



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA

APLICADAS À FARMÁCIA

THAIS FERNANDA MOREIRA

**Perfil antioxidante e efeito dos extratos, frações e das antraquinonas
crisofanol, emodina e fisciona de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*
sobre a viabilidade celular e estresse oxidativo em células tumorais de colo
uterino e carcinoma oral**

Araraquara

2016

THAIS FERNANDA MOREIRA

**Perfil antioxidante e efeito dos extratos, frações e das antraquinonas
crisofanol, emodina e fisiona de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*
sobre a viabilidade celular e estresse oxidativo em células tumorais de colo
uterino e carcinoma oral**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Universidade Estadual Paulista - UNESP, como requisito para obtenção do título de Doutor em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de Concentração: Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti

Coorientadora: Profa. Dra. Christiane Pienna Soares

Araraquara

2016

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

M838p Moreira, Thais Fernanda
 Perfil antioxidante e efeito dos extratos, frações e das antraquinonas crisofanol, emodina e fisciona de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* sobre a viabilidade celular e estresse oxidativo em células tumorais de colo uterino e carcinoma oral / Thais Fernanda Moreira. – Araraquara, 2016.
 122 + 38 f. : il.

 Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia. Área de pesquisa em Bioquímica.

 Orientador: Iguatemy Lourenço Brunetti.
 Coorientadora: Christiane Pienna Soares.

 1. *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*. 2. Emodina. 3. Fisciona. 4. Crisofanol. 5. Atividade citotóxica. 6. Mutagenicidade. 7. Estresse oxidativo. I. Brunetti, Iguatemy Lourenço, orient. II. Soares, Christiane Pienna, coorient. III. Título.

CAPES: 40500005

THAIS FERNANDA MOREIRA

Perfil antioxidante e efeito dos extratos, frações e das antraquinonas crisofanol, emodina e fisiona de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* sobre a viabilidade celular e estresse oxidativo em células tumorais de colo uterino e carcinoma oral

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Campus de Araraquara como requisito para a obtenção do título de Doutor(a) em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia

Araraquara, 25 de novembro de 2016

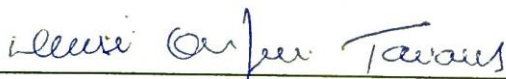
BANCA EXAMINADORA



IGUATEMY LOURENÇO BRUNETTI



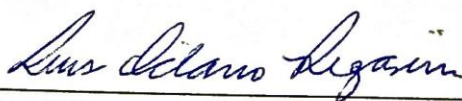
HUGO PEQUENO MONTEIRO



DENISE CRISPIM TAVARES



PATRICIA MARIA STUEL P CAMPELO



LUIS OCTÁVIO REGASINI

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios de Bioquímica e Citologia do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/SP – UNESP, sendo o doutorando contemplado com bolsa CAPES, com auxílios financeiros da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP e CNPQ.

Aos meus queridos pais, Sandra e Wandeyr

Ao meu amigo e irmão Lucas

Ao meu namorado Fernando

Em especial à minha querida tia Waldenice

Por todo amor, dedicação, paciência e incentivo!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e todas as conquistas.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Iguatemy Lourenço Brunetti, pela confiança, orientação, amizade, dedicação, carinho e apoio.

À Profa. Dra. Christiane Pienna Soares, pela coorientação, confiança, amizade, carinho e apoio.

À Profa. Dra. Amanda Martins Baviera, pelo apoio e motivação, pela confiança e amizade.

Aos Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, do Departamento de Farmácia da UFPR e Prof. Dr. Anderson Barisson do Departamento de Química da UFPR, pela amizade, parceria e contribuição nas análises fitoquímicas e de RMN.

Às doutorandas e amigas Fernanda Maria Marins Ocampos e Daniella Maria Soares de Oliveira, que apesar da distância, se fizeram sempre presentes.

Aos amigos e companheiros dos Laboratórios de Bioquímica e Citologia, Renata Pires de Assis, Carlos Alberto Arcaro Filho, Vânia Ortega Gutierrez, Felipe de Oliveira Souza, Geovana Navegante, Barbara Collato e Mariana Beltrame, por todo apoio, ajuda, amizade e parceria.

Em especial, a minha amiga Juliana Sorbo, que em todos os momentos, bons e ruins, sempre esteve presente.

A toda minha família, e em especial os meus pais, Sandra e Wandeyr, por todo amor, dedicação, paciência e incentivo em todos os momentos da minha vida.

Aos meus tios Waldenice e Bento, por todo exemplo, incentivo e amor.

Ao meu namorado Fernando, por todo amor, apoio, incentivo, companheirismo, dedicação e principalmente paciência.

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, e à CAPES.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Ensina-nos a contar os nossos dias para que
alcancemos coração sábio.”
Salmos 90;12.

“Os problemas significativos que enfrentamos não
podem ser resolvidos no mesmo nível de
pensamento em que estávamos quando os
criamos.”
Albert Einstein

RESUMO

Os produtos naturais apresentam imensa diversidade estrutural, característica útil para alcançar alvos moleculares específicos importantes para a terapia de diversas doenças, contribuindo assim para a ampliação do arsenal farmacológico. Como observado para o gênero *Rhamnus*, a espécie vegetal *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, nativa no Brasil, pode apresentar um grande potencial químico e farmacológico; popularmente é conhecida como “fruto-de-pombo”, com poucos estudos relatando suas propriedades. Tem composição rica em compostos antraquinônicos, onde já foram identificados crisofanol, fisciona e emodina. Os objetivos deste estudo foram verificar o potencial antioxidante via estudo da capacidade de captura sobre espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, assim como a capacidade de indução de morte celular dos extratos, frações e antraquinonas isoladas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Rhamnaceae) em células tumorais de colo uterino com e sem o genoma do vírus HPV (SiHa e C33-A, respectivamente), e carcinoma oral de células escamosas (HSC-3). A antraquinona emodina apresentou a melhor capacidade de captura sobre as espécies $\text{NO}^{\bullet}$ e $\text{O}_2^{\bullet-}$ em relação as demais antraquinonas e extratos brutos. No ensaio de captura sobre o HOCl/OCl^- todas as amostras foram efetivas, sendo os extratos brutos com melhor atividade, e dentre as antraquinonas, o crisofanol apresentou maior efetividade. Nenhuma amostra demonstrou capacidade na captura do H_2O_2 . As antraquinonas emodina e fisciona demonstraram efeito citotóxico sobre as linhagens celulares SiHa, C33-A, HSC-3 e HaCaT, com morte celular mista (apoptose e necrose), a qual ocorre de maneira independente de caspases, constatada nos ensaios citomorfológico de exclusão por fluorocromos, anexina-V e avaliação da atividade de capsase-3. O crisofanol não apresentou citotoxicidade. Emodina, fisciona e o extrato bruto promoveram aumento do estresse oxidativo intracelular, uma vez que foi observado aumento de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e aumento de danos ao DNA como observado nos ensaios de micronúcleo e cometa. As amostras foram capazes de promover supressão da via PI3K/AKT, diminuindo os níveis de fosforilação de AKT: a emodina apresenta melhor atividade e ação apenas sobre as linhagens tumorais SiHa, C33-A e HSC-3; fisciona e extrato bruto apresentaram este efeito sobre as linhagens HSC-3 (tumoral) e HaCaT (não tumoral). Estes dados sugerem que o mecanismo de indução de morte promovido pelas antraquinonas emodina e fisciona, assim como pelo extrato bruto de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, pode ser mediado pelo aumento do estresse oxidativo intracelular, danos ao DNA e também supressão da via PI3K/AKT, importante para a sobrevivência celular.

Palavras-chave: *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*. Emodina. Fisciona. Crisofanol. Atividade citotóxica. Mutagenicidade. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Natural products have immense structural diversity, useful feature to achieve specific molecular targets in cancer treatment, and thus contribute to the expansion of the therapeutic arsenal. As notorious for the *Rhamnus* genus, plant species *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, native in Brazil may present a great chemical and pharmacological potential; It is popularly known as the *Fruto-de-pombo*, with few studies reporting its properties. This species has rich composition with anthraquinones, which have been identified: chrysophanol, physcion and emodin. The objectives of this study were to verify the capture capability of reactive species of oxygen and nitrogen, as well as cell death inducing ability of the extracts, fractions and isolated anthraquinones of *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Rhamnaceae) in cervical tumor cells with and without the genome of HPV virus (SiHa and C33-A, respectively), and oral squamous cell carcinoma (HSC-3). The anthraquinone emodin showed the best capture capability of the species $\text{NO}^{\bullet}$ and $\text{O}_2^{\bullet-}$ compared with other anthraquinones and crude extracts. In the scavenge assay of $\text{HOCl} / \text{OCl}^-$ all samples were effective, and the crude extracts showed better activity and chrysophanol showed better effectiveness among anthraquinones. No samples demonstrated ability in capturing the H_2O_2 . The anthraquinones emodin and physcion demonstrated cytotoxic effect on the cell lines SiHa, C33-A, HSC-3 and HaCaT with mixed cell death (apoptosis and necrosis), independent of caspases pathway, detected in cytomorphological test with fluorochromes exclusion, annexin-V and evaluation of capsase-3 activity. The chrysophanol was not cytotoxic in these assays. Emodin, physcion and the crude extract promoted increased intracellular oxidative stress, verified by thiobarbituric acid reactive species assay (TBARS), and an increase of DNA damage as observed in the micronucleus test. Further, these samples were capable of promoting the suppression of PI3K/AKT, reducing levels of activation (phosphorylation) of AKT. In this parameter, emodin showed activity only on the tumor cell lines (SiHa, C33-A and HSC-3), on the other hand, physcion and crude extract showed this effect on HSC-3 and HaCaT cell lines. Therefore, the death induction mechanism promoted by emodin, physcion and crude extract of this plant species should be mediated by an increase of the intracellular oxidative stress, DNA damage, and suppression of the PI3K/AKT important for cell survival.

Keywords: *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*. Emodin. Physcion. Chrysophanol. Cytotoxicity. Mutagenicity. Oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Via de ativação da AKT no controle do metabolismo energético e crescimento celular.	20
Figura 2. Vias envolvidas na ativação da morte celular.	25
Figura 2. Representação do ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos em SiHa.	34
Figura 3. Fluoxograma de análise do ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos.	34
Figura 4. Representação do ensaio de anexina-V em HaCaT.	35
Figura 5. Fluoxograma de análise do ensaio de anexina-V.....	36
Figura 6. Ensaio de micronúcleo.	39
Figura 8. Estrutura química das antraquinonas de <i>Rhamnus sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i>	42
Figura 9. Inibição (captura) do $O_2^{\bullet-}$ dos padrões utilizados.	43
Figura 10. Inibição (captura) do $O_2^{\bullet-}$ das amostras de <i>R. sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i>	44
Figura 11. Inibição (captura) do $HOCl/OCl^-$ dos padrões utilizados.	45
Figura 12. Inibição (captura) do $HOCl/OCl^-$ das amostras de <i>R. sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i>	46
Figura 13. Inibição (captura) da $TauCl$ dos padrões utilizados.	47
Figura 14. Inibição (captura) para $NO^{\bullet}$ dos padrões utilizados.	48
Figura 15. Inibição (captura) para $NO^{\bullet}$ das amostras de <i>R. sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i>	49
Figura 16. Inibição (captura) do H_2O_2 dos padrões utilizados.	50
Figura 17. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com os padrões.	51
Figura 18. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com as amostras de <i>R. sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i>	52
Figura 21. Ensaio de citotoxicidade por sulforrodamina B para as antraquinonas.	56
Figura 22. Ensaio de citotoxicidade por sulforrodamina B para o extrato etanólico e fração hexânica do caule de <i>R. sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i>	58
Figura 23. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão de fluorocromos em SiHa.	62
Figura 24. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão de fluorocromos em C33-A.	63

Figura 25. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão de fluorocromos em HSC-3.	64
Figura 26. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão de fluorocromos em HaCaT.	65
Figura 27. Ensaio de morte celular por anexina-V em SiHa.	69
Figura 28. Ensaio de morte celular por anexina-V em C33-A.	70
Figura 29. Ensaio de morte celular por anexina-V em HSC-3.	71
Figura 30. Ensaio de morte celular por anexina-V em HaCaT.	72
Figura 31. Tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com as amostras de <i>R. sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i> frente a linhagem celular SiHa.	74
Figura 32. Tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com as amostras de <i>R. sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i> frente a linhagem celular C33-A.	75
Figura 33. Tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com as amostras de <i>R. sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i> frente a linhagem celular HSC-3.	76
Figura 34. Tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com as amostras de <i>R. sphaerosperma</i> var. <i>pubescens</i> frente a linhagem celular HaCaT.	77
Figura 35. Ensaio de atividade de caspase-3.	78
Figura 36. Níveis proteicos de AKT, fosforilação de AKT (Ser-473), BAX, BCL-2 e caspase-3 em SiHa tratadas com emodina, fisciona e EERs.	81
Figura 37. Níveis proteicos de AKT, fosforilação de AKT (Ser-473) e caspase-3 em C33-A tratadas com emodina, fisciona e EERs.	82
Figura 38. Níveis proteicos de AKT, fosforilação de AKT (Ser-473) e caspase-3 em HSC-3 tratadas com emodina, fisciona e EERs.	83
Figura 39. Níveis proteicos de AKT, fosforilação de AKT (Ser-473) e caspase-3 em HaCaT tratadas com emodina, fisciona e EERs.	84
Figura 40. Ensaio de TBARS nas linhagens SiHa, C33-A, HSC-3 e HaCaT.	86
Figura 41. Ensaio do cometa nas linhagens SiHa e C33-A.	88
Figura 42. Ciclo redox do núcleo quinônico com formação intermediária do radical semiquinona.	91
Figura 43. Mecanismo de morte celular induzido pelas antraquinonas emodina e fisciona. ..	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas.	32
Tabela 2. Valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H para crisofanol, emodina e fisciona.	41
Tabela 3. Capacidade de captura para $\text{O}_2^{\bullet-}$, HOCl/OCl^- e $\text{NO}^{\bullet}$	53
Tabela 4. Comparação do CI_{50} das antraquinonas entre todas as linhagens celulares analisadas.	57
Tabela 5. Frequência de micronúcleos formados após o tratamento com as antraquinonas. ..	87
Tabela 6. Avaliação da indução da atividade da quinona-redutase em células Hepa 1c1c7. ..	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- AAPH – 2,2'-azobis-2-metilpropionamida
- AIF – fator de indução de apoptose
- AKT – v-akt oncogene viral de timoma murino (ou proteína quinase B – PKB)
- APAF1 – protease apoptótica ativadora de fator-1
- ATP – adenosina trifosfato
- CE₅₀ – concentração efetiva necessária para inibir de 50% da atividade total
- c-FLIP – proteína inibidora da enzima conversora de FADD semelhante a IL-1 β
- CI₅₀ – concentração inibitória necessária para inibir de 50% da viabilidade celular total
- cIAP – proteínas inibidoras de apoptose
- DAF – diacetato de fluoresceína
- DD – domínio de morte
- DIABLO/SMAC – proteína direta de ligação IAP – DIABLO, também conhecida como segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria– SMAC
- DISC – complexo de sinalização indutor de morte (death-inducing signaling complex)
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- domínio PH – domínio com homologia a pleckstrina
- DTNB – ácido 5-5'-ditio-2-nitrobenzóico (DTNB)
- DTT – ditioneitol
- EGF – fator de crescimento epidérmico
- ERON – espécies reativas de oxigênio e nitrogênio
- FADD – proteína associada ao domínio de morte de FAS
- FITC – isotiocianato de fluoresceína
- FoxO – *Forkhead box O*
- GSH – glutatona reduzida
- H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
- HO – Hoechst 33342
- HOCl – ácido hipocloroso
- HTRA2 – proteína requerida de alta temperatura A2
- IDN – índice de divisão nuclear
- IGF-T – fator de crescimento semelhante a insulina

IP – iodeto de propídio
 mTOR – alvo da rapamicina em mamíferos
 NAD⁺ – nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidada
 NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
 NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido
 NBT – azul de nitrotetrazólio
 NO[•] – óxido nítrico
 NQO1 – enzima quinona-redutase
 O₂^{•-} – Radical ânion superóxido
 OCl⁻ – ânion hipoclorito
 PARP1 – poli ADP-ribose polimerase 1
 PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
 PDK1 – proteína quinase dependente de fosfoinositol 1
 PFK-1 – fosfofrutoquinase-1
 PFK-2 – fosfofrutoquinase-2
 PI3K – fosfatidilinositol-3-quinase
 PIP2 – fosfatilinositol-4,5-difosfato
 PIP3 – fosfatilinositol-3,4,5-trifosfato
 PKM2 – piruvato quinase isoenzima 2
 PMS – metassulfato de fenazina
 PTEN – fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato 3-fosfatase
 PTPC – complexo do poro de transição da permeabilidade
 RIPK1 ou RIP1 – receptor que interage com a proteína quinase 1
 ROO[•] – radical peroxila
 Ser – serina
 SRB – sulforrodamina B
 TauCl – taurina cloramina
 Thr – treonina
 TIGAR – TP53-regulador induzido de glicólise e apoptose
 TMB – 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina
 TNB – ácido 5-tio-2-nitrobenzóico
 TNF - α – fator de necrose tumoral alfa
 TRAIL – ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF
 UDP – uridina difosfato

SUMÁRIO

RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	9

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS TUMORAIS	15
1.2. MORTE CELULAR.....	21
1.2.1. <i>Apoptose</i>	21
1.2.2. <i>Necrose</i>	23
1.2.3. <i>Morte celular autofágica</i>	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS	27
3.2. MATERIAL VEGETAL	28
3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	28
3.3.1. <i>Ensaio de captura do O₂^{•-}</i>	28
3.3.2. <i>Ensaio de captura para o HOCl/OCl⁻ e para a taurina cloramina (TauCl)</i> ..	29
3.3.3. <i>Ensaio de captura do H₂O₂</i>	29
3.3.4. <i>Ensaio de captura do NO[•]</i>	30
3.3.5. <i>Ensaio do Clareamento da Crocina: captura do ROO[•]</i>	30
3.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E MORTE CELULAR	31
3.4.1. <i>Cultura de células</i>	31
3.4.2. <i>Tratamentos</i>	32
3.4.3. <i>Determinação da citotoxicidade: Ensaio de sulforrodamina B (SRB)</i>	33
3.4.6. <i>Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão com fluorocromos: Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína</i>	33
3.4.4. <i>Ensaio de morte celular por anexina-V</i>	35
3.4.5. <i>Deteção de apoptose pela avaliação da atividade de caspase-3</i>	36
3.4.6. <i>Conteúdo proteico e níveis de fosforilação de componentes intracelulares via Western blotting</i>	37
3.4.7. <i>Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	38
3.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO	38
3.5.1. <i>Avaliação da mutagenicidade pelo ensaio de micronúcleo</i>	38
3.5.2. <i>Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa</i>	39
3.6. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE QUIMIOPREVENTIVA.....	39
3.6.1. <i>Indução e atividade da enzima quinona-redutase (NQO1)</i>	39

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4. RESULTADOS	41
4.1. MATERIAL VEGETAL	41
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	42
4.2.1. <i>Ensaio de captura para $O_2^{\cdot-}$</i>	42
4.2.2. <i>Ensaio de captura para HOCl/OCl⁻ e para TauCl</i>	45
4.2.3. <i>Ensaio de captura para NO[•]</i>	47
4.2.4. <i>Ensaio de captura para H₂O₂</i>	50
4.2.5. <i>Ensaio de captura para ROO[•] (clareamento da crocina)</i>	50
Tabela 3. Capacidade de captura para $O_2^{\cdot-}$, HOCl/OCl ⁻ e NO [•]	53
4.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E TIPOS DE MORTE CELULAR	54
4.3.1. <i>Determinação da citotoxicidade: Ensaio de sulforrodamina B (SRB)</i>	54
4.3.2. <i>Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão com fluorocromos: Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína</i>	58
4.3.3. <i>Ensaio Ensaio de morte celular por anexina-V</i>	66
4.3.4. <i>Deteção de apoptose pela avaliação da atividade de caspase-3</i>	78
4.3.5. <i>Análise dos níveis proteicos de caspase-3, AKT e níveis de fosforilação de AKT</i>	79
4.3.6. <i>Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	85
4.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO	87
4.4.1. <i>Avaliação da mutagenicidade pelo ensaio de micronúcleo</i>	87
4.4.2. <i>Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa</i>	88
4.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE QUIMIOPREVENTIVA	89
4.5.1. <i>Atividade de enzima quinona redutase</i>	89
5. DISCUSSÃO	90
6. CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	99
ANEXO I	106
ANEXO II	115

CAPÍTULO 2

PROPOSTA DE ARTIGO	118
---------------------------------	------------

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema crescente de saúde pública mundial, com altos índices de morbidade e mortalidade e, apesar dos avanços na pesquisa e em terapias, muitos tumores ainda são caracterizados de mal prognóstico (LIU e WANG, 2015).

Os fármacos utilizados no câncer têm o objetivo de promover predominantemente a morte das células tumorais; entretanto, uma das principais dificuldades nestes tratamentos são os efeitos colaterais severos e intensos, além do surgimento de células tumorais resistentes à quimioterapia (BLAGOSKLONNY, 2005; BLAGOSKLONNY, 2006). Assim, justifica-se a ampliação de estudos com produtos naturais, pois esses produtos já são utilizados para fins terapêuticos e compreendem cerca de 50% dos medicamentos usados na quimioterapia do câncer (MANN, 2002; NEIDLE et al., 2005).

Nesse contexto, a família Rhamnaceae é descrita pelo potencial terapêutico de suas espécies, sendo as espécies *Rhamnus purshiana* e *Rhamnus frangula* as mais conhecidas no Brasil. O gênero *Rhamnus* inclui espécies com grande importância farmacológica; como *R. alaternus* e *R. alpinus*. Dentre as propriedades descritas para espécies deste gênero estão as atividades anti-inflamatória, antioxidante, antihipertensiva, citotóxica, antimutagênica e indutora de apoptose (TERENCIO et al., 1991; WEI et al., 2001; NG et al., 2007; AMMAR et al., 2008; AMMAR et al. 2011; BHOURI et al., 2011).

A espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* possui uma composição rica em compostos antraquinônicos, dos quais estão identificados o crisofanol e a fisiona no extrato do caule (MOREIRA, 2012), além de emodina. E também foi descrita a presença de fitosteróis (estigmasterol e sitosterol) no caule, e extratos e frações obtidos de suas folhas e caule apresentam atividade antioxidante, com expressiva inibição da peroxidação lipídica (MOREIRA et al., 2013). Contudo, ainda existem poucos estudos relacionados as atividades desta espécie vegetal.

Já foram descritas diversas antraquinonas neste gênero, entre elas a emodina apresenta resultados expressivos em ensaios preliminares para terapias antitumorais, tais como a inibição da proliferação celular, indução de apoptose e prevenção de metástases, além de apresentar outras propriedades, como por exemplo ação vaso relaxante, imunossupressora e laxante (TABOLACCI et al., 2010; IZHAKI, 2002). Antraquinonas apresentam potencial antitumoral e citotóxico, pois possuem estrutura semelhante às das antraciclinas, uma classe de drogas antitumorais amplamente utilizadas na clínica, como a doxorrubicina, por exemplo,

um quimioterápico que apresenta atividade alta contra diversas linhagens tumorais (MANET et al., 2011).

Estes compostos apresentam elevada diversidade e complexidade estrutural, características úteis para alcançar alvos moleculares específicos no tratamento de diversas doenças e em especial o câncer. Estas propriedades, aliadas a modelagem molecular e outras ferramentas químicas, podem contribuir para o melhoramento do arsenal terapêutico. Desta maneira, a espécie *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* apresenta diversidade em seus componentes, e torna-se promissora para a prospecção de agentes quimioterápicos.

1.1. CARACTERÍSTICAS DAS CÉLULAS TUMORAIS

O câncer representa um conjunto de doenças, classificadas de acordo com o tipo celular de origem, e são caracterizadas pelo crescimento descontrolado e diferenciação anormal de células, causando o desequilíbrio funcional no tecido de origem e tecidos adjacentes. A iniciação de um processo neoplásico ocorre com o acúmulo de eventos genéticos e epigenéticos que promovam a perda de sensibilidade em fatores que reprimam o crescimento celular e a capacidade de evasão à morte, adquirindo um potencial replicativo ilimitado (HANAHAHAN et al., 2011). Naturalmente, existe a necessidade de manutenção desse novo sistema, o qual deve ser sustentado pela capacidade em promover angiogênese, invasão de tecidos adjacentes, e ainda a perpetuação da instabilidade genômica adquirida, com funcionalidade para a manutenção do tumor (HANAHAHAN et al., 2011).

As características tumorais envolvem a reprogramação do metabolismo celular para satisfazer as novas necessidades energéticas e biossintéticas. Esta mudança garante a produção de adenosina trifosfato (ATP), bem como desvia intermediários produzidos a partir da glicólise, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos e da via das pentoses fosfato para a geração de biomoléculas essenciais e, conseqüentemente, produção de macromoléculas. Tais processos anabólicos demandam um alto consumo de glicose, bem como diversas adaptações no controle do metabolismo energético em nível de expressão gênica e regulação alostérica das enzimas, para sustentar este fenótipo de crescimento e proliferação celular (HAMANAKA, 2012; ZHAO, 2013).

As atividades metabólicas das células tumorais divergem significativamente das células normais. As células normais oxidam a glicose até CO_2 e H_2O via: glicólise, ciclo dos ácidos tricarboxílicos e cadeia transportadora de elétrons/fosforilação oxidativa, em condições de normoxia, ou até lactato, em condições de hipóxia, para obter energia (ATP). Já as células

tumorais realizam metabolismo oxidativo mitocondrial e fermentação láctica concomitantemente e independente da concentração de oxigênio, com menor rendimento energético, mas que favorecem determinadas vias biossintéticas; este fenômeno é denominado de glicólise aeróbica (efeito de Warburg). Deste modo, a glicose fornece energia para a manutenção e sobrevivência celular, e ainda, intermediários glicolíticos são direcionados para a biossíntese de biomoléculas necessárias para a replicação celular (HEIDEN, 2009).

A principal alteração descrita em células tumorais e que contribui para o contínuo fluxo de substratos pela via glicolítica é a ativação da via fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) / proteína quinase B (AKT), um processo de sinalização envolvido no controle do crescimento, proliferação e sobrevivência tumoral. A via PI3K/AKT mantém o fluxo de substratos na via glicolítica pela estimulação da captação da glicose e ativação de enzimas-chave [hexoquinase, fosfofrutoquinase-1 (PFK-1) e fosfofrutoquinase-2 (PFK-2)], estimulando assim a síntese de proteínas e lipídeos. A ativação de PFK2 por AKT1 é importante, uma vez que PFK1 é inibida por altas concentrações de ATP, em contrapartida é estimulada alostericamente por frutose-2,6-bifosfato, produto de PFK2. A elevada atividade de PFK2 tem sido associada diretamente com a perda de funcionalidade da proteína p53 (LIU, 2009; CAIRNS, 2011); a proteína p53, quando ativada, promove a diminuição nos níveis de frutose-2,6-bifosfato pela indução de TIGAR (TP53-regulador de glicólise e apoptose induzido) e ainda aumenta a expressão de fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato 3-fosfatase (PTEN), que tem sido reconhecido como um supressor tumoral por controlar (inibir) a via PI3K/AKT. De fato, mutações em p53 (proteínas mutantes de p53 com atividades oncogênicas) estimulam a biossíntese de nucleotídeos, pela indução na expressão de genes envolvidos nas vias de recuperação e síntese “de novo” de nucleotídeos. Esta atividade metabólica de p53 mutante dirige e sustenta o desenvolvimento tumoral (JONES, 2009; LIU, 2009; KOLLAREDDY, 2015).

Outro mecanismo que promove a manutenção do alto fluxo de substratos pela via glicolítica e aumenta a oferta de intermediários para processos biossintéticos é o aumento na expressão da isoenzima M2 da enzima piruvato quinase (PKM2); esta apresenta atividade lenta durante a glicólise, na conversão de fosfoenolpiruvato a piruvato, permitindo assim que intermediários glicolíticos *upstream* ingressem em outras vias, incluindo a via da hexosamina, vias de síntese da uridina difosfato (UDP) e glicerol e a via das pentoses fosfato. (CAIRNS, 2011; HAMANAKA, 2012; ZHAO, 2013).

A via das pentoses fosfato é outra via importante na sobrevivência e perpetuação tumoral, que converte a glicose em substratos utilizados na biossíntese de nucleotídeos, lipídeos e moléculas envolvidas em reações redox, tais como ribose-5-fosfato e nicotinamida

adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH). Esta via apresenta múltiplas conexões com a via glicolítica, mantendo a produção de ribose e NADPH, quando necessários. O NADPH atua como co-substrato na síntese de macromoléculas, e também é importante na oferta de equivalentes redutores para regeneração da glutathiona reduzida (GSH) e da tioredoxina, componentes de sistemas de captura de espécies reativas, portanto tem sido considerado uma biomolécula importante para a progressão e manutenção tumoral (CAIRNS, 2011; BOROUGHS, 2015).

Além da glicose, a importância da glutamina tem sido relacionada ao fornecimento de intermediários para a síntese de macromoléculas, sendo postulada como essencial no metabolismo das células tumorais. Logo após ser transportada para o interior da célula, a glutamina é convertida a glutamato, por ação de glutaminases. O glutamato pode seguir caminhos distintos, dependendo das necessidades metabólicas: *i*) ser convertido à α -cetoglutarato para repor intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos; *ii*) seguir para a produção de aminoácidos, ácidos graxos e NADPH (via malato), e *iii*) ser usado para a produção de glutathiona, mantendo o funcionamento das defesas antioxidantes da célula. Em células tumorais, tem sido observado um aumento na captação de glutamina, relacionado ao aumento na expressão de seus transportadores, além de níveis aumentados da enzima glutaminase 1, primeira enzima da glutaminólise (BOROUGHS, 2015; ALBERGHINA, 2014).

Conforme demonstrado na figura 1, a via PI3K/AKT está associada à ativação de mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos); a mTOR é uma proteína serina/treonina quinase, que atua distintamente na forma de dois complexos proteicos: mTORC1 e mTORC2 (complexos do alvo da rapamicina em mamíferos 1 e 2), os quais acoplam sinais de crescimento e disponibilidade de nutrientes, e também estimulam a síntese de proteínas pela ativação direta da tradução de RNA mensageiro e estímulo à biogênese de ribossomos (CAIRNS, 2011; BOROUGHS, 2015).

O controle coordenado do metabolismo energético, proliferação e sobrevivência celular é altamente dependente do nível de ativação por fosforilação da AKT. Esta ativação é iniciada por vias disparadas pela ativação de receptores do tipo tirosina-quinase que respondem a fatores de crescimento, como por exemplo fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-1) e insulina. Estes estímulos ativam PI3K, que fosforila o fosfolípídeo de membrana fosfatilinositol-4,5-difosfato (PIP2), produzindo fosfatilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3). O PIP3 permite o recrutamento de AKT, PDK 1 (proteína quinase dependente de

3-fosfoinositol 1) e mTORC2, via ancoramentos destas proteínas que têm domínio PH (domínio com homologia a *pleckstrina*). A interação do domínio PH de AKT com PIP3 promove sua translocação para a membrana, onde também se encontra PDK1, gerando mudanças conformacionais em AKT, que expõem os sítios de fosforilação (Thr-308 e Ser-473). A homodimerização direta dos domínios PH entre AKT e PDK1 promove a aproximação das proteínas e subsequente fosforilação de AKT em Thr-308, estabilizando a conformação e permitindo a fosforilação de AKT em Ser-473 por mTORC2. Desta maneira, AKT torna-se completamente ativa (SPARKS e GUERTIN, 2010).

