancer drugs: current trends. **European Journal of Pharmacology**, v. 714, p. 239–248, 2013.

SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F.; NEGRI, G. Traditional uses, chemistry and pharmacology of Croton species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N.N.; CLARK, M.; ANGELES, F.M.; LAO, J.; BUSTAMANTE, S.; MILLER, M.J. Sangre de grado *Croton palanostigma* induces apoptosis in human gastrointestinal cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2-3, p. 121-129, 2002.

SCHWARTZ, G. K.; SHAH, M. A. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9408-9421, 2005.

SHARMA, S. V.; HABER, D. A.; SETTLEMAN, J. Cell line-based platforms to evaluate the therapeutic efficacy of candidate anticancer agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 4, p. 241–253, 2010.

SHOEMAKER, R. H. The NCI 60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews - Cancer**, v. 6, p. 813-823, 2006.

SILVA, G. A. **Estudo Farmacognóstico de *Croton urucurana* Baillon (sangra d'água)**. 1999. 285 f. Tese (Doutorado em Fármaco e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP, São Paulo, 1999.

SILVA, C. E. L. da; MINGUZZI, S.; SILVA, R. C. L. da ; MATOS, M. F. C.; TOFOLI, D.; CARVALHO, J. E.; RUIZ, A. L. T. G.; COSTA, W. F., SIMIONATTO, E. Chemical composition and cytotoxic activity of the root essential oil from *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 233-238, 2015.

SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e

avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v. 30, p. 1809-1812, 2007.

SILVA, L. B.; SILVA, W.; MACEDO, M. L. R.; PERES, M. T. L. P. P. Effects of *Croton urucurana* extracts and crude resin on *Anagasta kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 3, p. 653-664, 2009.

SIMIONATTO, E.; CANCIDO, A. C. S.; POPPI, N. R.; PERES, M. T. L. P.; OGUMA, P. M.; SANTOS, E. C. S.; MATOS, M. F. C.; HESS, S. C.; BONANI, V. F. L.; CARVALHO, J. E.; DIRAIMO, D. L. Bioactivity and chemical composition of the essential oils of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 12, p. 250-261, 2009.

SIMIONATTO, E.; BONANI, V. F. L.; MOREL, A. F.; POPPI, N. R.; RAPOSO JÚNIOR, J. L.; STUKER, C. Z.; PERUZZO, G. M.; PERES, M. P. L. T.; HESS, S. C. Chemical Composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5, p. 879-885, 2007.

SIMIONATTO, E.; CHAGAS, M. O.; PERES, M. T. L. P.; HESS, S. C.; SILVA, C. B.; POPPI, N. R.; GEBARA, S. S.; CORSINO, J.; MOREL, A. F.; STUKER, C. Z.; MATOS, M. F. C.; CARVALHO, J. E. Chemical composition and biological activities of leaves essential oil from *Schinus molle* (Anacardiaceae). **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, v. 14, p. 590-599, 2011.

SIMIONATTO, E.; PERES, M. T. L. P.; HESS, S. C.; SILVA, C. B.; CHAGAS, M. O.; POPPI, N. R.; PRATES, C. B.; SANTOS, E. C. S.; MATOS, M. F. C.; CARVALHO, J. E. Chemical composition and cytotoxic activity of leaves essential oil from *Mangifera indica* var. coquinho (Anacardiaceae). **The Journal of Essential Oil Research**, v. 22, p. 596-599, 2010.

SPINNER, D. M. MTT growth assays in ovarian cancer. **Methods in Molecular Medicine**, v. 39, p. 175-777, 2001.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p. 1107-1112, 1990.

SUMANTRAN, V. N. Cellular chemosensitivity assays: an overview. In: CREE, I. A. (Ed.). **Cancer cell culture: methods and protocols**. 2. ed. Methods in Molecular Biology, v. 731, 2011. cap. 19, p. 219-236.

SUN, T.; JACKSON, S.; HAYCOCK, J. W.; MACNEIL, S. Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents. **Journal of Biotechnology**, v. 122, p. 372–381, 2006.

TAN, N.-H.; ZHOU, J. Plant cyclopeptides. **Chemical reviews**, v. 106, n. 3, p. 840-895, 2006.

TSUKATANI, T.; HIGUCHI, T.; SUENAGA, H.; AKAO, T.; ISHIYAMA, M.; EZOE, T.; MATSUMOTO, K. Colorimetric microbial viability assay based on reduction of water soluble tetrazolium salts for antimicrobial susceptibility testing and screening of antimicrobial substances. **Analytical Biochemistry**, v. 393, n. 1, p. 117–125, 2009.

TUNG, Y. C.; HSIAO, A. Y.; ALLEN, S. G.; TORISAWA, Y. S.; HO, M.; TAKAYAMA, S. Highthroughput 3D spheroid culture and drug testing using a 384 hanging drop array. **Analyst**, v. 136, p. 473–478, 2011.

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

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

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B: colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112-1116, 2006.

VINCI, M.; GOWAN, S.; BOXALL, F.; PATTERSON, L.; ZIMMERMANN, M. COURT, W.; LOMAS, C.; MENDIOLA, M.; HARDISSON, D.; ECCLES, S. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroidbased functional assays for target validation and drug evaluation. **BMC Biology**, v. 10, n. 29, 2012.

WANG, H.; CHENG, H.; WANG, F.; WEI, D.; WANG, X. An improved 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction assay for evaluating the viability of *Escherichia coli* cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 82, n. 3, p. 330–333, 2010.

WANG, S.; YU, H.; WICKLIFFE, J. K. Limitation of the MTT and XTT assays for measuring cell viability due to superoxide formation induced by nano-scale TiO₂. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 2147–2151, 2011.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, p. 2325-2327, 1971.