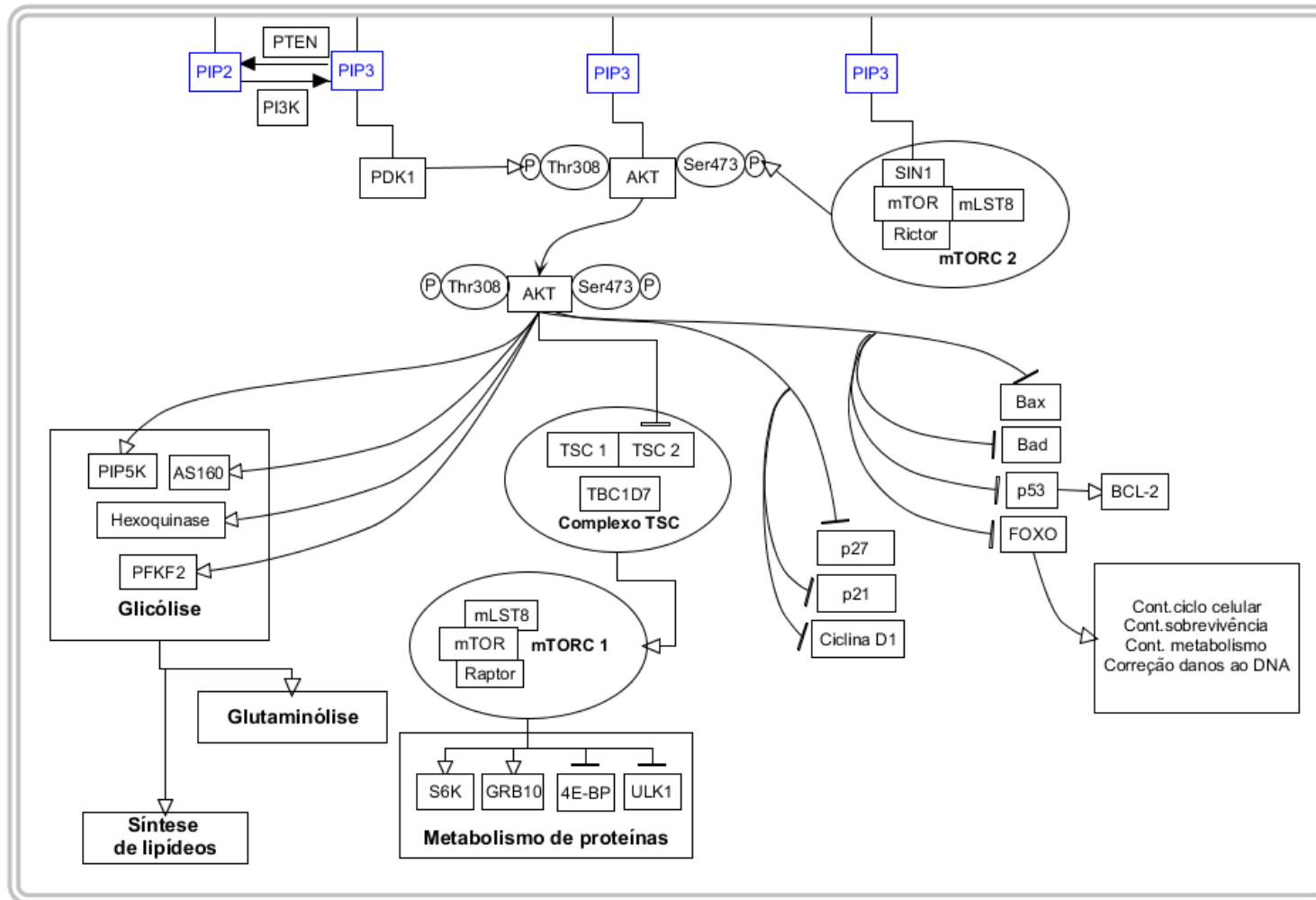
A AKT tem sido amplamente associada ao desenvolvimento de células tumorais, e regula diretamente o ciclo celular e a proliferação por atuar em CDKI (inibidor de ciclina dependente de quinase), como p21 e p27, e indiretamente pela modulação nos níveis de ciclina D1 e p53. A AKT também atua sobre os fatores de transcrição da família FoxO (*Forkhead box O*), promovendo sua fosforilação e inativação. Estes fatores atuam diretamente sobre o ciclo celular, reparo de DNA e apoptose. A inativação de FoxO promove a diminuição da expressão de reguladores negativos do ciclo celular, como a proteína relacionada ao retinoblastoma, p130, CDKI e p27 (ZHANG et al., 2011). O principal regulador negativo desta via é a proteína fosfatase PTEN, que atua desfosforilando PIP3 em PIP2, desfazendo assim os pontos de ancoramento de PDK1 e AKT1 (LIU, 2009).

Neste estado metabólico, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON) ocorrem abundantemente, pois são produtos do metabolismo oxidativo. O organismo dispõe de mecanismos antioxidantes que controlam a concentração destas espécies, evitando a ocorrência de danos tissulares, primeiramente, com as enzimas superóxido dismutase, glutatona peroxidase e catalase, e biomoléculas antioxidantes, tais como o ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides e compostos fenólicos. O conjunto de efeitos nocivos das espécies reativas é denominado estresse oxidativo, e é desencadeado quando ocorre a produção excessiva de ERON e desequilíbrio entre os processos pró- e antioxidantes (KLAUNIG et al., 2010; NOGUTI et al., 2013).

Os efeitos das ERON variam conforme as concentrações que prevalecem nas células, ou seja, de acordo com a velocidade com as que são produzidas/eliminadas. Em baixas concentrações, as ERON aumentam a proliferação e sobrevivência celular; em concentrações moderadas, as ERON induzem a expressão de genes responsivos ao estresse, promovendo o aumento na expressão de proteínas que contribuem para a sobrevivência celular. Em altas concentrações, as ERON causam danos a macromoléculas, levando à senescência celular ou aumentando a permeabilidade das membranas mitocondriais, com consequente estímulo à

apoptose. Por isso, células transformadas controlam os níveis de ERON com o aumento das defesas antioxidantes, especialmente pelo aumento na produção de NADPH (pelo metabolismo da glutamina e via das pentoses fosfato) para a regeneração de GSH (CAIRNS, 2011; ALBERGHINA, 2014).

Figura 1. Via de ativação da AKT no controle do metabolismo energético e crescimento celular.



Adaptado de SHIMOBAYASHI e HALL, 2014; BOROUGHS, 2015.

1.2. MORTE CELULAR

1.2.1. *Apoptose*

A apoptose é um processo que ocorre em organismos eucariotos, eliminando de maneira controlada células desnecessárias ou defeituosas. É desencadeada por excesso ou falta de estímulos ao crescimento, à proliferação ou por danos celulares. Durante a apoptose, a célula sofre alterações morfológicas características, tais como retração, perda de aderência, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (vacúolos contendo citoplasma e organelas intactas), que são removidos por fagócitos. Entre as biomoléculas que participam deste evento estão as caspases, que participam da indução e continuidade da apoptose através da clivagem de substratos proteicos em resíduos de aspartato (BLAGOSKLONNY, 2004; KREUZALER et al., 2012; NIKOLETOPOULOU, 2013). Existem duas vias que culminam no processo apoptótico: *i*) a via extrínseca, que é mediada por receptores de morte na superfície celular, e *ii*) a via intrínseca, mediada pela mitocôndria.

A via extrínseca, ou apoptose extrínseca, determina o tipo de morte celular induzido por sinais de estresse extracelular transmitidos por receptores transmembrana específicos, e é dependente de caspases. Os receptores de morte são ativados por seus ligantes naturais, como ligante de FAS/CD95, fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e ligantes da família TNF e ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL). A ligação do ligante com seu respectivo receptor induz mudanças conformacionais que permitem a montagem de um complexo proteico na região citosólica do receptor, a partir de uma sequência polipeptídica com 80 resíduos de aminoácidos, que é compartilhada por todos os receptores de morte, denominada domínio de morte (DD). As proteínas recrutadas neste domínio do receptor FAS são: o receptor que interage com a proteína quinase 1 (RIPK1, mais conhecida como RIP1), proteína associada ao domínio de morte de FAS (FADD), isoformas de c-FLIP (proteína inibidora da enzima conversora de FADD semelhante a IL-1 β), proteínas inibidoras de apoptose (cIAP) e ubiquitina ligases E3, que também inibem a apoptose devido a sua habilidade em interferir com a ativação de caspases, e pró-caspase-8 ou -10. O complexo molecular resultante, denominado complexo indutor de sinalização de morte (DISC), é responsável pela ativação de caspase-8 ou -10. Esta ativação culmina na ativação das caspases

executoras, principalmente caspase-3 (figura 2) (GALLUZZI et al., 2012; NIKOLETOPOULOU, 2013).

A via intrínseca da apoptose resulta da catástrofe bioenergética e metabólica acoplada a múltiplos mecanismos executores, ocasionada por condições de estresse intracelular. Assim, a apoptose intrínseca pode ser definida como um processo de morte celular, centrado na mitocôndria, que é mediado por permeabilização da membrana externa mitocondrial e consequentemente é associado à perda generalizada e irreversível do potencial mitocondrial transmembranas (com inibição da síntese de ATP mitocondrial e o transporte ativo dependente deste potencial), a liberação de proteínas do espaço intermembranas mitocondrial para o citosol e inibição da cadeia respiratória de elétrons. A permeabilização da membrana mitocondrial pode ocorrer diretamente na membrana externa, a partir da formação de poros pela atividade de proteínas pró-apoptóticas BAX e BAK, ou na membrana interna pela formação do complexo do poro de transição da permeabilidade (PTPC), processo denominado transição da permeabilidade mitocondrial (GALLUZZI et al., 2012).

As cascatas de sinalização na apoptose intrínseca são heterogêneas e, por isso, este tipo de morte ocorre de maneira dependente ou independente da ativação de caspases (figura 2).

A sequência da via apoptótica parece estar associada à atuação das proteínas liberadas do espaço intermembranas para o citosol, e a contribuição relativa destes processos para a via intrínseca da apoptose varia de acordo com distintos cenários fisiológicos, patológicos e experimentais (GALLUZZI et al., 2012).

A liberação de citocromo c para o citosol promove, a partir da sua interação com APAF1 (protease apoptótica ativadora de fator-1), ATP e pró-caspase-9, a formação de um complexo denominado apoptossoma, que tem a função de promover a ativação de caspase-3. Uma vez ativadas, as caspases iniciadoras (caspase-8, -9 e -10) iniciam o processo de clivagem e ativação das caspases executoras (caspase-3, -6 e -7), que clivam novas caspases, amplificando a cascata de ativação proteolítica. O processo apoptótico é dependente de concentrações favoráveis de ATP (figura 2) (IGNEY et al., 2002).

Por outro lado, a liberação e atuação de fator de indução de apoptose (AIF) e endonuclease G promovem a fragmentação do DNA, de maneira independente de caspases, a partir de sua migração para o núcleo. A DIABLO/SMAC (proteína direta de ligação IAP – DIABLO, também conhecida como segundo ativador de caspases derivado da mitocôndria–SMAC) e HTRA2 (proteína requerida de alta temperatura A2) inibem a função anti-apoptótica de muitos membros da família IAP, inibindo a ativação de caspases. Além disso, a

HTRA2 exerce efeitos pró-apoptóticos independente de caspases por apresentar atividade de serina-protease (GALLUZZI et al., 2012).

Outro tipo de morte celular que estimula a via intrínseca da apoptose é a piroptose, inicialmente pensada como morte exclusiva induzida por bactérias especificamente em macrófagos, é atualmente considerado um tipo de morte celular que pode ocorrer em outros tipos celulares sem a interferência de microrganismos. Neste tipo de morte celular, as células podem exibir características morfológicas de apoptose e/ou necrose. Esta via é iniciada com a ativação de caspase-1, que pode ocorrer via inflamassoma ou, alternativamente, via piroptossoma. Em ambos os casos, a caspase-1 ativada catalisa a maturação proteolítica e liberação das interleucinas 1β (IL-1 β) e IL-18, promovendo em determinados casos a morte celular. Esta caspase-1 ativada pode ainda promover a ativação da caspase-7, promovendo morte celular via um processo incomum envolvendo caspase-1-caspase-7, que pode apresentar em algumas situações o envolvimento limitado da caspase-3 (GALLUZZI et al., 2012).

1.2.2. Necrose

A necrose é definida como morte celular patológica, caracterizada morfológicamente pela dilatação das organelas, como o retículo endoplasmático e a mitocôndria, aumento do volume celular e ruptura da membrana plasmática, enquanto o núcleo é distendido ou permanece praticamente intacto. Células necróticas liberam fatores que promovem a resposta inflamatória local (GRIVICICH, 2007; NIKOLETOPOULOU, 2013).

Por muito tempo, a necrose foi considerada uma morte celular acidental, com ausência de características morfológicas de apoptose ou autofagia. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que a morte celular por necrose ocorre de maneira regulada, e tem importante participação em processos fisiológicos e patológicos. Vários estímulos podem desencadear a necrose regulada, como danos ao DNA, citotoxinas e a ativação de receptores de morte, em determinadas circunstâncias. Quando as caspases estão inibidas, RIP1 e RIP3 participam de processos que culminam na execução de necrose. A necrose controlada pode ocorrer de maneira dependente de RIP1 ou dependente apenas de RIP3 (neste caso independente de RIP1) (GALLUZZI et al., 2012).

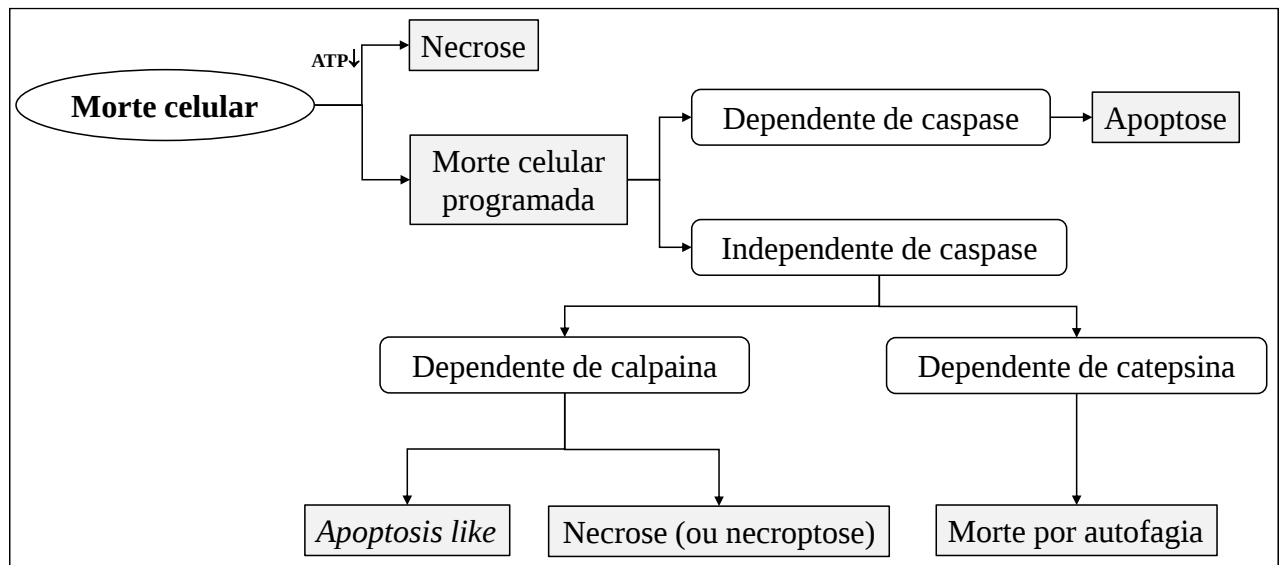
A diminuição dos níveis celulares de ATP também pode favorecer a morte celular por um tipo específico de necrose (figura 2) denominado *parthanatos*, a partir da indução de danos constantes ao DNA, como os provocados pelas ERON, que levam a ativação de

enzimas nucleares de reparo, como PARP1 (poli ADP-ribose polimerase 1), que consome grandes quantidades de NAD^+ , promovendo a depleção de ATP e acúmulo de PAR (poli ADP-ribose) na mitocôndria, favorecendo a perda do potencial transmembranas e liberação de fator de indução de apoptose (AIF), a qual interage com PAR culminando em degradação da cromatina (GALLUZZI et al., 2012; NIKOLETOPOULOU, 2013).

1.2.3. Morte celular autofágica

A morte celular autofágica tem sido usada para indicar situações onde a morte celular é acompanhada de intensa vacuolização citoplasmática, o que indica um fluxo autofágico aumentado. A autofagia envolve a digestão enzimática do conteúdo do citoplasma e de organelas intracelulares dentro de vesículas de dupla membrana, denominadas autofagolisossomos, as quais são formadas a partir da fusão do autofagossomo com o lisossomo, e seu conteúdo é degradado por hidrolases ácidas específicas. A morte celular autofágica tem sido demonstrada em células que apresentam diminuição nos moduladores apoptóticos como BAX, BAK ou caspases, e constitui um mecanismo fracassado de proteção que é ativado por células sob estresse na tentativa de sobrevivência, entretanto, essa tentativa acelera a morte celular (GALLUZZI et al., 2012). Normalmente a autofagia é ativada em resposta a um estresse no retículo endoplasmático, e ocorre de maneira independente de caspases, via ativação de catepsinas (figura 2), em condições de deficiência nutricional, na depleção de fatores de crescimento e na hipóxia (NIKOLETOPOULOU, 2013). De maneira geral, todos os casos de morte celular autofágica parecem exibir marcadores de autofagia como a lipidificação de microtúbulos associados a proteína 1 de cadeia leve 3 (LC3/Atg8), ou o aumento da degradação autofágica de substratos como sequestossoma 1 (SQSTM1) (GALLUZZI et al., 2012).

Figura 2. Vias envolvidas na ativação da morte celular.



Adaptado de NIKOLETOPOULOU, 2013.

2. OBJETIVOS

Determinar a atividade antioxidante do extrato etanólico bruto do caule, suas frações e das antraquinonas crisofanol, fisiona e emodina, obtidos de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Rhamnaceae), assim como seu potencial citotóxico em células tumorais de colo uterino (com genoma do vírus HPV – SiHa, e sem – C33-A), e carcinoma oral de células escamosas (HSC-3) e as respectivas inferências destes ponteciais sobre o mecanismo de ação nestas diferentes linhagens celulares.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade antioxidante sobre as espécies reativas de oxigênio: $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $ROO^{\cdot}$, $HOCl/OCl^-$ e $NO^{\cdot}$.
- Avaliar a citotoxicidade através do ensaio de sulforrodamina B (SRB).
- Determinar o tipo de morte celular induzido por meio dos ensaios de anexina-V, ensaio de exclusão por fluorocromos com Hoechst 33342 e iodeto de propídio, e atividade da caspase-3.
- Avaliar as alterações nos níveis proteicos e/ou níveis de fosforilação das proteínas AKT, p-Ser-473-AKT e caspase-3 por meio de *western blotting*.
- Verificar a genotoxicidade e a mutagenicidade por meio dos ensaios do cometa e do micronúcleo, respectivamente.
- Verificar a indução de estresse oxidativo celular por meio da quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).
- Avaliar a capacidade de quimioprevenção do câncer pelo ensaio de indução da enzima quinona-redutase.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. REAGENTES E EQUIPAMENTOS

O clorofórmio deuterado (CDCl_3) foi obtido de Cambridge Isotope Laboratories[®] (Andover, MA, USA). E os experimentos de RMN foram realizados no espectrômetro BrukerAvance III 600[®] (Bruker, Billerica, MA, USA). A água ultrapura, foi obtida em equipamento Milli-Q (Millipore system, USA). O DMSO (99,9%), trolox, ácido gálico, quercetina, curcumina, ácido ascórbico, catalase, doxorubicina, *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), mistura de nutrientes Ham F10 e F12, hidrocortisona, soluções de penicilina e estreptomicina, bicarbonato de sódio, kanamicina, substrato fluorogênico para caspase-3 (Ac-Asp-Met-Gln-Asp-AMC), isotiociano de fluoresceína, sulforrodamina-B, ditiotretitol, Tris, dodecil sulfato de sódio, β -mercaptoetanol, aprotinina, PMSF, leupeptina, ortovanadato de sódio, NaOCl, 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, iodeto de potássio, NADH, metassulfato de fenazina, azul de tetrazólio, ácido sulfanílico, N-(1-naftalenodiamina), citocalasina B and tripsina foram obtidos de Sigma Aldrich[®]. Soro fetal bovino foi adquirido via Cultilab[®], diacetato de fluoresceína, iodeto de propídeo e Hoechst 33342 via Invitrogen[®], anexina-V conjugada com FITC via *Life Technologies*[®]. Pirofosfato de sódio, fluoreto de sódio e nitroprussiato de sódio via Merck[®]. Os anticorpos anti-AKT, anti-p-[Ser-473]-AKT, anti-caspase-3, *anti-rabbit* conjugado com *horseradish* peroxidase (1:1000) foram obtidos via *Cell Signaling*[®] e anti-GAPDH via CusAB[®].

Os ensaios de captura foram realizados no espectrofotômetro para microplacas *PowerWave XS2* (BIOTEK[®]). Para os ensaios de apoptose (citomorfológico, anexina-V e caspase-3) e micronúcleo foi utilizado o equipamento IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare[®]). O ensaio de TBARS foi realizado em espectrofluorímetro para microplacas *Synergy 5* (BIOTEK[®]). O ensaio do cometa foi realizado em microscópio para fluorescência Nikon modelo ECLIPSE 50i, acoplado com câmera fotográfica Nikon modelo DS-Ri1 (Nikon Instruments Inc., Japan). Para os ensaios de *western blot* foram utilizados: aparato de gel miniatura Bio-Rad e aparato de transferência miniatura Bio-Rad (Mini-Protean, BioRad Laboratories); e C-Digit Blot Scanner (LI-COR).

3.2. MATERIAL VEGETAL

Foram utilizados os caules de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*. Este estudo foi realizado em colaboração com os professores Obdulio Gomes Miguel, no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia, e Anderson Barisson, no Laboratório de RMN do Departamento de Química na Universidade Federal do Paraná (UFPR).

A espécie vegetal foi coletada na Universidade Federal do Paraná, campus Jardim Botânico (25°26'52"S49°14'21"W), durante o período da manhã, em maio/2011 e julho/2013 e a identificação botânica foi realizada no Museu Botânico Municipal de Curitiba (Paraná, Brasil), por comparação (exsicata 243989) (MOREIRA, 2012).

Os caules de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* foram secos e moidos, e então submetidos a extração com etanol absoluto, obtendo-se o extrato etanólico bruto (EERs), o qual foi particionado em partição líquido-líquido com hexano (fração hexânica – HFRs), clorofórmio (fração clorofórmica – CFRs) e acetato de etila (fração acetato de etila – EAFRs). Para ambos os métodos, extração e partição, foi utilizado o equipamento de Soxhlet, em temperatura constante de 60°C, em tempo suficiente para esgotamento da amostra (extração total). Posteriormente, a fração hexânica foi submetida a cromatografia em coluna com sílica gel 60 e fase móvel composta por hexano e acetato de etila, acetato de etila e metanol, com gradientes de aumento da polaridade (início em 100% de hexano até 100% de acetato de etila, e de 100% de acetato de etila até 80% de metanol) (MOREIRA, 2012).

Neste período foram isoladas três antraquinonas, crisofanol, emodina e fisiona, identificadas por ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H), dissolvidos em clorofórmio deuterado (CDCl_3), em tubos de RMN de 5mm, no espectrômetro Bruker Avance III 600[®]. As antraquinonas isoladas, o extrato etanólico bruto do caule e suas frações foram utilizados neste estudo.

3.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.3.1. Ensaio de captura do $\text{O}_2^{\cdot-}$

Essa ERO pode ser gerada, *in vitro*, por reação não enzimática entre nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e metassulfato de fenazina (PMS) e oxigênio do meio reacional, sendo sua formação quantificada por espectrofotometria, com a redução de

azul de nitrotetrazólio (NBT), que adquire coloração púrpura. O ensaio foi realizado em tampão pirofosfato de sódio (25mM, pH 8,3), contendo PMS (0,372mM), NBT (0,6mM), NADH (1,56mM), diferentes concentrações das amostras, com volume final da reação de 300 μ L. Após incubação desta mistura reacional por 7 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a absorbância foi monitorada a 560nm, para determinação da quantidade de formazana gerada. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão do CE₅₀ (concentração efetiva necessária para inibir de 50% da atividade total) (HAZRA et al., 2008).

3.3.2. Ensaio de captura para o HOCl/OCl⁻ e para a taurina cloramina (TauCl)

Este ensaio, *in vitro*, permite observar a capacidade antioxidante de uma amostra a partir da sua habilidade em capturar o HOCl/OCl⁻ ou TauCl. O método se baseia na inibição do ácido hipocloroso ou da taurina cloramina em oxidar a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), que gera um composto de coloração azul, monitorado a 652nm. Inicialmente o OCl⁻ deve ser quantificado a partir da mistura de hipoclorito de sódio (NaOCl) em hidróxido de sódio (NaOH), 10mM (pH 12). A concentração de OCl⁻ foi determinada por seu coeficiente de extinção molar (ϵ = 350M⁻¹.cm⁻¹ a 295 nm) (MORRIS et al.,1966). A solução de TMB (2,8mM) foi preparada a partir da sua dissolução em uma solução contendo 50% (v/v) de dimetilformamida, 49% (v/v) de ácido acético (0,8M) e 1% (v/v) de iodeto de potássio (0,01M). A reação é iniciada pela incubação da amostra com HOCl/OCl⁻ (30 μ M) em tampão fosfato de sódio (50mM, pH 7,4), por 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, a solução de TMB (2,8mM) é adicionada e seguida de nova incubação, nas mesmas condições, e a leitura da absorbância é realizada a 652nm. Após a adição do reagente revelador (TMB), o volume final da reação foi de 300 μ L. Para a formação de taurina cloramina, foram utilizadas as mesmas condições do ensaio supracitado, com a adição inicial de taurina (5 mM) e incubação por 5 minutos com o HOCl/OCl⁻ antes da adição das amostras. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão do CE₅₀ (DYPBUKT et al., 2005; KETTLE et al., 1994; ZGLICZYNSKI et al., 1971).

3.3.3. Ensaio de captura do H₂O₂

A capacidade de captura do H₂O₂ é avaliada através da oxidação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) promovida pelo peróxido de hidrogênio, formando o ácido 5-5'-ditio-2-

nitrobenzóico (DTNB), monitorado a 560 nm. A concentração das soluções de TNB e H_2O_2 foram determinadas em função do coeficiente de extinção molar de cada composto (TNB: $\epsilon=13600\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 412nm; H_2O_2 : $\epsilon=80\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, 230nm) (BRESTEL, 1985). Para realização do ensaio, as amostras foram incubadas com H_2O_2 (0,3mM) em tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7,4) durante 30 minutos, a 37°C. Após essa incubação, TNB (53 μM) foi adicionado ao meio de reação, e submetido a incubação por 60 minutos, nas mesmas condições. Ao final do experimento, a leitura da absorbância foi realizada a 412nm. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão do CE_{50} (CHING et al., 1994).

3.3.4. Ensaio de captura do $\text{NO}^\bullet$

Este ensaio avalia a capacidade dos compostos antioxidantes em capturar o óxido nítrico, formado a partir da dissolução de nitroprussiato de sódio, em solução aquosa com pH 7,4. O óxido nítrico reage com o oxigênio do meio formando nitrato e nitrito. O nitrito formado é determinado, espectrofotometricamente com o reagente de Griess: ácido sulfanílico 1,0 % (p/v); N-(1-naftalenodiamina) 0,1% (p/v) e ácido fosfórico 2,5% (v/v), produzindo um composto colorido. As amostras foram incubadas, em diferentes concentrações, com nitroprussiato de sódio (4mM) em tampão fosfato de sódio (20mM, pH 7,4), por 150 minutos, a temperatura ambiente. E após o tempo de reação, foi adicionado o reagente de Griess, e a leitura de absorbância realizada a 540nm. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão do CE_{50} (YEN et al., 2001).

3.3.5. Ensaio do Clareamento da Crocina: captura do $\text{ROO}^\bullet$

O radical peroxila ($\text{ROO}^\bullet$) é gerado na oxidação de lipídios. O ensaio do clareamento (*bleaching*) da crocina, avalia a habilidade de compostos antioxidantes em proteger o carotenoide crocina da lipoperoxidação provocada por um composto gerador de radicais livres. A reação é iniciada a partir da termólise à 40°C do dihidrocloreto de 2,2'-Azobis-2-metilpropionamida (AAPH), que produz de um radical que reage com o oxigênio em meio aerado e forma o radical peroxila. A partir da sua formação, esse radical tem a habilidade de abstrair um átomo de hidrogênio da estrutura da crocina, resultando no rompimento do seu sistema de duplas ligações conjugadas, o que provoca a diminuição da intensidade de cor do carotenoide (clareamento), o que é avaliado em função do tempo. A reação foi realizada em

tampão fosfato (0,12M; pH 7,0), na presença de crocina (25 μ M) e diferentes concentrações das amostras, com volume final de 2mL. O início da reação ocorre a partir da adição de 50 μ L de AAPH (12,5mM, em tampão fosfato 0,12M, pH 7,0), a absorbância da mistura reacional foi monitorada em espectrofotômetro a 443nm, durante 10 minutos, sob agitação e temperatura (40°C) constantes. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão do CE₅₀ (BORS et al., 1984).

3.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E MORTE CELULAR

As concentrações citotóxicas das antraquinonas, extrato bruto e frações foram inicialmente definidas pelo ensaio de citotoxicidade por sulforrodamina B. Para verificar morfologicamente o tipo de morte celular predominante (apoptose ou necrose), foi realizado o ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos. A definição do tipo de morte celular foi realizada pelos ensaios de anexina-V e atividade de caspase-3. Para verificar possíveis vias envolvidas na citotoxicidade, foram realizados os ensaios de *western blotting* para avaliação dos níveis de fosforilação de AKT e quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

3.4.1. Cultura de células

As amostras provenientes de *Rhamnus sphaerosperma* var *pubescens*, inicialmente foram avaliadas, quanto a sua citotoxicidade e seletividade, sobre as linhagens celulares relacionadas na tabela 1.

Para o cultivo celular foram utilizados os meios de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com F-12 (Mistura nutriente F-12 *Ham*), hidrocortisona (0,4 μ g/L) e ácido ascórbico (50mg/L) para a linhagem HSC-3, e DMEM com F10 (Mistura nutriente F-10 *Ham*) para as demais linhagens. Todos os meios foram suplementados com soro fetal bovino 10%, penicilina 100U/mL, estreptomicina 100 μ g/mL e anfotericina B 0,25 μ g/mL. As linhagens foram cultivadas em frascos de cultura de células, em ambiente estéril, a 37°C, sob atmosfera com 5% de CO₂. As células foram mantidas nas condições de cultivo até a obtenção da concentração ideal para a realização dos ensaios e foram desaderidas com solução de tripsina 0,5% (m/v) em solução salina de Hanks, para o plaqueamento dos ensaios.

Tabela 1. Linhagens celulares utilizadas.

Linhagem celular	Características
HepG2 (ATCC® HB-8065™)	Carcinoma hepatocelular humano
SiHa (ATCC® HTB35™)	Neoplasia de cérvix uterina escamosa humana com genoma de HPV16
C33-A (ATCC® HTB31™)	Neoplasia de cérvix uterina metastática humana
MCF-7 (ATCC® HTB-22)	Adenocarcinoma mamário humano – Dependente de estrogênios
HSC-3 (JCRB:JCR0623)	Carcinoma epidermoide de boca
HACAT (CLS 300493)	Queratinócitos humanos imortalizados (não tumoral)
MCF 10A (ATCC® CRL10317™)	Glândula mamária humana (não tumoral)

3.4.2. Tratamentos

No ensaio de citotoxicidade (sulforrodamina B), as células foram tratadas por 24 horas, com as antraquinonas, extrato e frações de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*. As antraquinonas foram testadas nas concentrações de 3,125 a 50,0 µg/mL, e os extratos nas concentrações de 12,5 a 100,0 µg/mL, e como controle positivo, doxorrubicina foi utilizada a 50 µg/mL.

Nos ensaios de exclusão por fluorocromos, anexina-V e atividade de caspase-3 o tempo de tratamento variou para cada ensaio, de acordo com as adequações experimentais, sendo de 12 ou 24 horas para o ensaio de exclusão por fluorocromos e anexina-V e de 6 horas para atividade de caspase-3. Nestes ensaios emodina foi avaliada nas concentrações de 46,3 a 185,0 µM (12,5 a 50 µg/mL), fisciona de 43,8 a 175,0 µM (25 a 50 µg/mL) e o extrato bruto e sua fração hexânica de 25 a 100 µg/mL, nestes ensaios foram utilizadas curcumina (53 µg/mL ou 100 µM) e doxorrubicina (50 µg/mL ou 90 µM) como controles de indução de morte.

Nos ensaios de western blotting, o tempo de tratamento foi de 24 horas, e as concentrações testadas foram: 23,2 a 92,5 µM (6,25 a 25 µg/mL) para emodina; 21,9 a 87,5 µM (6,25 a 25 µg/mL) para fisciona e 6,25 a 25 µg/mL para o extrato bruto.

Para o ensaio de quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), as células foram tratadas por 24 horas, com fisciona nas concentrações 43,8 e 87,5 µM (12,5 e 25 µg/mL); com emodina a 46,3 e 92,5 µM (12,5 e 25 µg/mL) e com extrato bruto a 12,5 e 25,0 µg/mL.

No ensaio de micronúcleo as antraquinonas foram avaliadas nas concentrações de 3,125 a 12,5 µg/mL e o extrato bruto de 6,25 a 25 µg/mL, com tratamento de 24 horas. E no ensaio de indução da enzima quinona reductase, crisofanol e extrato bruto foram testados a 6,25 e 12,5 µg/mL por 48 horas.

3.4.3. Determinação da citotoxicidade: Ensaio de sulforrodamina B (SRB)

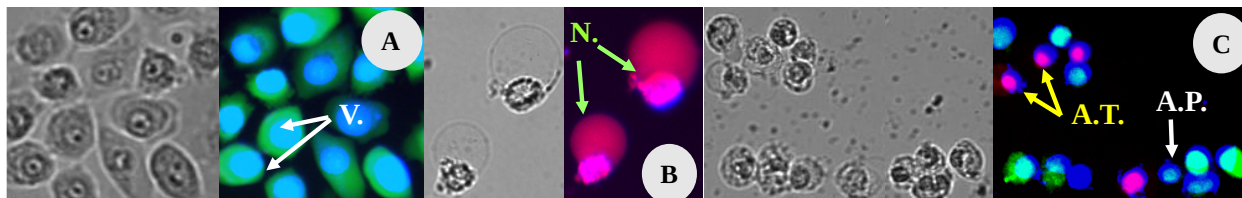
Sulforrodamina B é um corante aniônico que se liga a resíduos básicos de aminoácidos, e consequentemente cora as proteínas de células íntegras, possibilitando sua quantificação espectrofotométrica (570nm). Para determinação da citotoxicidade (IC₅₀) e seletividade sobre as linhagens celulares, as células foram cultivadas em placas de cultura de células de 96 poços, na concentração de $1,5 \times 10^3$ células/poço, em estufa a 37°C com atmosfera com 5% de CO₂, durante 24 horas. Estas células foram tratadas com diferentes concentrações das amostras por 24 horas. Após o tratamento, as células foram fixadas com ácido tricloroacético (50%, m/v) por 1 hora a 4°C. Após a etapa de fixação, as células foram lavadas com água deionizada por 3 vezes, coradas com Sulforrodamina B (0,4% - p/v) por 20 minutos a temperatura ambiente, e lavadas novamente com ácido acético (1% - v/v). Após a secagem das placas, o corante ligado a proteínas das células foi solubilizado com solução Tris-base 10mM (pH 10,5), e a absorbância foi medida a 570 nm. Os resultados foram expressos como média±erro padrão da viabilidade celular obtida em três experimentos independentes (SKEHAN et al., 1990; VOIGT, 2005).

3.4.6. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão com fluorocromos: Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína

A diferenciação entre a ocorrência de células apoptóticas e necróticas foi realizada pelo método de exclusão com fluorocromos, utilizando-se uma solução fluorescente, contendo diacetato de fluoresceína (DAF), iodeto de propídeo (IP), e Hoechst 33342 (HO). O iodeto de propídeo é uma molécula de alta massa molecular que se intercala no DNA de células com a permeabilidade da membrana plasmática prejudicada. Por outro lado, o Hoechst 33342 é um corante fluorescente de DNA, rapidamente absorvido por células com a membrana plasmática com permeabilidade sem prejuízos (viáveis ou em estágios precoces de apoptose). O diacetato de fluoresceína é um corante fluorescente do citoplasma em células que ainda mantém a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática. Assim, a combinação destes corantes

fluorescentes permite diferenciar os estágios de apoptose (precoce ou tardia), bem como apoptose de necrose (CIANCIO et al., 1988).

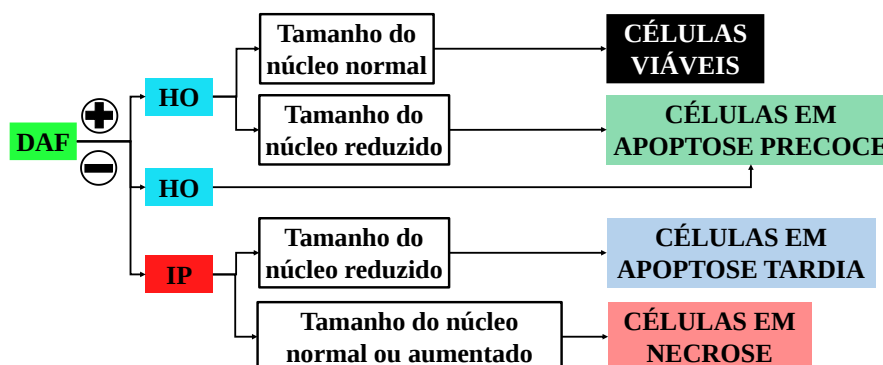
Figura 3. Representação do ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos em SiHa.



Legenda: A) Células viáveis (V.) B) Células em necrose (N.); C) Células em apoptose precoce (A.P.) e em apoptose tardia (A.T.). Fotomicrografias adquiridas com o IN Cell Analyser 2000 (Aumento de 200x).

O ensaio de exclusão de fluorocromos foi realizado segundo HASHIMOTO *et al.*, 2003, com as modificações necessárias para utilização do equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare). Foram plaqueadas 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após o tempo de crescimento (24 horas), os tratamentos foram realizados por 12h e /ou 24h. A distinção entre células apoptóticas e necróticas foi realizada a partir da coloração das células com uma solução contendo diacetato de fluoresceína 3,5 $\mu\text{g/mL}$ (DAF), iodeto de propídeo 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (IP), e Hoechst 1,5 $\mu\text{g/mL}$ (HO) 33342 (Invitrogen®) em PBS. Após o período de tratamento, a placa foi centrifugada a 2.500 r.p.m., e cada poço foi lavado com PBS e centrifugado novamente. Após a lavagem, as células foram coradas (100 μL /poço) com os fluorocromos por 10 minutos em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Após o período de incubação as imagens foram adquiridas e analisadas utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da porcentagem de células viáveis, em apoptose precoce, em apoptose tardia e em necrose.

Figura 4. Fluxograma de análise do ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos.

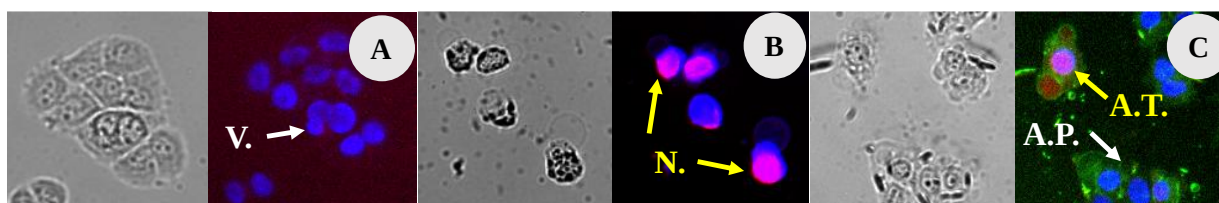


Legenda: Células viáveis: coloração com DAF e HO e tamanho nuclear normal. Células em apoptose precoce: coloração com DAF e HO, com núcleo reduzido ou apenas coloração com HO. Células em apoptose tardia: coloração com IP e núcleo reduzido. Células em necrose: coloração com PI e núcleo normal ou aumentado.

3.4.4. Ensaio de morte celular por anexina-V

Anexina-V é uma proteína que se liga a fosfolipídeos, e tem alta afinidade por fosfatidilserina, que em células apoptóticas está translocada para a superfície externa da bicamada lipídica da membrana plasmática. Desta maneira, mudanças na assimetria da membrana correspondente ao grau de aderência de anexina-V aos fosfolipídeos translocados, associadas ao início da apoptose, são detectadas antes da perda da integridade da membrana e do aparecimento de alterações morfológicas (KOOPMAN et.al., 1994).

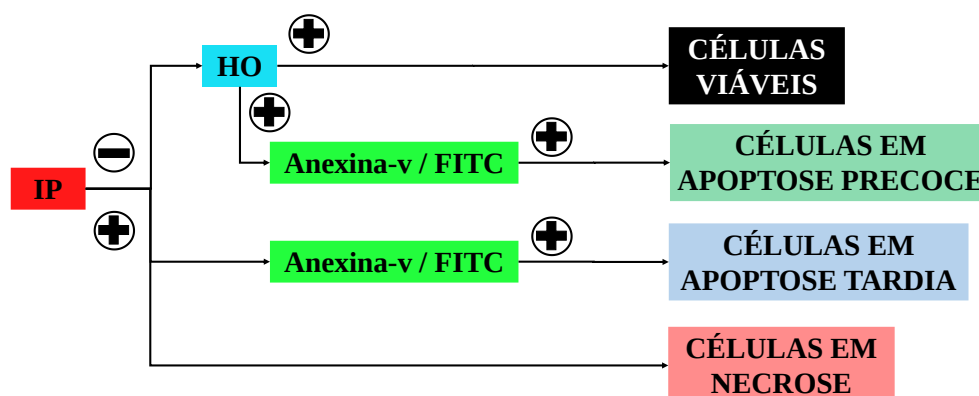
Figura 5. Representação do ensaio de anexina-V em HaCaT.



Legenda: A) Células viáveis (V.) B) Células em necrose (N.); C) Células em apoptose precoce (A.P.) e em apoptose tardia (A.T.). Fotomicrografias adquiridas com IN Cell Analyser 2000 (Aumento de 200x).

O ensaio de anexina-V foi realizado segundo DUARTE et al., 2010, com as modificações necessárias para utilização do equipamento IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare). Foram plaqueadas 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após o tempo de crescimento (24 horas), as células foram tratadas por 12 e/ou 24 horas nas concentrações estabelecidas por meio do ensaio de citotoxicidade. Em seguida, a placa foi centrifugada a 2.500 r.p.m., e os poços lavados com PBS, seguido de nova centrifugação. Após a lavagem, foram adicionados 100µL/poço de tampão de ligação para anexina-V (HEPES 10mM, NaCl 140mM e CaCl_2 2,5Mm), contendo 1,3µg/mL de anexina-V conjugada com FITC (*Life Technologies*®), e 1,6µg/mL de Hoechst 33342 (*Invitrogen*®) (1mg/mL), seguido de incubação por 15 minutos a 4°C ao abrigo da luz. Após os 15 minutos, foram adicionados 20µL de iodeto de propídeo (1µg/mL) em tampão de ligação. As imagens foram adquiridas e analisadas utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000. Os resultados foram expressos como média±erro padrão da porcentagem de células viáveis, em apoptose precoce, em apoptose tardia e em necrose.

Figura 6. Fluoxograma de análise do ensaio de anexina-V.



Legenda: Células viáveis: coloração com HO. Células em apoptose precoce: marcadas com anexina-V/FITC e coloração com HO. Células em apoptose tardia: marcadas com anexina-V/FITC e coloração com IP. Células em necrose: coloração com PI.

3.4.5. Detecção de apoptose pela avaliação da atividade de caspase-3

A ativação das caspases executoras (caspase-3, -6, -7) é o sinal celular que promove a amplificação da ativação proteolítica na apoptose, sendo assim, a detecção do aumento da atividade da caspase-3 confirma o estado apoptótico de células antes que ocorram as mudanças morfológicas características (NIKOLETOPOULOU, 2013).

Para verificar o nível da ativação da caspase-3, as células foram plaqueadas (1×10^4 células/poço) em placas de 96 poços. Após o tempo de crescimento (24 horas), as células foram tratadas por 6 horas, e em seguida a placa foi centrifugada a 2.500 r.p.m., e cada poço foi lavado com PBS, e centrifugado novamente. Após a lavagem as células foram permeabilizadas, com solução de saponina 0,5% (dissolvida em meio de cultura contendo ditionitroto - DTT a 5mM e EDTA a 2mM) por 10 minutos. Após a etapa de permeabilização, foram adicionados 100µL da solução de substrato fluorogênico (Ac-asp-met-gln-asp-AMC) específico para caspase-3 (20µM concentração final) – Sigma Aldrich® e iodeto de propídeo (2,5 µg/mL) para marcação nuclear. As imagens foram imediatamente adquiridas e analisadas utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000. Os resultados foram expressos como média±erro padrão da intensidade de fluorescência emitida pela clivagem do substrato fluorogênico (EARNSHAW, 1999).

3.4.6. *Conteúdo proteico e níveis de fosforilação de componentes intracelulares via Western blotting*

Para detecção na mudança nos níveis de expressão de caspase-3, Akt e Akt fosforilada, as células foram plaqueadas em placa de 6 poços (8×10^5 células/poço), por 24 horas, e tratadas com diferentes concentrações das amostras por 24 horas. Após o período de tratamento, as células foram lavadas com PBS e lisadas com solução de lise contendo Tris 125mM (pH 6,8), dodecil sulfato de sódio (SDS) a 10% (m/v), β -mercaptoetanol a 1% (v/v), inibidores de proteases (5 μ g/mL de aprotinina; 1 mM de PMSF; 2,34 mM de leupeptina) e inibidores de fosfatases (10 mM de pirofosfato de sódio; 100 mM de fluoreto de sódio e 10 mM de ortovanadato de sódio). Após a lise, o conteúdo celular foi aquecido a 95°C por 8 minutos, e as amostras estocadas a -80°C até o momento do uso, uma alíquota foi separada para quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). As proteínas dos lisados celulares foram separados por eletroforese tipo SDS-PAGE em gel de acrilamida/bisacrilamida a 10% (LAEMMLI, 1970) em aparato de gel miniatura. A eletrotransferência das proteínas do gel para membranas de nitrocelulose foi realizada em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, pH 8,3, 192 mM glicina, 10% metanol, 0,05% de SDS) durante 120 minutos a amperagem constante de 0,35 A em aparato de transferência miniatura de acordo com Towbin et al. (1979). Após a transferência, as membranas foram submetidas a etapa de bloqueio (tampão de bloqueio: 10% de leite desnatado, 10 mM de Tris, 125 mM de NaCl e 0,05% de Tween 20) por 1 hora, sob agitação constante em temperatura ambiente; e em seguida incubadas a 4°C *overnight* com anticorpos primários específicos: anti-AKT (1:500), anti-p-[Ser-473]-AKT (1:500), anti-caspase-3 (1:1000) (Cell Signaling). Anti-GAPDH (1:1000) (CusAB) foi usado como controle interno. Após o tempo de incubação, as membranas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário conjugado a *horseradish* peroxidase (HRP) na diluição 1:1000 (Cell Signaling) durante 1 hora à temperatura ambiente, e então as membranas foram lavadas e incubadas por 5 minutos com substrato quimioluminescente (5 mM de luminol, 4 mM de ácido p-iodofenilborônico, 8 mM de peróxido de hidrogênio, Tris-HCl 0,1 M, pH 8,8) (HAAN e BEHRMANN, 2007, com modificações). O sinal quimioluminescente foi detectado pelo equipamento C-Digit Blot Scanner e a intensidade das bandas foi quantificada utilizando o programa LI-COR Image Studio 4.0.

3.4.7. Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A quantificação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) presentes no meio de cultura extracelular é utilizada como indicador de estresse oxidativo. As células foram plaqueadas (2×10^5 células/poço) em placas de 24 poços, com tempo de crescimento de 24 horas, e tratadas por 24 horas. Após o tratamento, o meio de cultura de cada poço (200 μ L) foi utilizado para quantificação de TBARS, a partir da reação com 800 μ L de ácido tiobarbitúrico (0,8% - m/v) diluído em ácido acético (20% - v/v) e dodecil sulfato de sódio (8,1% - m/v). Após a mistura dos reagentes, os tubos foram incubados a 95°C, por 60 minutos, e a intensidade de fluorescência foi medida a 510 nm de excitação e 553 nm de emissão. Os resultados foram expressos em μ M de malondialdeído (MDA), quantificado a partir de uma curva padrão realizada com tetrametoxipropano (ZAMRI et al. 2014).

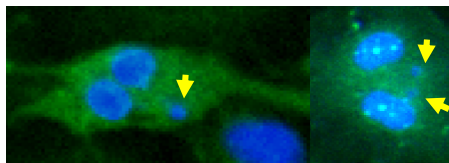
3.5. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO

3.5.6. Avaliação da mutagenicidade pelo ensaio de micronúcleo

O ensaio de micronúcleo é utilizado para detectar danos irreparáveis ao DNA, durante o processo de divisão celular (FENECH, 2000).

A avaliação da mutagenicidade foi realizada a partir do ensaio de micronúcleo, com adaptações necessárias para utilização de microscopia de fluorescência no equipamento IN Cell Analyser 2000. Foram plaqueadas 4×10^3 células/poço em placas de 96 poços, por 24 horas. Os tratamentos foram realizados por 24h. Após o período de tratamento, os poços foram lavados com PBS e as células foram incubadas com citocalasina B (6 μ g/mL), por 36 horas a 37°C, para bloquear a etapa de citocinese da divisão celular, permitindo a observação de células multinucleadas (com dois ou mais núcleos). Após esta etapa, as células foram fixadas com etanol absoluto, por 30 minutos, e coradas com Isotiocianato de fluoresceína (FITC), 1 μ g/mL, por 1 hora, para coloração do citoplasma e em seguida com Hoechst 33342 (10 μ g/mL), por 30 minutos, para coloração do núcleo e micronúcleos. Imediatamente após a coloração, As imagens foram adquiridas e analisadas utilizando o equipamento IN Cell Analyser 2000. A frequência de micronúcleos foi obtida com o auxílio do software do equipamento a partir da contagem de micronúcleos em todas as células analisáveis, em doze campos por poço (SHIBAI-OGATA et al., 2011).

Figura 7. Ensaio de micronúcleo.



Legenda: Células com um ou com dois micronúcleos (setas). Fotomicrografias adquiridas com IN Cell Analyser 2000 (Aumento de 200x).

3.5.7. Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa

A avaliação da genotoxicidade pode ser verificada pelo ensaio do cometa, que detecta danos ao DNA passíveis de reparação, os quais podem originar mutações (TICE et al., 2000).

As células foram cultivadas em placas de 24 poços a partir de uma suspensão com 1×10^5 células/poço, por 24 horas. As células foram colocadas em contato com as amostras durante 6 horas, e após o tratamento, as células foram colhidas com solução de tripsina e suspensas em 200 μ L de uma solução de agarose de baixo ponto de fusão a 0,5% (m/v) em PBS livre de Ca^{++} e Mg^{++} . Uma alíquota de 100 μ L desta suspensão de células foram adicionados em lâminas previamente cobertas com solução de agarose ponto de fusão normal a 1,5% (m/v) na mesma solução de PBS e cobertas com lamínula. As lâminas foram armazenadas a 4°C por 15 minutos e então colocadas em solução de lise (NaCl 2,5 M; EDTA 100 mM; tampão Tris-HCl 10 mM, pH 10; Triton X-100, 1% e DMSO 10%) por 12 horas a 4°C. Após a lise, as lâminas foram lavadas com PBS e submetidas à eletroforese alcalina (pH 13,0) por 20 minutos (25V, 280mA). Então, as lâminas foram neutralizadas com Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5), fixadas com etanol absoluto e armazenadas a 4°C para a análise. Como controle positivo foi utilizado peróxido de hidrogênio 0,1 mM. As lâminas foram coradas com brometo de etídio 20 μ g/mL e observadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. As imagens foram fotografadas e analisadas com software *TriTek CometScore™* v1.5 (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000).

3.6. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE QUIMIOPREVENTIVA

3.6.6. Indução e atividade da enzima quinona-redutase (NQO1)

A quinona-redutase (NQO1) é uma enzima microsomal de fase 2 que participa de reações que envolvem a metabolização de xenobióticos no organismo, e por isso, a capacidade de promover sua indução é considerada como indicativo de atividade

quimiopreventiva para testes de novos fármacos. Neste ensaio, ocorre a medida direta da atividade da enzima em células de hepatoma murino (Hepa 1c1c7). A quinona-redutase catalisa a redução da menadiona a menadiol, o que promove a redução não enzimática do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio (MTT), envolvendo NADPH como doador de elétrons, produzindo formazana, detectada por espectrofotometria (YANG et al., 2009). Para a indução e atividade da enzima quinona-redutase foi analisada células Hepa 1c1c7 foram cultivadas em placas de 96 poços (1×10^3 células/poço), por 24 horas. As células foram tratadas com o extrato bruto do caule e a antraquinona crisofanol, em diferentes concentrações por 48 horas. Após esse período, as células foram permeabilizadas com digitonina 0,8% (em EDTA 2mM, pH 7,8) por 10 minutos, a 37°C. E em seguida, a mistura de reação (Tris-HCl - 25mM, pH7,4; glicose-6-fosfato - 1mM; menadiona - 50µM; NADPH - 30µM; FAD - 5µM; albumina sérica bovina -0,07%, m/v; MTT - 0,03%, m/v; Tween 20 - 0,01%, v/v e glicose-6-fosfato desidrogenase - 2U/mL) foi adicionada e a placa submetida a agitação por 5 minutos em temperatura ambiente. A absorbância foi medida a 595nm após a agitação. A concentração de proteínas nas células foi determinada através da coloração com cristal violeta (0,2% - m/v) em etanol (2%). A atividade específica de NQO1 foi expressa em concentração (nmol) de azul de formazana produzido por quantidade de proteína (mg), por minuto. E o índice de indução foi estabelecido pela relação entre as atividades específicas de células tratadas com o indutor 4'-bromoflavona e células tratadas com o controle de veículo (DMSO - 0,5%) (KANG et al., 2004).

3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os ensaios de citotoxicidade e de avaliação do tipo de morte celular, foi aplicado o teste de análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Tukey. E para os ensaios de micronúcleo, TBARS e *western blotting* foi realizado o teste de análise de variância *one-way* (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Newman-keuls. No ensaio do cometa foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn.

4. RESULTADOS

4.1. MATERIAL VEGETAL

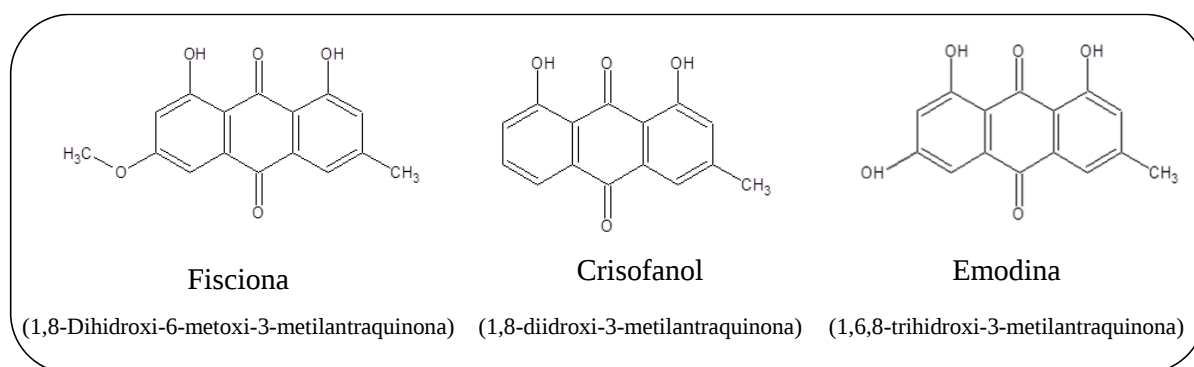
Caules secos e triturados foram submetidos a extração com etanol absoluto e particionamento líquido-líquido com hexano, clorofórmio e acetato de etila, em equipamento de Soxhlet. O extrato etanólico bruto e suas frações foram submetidos à análise de ressonância magnética nuclear (RMN) de hidrogênio (^1H). Os espectros de RMN do extrato etanólico e suas frações hexânica e clorofórmica apresentaram picos correspondentes a núcleos antraquinônicos presentes nestas amostras, por outro lado, essas características não foram encontradas na fração acetato de etila. As frações foram submetidas à cromatografia em coluna e três amostras cristalinas foram isoladas da fração hexânica. Após análise por RMN (tabela 2), estes compostos foram identificados como crisofanol (1,8-diidroxi-3-metilantraquinona), fisciona (1,8-Dihidroxi-6-metoxi-3-metilantraquinona) (MOREIRA, 2012) e emodina (1,6,8-trihidroxi-3-metilantraquinona) (figura 8).

Tabela 2. Valores de deslocamento químico e constantes de acoplamento dos espectros de RMN de ^1H para crisofanol, emodina e fisciona.

Posição	Deslocamento químico (ppm) ^1H		
	Crisofanol	Emodina	Fisciona
1 (C)–OH	12,09	12,21 (s)	12,10 (s)
2 (CH)	7,09 (m)	7,08 (dq; $J=1,6\text{Hz}$ e $0,8\text{Hz}$)	7,07 (m)
3 (Metila)	2,46 (s)	2,45 (dd; $J=0,8\text{Hz}$ e $0,5\text{Hz}$)	2,45 (s)
4 (CH)	7,65 (m)	7,60 (dq; $J=1,6\text{Hz}$ e $0,5\text{Hz}$)	7,62 (m)
5 (CH)	7,81 (d; $J=7,8\text{Hz}$)	7,23 (d; $J=2,41$)	7,35 (d; $J=2,61\text{Hz}$)
6 (CH)	7,68(dd; $J=8,5\text{Hz}$ e $7,8\text{Hz}$)	-	-
6 (Metoxila)	-	-	3,93 (s)
7 (CH)	7,28 (d; $J=8,5\text{Hz}$)	6,63 (d; $J=2,4\text{Hz}$)	6,67 (d, $J= 2,60\text{Hz}$)
8 (C)–OH	12,11 (s)	12,31 (s)	12,29 (s)

Legenda: RMN de ^1H (CDCl_3) J = constante de acoplamento; d = dubleto; dd = duplo dubleto; dq = duplo quarteto; s = singlete; t = tripleto, m = multiplete.

Figura 8. Estrutura química das antraquinonas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.



4.2.AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Nos ensaios antioxidantes foram utilizados os padrões quercetina (flavonoide), curcumina (β -dicetônico), ácido gálico (ácido fenólico) e trolox (6-Hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico, composto com o anel cromanol), análogo hidrosolúvel do alfa-tocoferol (preserva o anel cromanol); no ensaio de captura do H_2O_2 foram utilizados o ácido ascórbico (vitamina C) e a catalase.

Para comparação das amostras, o valor de EC_{50} (concentração efetiva necessária para inibir de 50% do sinal analítico, considerado como atividade total na ausência de amostra ou padrão) foi calculado para cada amostra, em todos os ensaios, sendo que, quanto menor este valor, melhor a atividade da amostra.

4.2.1. Ensaio de captura para $O_2^{\cdot -}$

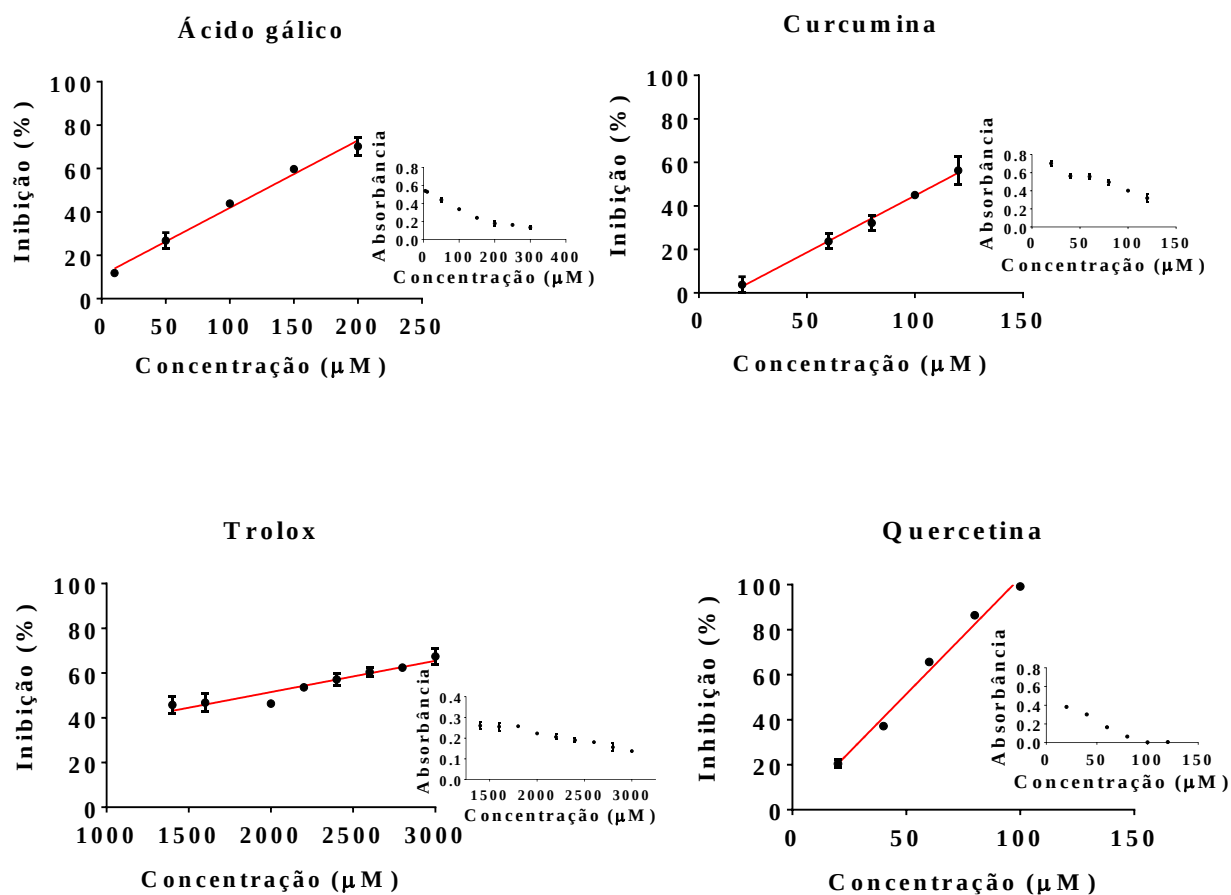
O radical $O_2^{\cdot -}$ está presente na maioria das células aeróbicas e efetivamente é produzido durante o metabolismo energético, na ativação de fagócitos do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos e eosinófilos, etc. É muito importante na geração de outras espécies reativas como peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (MARNETT, 2003).

Neste ensaio, quercetina apresentou melhor efetividade, com valor de EC_{50} de $13,48 \pm 0,23$ $\mu\text{g/mL}$ ($44,61 \pm 0,75$ μM), seguido de curcumina, com EC_{50} de $59,45 \pm 5,85$ $\mu\text{g/mL}$ ($112,9 \pm 11,14$ μM), ácido gálico EC_{50} de $18,81 \pm 0,46$ $\mu\text{g/mL}$ ($110,6 \pm 2,72$ μM) e trolox, com EC_{50} de $436,6 \pm 9,39$ $\mu\text{g/mL}$ ($1813,0 \pm 52,81$ μM). Os resultados estão apresentados nas figuras 9 e 10, e tabela 3.