WEBSTER, G. L. A provisional synopsis of the sections of the genus *Croton* (Euphorbiaceae). **Taxon**, v. 42, p. 793-823, 1993.

WEI, M. C., ZONG, W. X.; CHENG, E. H.; LINDSTEN, T.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; ROSS, A. J.; ROTH, K. A.; MACGREGOR, G. R.; THOMPSON, C. B.; KORSMEYER, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v. 27, p. 727-730, 2001.

WEIGELT, B.; BISSELL, M. J. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, p. 311-321, 2008.

YAMADA, K. M.; CUKIERMAN, E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. **Cell**, v. 130, p. 601-610, 2007.

YIN, L.-M.; WEI, Y.; WANG, Y.; XU, Y.-D.; YANG, Y.-Q. Long term and standard incubations of WST-1 reagent reflect the same inhibitory trend of cell viability in rat airway smooth muscle cells. **International Journal of Medical Sciences**, v. 10, p. 68-72, 2013.

YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D.; SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**, v.62, n. 6, p.763-768, 2007.

YUE, G. G. L.; FAN, J.- T.; LEE, J. K. M.; ZENG, G. Z.; HO1, T. W. F.; FUNG, K. P.; LEUNG, P. C.; TAN, N.- H.; LAU, C. B. S. Cyclopeptide RA-V inhibits angiogenesis by down-regulating ERK1/2 phosphorylation in HUVEC and HMEC-1 endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1883-1898, 2011.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J.B.; **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó-SC: Argos, 2001,120p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. 2015. **Cancer**. [Acesso em 4 de janeiro de 2015]. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/index.html>

ZHANG, Y.; ONG, C. N.; SHEN, H. M. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Cancer Letters**, v. 211, n. 2, p.175-188, 2004.

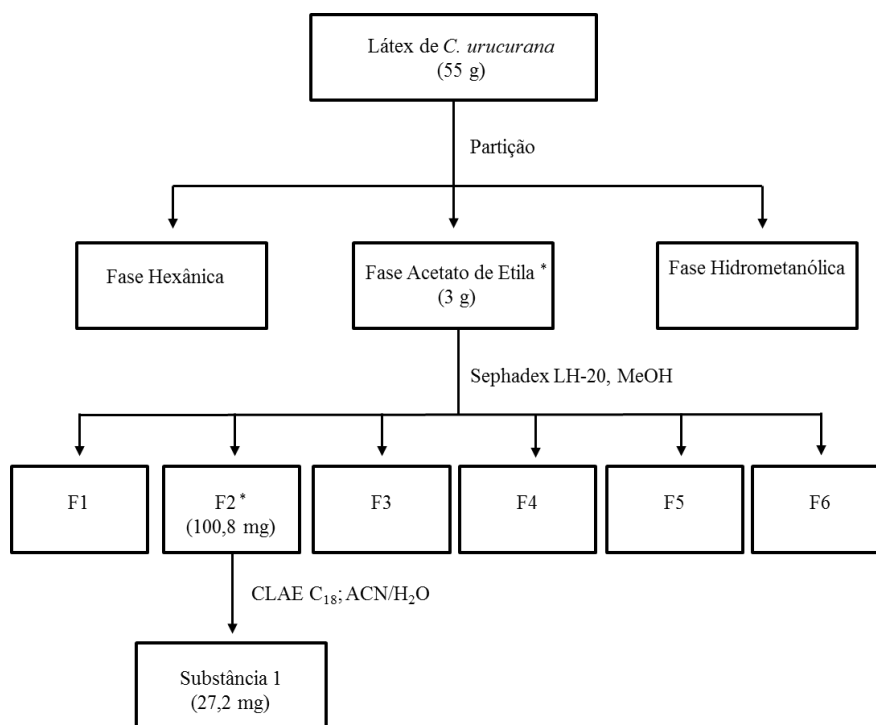
ZHAO, R.; GAO, X.; CAI, Y.; SHAO, X.; JIA, G.; HUANG, Y.; QIN, X.; WANG, J.; ZHENG, X. Antitumor activity of *Portulaca oleracea* L. polysaccharides against cervical carcinoma *in vitro* and *in vivo*. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p. 376–383, 2013.

Tabela 1 - Obtenção das fases Hexânica, Acetato de Etila e Hidrometanólica a partir de 55 g do látex de *Croton urucurana* Baillon.

| Amostras | Massa (g) | Rendimento (%) |
|-----------------------|------------------|-----------------------|
| Fase Hexânica | 0,0207 | 0,04 |
| Fase Acetato de Etila | 4,11 | 7,47 |
| Fase Hidrometanólica | * | * |

*A fase hidrometanólica foi mantida em solução para evitar a degradação de seus constituintes químicos (taninos).

Figura 1 - Fracionamento biomonitorado do látex de *C. urucurana* por meio do ensaio de citotoxicidade com o corante sulforrodamina B.



*Frações ativas selecionadas para posterior fracionamento.

Tabela 2 - Frações obtidas a partir de 3 g da Fase Acetato de Etila do látex de *C. urucurana*.

| Frações | Massa (mg) | Rendimento (%) |
|----------------|-------------------|-----------------------|
| F1 | 55,0 | 1,83 |
| F2 | 143,5 | 4,78 |
| F3 | 187,1 | 6,24 |
| F4 | 334,7 | 11,16 |
| F5 | 171,7 | 5,72 |
| F6 | 291,1 | 9,70 |

Figura 2 - Perfil cromatográfico da Fração 2 por CLAE. O pico 3 corresponde a substância 1 isolada.