Quando as amostras de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* foram avaliadas, a antraquinona emodina apresentou melhor atividade ($140,8 \pm 1,44$ μM), sendo que fisciona e

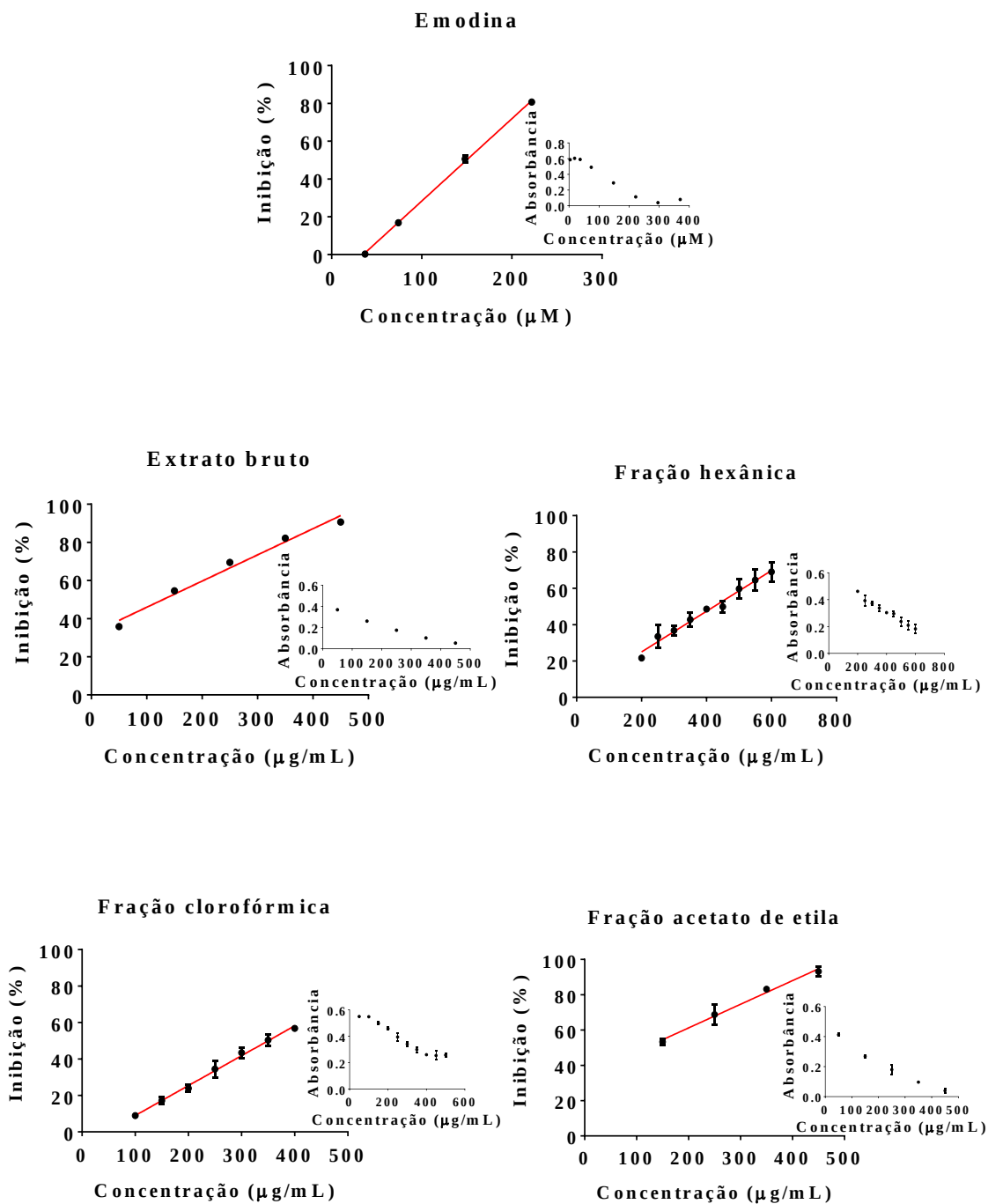
crisofanol não apresentaram capacidade de captura desta espécie reativa até concentrações solúveis no meio reacional. Os extratos também foram efetivos, onde o extrato bruto ($100,5 \pm 0,68 \mu\text{g/mL}$) e a fração acetato de etila ($144,7 \pm 10,67 \mu\text{g/mL}$) apresentaram melhor atividade, ambas iguais estatisticamente.

Figura 9. Inibição (captura) do $\text{O}_2^{\cdot-}$ dos padrões utilizados.



Legenda: Inibição (captura) do $\text{O}_2^{\cdot-}$ dos padrões utilizados: ácido gálico, curcumina, trolox e quercetina, em tampão pirofosfato de sódio 25 mM, pH 8,3; $\lambda = 560 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $\text{O}_2^{\cdot-}$ na presença de diferentes concentrações do padrão.

Figura 10. Inibição (captura) do $O_2^{\cdot -}$ das amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*.



Legenda: Inibição (captura) do $O_2^{\cdot -}$ das amostras de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*: emodina, extrato bruto do caule, fração hexânica do caule, fração clorofórmica do caule e fração acetato de etila do caule, em tampão pirofosfato de sódio 25 mM, pH 8,3; $\lambda = 560$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do $O_2^{\cdot -}$ na presença de diferentes concentrações de amostra.

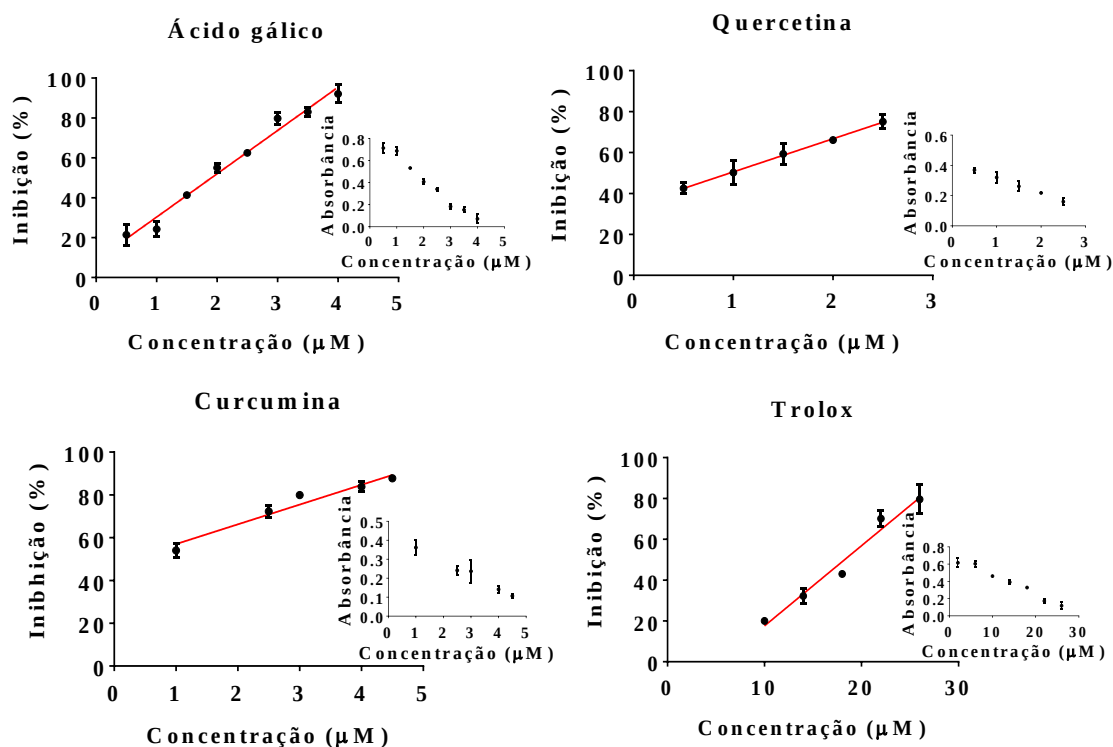
4.2.2. Ensaio de captura para HOCl/OCl⁻ e para TauCl

O ácido hipocloroso (HOCl) é produzido por células do sistema imune, principalmente neutrófilos, a partir do peróxido de hidrogênio e íons cloreto, em uma reação catalisada pela mieloperoxidase. Na presença do aminoácido taurina, o ácido hipocloroso é convertido em taurina cloramina, também um forte agente oxidante (ARNHOLD, 2004).

Para o HOCl/OCl⁻ todos os padrões e amostras apresentaram efetividade, com baixas concentrações no CE₅₀ (abaixo de 1μg/mL). Dentre os padrões utilizados, quercetina apresentou a melhor atividade para o HOCl/OCl⁻, com CE₅₀ de 0,259±0,04μg/mL (0,858±0,14 μM). Os resultados estão apresentados nas figuras 11 e 12, e tabela 3.

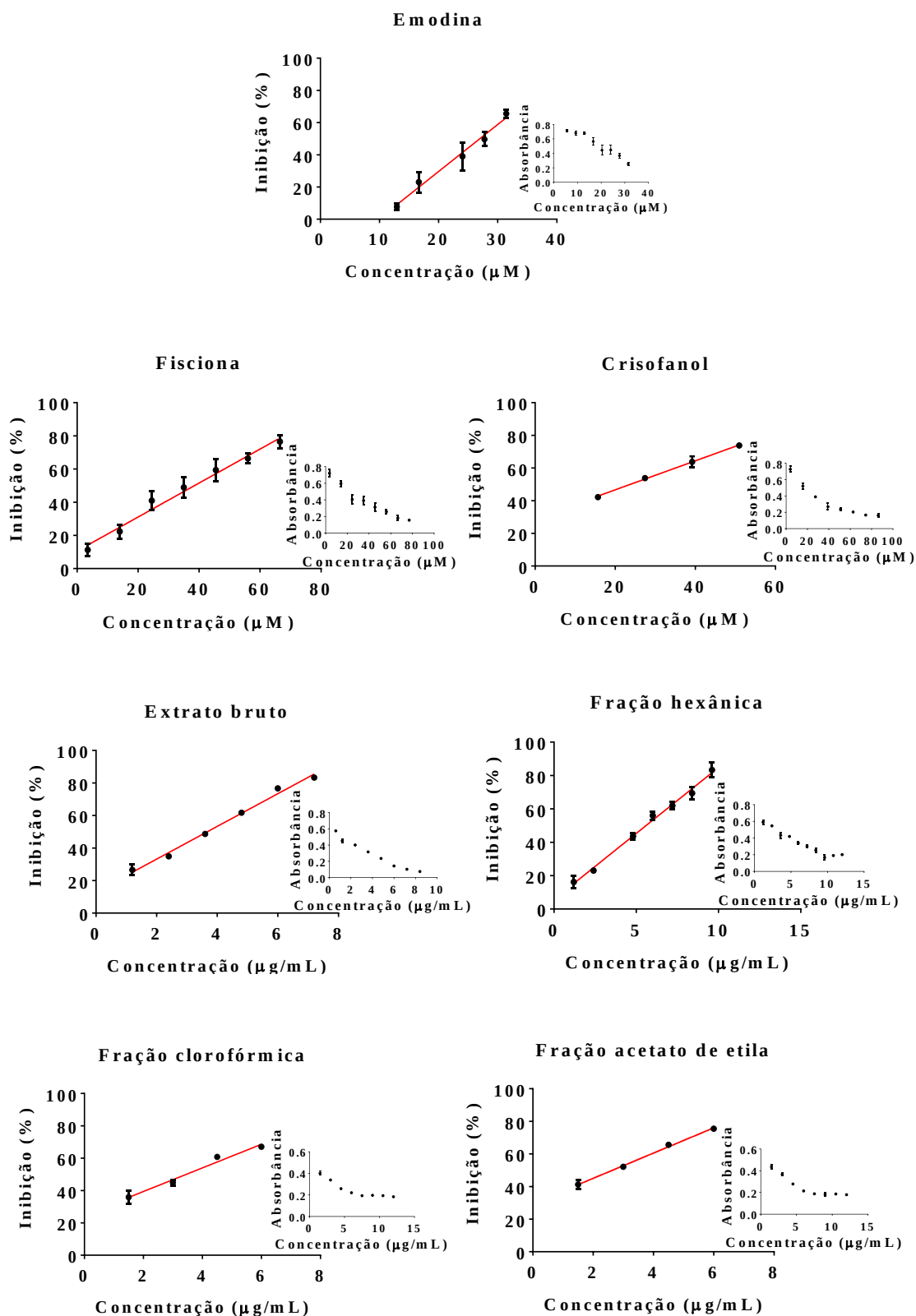
Neste ensaio, os extratos (misturas complexas) demonstraram melhor desempenho em comparação às antraquinonas. A fração acetato de etila apresentou menor CE₅₀ (2,32±0,12μg/mL), e dentre as antraquinonas, não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores de CE₅₀.

Figura 11. Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ dos padrões utilizados.



Legenda: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ dos padrões utilizados: ácido gálico, quercetina, curcumina e trolox, tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; $\lambda = 652$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações dos padrões.

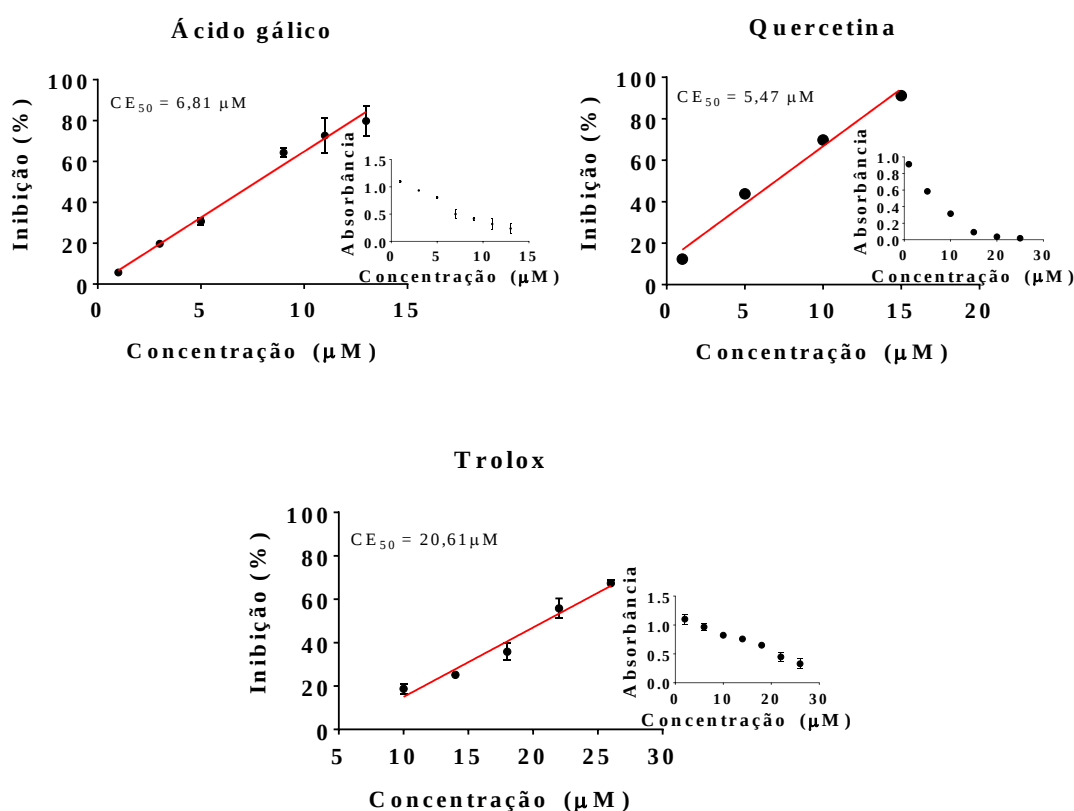
Figura 12. Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ das amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*.



Legenda: Inibição (captura) do HOCl/OCl⁻ das amostras de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*: emodina, crisofanol, fisciona, extrato bruto do caule, fração hexânica do caule, fração clorofórmica do caule e fração acetato de etila do caule, em tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; $\lambda = 652$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações das amostras.

Para a TauCl, os padrões ácido gálico ($1,16 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$) e quercetina ($1,65 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$) apresentaram melhores valores de CE_{50} em comparação com o trolox ($5,15 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$), sendo que curcumina não foi eficaz contra esta espécie. Quando as amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* foram analisadas, nenhuma atividade de captura foi observada até concentrações solúveis (figura 13).

Figura 13. Inibição (captura) da TauCl dos padrões utilizados.



Legenda: Inibição (captura) da TauCl dos padrões utilizados: ácido gálico, trolox e quercetina, tampão fosfato de sódio 50mM, pH 7,4; $\lambda = 652 \text{ nm}$. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias da TauCl na presença de diferentes concentrações dos padrões.

4.2.3. Ensaio de captura para $NO^{\bullet}$

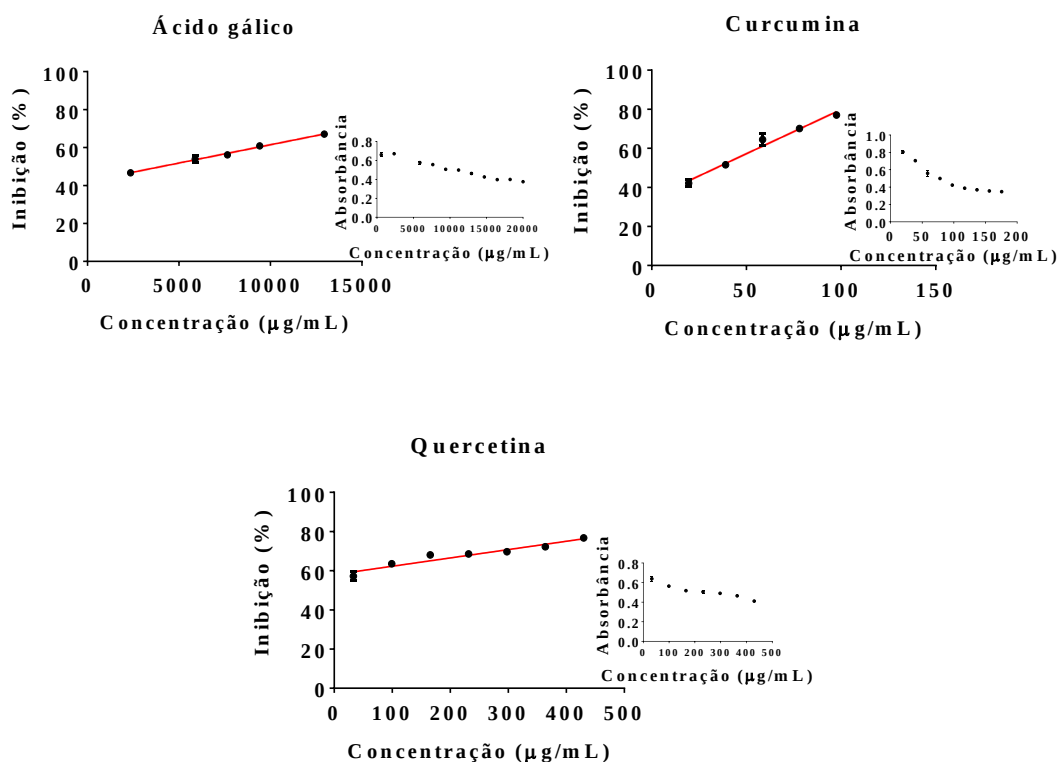
O $NO^{\bullet}$ é um radical livre, gasoso, que atravessa livremente as membranas celulares, e regula várias funções no organismo. Seus efeitos podem ser reguladores ou deletérios, dependendo da sua concentração nos tecidos (VANNINI et al., 2015).

Neste ensaio, quercetina apresentou melhor eficiência, com EC_{50} de $4,41 \pm 1,69 \mu\text{g/mL}$ ($14,59 \pm 5,58 \mu\text{M}$), seguido de curcumina e ácido gálico, o trolox não foi ativo nas

concentrações solúveis no meio reacional. Os resultados estão apresentados nas figuras 14 e 15, e tabela 3.

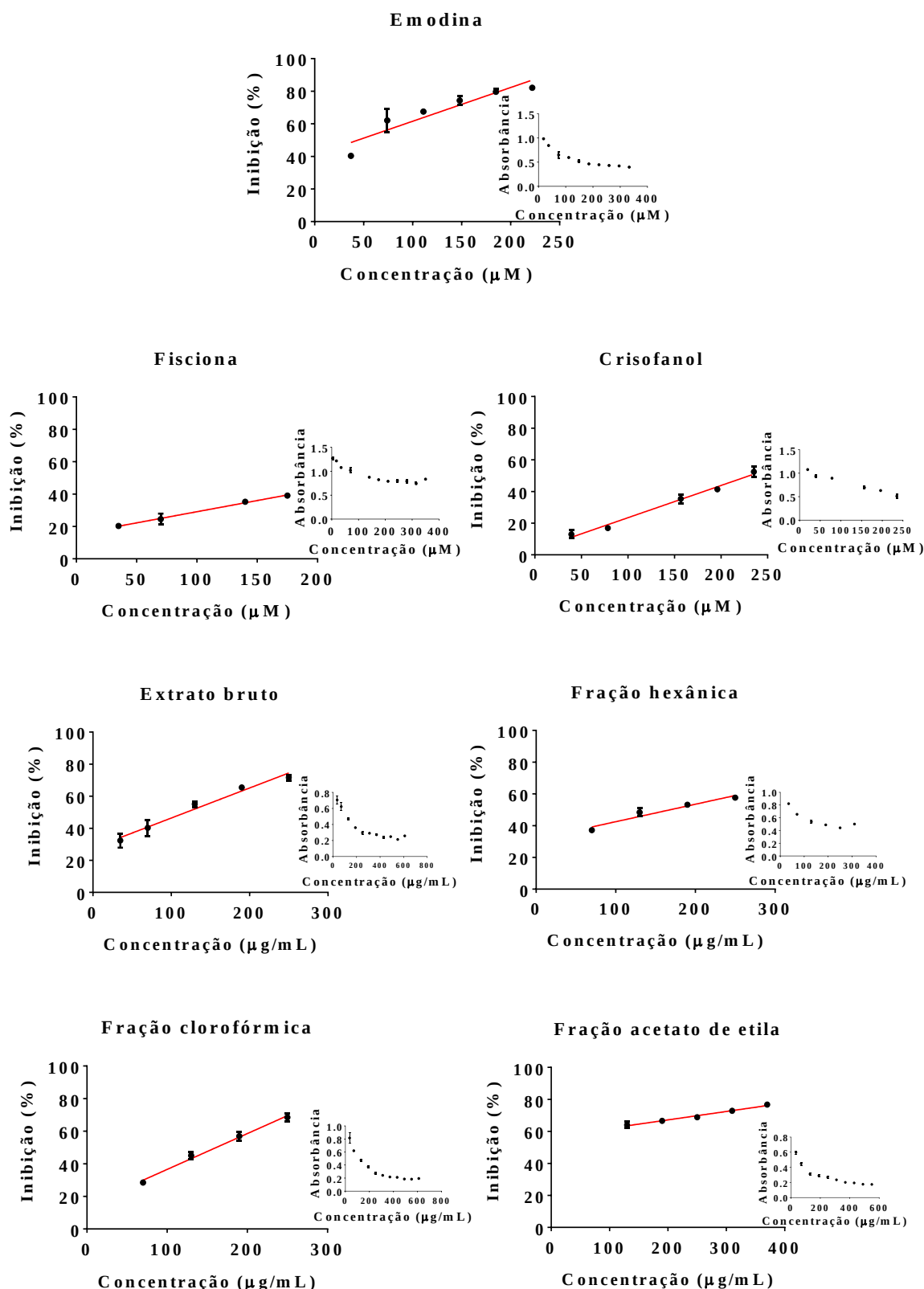
As amostras de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* foram ativas na captura do óxido nítrico, com a antraquinona emodina apresentando melhor atividade ($52,03 \pm 4,28 \mu\text{M}$). Os extratos também foram ativos, sendo a fração acetato de etila com menor valor de CE_{50} ($49,7 \pm 13,79 \mu\text{g/mL}$).

Figura 14. Inibição (captura) para NO^* dos padrões utilizados.



Legenda: Inibição (captura) do NO^* dos padrões utilizados: ácido gálico, trolox e quercetina, tampão fosfato de sódio 20mM, pH 7,4; $\lambda = 652 \text{ nm}$.

Figura 15. Inibição (captura) para NO^{*} das amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*.

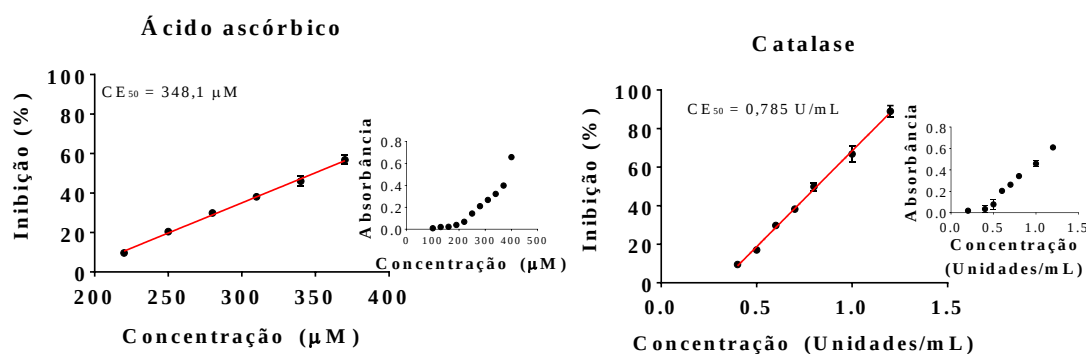


Legenda: Inibição (captura) do NO^{*} das amostras de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*: emodina, crisofanol, fisciona, extrato bruto do caule, fração hexânica do caule, fração clorofórmica do caule e fração acetato de etila do caule, em tampão fosfato de sódio 20mM, pH 7,4; $\lambda = 652$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do HOCl/OCl⁻ na presença de diferentes concentrações das amostras.

4.2.4. Ensaio de captura para H_2O_2

O H_2O_2 é constantemente produzido no metabolismo celular via a dismutação do $O_2^{\cdot-}$, espontânea ou em reação catalisada pela superóxido dismutase (SOD), e é neutralizado pela catalase e/ou peroxidases. É uma espécie não radicalar, altamente reativa, com alta capacidade de perfusão entre os tecidos (CHING et al., 1994). Neste ensaio, nenhum dos padrões testados nos ensaios supracitados foi eficaz, sendo necessária a utilização de padrões como a catalase (CE_{50} : $0,785 \pm 0,01$ U/mL) e o ácido ascórbico (CE_{50} : $348,1 \pm 3,6$ μ M) (figura 16). Nenhuma das amostras vegetais apresentou atividade contra esta espécie reativa.

Figura 16. Inibição (captura) do H_2O_2 dos padrões utilizados.



Legenda: Inibição (captura) do H_2O_2 dos padrões utilizados: catalase e ácido ascórbico, em tampão fosfato de potássio 50mM, pH 7,4; $\lambda = 412$ nm. A figura inserida apresenta a média das absorbâncias do H_2O_2 na presença de diferentes concentrações dos padrões.

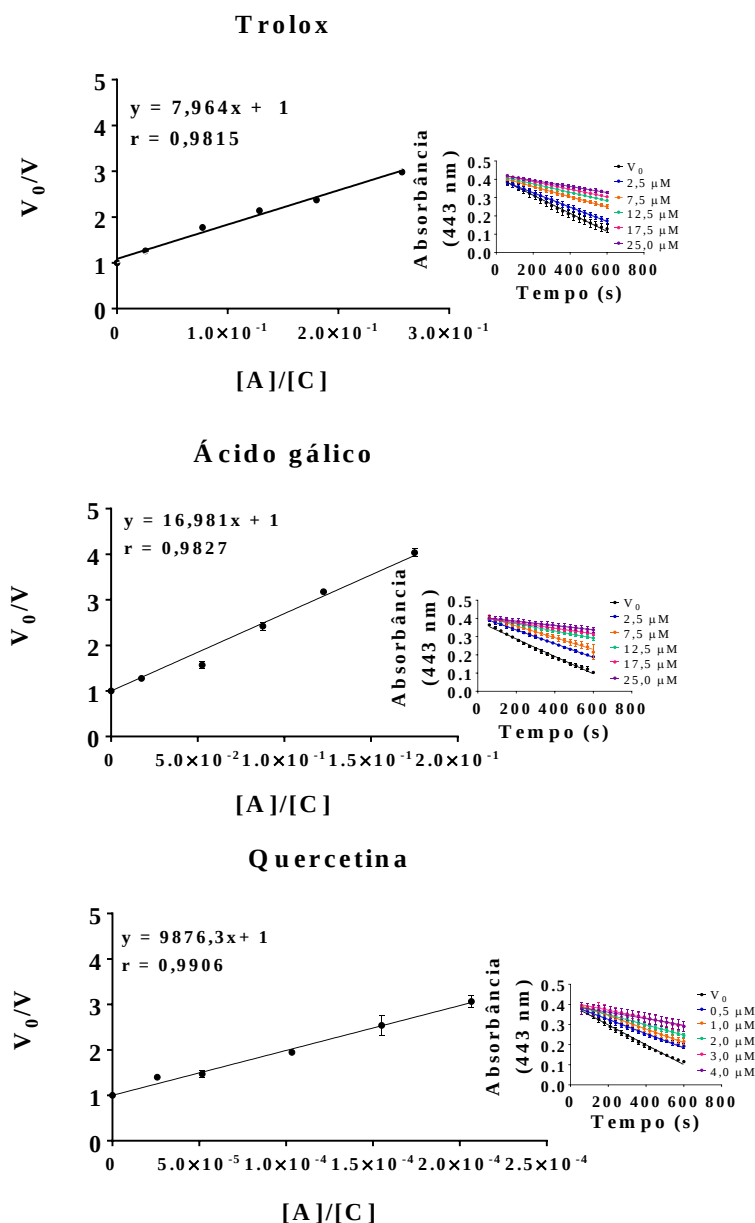
4.2.5. Ensaio de captura para $ROO^{\cdot}$ (clareamento da crocina)

Este método é utilizado para verificar a capacidade das amostras em inibir a peroxidação lipídica induzida pelo radical o $ROO^{\cdot}$, produzido *in vitro* e em velocidade constante, sobre o carotenoide crocina, simulando assim a proteção de estruturas lipídicas *in vivo*.

Os padrões trolox, ácido gálico e quercetina, como esperado, foram eficientes na proteção do clareamento do carotenoide via a lipoperoxidação. Quercetina apresentou melhor atividade do que o trolox (padrão clássico deste ensaio). O padrão curcumina não foi analisado porque apresenta absorção de luz no mesmo comprimento de onda de

monitoramento da crocina. Para a realização deste ensaio, as amostras testadas apresentaram problemas de solubilidade no meio reacional, e portanto não foram avaliadas por este método.

Figura 17. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com os padrões.

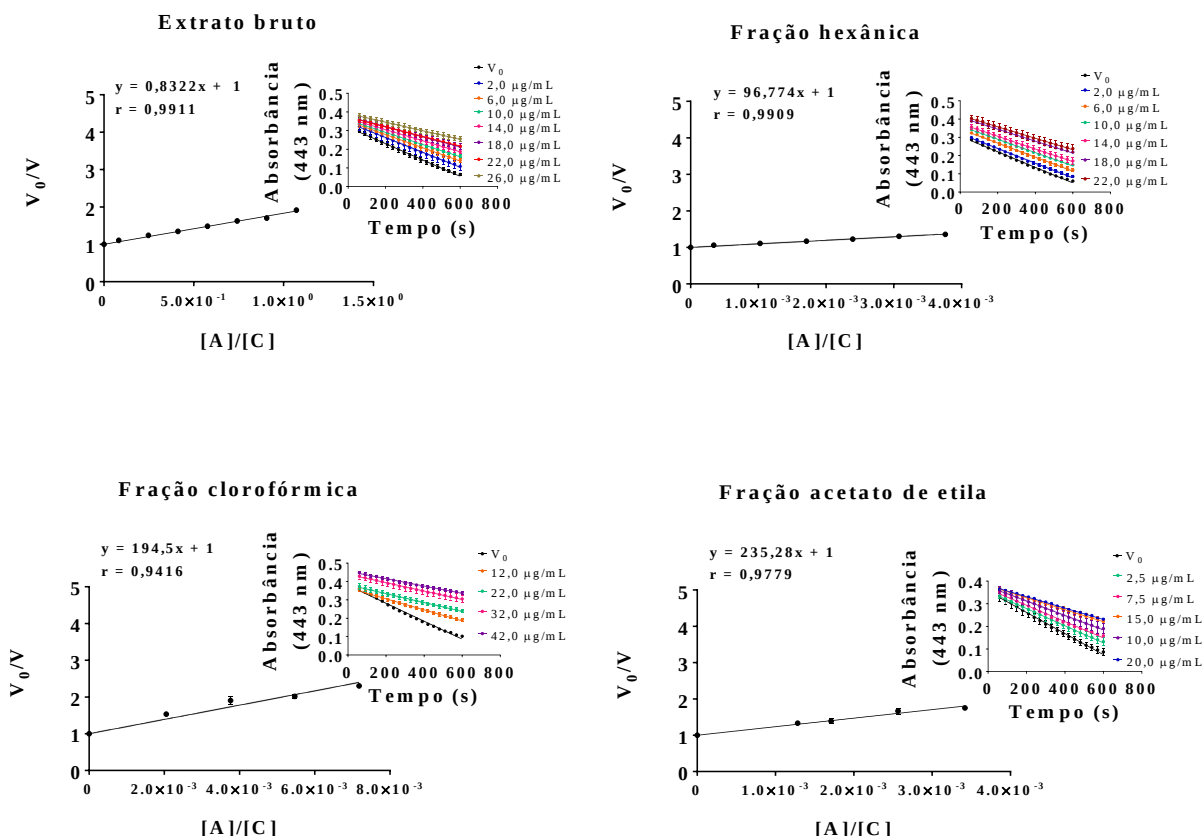


Legenda: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com os padrões: (A) trolox, (B) ácido gálico e (C) quercetina. V_0 , velocidade na ausência de padrão; V , velocidade na presença de padrão; $[C]$, concentração de crocina constante (25 μM) e $[A]$, concentração de padrão (μM). O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (V_0) e presença (V) de padrão em função do tempo.

As antraquinonas são muito pouco solúveis em meio aquoso e não apresentaram atividade de proteção da crocina nas concentrações testadas (apenas até 5 $\mu g/mL$); os extratos

(misturas complexas) demonstraram pouca efetividade, devido também a baixa solubilidade, e portanto restritas para realização do ensaio, e não alcançaram a concentração EC_{50} experimentalmente.

Figura 18. Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com as amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*.



Legenda: Representação entre as razões das velocidades e das concentrações, no ensaio de clareamento da crocina com as amostras de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*: extrato bruto do caule, fração hexânica do caule, fração clorofórmica do caule e fração acetato de etila do caule. V_0 , velocidade na ausência de amostra; V , velocidade na presença de amostra; $[C]$, concentração de crocina constante (5850,0 $\mu\text{g/mL}$) e $[A]$, concentração de amostra ($\mu\text{g/mL}$). O gráfico inserido representa a queda de absorbância, a 443 nm, da crocina, na ausência (V_0) e presença (V) de amostra, em função do tempo.

A tabela 3 apresenta a compilação dos dados da atividade antioxidante apresentados até o momento. A concentração efetiva que promove 50% de inibição (CE_{50}) da captura sobre as espécies reativas analisadas, calculadas por regressão linear, foram avaliadas estatisticamente, para cada ensaio, onde os padrões utilizados e as amostras testadas foram comparados, sendo que quanto menor o valor de CE_{50} , maior a efetividade da amostra ou padrão. Curcumina e quercetina apresentaram menores valores de CE_{50} para todas as espécies

analisadas, com exceção do H_2O_2 . Ácido gálico apresentou menor eficiência apenas no ensaio de captura do $\text{NO}^\bullet$, enquanto trolox apresentou maior EC_{50} na captura do HOCl/OCl^- , TauCl e $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Tabela 3. Capacidade de captura para $\text{O}_2^{\bullet-}$, HOCl/OCl^- e $\text{NO}^\bullet$.

	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	$\text{O}_2^{\bullet-}$	HOCl/OCl^-	$\text{NO}^\bullet$
Curcumina	$59,45 \pm 5,85$ b	$0,5336 \pm 0,081$ b	$15,69 \pm 1,03$ b
Ácido gálico	$18,81 \pm 0,46$ c	$0,2843 \pm 0,02$ b	$604,5 \pm 52,52$ a
Quercetina	$13,48 \pm 0,23$ c	$0,2594 \pm 0,04$ b	$4,411 \pm 1,69$ c
Trolox	$436,6 \pm 9,39$ a	$4,578 \pm 0,14$ a	-
EERs	$100,5 \pm 0,68$ d	$3,195 \pm 0,09$ c	$95,43 \pm 8,73$ d
HFRs	$409,5 \pm 26,36$ a	$4,99 \pm 0,15$ a	$152,5 \pm 4,11$ e
CFRs	$348,7 \pm 12,02$ e	$3,028 \pm 0,25$ c	$148,2 \pm 10,34$ e
EAFRs	$144,7 \pm 10,67$ d	$2,323 \pm 0,12$ d	$49,7 \pm 13,79$ f

	CE_{50} (μM)		
	$\text{O}_2^{\bullet-}$	HOCl/OCl^-	$\text{NO}^\bullet$
Curcumina	$112,9 \pm 11,14$ b	$1,014 \pm 0,15$ b	$30,62 \pm 2,01$ b
Ácido gálico	$110,6 \pm 2,72$ b	$1,672 \pm 0,10$ b	3556 ± 309 a
Quercetina	$44,61 \pm 0,75$ c	$0,8583 \pm 0,14$ b	$14,59 \pm 5,58$ b
Trolox	$1813 \pm 52,81$ a	$17,82 \pm 0,55$ a	-
Emodina	$140,8 \pm 1,44$ d	$26,56 \pm 0,74$ c	$52,03 \pm 4,28$ c
Fisciona	-	$33,1 \pm 4,06$ c	$377 \pm 16,71$ d
Crisofanol	-	$23,56 \pm 1,12$ c	$243 \pm 18,3$ e

Legenda: Avaliação da atividade antioxidante das antraquinonas crisofanol, emodina e fisciona sobre as espécies reativas $\text{O}_2^{\bullet-}$, HOCl/OCl^- e $\text{NO}^\bullet$. Resultados estão expressos como média do $\text{CE}_{50} \pm$ erro padrão ($\text{M} \pm \text{EP}$) (μM), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (Letras diferentes representam diferença estatística).

Dentre os extratos e frações de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*, a fração acetato de etila (EAFRs) foi mais eficiente sobre a espécie sobre as espécies HOCl/OCl^- e $\text{NO}^\bullet$, o extrato bruto (EERs) apresentou igualdade estatística com esta fração para $\text{O}_2^{\bullet-}$ e $\text{ROO}^\bullet$ (clareamento da crocina), sendo estas duas amostras, as mais efetivas de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*.

Na comparação entre as antraquinonas, emodina mostrou melhor efeito de captura sobre $O_2^{\cdot-}$ (fisciona e crisofanol não foram ativos para esta espécie) e $NO^{\cdot}$. No ensaio de captura sobre $HOCl/OCl^-$ não houve diferença estatisticamente significativa entre as antraquinonas. A fisciona apresentou pior desempenho de captura nestes ensaios.

A comparação da eficiência antioxidante das antraquinonas crisofanol, emodina e fisciona nos ensaios de análise da atividade antioxidante permite observar a relação entre estrutura/atividade, uma vez que poucas diferenças estruturais são observadas nestes compostos (fisciona apresenta um grupo metoxila e emodina um grupo hidroxila, a mais que crisofanol). Sendo assim, o grupo metoxila presente na fisciona, piora a efetividade de captura sobre todas as espécies reativas testadas para estas amostras, enquanto, o grupo hidroxila da emodina, promove a melhora da atividade antioxidante sobre todas as espécies avaliadas.

Nos compostos fenólicos, a presença de hidroxilas nas posições orto ou para do anel aromático, estão descritas aumentando a atividade antioxidante em relação a compostos com hidroxila na posição meta. O grupo metoxila, doador de elétrons, também na posição orto, pode aumentar a estabilidade de intermediários de reação, promovendo o aumento na eficiência de captura de espécies reativas, em relação a compostos com este grupo na posição meta. Desta maneira, a presença de um grupo doador de elétrons (metoxila), em comparação com um retirador de elétrons (hidroxila), na posição meta, piora a eficiência de captura sobre as espécies reativas estudadas (SCOTTI, et al., 2007).

4.3. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO E TIPOS DE MORTE CELULAR

4.3.1. *Determinação da citotoxicidade: Ensaio de sulforrodamina B (SRB)*

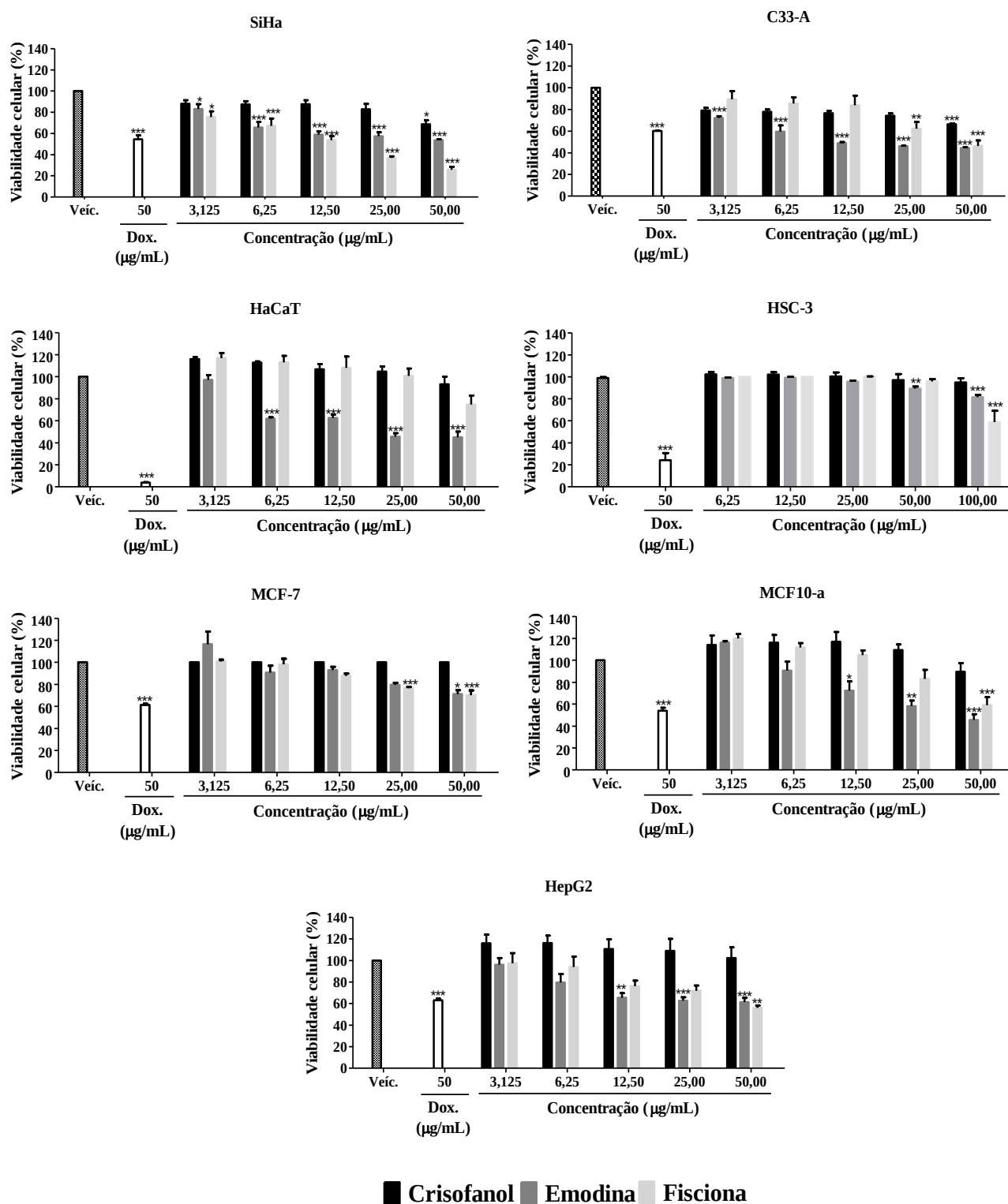
A capacidade citotóxica foi determinada para as amostras Crisofanol, Fisciona e Emodina, isoladas e identificadas a partir de extratos do caule de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, utilizando o ensaio de sulforrodamina B. O ensaio de citotoxicidade foi realizado em diversas linhagens (tabela 1), para verificar a eficiência e seletividade das amostras. Os resultados estão apresentados na figura 19 e tabela 4.

Os valores das concentrações que promoveram 50% de inibição da viabilidade celular (CI_{50}) foram calculados, por regressão linear, a partir dos dados obtidos em todos os experimentos independentes. Quando a indução de citotoxicidade foi baixa, não foi possível a realização destes cálculos, isso ocorreu para algumas amostras, como crisofanol em todas as

linhagens e emodina na linhagem HSC-3. Os valores de CI_{50} maiores que a maior concentração testada (50 $\mu\text{g/mL}$) foram interpolados, uma vez que até esta concentração não foi alcançado 50% de inibição.

As antraquinonas emodina e fisciona foram citotóxicas para todas as linhagens usadas, com maior eficiência sobre as células provenientes de tumores de colo uterino, (SiHa e C33-A). Foi observada ainda uma possível seletividade da emodina sobre a linhagem C33-A, em comparação com fisciona; enquanto fisciona foi mais citotóxica para SiHa. A emodina, por este método apresentou citotoxicidade sobre as linhagens imortalizadas de origem não tumoral (HaCaT e MCF10-a), mais expressiva que fisciona. Crisofanol não apresentou toxicidade em nenhuma linhagem avaliada. Nenhuma das amostras testadas exerceu toxicidade expressiva sobre as linhagens HSC-3, HEPG2 e MCF-7. A linhagem HSC-3 foi a linhagem mais resistente neste ensaio, sendo as antraquinonas fisciona e emodina citotóxicas apenas nas maiores concentrações.

Doxorrubicina (50 $\mu\text{g/mL}$), usada como controle positivo do ensaio, apresentou morte celular, analisada por este método. Este composto apresentou mais efetividade sobre a linhagem normal HaCaT e a tumoral HSC-3, em relação as demais linhagens, para as quais apresentou viabilidade de aproximadamente 60%.

Figura 19. Ensaio de citotoxicidade por sulforrodamina B para as antraquinonas.

Legenda: Ensaio de sulforrodamina B em SiHa, C33-A, HaCaT, HSC-3, MCF-7, MCF10-a e HepG2, após tratamento por 24h com: crisofanol, emodina e fisciona. Doxorubicina (50µg/mL) e DMSO (0,5%) foram usados como controles, positivo e veículo, respectivamente. Resultados estão expressos como média da viabilidade celular de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (Diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle de veículo (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)).

As amostras de antraquinonas neste estudo possuem grande semelhança estrutural, contudo, apresentaram dados relevantes com relação a citotoxicidade e seletividade. Para prosseguir com a avaliação do perfil de morte celular, foram selecionadas as antraquinonas com expressivo efeito citotóxico (emodina e fisciona) e as linhagens celulares SiHa, C33-A, HSC-3 e HaCaT.

Tabela 4. Comparação do CI_{50} das antraquinonas entre todas as linhagens celulares analisadas.

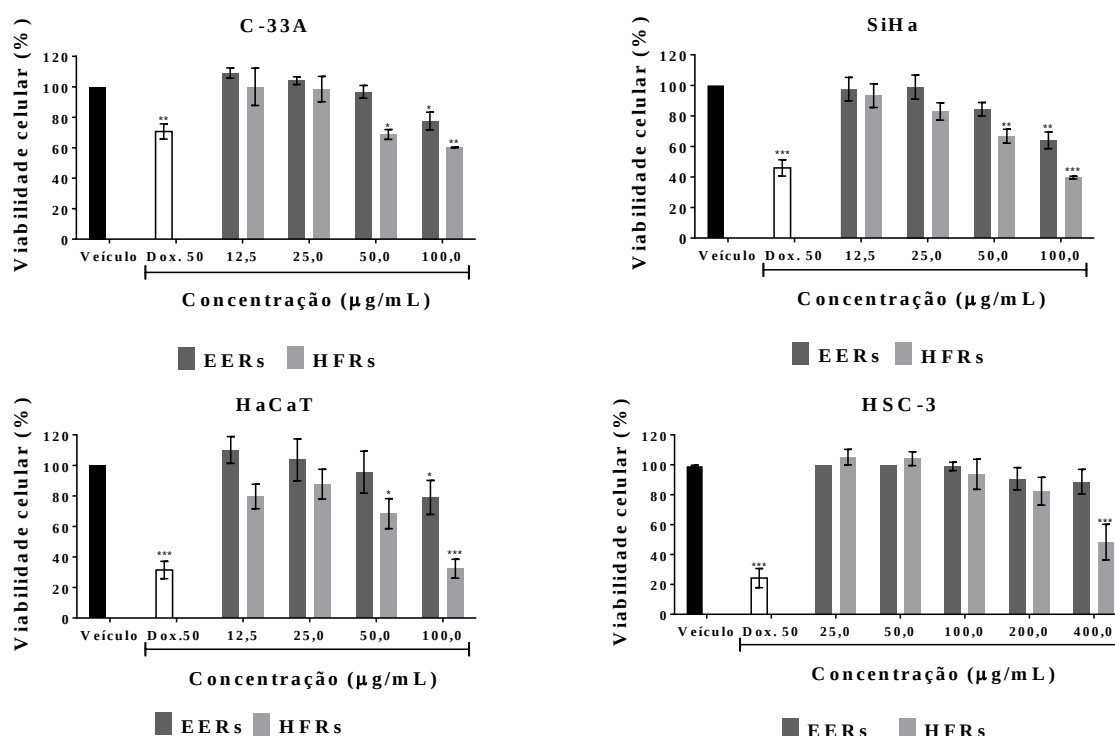
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)						
	C33-A	SiHa	HSC-3	HaCaT	MCF-7	MCF10-a	HepG2
Crisofanol	-	-	-	-	-	-	-
Emodina	18,9	52,2	-	25,9	89,2	36,7	62,5
Fisciona	44,5	13,9	96,9	52,5	100,0	56,7	75,7
EERs	141,1	135,4	-	152,8	- -	- -	- -
HFRs	120,0	76,7	387,7	70,5	- -	- -	- -

Legenda: Valores de CI_{50} calculados para as antraquinonas analisadas, a partir dos dados obtidos no ensaio de SRB após três ensaios independentes (- = não calculado/ - - = não avaliado).

O extrato etanólico bruto do caule (EERs) e sua fração hexânica (HFRs) também foram avaliados no ensaio de citotoxicidade (figura 20) para prospectar estas amostras como misturas complexas e capazes de promover morte em relação as antraquinonas citotóxicas, com as mesmas linhagens celulares.

A fração hexânica apresentou citotoxicidade sobre todas as linhagens celulares testadas, inclusive a de origem normal (HaCaT), e dentro das linhagens tumorais, SiHa foi a mais sensível a esta fração, em relação ao extrato bruto. O extrato bruto do caule demonstrou ser menos efetivo na indução de citotoxicidade, e conseqüentemente não promoveu morte celular significativa na linhagem normal, por este método. Da mesma maneira que no ensaio com as antraquinonas, a linhagem HSC-3 também apresentou maior resistência aos tratamentos com as amostras vegetais, mesmo após o aumento das concentrações testadas, sendo observada ligeira citototoxicidade para a fração hexânica a 400 $\mu\text{g/mL}$. Estas amostras também foram avaliadas nos demais experimentos para verificar o tipo de morte celular induzido.

Figura 20. Ensaio de citotoxicidade por sulforrodamina B para o extrato etanólico e fração hexânica do caule de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*.



Legenda: Ensaio de sulforrodamina B em SiHa, C33-A, HaCaT e HSC-3, após tratamento por 24h com: extrato etanólico (EERs) e sua fração hexânica (HFRs). Doxorubicina (50µg/mL) e DMSO (0,5%) foram usados como controles, positivo e veículo, respectivamente. Resultados estão expressos como média da viabilidade celular de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (Diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle de veículo (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$)).

4.3.2. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão com fluorocromos: Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína

Para este ensaio emodina foi testada nas concentrações de 46,3 a 185,0 µM (12,5 a 50,0 µg/mL) e fisciona nas concentrações de 43,8 a 175,0 µM (12,5 a 50,0 µg/mL); o extrato bruto (EERs) e a sua fração hexânica (HFRs) nas concentrações de 25,0 a 100,0 µg/mL. Para as linhagens SiHa e C33-A o tempo de tratamento foi de 24h, e para as linhagens HSC-3 e HaCaT, de 12h, devido à alta porcentagem de morte em 24h no controle negativo. Os resultados estão demonstrados nas figuras 21 a 24 e na tabela 1 presente no anexo I.

Para SiHa, a viabilidade celular no controle de veículo (DMSO 0,5% - v/v) foi de $88,9 \pm 0,9\%$. As células desta linhagem tratadas com doxorubicina (90 µM) apresentaram

predomínio de morte por necrose, e as tratadas com curcumina (100 μ M), morte por apoptose tardia e necrose.

O tratamento desta linhagem com 25 μ g/mL de EERs promoveu morte por necrose ($15,2 \pm 1,9\%$) e apoptose ($20,2\%$). Com o aumento da concentração (50 μ g/mL), a quantidade de células em apoptose permaneceu a mesma, enquanto o número de células em necrose aumentou ($52,8 \pm 2,4\%$). Após o tratamento com 100 μ g/mL, maior concentração avaliada, o número de células em apoptose aumentou ($58,1\%$) (Figura 21).

Quando as células foram tratadas com HFRs (25 μ g/mL), $8,6\%$ de células estavam em apoptose e $23,3 \pm 3,2\%$ em necrose. O aumento da concentração para 50 μ g/mL não promoveu alterações significativas na viabilidade e morte celular. Entretanto, as células tratadas com 100 μ g/mL apresentaram características morfológicas de apoptose tardia ($52,1 \pm 1,8\%$) e necrose ($40,6 \pm 1,7\%$) (Figura 21).

Emodina, frente a linhagem SiHa, apresentou maior eficácia na concentração de 185,0 μ M, com morte celular mista, $37,4\%$ de células apoptóticas e $31,2 \pm 1,2\%$ de células necróticas. Esse perfil foi semelhante para a concentração de 92,5 μ M, enquanto a menor concentração (46,3 μ M) foi pouco eficiente (Figura 21). Fisciona não foi tóxica na menor concentração (43,8 μ M) para linhagem SiHa (não houve diferença estatística em relação ao controle de veículo), por este método. Quando utilizada a 175 μ M, apresentou células em necrose ($23,9 \pm 1,2\%$) e em apoptose ($23,1\%$), ou seja, morte celular mista. Na concentração intermediária, foi observado $13,6 \pm 1,2\%$ de células necróticas (Figura 21).

Portanto, todas as amostras testadas apresentaram perfil de morte celular misto para a linhagem SiHa, com a presença de células que foram classificadas morfolologicamente em apoptose (precoce ou tardia) e necrose (Figura 21). Sendo a fração hexânica mais efetiva que o extrato; e emodina mais efetiva que fisciona.

Para C33-A, a viabilidade celular no controle de veículo (DMSO 0,5% - v/v) foi de $88,8 \pm 1,7\%$. As células desta linhagem tratadas com doxorrubicina (90 μ M) e curcumina (100 μ M) apresentaram predomínio de morte por necrose.

Na linhagem C33-A, emodina também foi mais eficiente que fisciona. Para ambas antraquinonas, as células mortas apresentaram características morfológicas predominante de necrose (figura 22).

Nesta linhagem, o EERs a 25 μ g/mL apresentou células mortas predominantemente por apoptose ($51,9 \pm 2,72\%$). Na concentração de 50 μ g/mL ocorreu morte mista, enquanto em 100 μ g/mL, predominou a presença de células necróticas (figura 22).

Quando HFRs foi utilizada na linhagem C33-A, o tipo de morte predominante foi necrose, em todas as concentrações testadas, com aumento significativo de acordo com o aumento da concentração, enquanto a quantidade de células apoptóticas permaneceu constante apesar da variação da concentração (figura 22).

Neste ensaio, EERs e FHRs apresentaram maior efetividade na linhagem C33-A, em comparação com SiHa, onde promoveram morte mista. De maneira geral, todas as amostras induziram morte predominante por necrose em C33-A.

As células da linhagem HSC-3, tratadas com doxorrubicina, por 12 horas, apresentaram morfologia mista, células necróticas e em apoptose. O controle tratado com curcumina mostrou predominância de morte por apoptose. A viabilidade celular no controle de veículo (DMSO 0,5% - v/v) foi de $78,7 \pm 1,9\%$ (figura 23).

Frente a esta linhagem celular, EERs demonstrou efeito de morte celular proporcional a concentração, e o tipo de morte celular predominante foi apoptose precoce em todas as concentrações. Quando as células foram tratadas com HFRs, apenas as concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ induziram morte celular estatisticamente significativa com relação ao controle de veículo. Para esta amostra, o tipo de morte celular predominante foi apoptose precoce (figura 23).

Emodina e fisciona exerceram citotoxicidade estatisticamente significativa apenas na maior concentração testada (185 e 175 μM , respectivamente), com apoptose tardia e necrose para emodina; e apoptose precoce para fisciona (figura 23).

Nesta linhagem, houve diferença para os tratamentos com as diferentes amostras analisadas. O EERs foi mais efetivo que sua fração (HFRs), com morte mista. As antraquinonas foram menos eficientes que EERs e HFRs, emodina foi mais efetiva que fisciona, sendo que ambas induziram morte mista (figura 23).

Para a linhagem HaCaT, após 12 horas de tratamento, a viabilidade do controle de veículo foi de $78,3 \pm 1,6\%$. O tratamento com doxorrubicina induziu necrose e o tratamento com curcumina induziu apoptose (figura 24).

O EERs induziu morte por necrose na menor concentração, enquanto nas maiores concentrações houve indução de morte mista, com células apoptóticas e necróticas. A HFRs não foi citotóxica na menor concentração, e nas demais testadas também promoveu morte por necrose (figura 24).

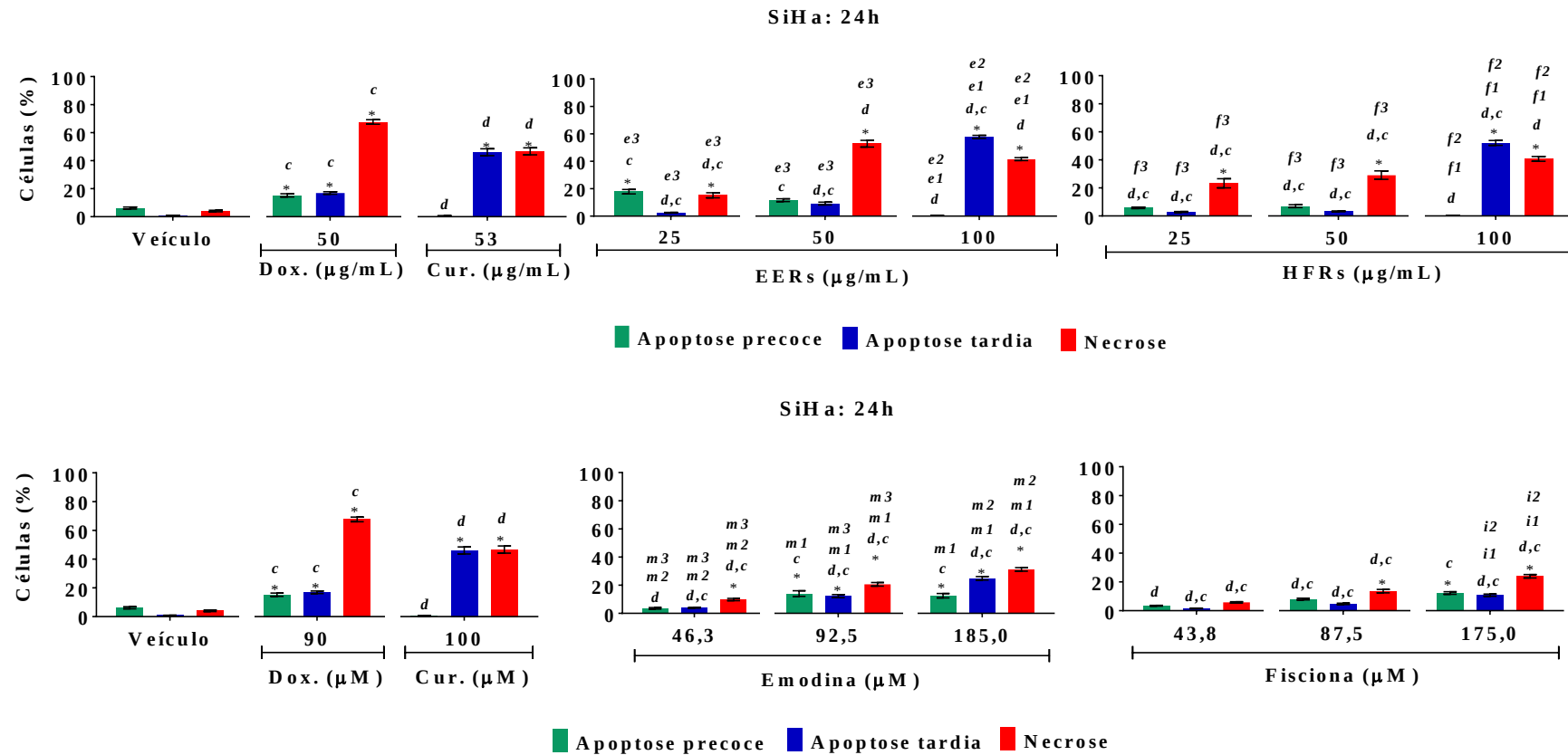
Emodina apresentou maior citotoxicidade nesta linhagem em comparação com fisciona, e morte celular mista com 37% de células apoptótica e $25,1 \pm 1,9$ de necróticas; enquanto fisciona não apresentou citotoxicidade na menor concentração, e as maiores não

foram diferentes entre si, após análise estatística, com morte por apoptose tardia de necrose (figura 24).

Por este método, EERs e emodina foram mais efetivos na linhagem SiHa, em comparação com HFRs e fisciona. Na linhagem C33-A, as antraquinonas foram menos efetivas que os extratos complexos.

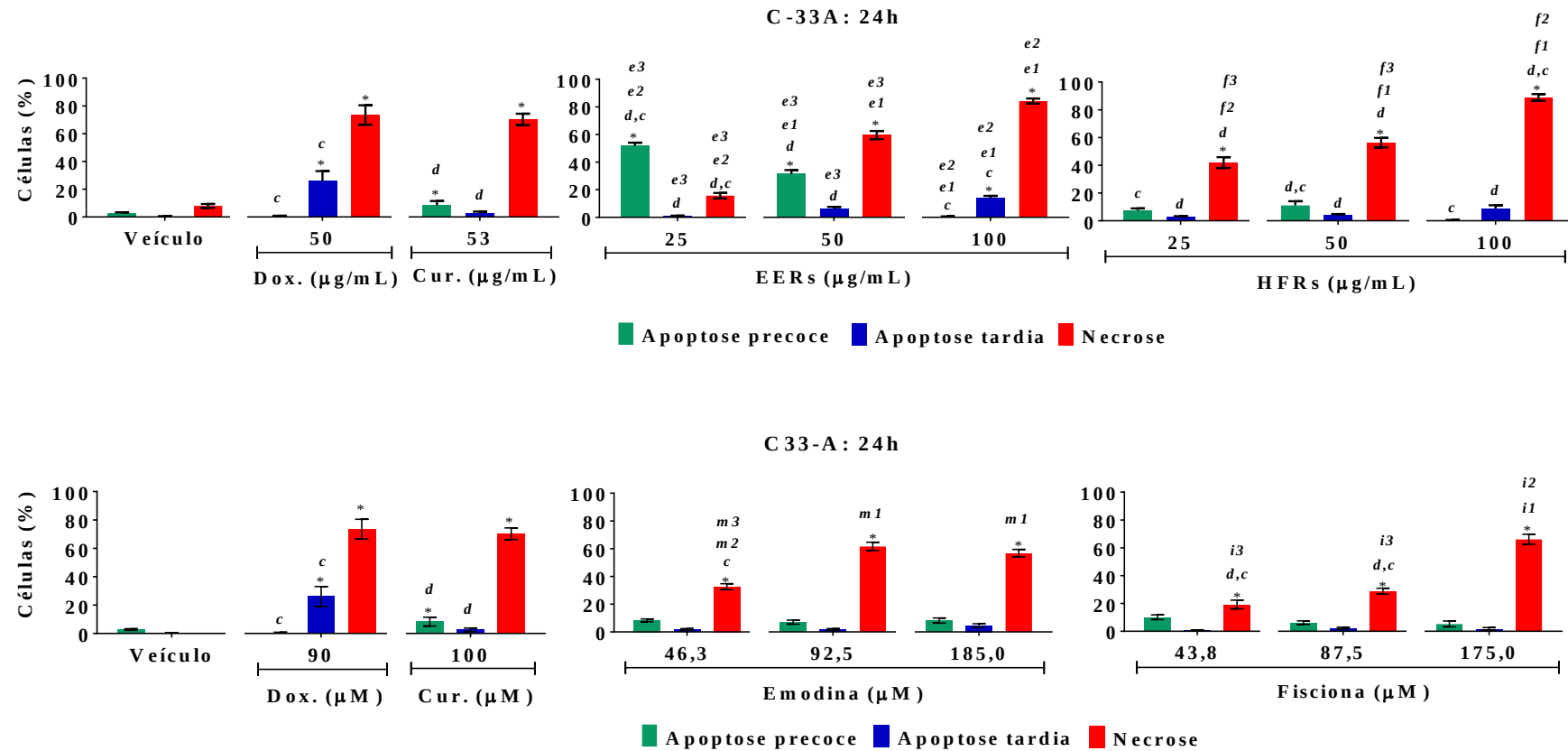
Todas as amostras, de maneira geral, foram menos efetivas na linhagem HSC-3 (como observado no ensaio de SRB), entretanto, por este método, EERs foi mais efetivo após 12h de tratamento. Para a linhagem normal HaCaT, a amostra menos efetiva foi fisciona, com morte por apoptose. E a mais efetiva foi o EERs, com ausência de viabilidade na maior concentração testada, em apenas 12 h de tratamento.

Figura 21. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão de fluorocromos em SiHa.



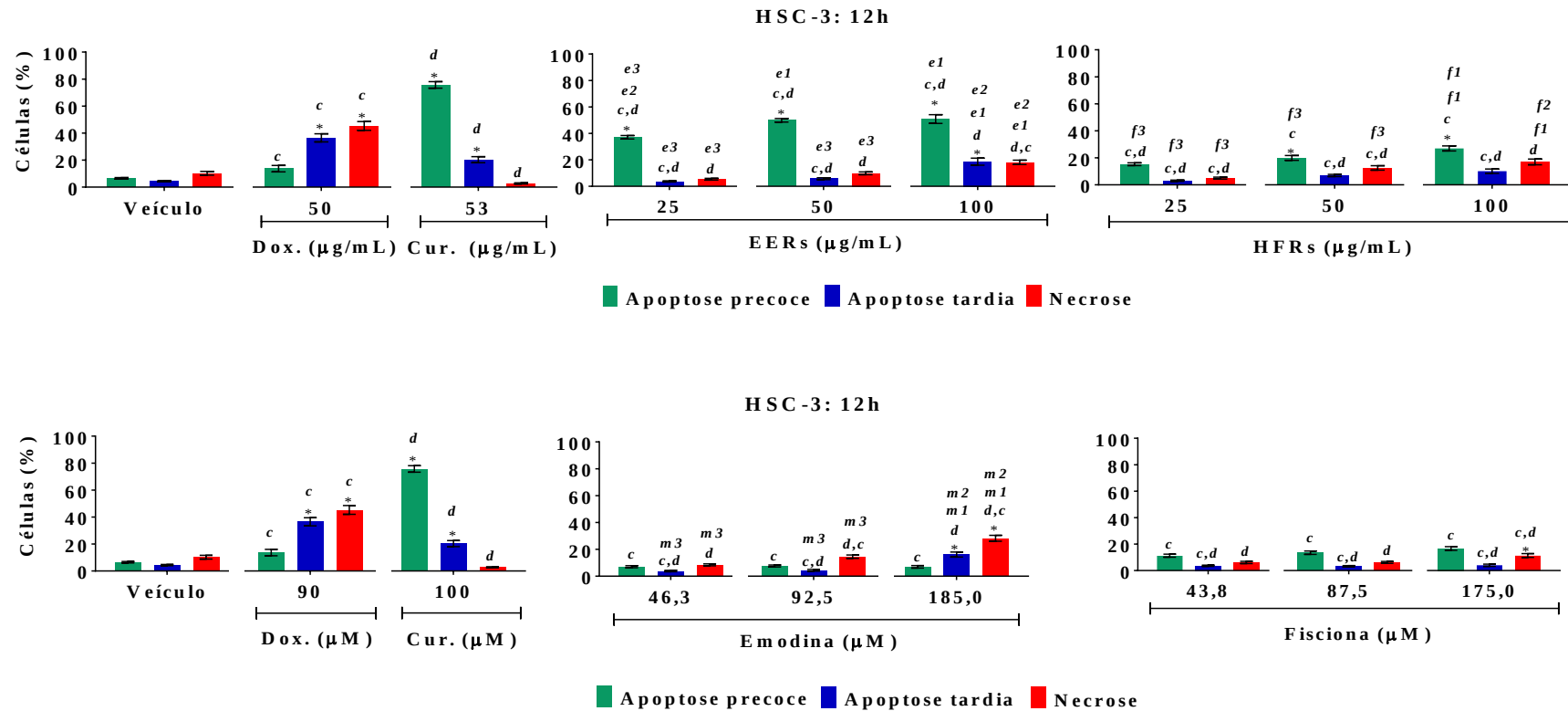
Legenda: Comparação com diferença estatística significativa entre os **tratamentos**: Veículo (*), doxorubicina (**d**), curcumina (**c**), EERs 25μg/mL (**e1**), EERs - 50μg/mL (**e2**), EERs - 100μg/mL (**e3**), HRRs - 25μg/mL (**f1**), HRRs - 50μg/mL (**f2**), HRRs - 100μg/mL (**f3**), emodina 46,3μM (**m1**), emodina - 92,8μM (**m2**), emodina - 185,0μM (**m3**), fisciona - 43,8μM (**i1**), fisciona - 87,5μM (**i2**), fisciona - 175,0μM (**i3**) e os **status celulares**: células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes ± erro padrão (M±EP), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

Figura 22. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão de fluorocromos em C33-A.



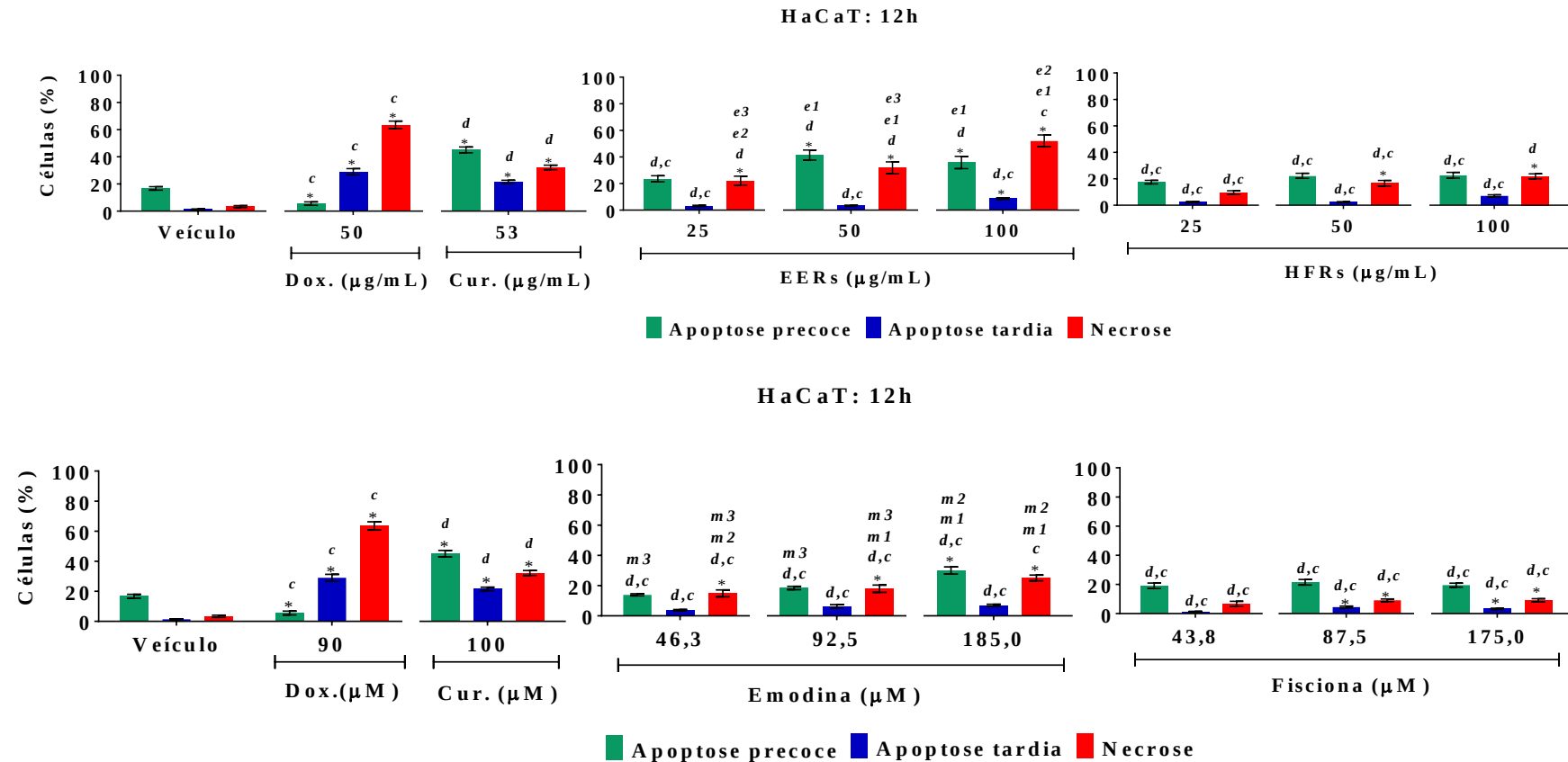
Legenda: Comparação com diferença estatística significativa entre os **tratamentos**: Veículo (*), doxorubicina (*d*), curcumina (*c*), EERs 25µg/mL (*e1*^o), EERs - 50µg/mL (*e2*), EERs - 100µg/mL (*e3*), HRRs - 25µg/mL (*f1*), HRRs - 50µg/mL (*f2*), HRRs - 100µg/mL (*f3*), emodina 46,3µM (*m1*), emodina - 92,8µM (*m2*), emodina - 185,0µM (*m3*), fisciona - 43,8µM (*i1*), fisciona - 87,5µM (*i2*), fisciona - 175,0µM (*i3*) e os **status celulares**: células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes ± erro padrão (M±EP), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

Figura 23. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão de fluorocromos em HSC-3.



Legenda: Comparação com diferença estatística significativa entre os **tratamentos**: Veículo (*), doxorubicina (d), curcumina (c), EERs 25µg/mL (e1*), EERs - 50µg/mL (e2), EERs - 100µg/mL (e3), HRRs - 25µg/mL (f1), HRRs - 50µg/mL (f2), HRRs - 100µg/mL (f3), emodina 46,3µM (m1), emodina - 92,8µM (m2), emodina - 185,0µM (m3), fisciona - 43,8µM (i1), fisciona - 87,5µM (i2), fisciona - 175,0µM (i3) e os **status celulares**: células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes ± erro padrão (M±EP), analisados por one-way ANOVA com pós-teste de Tukey, p≤0,05.

Figura 24. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão de fluorocromos em HaCaT.



Legenda: Comparação com diferença estatística significativa entre os **tratamentos**: Veículo (*), doxorubicina (*d*), curcumina (*c*), EERs 25µg/mL (*e1*^o), EERs - 50µg/mL (*e2*), EERs - 100µg/mL (*e3*), HRRs - 25µg/mL (*f1*), HRRs - 50µg/mL (*f2*), HRRs - 100µg/mL (*f3*), emodina 46,3µM (*m1*), emodina - 92,8µM (*m2*), emodina - 185,0µM (*m3*), fisciona - 43,8µM (*i1*), fisciona - 87,5µM (*i2*), fisciona - 175,0µM (*i3*) e os **status celulares**: células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes ± erro padrão (M±EP), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

4.3.3. Ensaio *Ensaio de morte celular por anexina-V*

Emodina foi testada nas concentrações de 46,3 a 185,0 μM (12,5 a 50,0 $\mu\text{g/mL}$) e fisciona nas concentrações de 43,8 a 175,0 μM (12,5 a 50,0 $\mu\text{g/mL}$); o extrato bruto (EERs) e a sua fração hexânica (HFRs) foram avaliados nas concentrações de 25,0 a 100,0 $\mu\text{g/mL}$. Para as linhagens SiHa e C33-A o tempo de tratamento foi de 24h, e para as linhagens HSC-3 e HaCaT, de 12h, devido à alta porcentagem de morte em 24h encontrada no controle negativo. Os resultados estão demonstrados nas figuras 25 a 28 e na tabela 2 presente no anexo I.

Após 24h de tratamento da linhagem SiHa, $98,9 \pm 0,7\%$ das células tratadas com curcumina (100 μM) eram apoptóticas. Por outro lado, $76,4 \pm 2,0\%$ das células tratadas com doxorrubicina estavam em necrose. A viabilidade celular para o controle de veículo (DMSO 0,5% - v/v) foi $87,2 \pm 1,5\%$.

O EERs foi mais citotóxico que sua fração, e a morte celular da maioria as células ocorreu por necrose em todas as concentrações, entretanto, cerca de 30% das células estavam em apoptose tardia nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, nas quais, não houve percentual de células viáveis para EERs. A FHRs também apresentou elevada citotoxicidade, e quando as células foram tratadas com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$, a morte celular observada foi mista, com células em apoptose tardia e necrose (figura 25).

Emodina apresentou melhor efetividade na indução de morte celular por este método em comparação com fisciona. As células SiHa tratadas com emodina a 46,3 μM e 92,5 μM morreram por necrose, enquanto as células tratadas na maior concentração (185 μM) estavam em apoptose tardia e necrose. Embora, menos eficiente, fisciona induziu morte mista em todas as concentrações testadas, com células em apoptose tardia e necrose (figura 25).

Na linhagem C33-A, após 24h de tratamento com doxorrubicina (90 μM) $72,5 \pm 2,2\%$ das células eram necróticas, e após o tratamento com curcumina (100 μM) $93,4 \pm 3,0\%$ das células eram apoptóticas. A viabilidade celular para o controle de veículo (DMSO 0,5% - v/v) foi $73,0 \pm 1,7\%$.

Após o tratamento com EERs e FHRs, todas as células desta linhagem estavam mortas, em todas as concentrações testadas. E a morte celular ocorreu de maneira mista, com células em apoptose tardia e necrose, com exceção das células tratadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ de FHRs, que morreram por apoptose tardia (figura 26).

Emodina, embora eficaz na indução da morte celular, não apresentou diferença significativa na viabilidade celular (aproximadamente 20% de células vivas) entre as três concentrações avaliadas, ou seja, a menor concentração já apresentou máxima capacidade

citotóxica, e a morte ocorreu de maneira mista, com apoptose tardia e necrose em todas as concentrações. Fisciona também apresentou citotoxicidade, com morte celular por apoptose em todas as concentrações (figura 26).

Para a análise dos resultados de morte celular das linhagens HSC-3 e HaCaT o tempo de tratamento considerado foi de 12h, uma vez que os controles de veículo destas linhagens apresentaram cerca de 50% de viabilidade celular quando tratados por 24 h (dados não apresentados).

Em 12h de tratamento, as células do grupo controle de veículo (DMSO 0,5% - v/v) na linhagem HSC-3, apresentaram $82,6 \pm 1,5\%$ de viabilidade. Doxorubicina ($90 \mu\text{M}$) promoveu morte mista com $41,9 \pm 3,0\%$ de apoptose tardia e $58,1 \pm 3,0\%$ de necrose com ausência de células viáveis. Após o tratamento com curcumina ($100 \mu\text{M}$), $90,7 \pm 1,8\%$ estavam em apoptose tardia.

EERs nas concentrações de 25 e $50 \mu\text{g/mL}$, sobre a linhagem HSC-3, promoveu morte por necrose, enquanto em $100 \mu\text{g/mL}$, a morte foi mista com $41,2 \pm 1,9\%$ de apoptose tardia e $58,6 \pm 2,0\%$ de necrose. Esta linhagem foi mais resistente a FHRs em comparação com o EERs, e nas menores concentrações, a morte foi mista, com apoptose precoce e necrose, enquanto na maior, prevaleceu a morte por necrose (figura 27).

Emodina e fisciona tiveram viabilidades semelhantes nas menores concentrações após 12h de tratamento, ainda, nestas concentrações a morte ocorreu por apoptose precoce. Com a concentração intermediária de emodina, a viabilidade diminuiu e 50,0% das células estavam em apoptose; enquanto fisciona, na concentração intermediária promoveu morte apenas por apoptose precoce. Com $175,0 \mu\text{M}$ de fisciona, 59,4% das células estavam em apoptose e $26,2 \pm 4,1\%$ em necrose. E para $185,0 \mu\text{M}$ de emodina, todas as células mortas eram apoptóticas (64,3%) (figura 27).

Para a linhagem HaCaT, de origem não tumoral, $74,1 \pm 2,1\%$ das células do controle de veículo estavam viáveis após 12 horas de tratamento. Não houve viabilidade celular após o tratamento com doxorubicina ($90 \mu\text{M}$) e curcumina ($100 \mu\text{M}$). Doxorubicina induziu morte por necrose e curcumina por apoptose tardia.

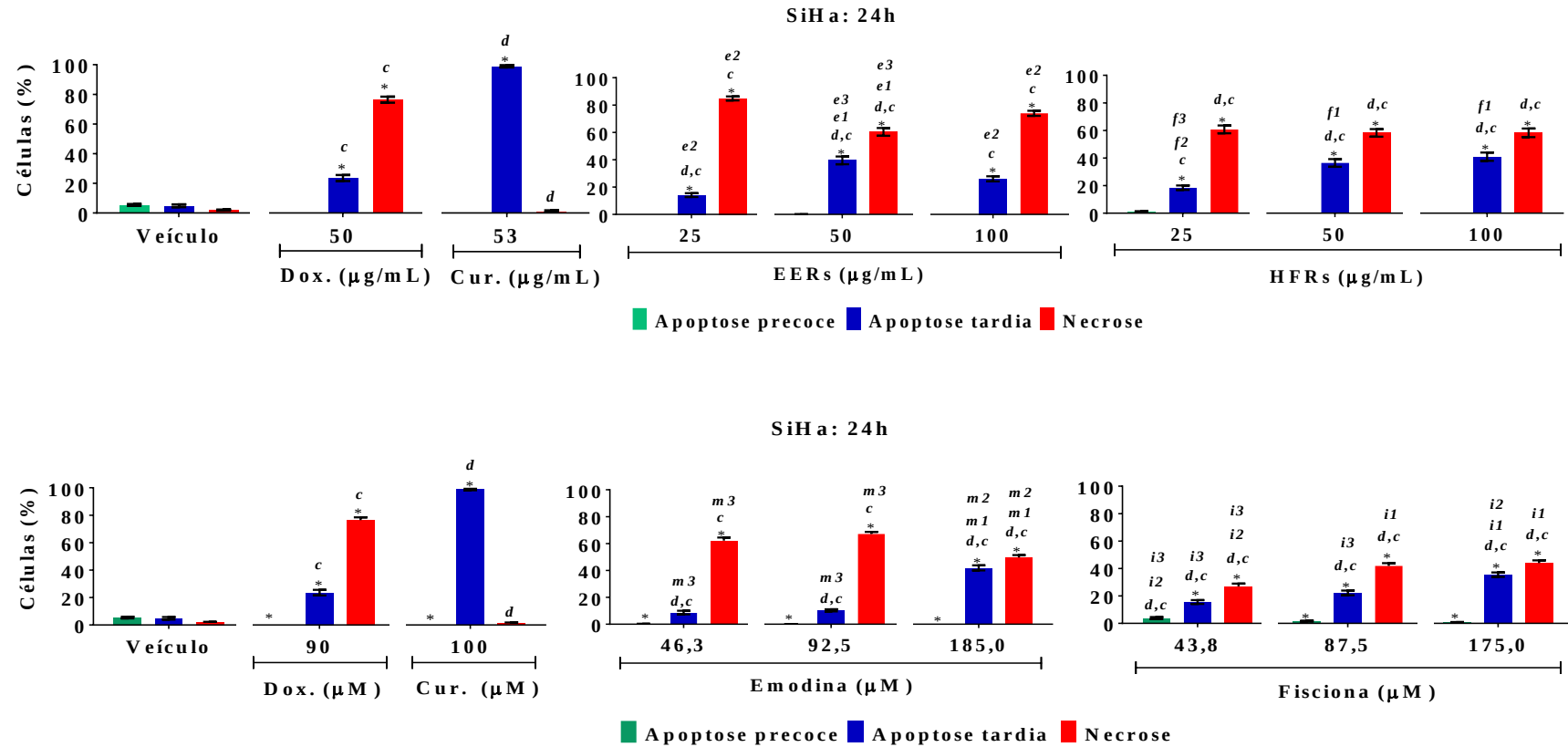
O EERs foi mais citotóxico que sua fração, com ausência de células viáveis em todas as concentrações, e a morte celular da maioria as células ocorreu por necrose em todas as concentrações, entretanto, cerca de 30% das células estavam em apoptose tardia. A FHRs também apresentou elevada citotoxicidade, e quando as células foram tratadas com 25 e $50 \mu\text{g/mL}$, a morte celular observada foi mista, com células em apoptose tardia e necrose (figura 28).

Emodina foi mais tóxica para esta linhagem na menor concentração, quando comparada com fisciona, mas quando as maiores concentrações destas antraquinonas foram comparadas, fisciona foi mais efetiva que emodina. Para emodina a viabilidade celular após 12h de tratamento foi $12,9 \pm 0,8\%$ em $46,3 \mu\text{M}$ e $3,9 \pm 0,5\%$ em $185 \mu\text{M}$; enquanto para fisciona a viabilidade a $43,8 \mu\text{M}$ foi de $38,4 \pm 1,5\%$ e de $0,5 \pm 0,2\%$ a $175 \mu\text{M}$. As células tratadas com ambas antraquinonas morreram por apoptose tardia e necrose em todas as concentrações testadas (figura 28).

Neste ensaio, todas as linhagens apresentaram maior sensibilidade aos tratamentos, em comparação com o ensaio de exclusão por fluorocromos, e isto se deve a maior sensibilidade de detecção de morte deste ensaio.

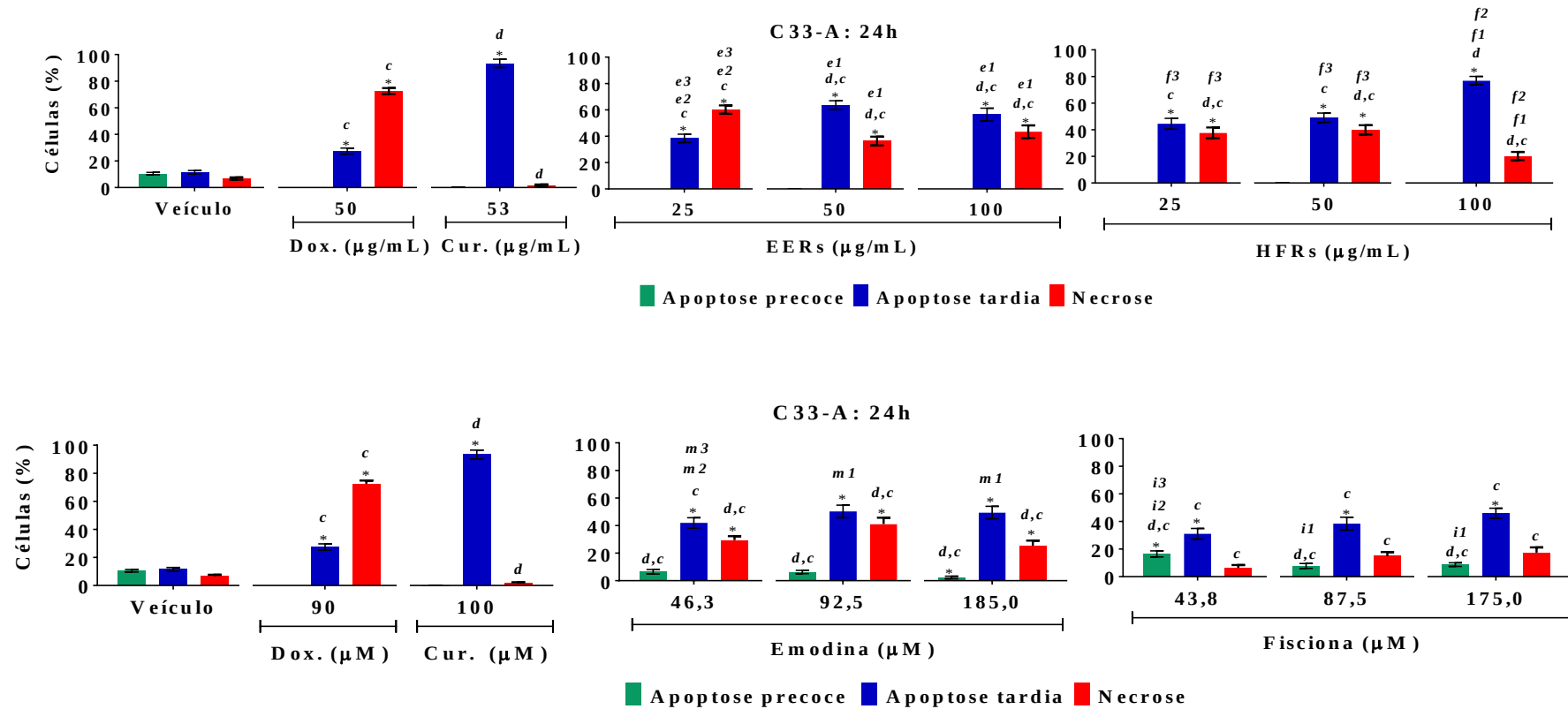
De maneira geral, o extrato bruto e sua fração foram mais efetivos na indução de morte celular para todas as linhagens analisadas por este método. Dentre as antraquinonas, emodina foi mais eficiente que fisciona. Por outro lado, fisciona foi menos tóxica na linhagem normal HaCaT.

Figura 25. Ensaio de morte celular por anexina-V em SiHa.



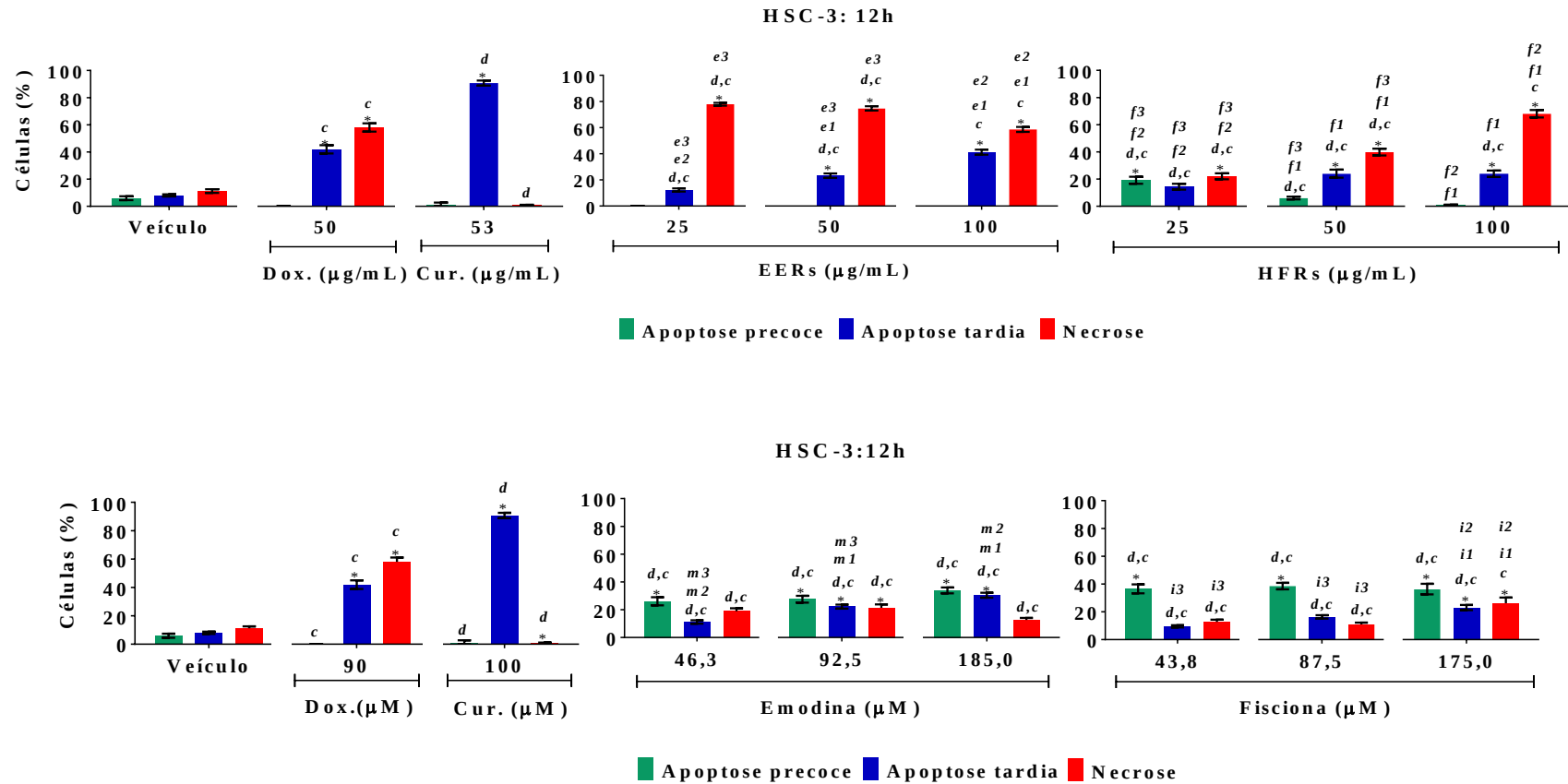
Legenda: Comparação com diferença estatística significativa entre os **tratamentos**: Veículo (*), doxorubicina (*d*), curcumina (*c*), EERs 25 $\mu\text{g/mL}$ (*e1*^o), EERs - 50 $\mu\text{g/mL}$ (*e2*), EERs - 100 $\mu\text{g/mL}$ (*e3*), HRRs - 25 $\mu\text{g/mL}$ (*f1*), HRRs - 50 $\mu\text{g/mL}$ (*f2*), HRRs - 100 $\mu\text{g/mL}$ (*f3*), emodina 46,3 μM (*m1*), emodina - 92,8 μM (*m2*), emodina - 185,0 μM (*m3*), fisciona - 43,8 μM (*i1*), fisciona - 87,5 μM (*i2*), fisciona - 175,0 μM (*i3*) e os **status celulares**: células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

Figura 26. Ensaio de morte celular por anexina-V em C33-A.



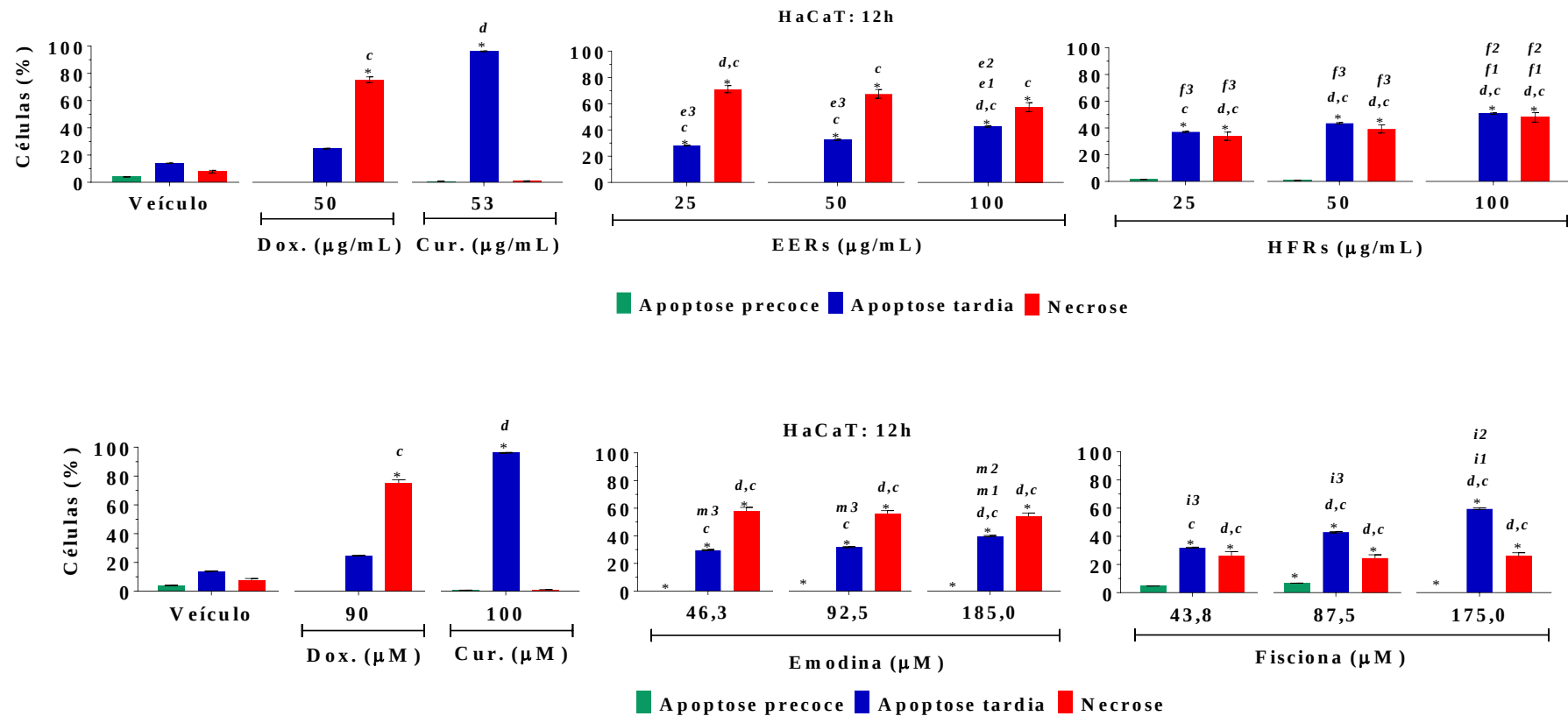
Legenda: Comparação com diferença estatística significativa entre os **tratamentos**: Veículo (*), doxorubicina (*d*), curcumina (*c*), EERs 25 $\mu\text{g/mL}$ (*e1*^o), EERs - 50 $\mu\text{g/mL}$ (*e2*), EERs - 100 $\mu\text{g/mL}$ (*e3*), HRRs - 25 $\mu\text{g/mL}$ (*f1*), HRRs - 50 $\mu\text{g/mL}$ (*f2*), HRRs - 100 $\mu\text{g/mL}$ (*f3*), emodina 46,3 μM (*m1*), emodina - 92,8 μM (*m2*), emodina - 185,0 μM (*m3*), fisciona - 43,8 μM (*i1*), fisciona - 87,5 μM (*i2*), fisciona - 175,0 μM (*i3*) e os **status celulares**: células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

Figura 27. Ensaio de morte celular por anexina-V em HSC-3.



Legenda: Comparação com diferença estatística significativa entre os **tratamentos**: Veículo (*), doxorubicina (*d*), curcumina (*c*), EERs 25μg/mL (*e1*^o), EERs - 50μg/mL (*e2*), EERs - 100μg/mL (*e3*), HRRs - 25μg/mL (*f1*), HRRs - 50μg/mL (*f2*), HRRs - 100μg/mL (*f3*), emodina 46,3μM (*m1*), emodina - 92,8μM (*m2*), emodina - 185,0μM (*m3*), fisciona - 43,8μM (*i1*), fisciona - 87,5μM (*i2*), fisciona - 175,0μM (*i3*) e os **status celulares**: células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes ± erro padrão (M±EP), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

Figura 28. Ensaio de morte celular por anexina-V em HaCaT.



Legenda: Comparação com diferença estatística significativa entre os **tratamentos**: Veículo (*), doxorubicina (**d**), curcumina (**c**), EERs 25 $\mu\text{g/mL}$ (**e1**), EERs - 50 $\mu\text{g/mL}$ (**e2**), EERs - 100 $\mu\text{g/mL}$ (**e3**), HRRs - 25 $\mu\text{g/mL}$ (**f1**), HRRs - 50 $\mu\text{g/mL}$ (**f2**), HRRs - 100 $\mu\text{g/mL}$ (**f3**), emodina 46,3 μM (**m1**), emodina - 92,8 μM (**m2**), emodina - 185,0 μM (**m3**), fisciona - 43,8 μM (**i1**), fisciona - 87,5 μM (**i2**), fisciona - 175,0 μM (**i3**) e os **status celulares**: células viáveis, apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Resultados estão expressos como média de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey, $p \leq 0,05$.

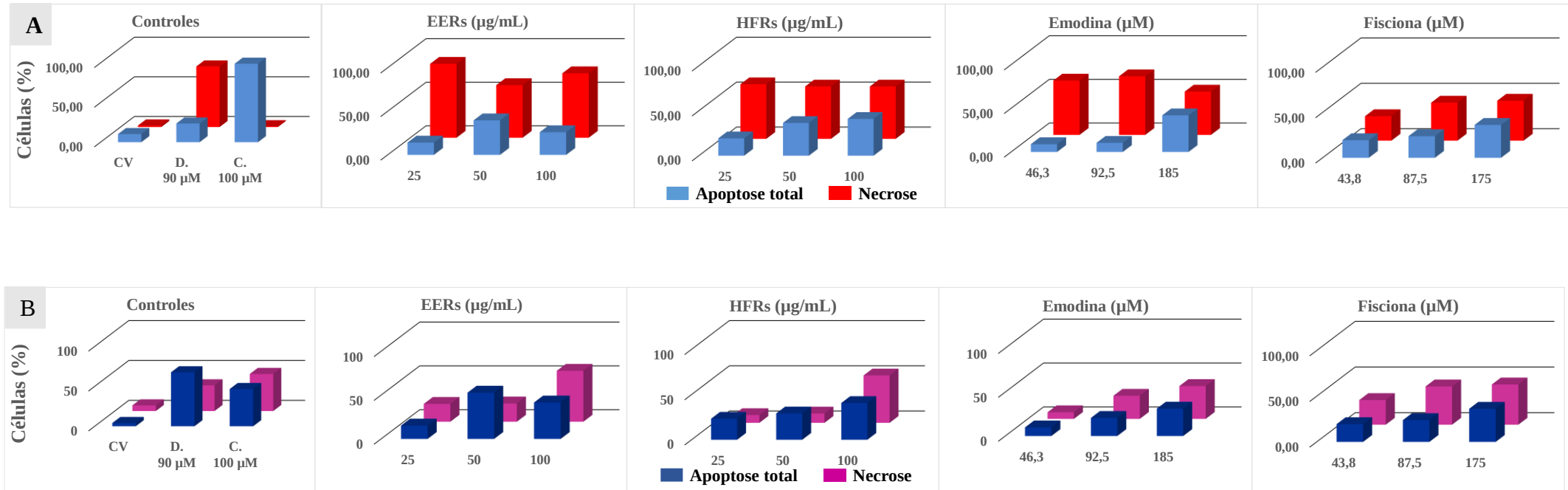
Os dados de morte celular obtidos para as linhagens nos ensaios de exclusão por fluorocromos e anexina-V foram comparados, a fim de se detectar a principal via induzida após o tratamento com as amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*. A comparação dos dados de morte celular obtidos nesses dois experimentos estão demonstrados nas figuras 29 a 32.

O ensaio citomorfológico, que detecta viabilidade e tipos de morte, via coloração com fluorocromos e morfologia celular, foi menos sensível, e portanto, após os tratamentos, foi verificado maior viabilidade celular em comparação com o ensaio de anexina-V. Por outro lado, o ensaio de anexina-V detecta a inversão dos fosfolipídeos de membrana, um estágio inicial dos eventos apoptóticos, que pode ser observado antes de alterações morfológicas clássicas (analisados no ensaio anterior), e, desta maneira, maior citotoxicidade foi observada no ensaio de anexina-V.

Para as linhagens C33-A (tratada por 24 horas), HSC-3 e HaCaT (tratadas por 12 horas) foram detectadas maiores porcentagens de apoptose para todas as amostras de maneira geral, enquanto na linhagem SiHa, prevaleceu a necrose.

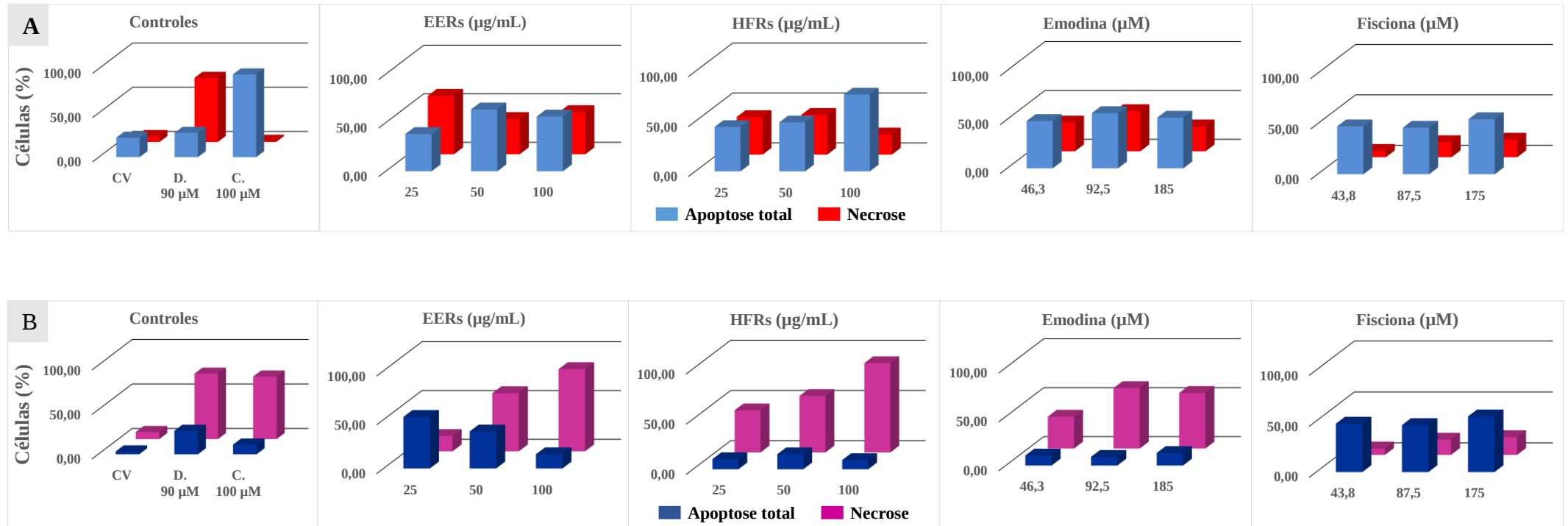
De maneira geral, em ambos experimentos, as amostras induziram morte celular mista, com a presença de apoptose e necrose. E as diferenças observadas entre as amostras pode ser atribuída as diferentes valores de células viáveis obtidos em cada ensaio.

Figura 29. Tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com as amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* frente a linhagem celular SiHa.



Legenda: Demonstração do tipo de morte celular (apoptose total ou necrose) induzido pelo tratamento com as amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* (A) no ensaio de anexina-V e (B) no ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos (CV = controle de veículo com DMSO a 0,5%, D= doxorubicina, C= curcumina, EERs= extrato etanólico de *R. sphaerosperma*, HFRS= fração hexânica de *R. sphaerosperma*).

Figura 30. Tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com as amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* frente a linhagem celular C33-A.



Legenda: Demonstração do tipo de morte celular (apoptose total ou necrose) induzido pelo tratamento com as amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* (A) no ensaio de anexina-V e (B) no ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos (CV = controle de veículo com DMSO a 0,5%, D= doxorubicina, C= curcumina, EERs= extrato etanólico de *R. sphaerosperma*, HFRS= fração hexânica de *R. sphaerosperma*).

Figura 31. Tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com as amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* frente a linhagem celular HSC-3.

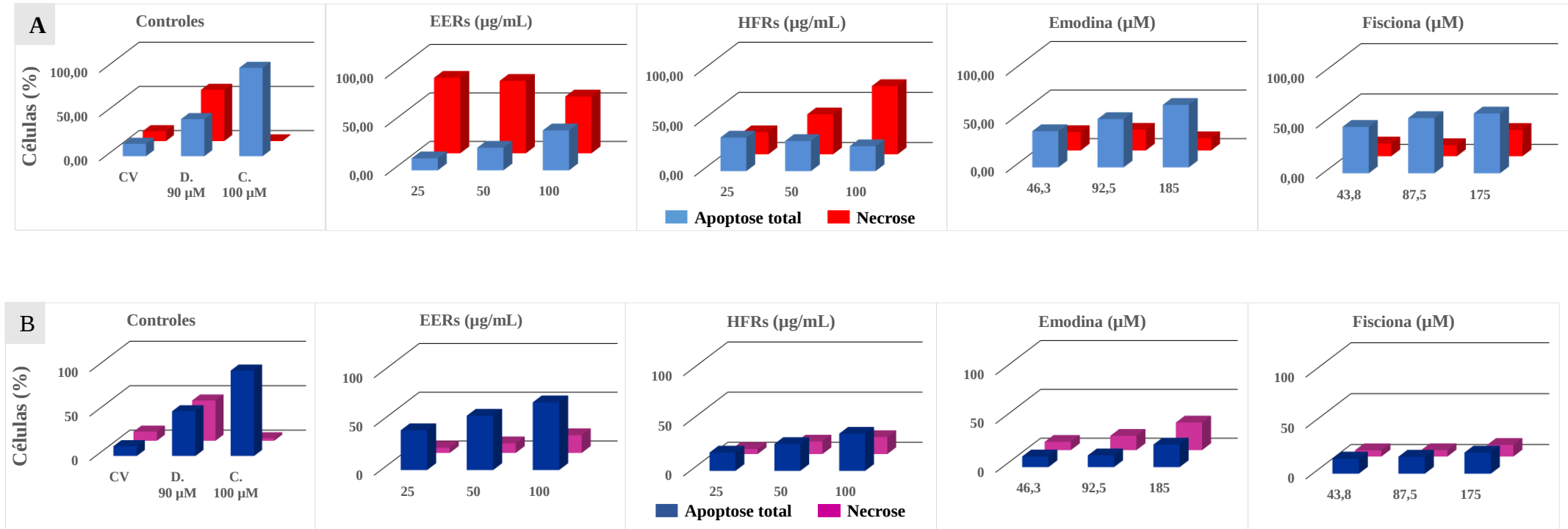
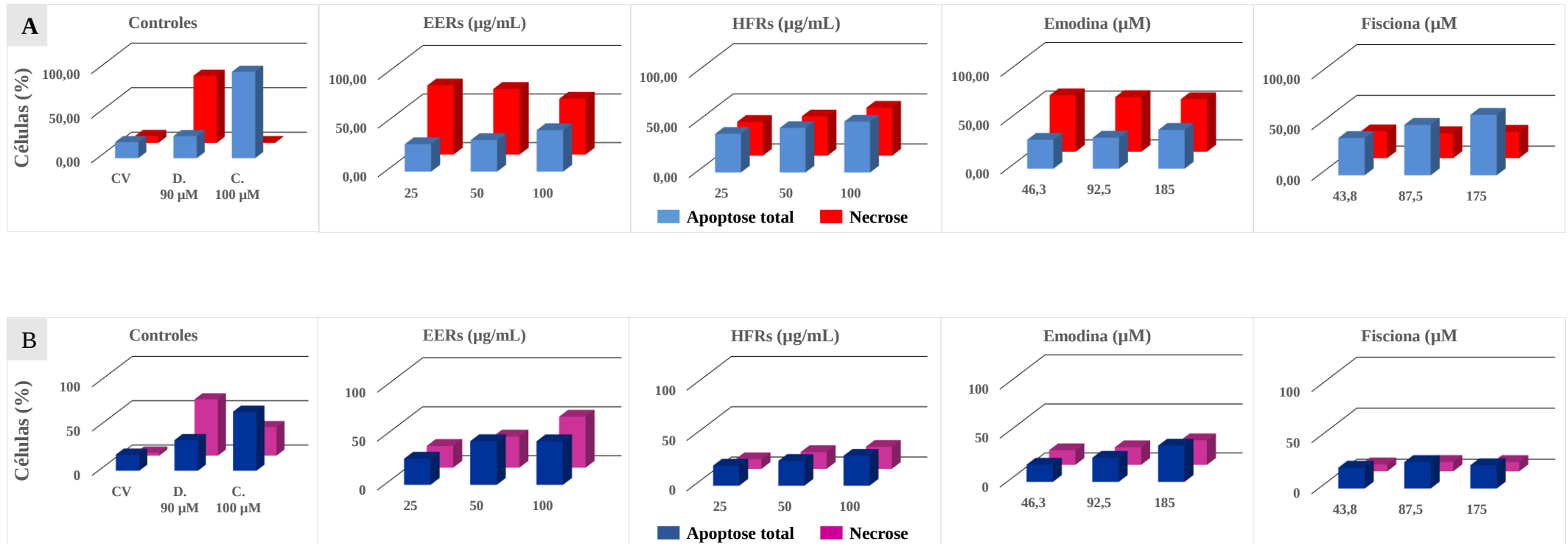


Figura 32. Tipo de morte celular induzida pelos tratamentos com as amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* frente a linhagem celular HaCaT.



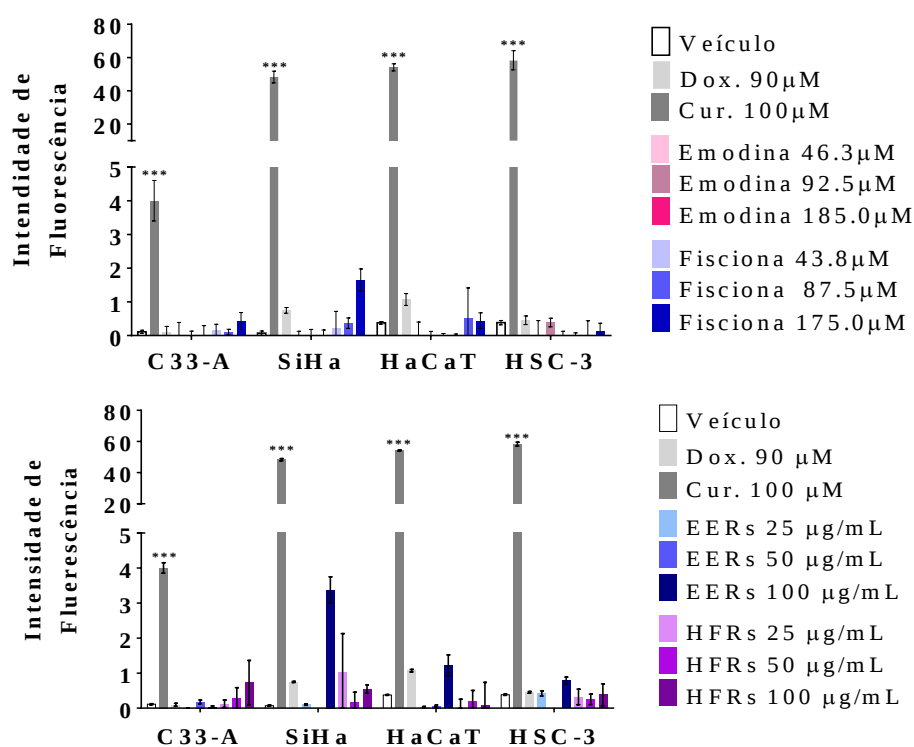
Legenda: Demonstração do tipo de morte celular (apoptose total ou necrose) induzido pelo tratamento com as amostras de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* (A) no ensaio de anexina-V e (B) no ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos (CV = controle de veículo com DMSO a 0,5%, D= doxorubicina, C= curcumina, EERs= extrato etanólico de *R. sphaerosperma*, HFRS= fração hexânica de *R. sphaerosperma*).

4.3.4. Detecção de apoptose pela avaliação da atividade de caspase-3

Este ensaio foi realizado para analisar a participação efetiva da caspase-3 na indução de morte celular programada, e constatar morte pela via intrínseca da apoptose.

Apenas as células tratadas com curcumina apresentaram ativação de caspase-3. Os tratamentos com doxorrubicina também não apresentaram aumento na atividade de caspase-3, corroborando com os dados encontrados nos experimentos de anexina-V e exclusão por fluorocromos, onde foi observada morte por necrose, que ocorre sem ativação de caspases, foi predominante (figura 33).

Figura 33. Ensaio de atividade de caspase-3.



Legenda: células SiHa, C33-A, HSC-3 e HaCaT após tratamento por 6h com: emodina, fisetina, extrato bruto do caule (EERs) e fração hexânica do caule (HFRs). Resultados estão expressos como média da intensidade de fluorescência celular de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Tukey (Diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle de veículo: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Neste ensaio, os tratamentos com as antraquinonas, o extrato bruto e sua fração hexânica não promoveram alterações na atividade de caspase-3, ou seja, em nenhum tempo de tratamento analisado foi constatado a ativação dessa enzima, sendo assim, a morte celular

observada nos ensaios anteriores ocorre de maneira independente de caspase-3, e a morfologia apoptótica observada é decorrente da ativação de outras vias bioquímicas.

4.3.5. *Análise dos níveis proteicos de caspase-3, AKT e níveis de fosforilação de AKT*

Para verificar componentes intracelulares que poderiam ter participação na indução de estresse e morte celular após o tratamento com as antraquinonas e com o extrato bruto provenientes de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*, os níveis proteicos de caspase-3 e de AKT bem como os níveis de fosforilação de AKT (Ser-473) foram avaliados pelo ensaio de *western blotting*. Os resultados estão apresentados nas figuras 34 a 37.

Na linhagem SiHa, nenhuma antraquinona alterou significativamente os níveis proteicos de AKT, apenas o EERs foi capaz de promover uma redução significativa nos níveis desta quinase, nas concentrações de 6,25 e 25,0 µg/mL. Na avaliação da fosforilação de AKT, observou-se que a emodina reduziu significativamente os níveis de fosforilação de AKT, nas maiores concentrações testadas (46,3 e 92,5 µM). O EERs também reduziu os níveis de fosforilação de AKT, nas concentrações 6,25 e 25,0 µg/mL (isto é, mas mesmas concentrações que promoveram redução nos níveis proteicos da quinase). Em relação aos níveis de caspase-3, emodina a 92,5 µM promoveu um aumento nos níveis de caspase-3, enquanto as outras concentrações (46,3 e 23,2 µM) apresentaram uma tendência a diminuir os níveis desta enzima, porém sem significância estatística. Fisciona e EERs não promoveram alterações significativas nos níveis de caspase-3. Ainda, apenas nesta linhagem celular foi possível analisar os níveis proteicos de BAX (proteína pró-apoptótica) e BCL-2 (proteína anti-apoptótica). Os níveis de BAX foram aumentados após o tratamento com 92,5 µM de emodina, enquanto que o tratamento com EERs promoveu uma diminuição nos níveis de BAX, em todas as concentrações testadas. Os níveis de BCL-2 foram diminuídos após os tratamentos com emodina (todas as concentrações analisadas), fisciona e EERs (nas maiores concentrações).

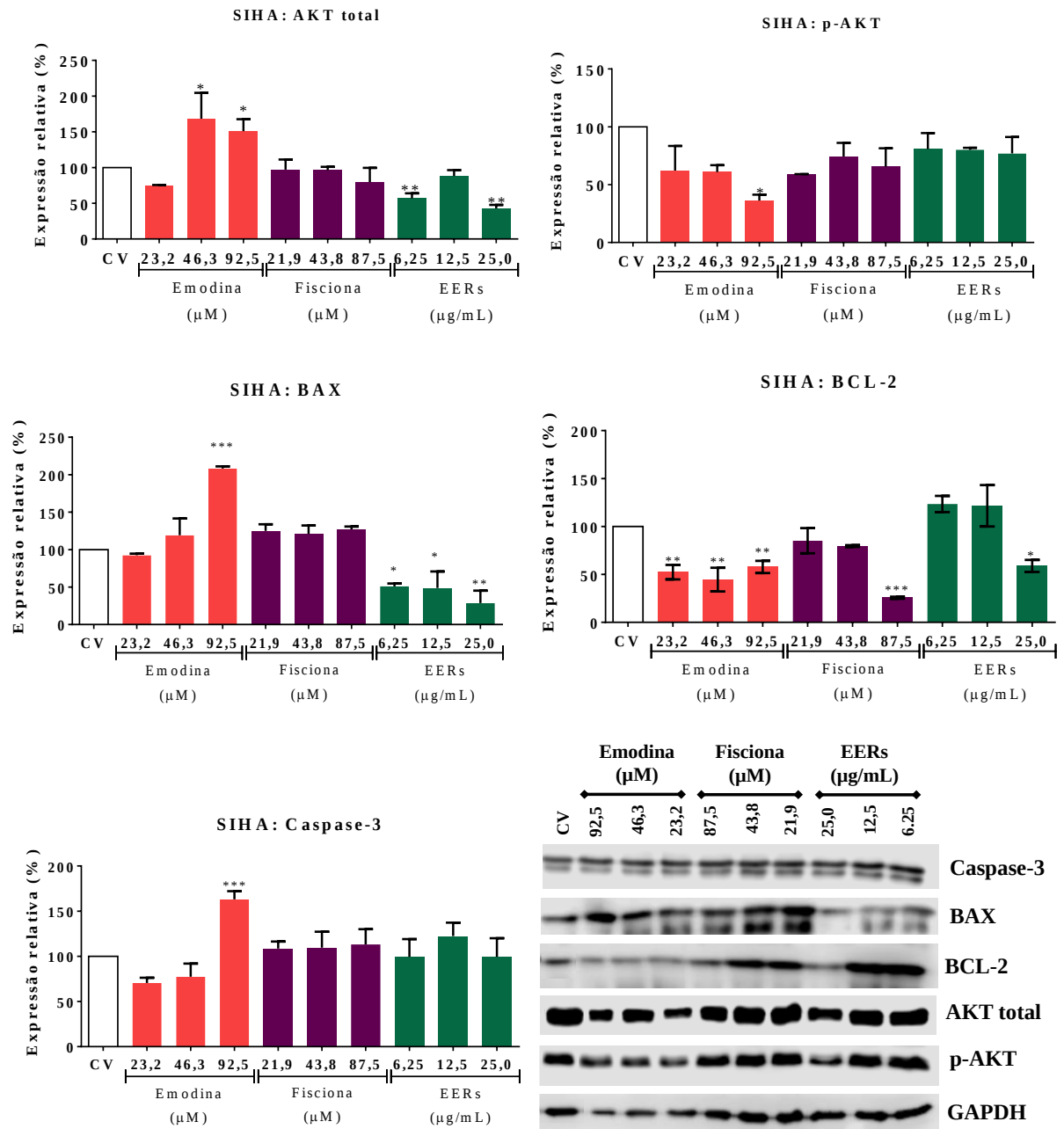
Na linhagem C33-A, não foram observadas alterações nos níveis proteicos de AKT. Por outro lado, a emodina (nas maiores concentrações) e EERs (todas as concentrações) foram capazes de reduzir a fosforilação de AKT; já a fisciona não foi capaz de promover alterações nos níveis de fosforilação de AKT. Em relação aos níveis de caspase-3, a emodina a 92,5 µM reduziu os níveis de caspase-3 (efeito oposto ao observado na linhagem SiHa), já fisciona, e EERs não promoveram alterações significativas nos níveis de caspase-3.

Os níveis proteicos de AKT não foram alterados em células HSC-3 tratadas com emodina, fisciona ou EERs, enquanto os níveis de fosforilação foram diminuídos após o

tratamento com emodina (todas as concentrações) ou fisciona (com exceção da maior concentração). Já os níveis de caspase-3 na linhagem HSC-3 foram aumentados após o tratamento com fisciona e EERs, em todas as concentrações, bem como nas maiores concentrações de emodina.

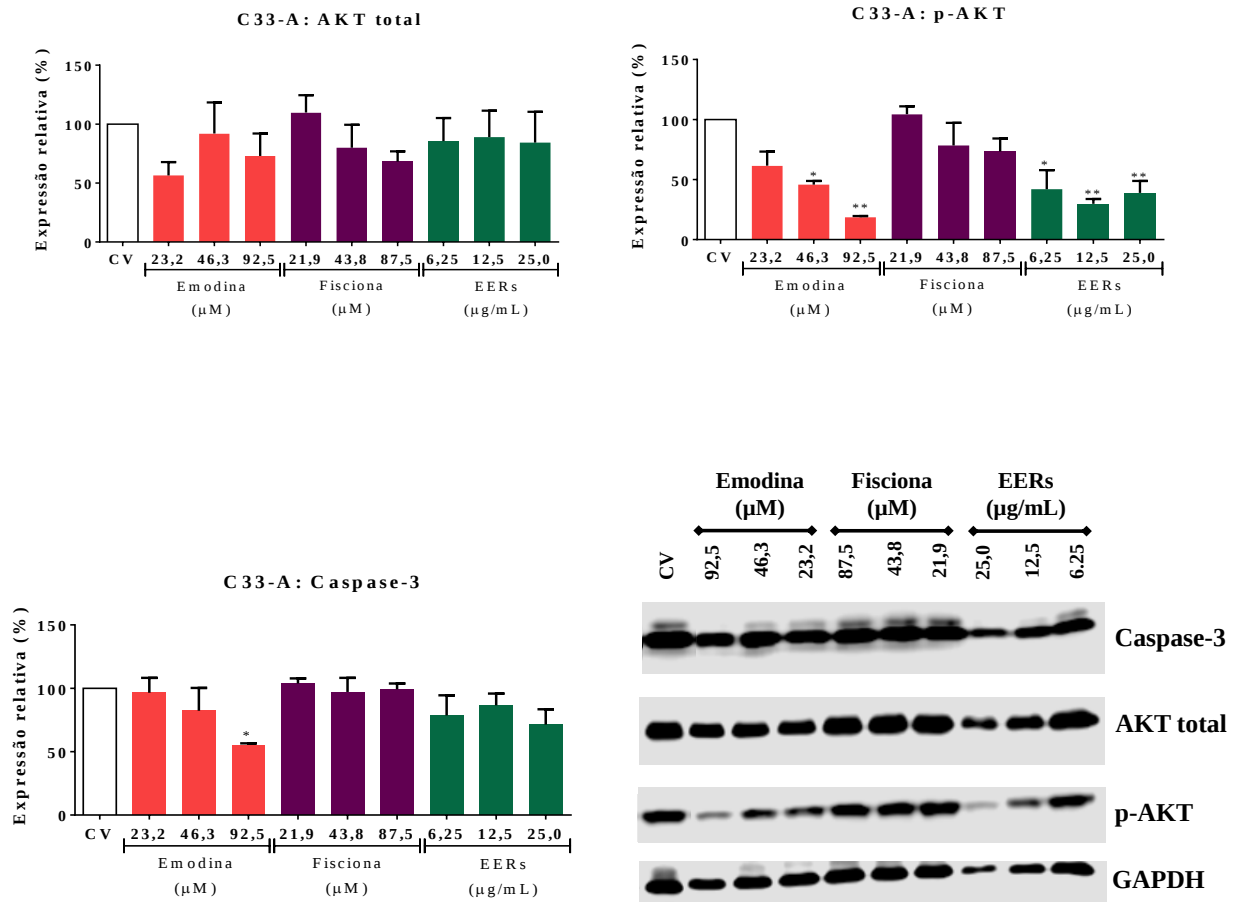
Para a linhagem não tumoral, HaCaT, os níveis proteicos de AKT foram aumentados após o tratamento com emodina a 23,2 e 92,5 μM , já os tratamentos com fisciona ou EERs não alteraram significativamente os níveis desta proteína em relação ao controle. Quando a fosforilação de AKT foi analisada, houve redução apenas com o tratamento com fisciona na menor concentração e EERs, em todas as concentrações. Em relação aos níveis de caspase-3, fisciona a 21,9 μM e EERs a 25,0 $\mu\text{g/mL}$ reduziram os níveis desta proteína, enquanto as outras concentrações, bem como a emodina, não promoveram alterações significativas.

Figura 34. Níveis proteicos de AKT, fosforilação de AKT (Ser-473), BAX, BCL-2 e caspase-3 em SiHa tratadas com emodina, fisciona e EERs



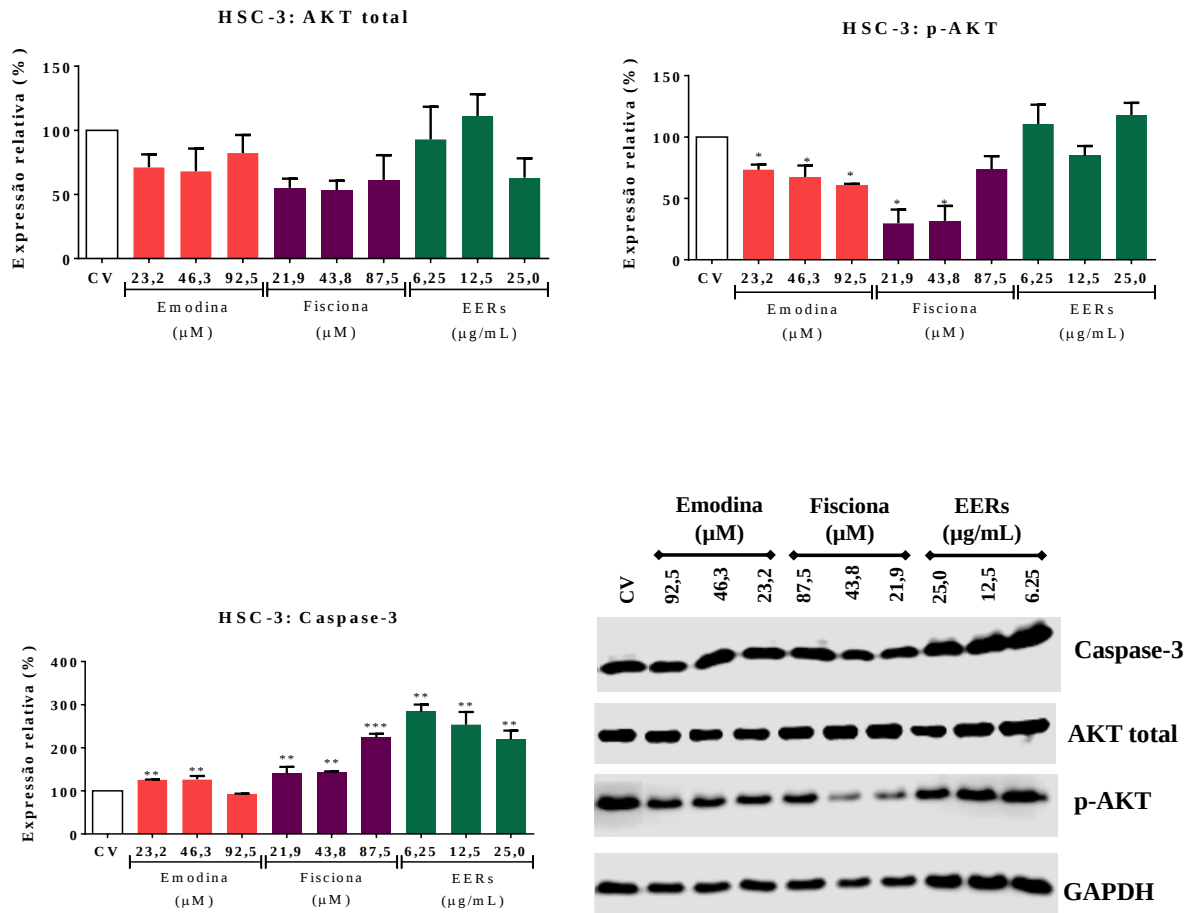
Legenda: células SiHa após tratamento por 24h com: emodina, fisciona e extrato bruto do caule (EERs). Resultados estão expressos como média da densitometria das bandas eletroforéticas, e corrigidos em relação ao controle de células tratadas apenas com DMSO 0,5% - v/v (CV), de dois experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Newman-keuls (Diferença estatisticamente significativa em comparação com grupo CV: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Figura 35. Níveis proteicos de AKT, fosforilação de AKT (Ser-473) e caspase-3 em C33-A tratadas com emodina, fisciona e EERs.



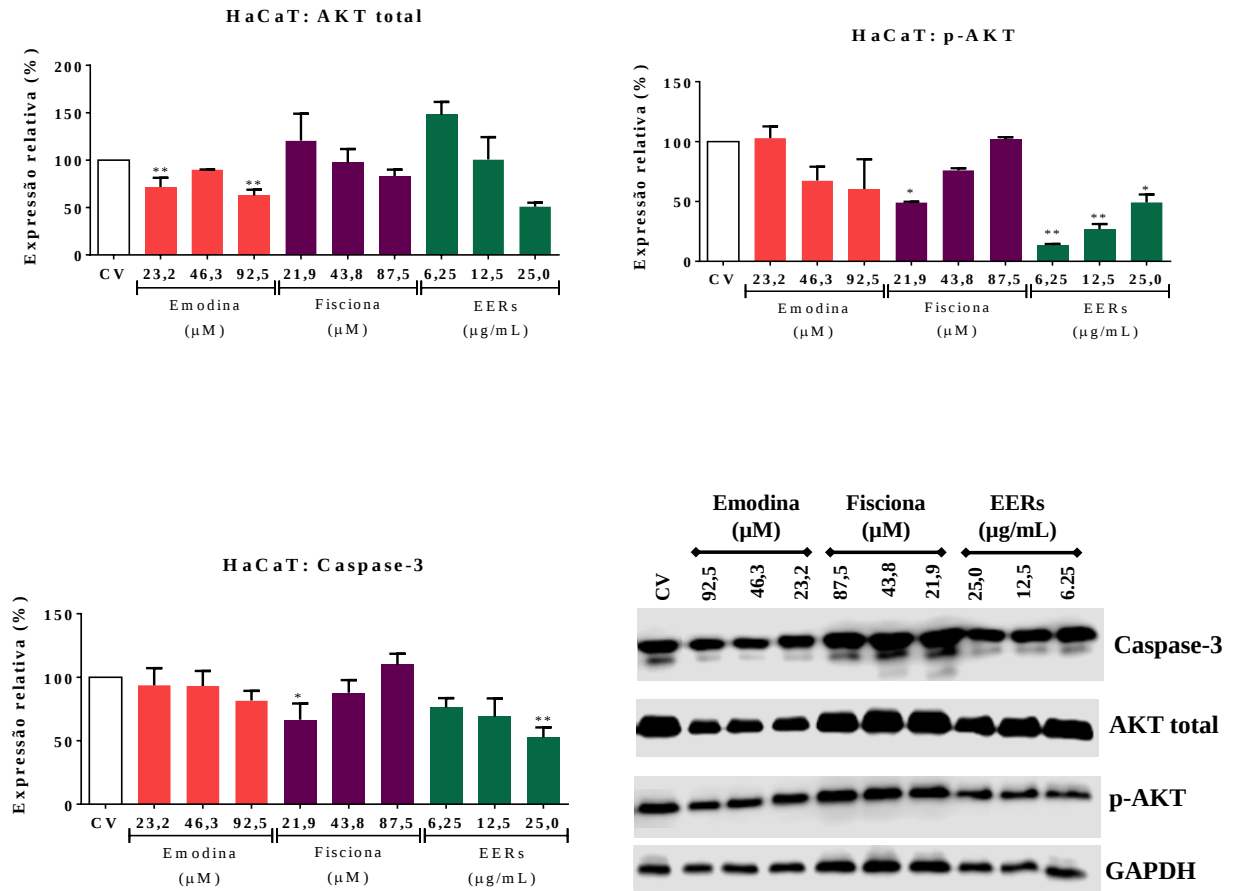
Legenda: células C33-A após tratamento por 24h com: emodina, fisciona e extrato bruto do caule (EERs). Resultados estão expressos como média da densitometria das bandas eletroforéticas, e corrigidos em relação ao controle de células tratadas apenas com DMSO 0,5% - v/v (CV), de dois experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Newman-keuls (Diferença estatisticamente significativa em comparação com grupo CV: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Figura 36. Níveis proteicos de AKT, fosforilação de AKT (Ser-473) e caspase-3 em HSC-3 tratadas com emodina, fisciona e EERs.



Legenda: células HSC-3 após tratamento por 24h com: emodina, fisciona e extrato bruto do caule (EERs). Resultados estão expressos como média da densitometria das bandas eletroforéticas, e corrigidos em relação ao controle de células tratadas apenas com DMSO 0,5% - v/v (CV), de dois experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Newman-keuls (Diferença estatisticamente significativa em comparação com grupo CV: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

Figura 37. Níveis proteicos de AKT, fosforilação de AKT (Ser-473) e caspase-3 em HaCaT tratadas com emodina, fisciona e EERs.



Legenda: células HaCaT após tratamento por 24h com: emodina, fisciona e extrato bruto do caule (EERs). Resultados estão expressos como média da densitometria das bandas eletroforéticas, e corrigidos em relação ao controle de células tratadas apenas com DMSO 0,5% - v/v (CV), de dois experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Newman-keuls (Diferença estatisticamente significativa em comparação com grupo CV: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

4.3.6. Determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

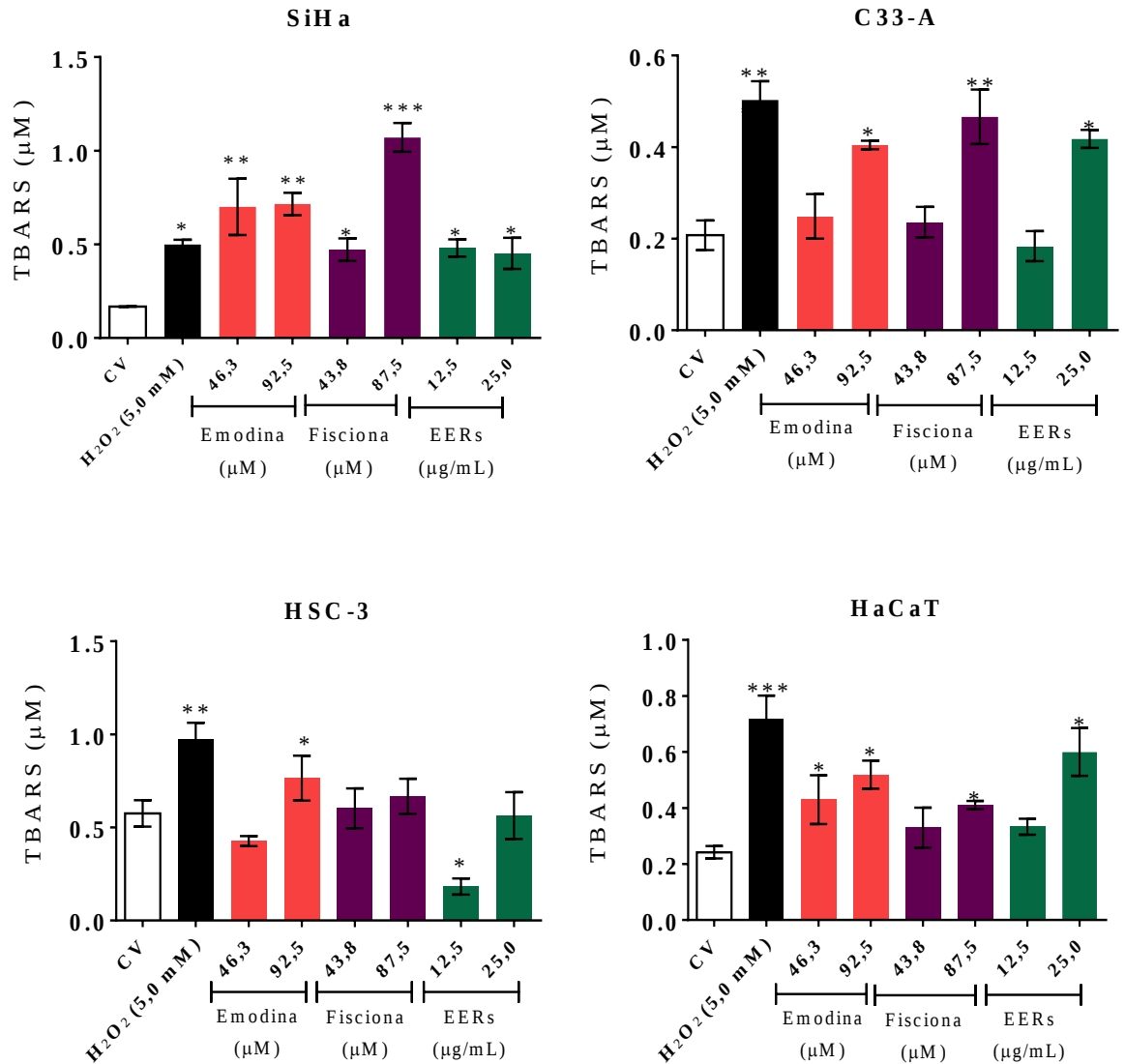
Os níveis de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, expressos em quantidade de MDA, após os tratamento das células com o extrato bruto e com as antraquinonas emodina e fisciona, após 24h, foram quantificados para as linhagens SiHa, C33-A, HSC-3 e HaCaT (figura 38).

Emodina promoveu o aumento na concentração de MDA, em comparação com o controle de veículo, em todas as linhagens, sendo que em C33-A e HSC-3, apenas a maior concentração apresentou significância.

Fisciona apresentou um aumento significativo na concentração de MDA em SiHa, C-33A e HaCaT, apenas na maior concentração avaliada.

Nas linhagens SiHa, C33-A e HaCaT, o extrato bruto promoveu o aumento nos níveis de MDA, enquanto para HSC-3 tratada com EERs na menor concentração diminuiu a quantidade de MDA.

Figura 38. Ensaio de TBARS nas linhagens SiHa, C33-A, HSC-3 e HaCaT.



Legenda: células SiHa, C33-A, HSC-3 e HaCaT após tratamento por 24h com: emodina, fisciona e extrato bruto do caule (EERs), e controle positivo H₂O₂ (5,0 mM). Resultados estão expressos como média da concentração de MDA (produto formado após a reação do meio extracelualr com ácido tiobarbitúrico em meio ácido, a 95°C por 60 minutos) de três experimentos independentes $\pm$ erro padrão ($M \pm EP$), analisados por *one-way* ANOVA com pós-teste de Newman-keuls (Diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle de veículo: * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

4.4. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO E GENOTÓXICO

4.4.6. Avaliação da mutagenicidade pelo ensaio de micronúcleo

O ensaio de micronúcleo é utilizado para detectar danos irreparáveis ao DNA, durante o processo de divisão celular (FENECH, 2000). Foram realizados três experimentos independentes para cada linhagem. Em cada experimento foram analisadas mil células, nas quais foi quantificado o número de micronúcleos. Os resultados estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Frequência de micronúcleos formados após o tratamento com as antraquinonas.

	Frequência de micronúcleos (%)			
	SiHa	C33-A	HSC-3	HaCaT
DMSO (1%)	0,939 ± 0,09	0,617 ± 0,03	4,16 ± 0,54	0,177 ± 0,02
H₂O₂ (0,1mM)	1,916 ± 0,32*	1,190 ± 0,16**	9,33 ± 0,63*	1,198 ± 0,27***
Crisofanol				
3,125 µg/mL (12,3 µM)	3,894 ± 0,33***	0,757 ± 0,20	3,913 ± 0,69	0,228 ± 0,18
6,25 µg/mL (24,5 µM)	2,832 ± 0,21***	1,129 ± 0,05**	2,655 ± 0,063	0,066 ± 0,02
12,5 µg/mL (49,1µM)	2,431 ± 0,2**	1,403 ± 0,07***	2,706 ± 0,9	0,151 ± 0,09
Emodina				
3,125 µg/mL (11,6 µM)	2,120 ± 0,13*	0,932 ± 0,08*	4,720 ± 0,82	0,181 ± 0,06
6,25 µg/mL (23,2µM)	2,428 ± 0,36**	1,318 ± 0,13***	4,246 ± 1,23	0,296 ± 0,16
12,5 µg/mL (46,3µM)	3,528 ± 0,19***	1,081 ± 0,04**	2,789 ± 1,63	0,102 ± 0,018
Fisciona				
3,125 µg/mL (10,9µM)	1,699 ± 0,26*	1,298 ± 0,06**	5,723 ± 0,96	0,478 ± 0,21
6,25 µg/mL (21,9µM)	1,990 ± 0,27*	1,246 ± 0,12**	4,794 ± 1,02	0,421 ± 0,091
12,5µg/mL (43,8µM)	1,896 ± 0,17*	1,143 ± 0,15**	4,915 ± 0,76	0,239 ± 0,19

Legenda: Avaliação do potencial mutagênico sobre as linhagens celulares SiHa C33-A, HSC-3 e HaCaT. Média±EP do número de micronúcleos encontrados em três experimentos independentes em células tratadas com Crisofanol, Emodina e Fisciona, Peróxido de hidrogênio (0,1mM) e DMSO (1%). Todas as células foram analisadas pelo software IN Cell Analyser 2000 (GE Healthcare). (* p≥0,05; ** p≥0,01; *** p≥0,001 em comparação com o controle de veículo analisada por on way ANOVA e pós-teste de Newman-Keuls).

As antraquinonas crisofanol, emodina e fisciona promoveram mutagenicidade sobre as linhagens SiHa e C33-A, após 24 horas de tratamento, em todas as concentrações testadas.

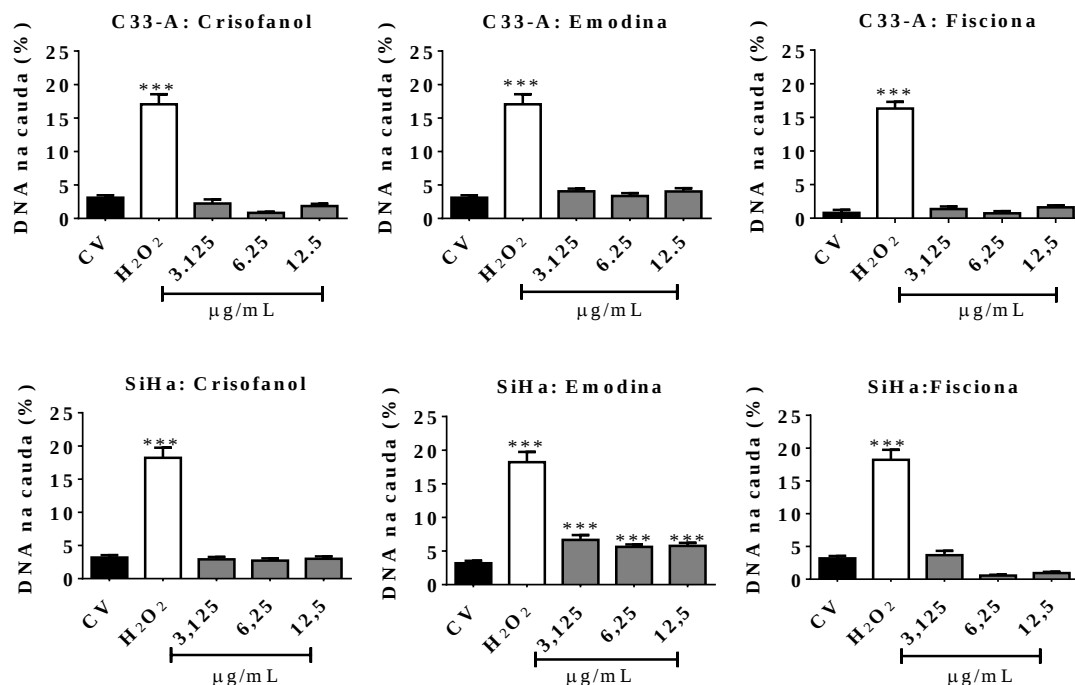
Nenhuma antraquinona avaliada exerceu mutagenicidade nas linhagens HSC-3 e HaCaT. Nestas linhagens, apenas as células tratadas com peróxido de hidrogênio apresentaram o aumento na quantidade de aberrações cromossômicas.

4.4.7. Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa

O ensaio do cometa detecta danos ao DNA passíveis de reparação, os quais podem originar mutações (TICE et al., 2000). Este ensaio foi realizado para as linhagens celulares SiHa e C33-A, nas quais houve aumento de na frequência de micronúcleos após o tratamento das antraquinonas. Os resultados estão expressos como porcentagem de DNA na cauda, originada pela quebra nas fitas do DNA.

Neste ensaio, apenas emodina apresentou indução de genotoxicidade significativa na linhagem celular SiHa, em todas as concentrações testadas (figura 39).

Figura 39. Ensaio do cometa nas linhagens SiHa e C33-A.



Legenda: Avaliação da genotoxicidade das antraquinonas Crisofanol, Emodina e Fisciona, sobre as linhagens celulares SiHa e C33-A. H₂O₂: Peróxido de hidrogênio (0,1mM), controle positivo e CV: controle de veículo (DMSO 1%). (***) = diferença estatisticamente significativa para diferença estatisticamente significativa para p≥0,001, analisada por Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn).

Em conjunto, os dados dos ensaios de micronúcleo e cometa sugerem que as antraquinonas crisofanol e fisciona são capazes de promover danos mutagênicos, causando erros durante a divisão celular, com aumento na frequência de aberrações cromossômicas (micronúcleos). Por outro lado, emodina é capaz de promover quebras nas fitas de DNA (linhagem SiHa), assim como promover danos durante a segregação cromossômica (aumento de micronúcleos).

4.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE QUIMIOPREVENTIVA

4.5.1. Atividade de enzima quinona redutase

A quinona-redutase (NQO1) é uma enzima microsomal de fase 2 que participa de reações que envolvem a detoxificação do organismo, e por isso, a capacidade de promover sua indução é considerada como indicação da atividade quimiopreventiva para testes de novos fármacos (YANG et al., 2009), os resultados obtidos nesse ensaio estão expressos na tabela 6.

Como a antraquinona crisofanol não demonstrou elevada citotoxicidade, esta antraquinona foi avaliada quanto a capacidade de promover a indução da enzima quinona reductase. O extrato bruto, apesar de ter apresentado elevada citotoxicidade, também foi avaliado neste ensaio por ser uma mistura complexa. O índice de indução deve ser igual ou maior a 2,0 para um composto ser considerado indutor da atividade de quinona reductase, portanto, as amostras testadas neste ensaio não foram efetivas, uma vez que não apresentaram índice de indução favorável.

Tabela 6. Avaliação da indução da atividade da quinona-redutase em células Hepa 1c1c7.

	Atividade específica (nmol/mg/min)	Índice de indução
Veículo (DMSO 1%)	1074,27	1,1458
4'-bromoflavona: 2µM	2798,25	2,6048
Crisofanol: 12,5µg/mL (49,1µM)	1285,72	1,1968
Crisofanol: 6,25µg/mL (23,2µM)	876,23	0,8156
Extrato Bruto: 12,5µg/mL	1186,52	1,1045
Extrato Bruto: 6,25µg/mL	1234,87	1,1495

Legenda: Avaliação da indução da atividade da enzima quinona-redutase em células Hepa 1c1c7 da antraquinona Crisofanol e do extrato bruto do caule. 4'-bromoflavona (2µM) foi utilizado como controle positivo e controle de Veículo (DMSO 1%).

5. DISCUSSÃO

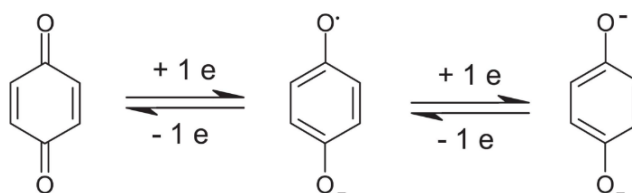
Atualmente existe uma intensa controvérsia na literatura a respeito do uso de compostos antioxidantes como coadjuvantes no tratamento do câncer, uma vez que muitos compostos utilizados na quimioterapia atuam em células tumorais promovendo o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERON), causando desequilíbrio entre a quantidade destas espécies e as defesas antioxidantes (como NADPH e GSH), com consequente estresse oxidativo, e assim observam-se seus efeitos deletérios, como a perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação de proteínas mitocondriais do espaço intermembranas para o citosol, o que desencadeia o processo de morte celular. As antraciclinas doxorubicina e saubarrubicina, amplamente utilizadas na quimioterapia, promovem morte celular induzida via aumento dos níveis celulares de ERON (LIU e WANG, 2015). Assim, tem sido discutido se compostos com capacidade de captura sobre espécies reativas, usados de maneira concomitante aos tratamentos com esse mecanismo de ação, poderiam atuar como antioxidantes, desfavorecendo a ação terapêutica nas células alvo, levando a resistência tumoral à terapia, mas que poderia trazer benefícios para células do tecido adjacente ao tumor (células normais). Entretanto, a atuação destes compostos depende das suas características químicas. Assim, podemos ter também um perfil antioxidante *in vitro* e ao mesmo tempo toxicidade *in vivo*.

Neste estudo foram comparadas as atuações sobre a captura de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, *in vitro*, do extrato etanólico bruto do caule de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, suas frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila, bem como das antraquinonas presentes nestes extratos: crisofanol, emodina e fisciona. De maneira geral, todas as amostras demonstraram eficiência na captura das espécies reativas $O_2^{\cdot-}$, HOCl/OCl⁻ e NO[•]. Para o extrato bruto e frações, a presença de antraquinonas em sua composição não influenciou a capacidade de captura, uma vez que a fração acetato de etila, que não possui antraquinonas, apresentou melhor eficácia relativa às demais frações com compostos antraquinônicos, e foi equivalente ao extrato bruto. Assim, é provável que o efeito de captura de espécies reativas do extrato bruto se deva ao sinergismo de compostos (ainda não identificados) com as antraquinonas.

Quando as antraquinonas foram avaliadas isoladamente, a emodina foi mais eficiente em comparação ao crisofanol e fisciona, sendo esta última de pior desempenho, o que permite a conclusão de que a substituição do hidrogênio do carbono 6 por um grupamento metoxila piora a capacidade de captura sobre as espécies HOCl/OCl⁻ e NO[•]. O núcleo quinônico das

antraquinonas tem reconhecida capacidade redox, com formação intermediária do radical semiquinona e subsequente estabilização em hidroquinona (figura 40) (GOULART et al., 2003; WATANABE; FORMAN, 2003; SOUSA et al., 2016).

Figura 40. Ciclo redox do núcleo quinônico com formação intermediária do radical semiquinona.



Legenda: Radical semiquinona produzida pela redução de quinonas (SOUSA et al., 2016)

Após a avaliação sobre a capacidade de captura das espécies reativas pelo extrato, frações e antraquinonas isoladas de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*; o perfil citotóxico destas amostras foi analisado frente a diferentes linhagens celulares de origem normal ou tumoral (tabela 1).

Inicialmente, a citotoxicidade das amostras foi analisada por meio do ensaio de sulforrodamina B (SRB), o qual permite verificar a viabilidade celular a partir da coloração de proteínas em células vivas fixadas após o tratamento com as amostras (PEREZ et al., 1993). Este ensaio foi escolhido porque não permite interações diretas com as amostras analisadas, como ocorre no ensaio de viabilidade celular por redução do MTT, onde amostras com capacidade de redução do MTT provocam resultados duvidosos, o que foi observado em testes piloto (dados não mostrados), e que reforçam a utilização do ensaio de SRB.

No ensaio de SRB, crisofanol não apresentou citotoxicidade significativa sobre as linhagens avaliadas, enquanto a emodina e fisciona foram citotóxicas e, portanto, selecionadas para os demais ensaios de avaliação de morte celular. Por este ensaio também foram analisados o extrato bruto e suas frações, e somente a fração acetato de etila não exerceu efeito tóxico para as linhagens analisadas (dados não apresentados), demonstrando que a capacidade citotóxica do extrato pode ser atribuída, pelo menos em parte, às antraquinonas presentes em sua composição. Assim, extrato bruto e sua fração hexânica também foram selecionados para os demais ensaios celulares.

A comparação das antraquinonas citotóxicas revelou que emodina, no ensaio de SRB, apresentou maior toxicidade sobre a linhagem celular tumoral C33-A e linhagens normais HaCaT e MCF-10a; enquanto a fisciona apresentou maior toxicidade sobre SiHa e HSC-3 tumorais. Entretanto, nos ensaios mais sensíveis (ensaio citomorfológico de exclusão por fluorocromos e anexina-V), emodina foi mais efetiva do que fisciona na indução de morte celular, com menor viabilidade celular em todas as linhagens. Nenhuma das antraquinonas promoveu a ativação da caspase-3 nas concentrações analisadas.

O tipo de morte celular predominante após o tratamento com emodina foi misto, com presença de apoptose precoce, tardia e necrose, em ambos os ensaios; contudo, o ensaio de anexina-V foi mais sensível na detecção de morte celular. Esta antraquinona tem sido amplamente estudada na literatura, tanto em linhagens tumorais quanto em células normais.

Em células tumorais de pulmão, A549, H460 e CH27, emodina a 10 μ M foi capaz de inibir o crescimento celular após 48h de tratamento. Neste mesmo estudo, a concentração de 50 μ M induziu morte por apoptose, com fragmentação do DNA, verificada pelo ensaio do TUNEL, após 48h de tratamento, e ativação das caspases 2, 3 e 9, após 12h de tratamento na linhagem A549 (SU et al., 2005). A emodina também foi capaz de induzir morte celular dependente de caspases em células cervicais tumorais Bu 25TK (SRINIVAS et al., 2003); carcinoma hepatocelular, SMMC-7721 (LIN et al., 2016) e HepG2 (CUI et al., 2016).

A fisciona também apresentou elevado grau de citotoxicidade pelos ensaios mais sensíveis, embora ligeiramente menos efetiva que emodina, com morte celular mista em todas as linhagens analisadas, também sem ativação de caspase-3. Alguns trabalhos demonstram o efeito citotóxico de fisciona dependente de caspases e com interrupção do ciclo celular, em células de câncer cervical, HeLa (WIJESEKARA et al., 2014), cancer colorretal, SW620 (HAN et al., 2016), cancer de mama, MDA-MB-231 (HONG et al., 2014). Além de estudos com a aglicona fisciona, uma forma glicosilada, fisciona 8-O- β glicopiranosídeo, também tem sido descrita por sua atividade citotóxica em HepG2, A549 e células de melanoma humano (HEM) (WANG et al., 2016; ZHANG et al., 2016; XIE e YANG, 2014).

A maior parte dos trabalhos encontrados na literatura associa o efeito tóxico de emodina e fisciona com o aumento intracelular de ERON, promovendo assim a desregulação do potencial de membrana mitocondrial e ativação de morte celular. Emodina promoveu o aumento nas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em todas as linhagens analisadas, enquanto fisciona não induziu este aumento somente na linhagem HSC-3. Além disso, nas linhagens SiHa e C33-A, o tratamento com essas antraquinonas promoveu um aumento significativo de danos ao DNA, observado no ensaio de micronúcleo. Estes dados

sugerem que a possível formação do radical semiquinona, a partir da interação com ERON endógenas, pode ser um dos mecanismos da ação citotóxica destas amostras, uma vez que foram capazes de capturar, em ensaios químicos, tais espécies. Além disso, a melhor capacidade de captura apresentada por emodina em relação a fisciona pode corroborar sua melhor atividade citotóxica, assumindo que maior quantidade de semiquinona intracelular seja formada a partir do tratamento com emodina. Torna-se importante ponderar com estes dados o estudo de Su et al. (2005), onde o pré-tratamento das células A549 com ácido ascórbico e N-acetil cisteína suprimiu os efeitos citotóxicos da emodina.

Tem sido demonstrado que a fisciona 8-O- β glicopiranosídeo promove o aumento de ERON em células HepG2, que levam à ativação da proteína quinase ativada por AMP (AMPK), resultando em *down-regulation* da enzima DNA metil transferase 1 (DNMT1) via inibição do fator de transcrição Sp1. A DNMT1 é responsável pela metilação do DNA e sua elevada expressão tem sido reportada como causa do silenciamento de alguns genes supressores de tumores, em vários tipos de carcinomas (WANG et al., 2016).

Em condições de estresse oxidativo, determinadas biomoléculas são alvos relevantes das ERON, como o DNA, por exemplo. Danos ao DNA são reparados pela enzima PARP-1, que se liga à fita danificada para sintetizar poli ADP-ribose sobre proteínas envolvidas no reparo do DNA, utilizando NAD^+ no processo. Quando o dano é limitado, o DNA pode ser restaurado e os níveis de NAD^+ são regenerados utilizando ATP, entretanto, se o dano não é reparado, as células morrem por apoptose, neste caso por via dependente de caspases.

Por outro lado, quando os danos são extensos, a frequente ativação de PARP-1 esgota os estoques de NAD^+ e ATP, e as células não ativam a via das caspases (que são dependentes de ATP), e ocorre morte por necrose (BARITAUD et al., 2010). Assim, a morte independente de caspase-3 observada pode estar relacionada a ativação excessiva de PARP-1, uma vez que aumento no estresse oxidativo e danos ao DNA foram constatados após o tratamento com as antraquinonas.

Deve-se observar ainda, para a linhagem SiHa, que os níveis de BAX estavam menores tratamento com EERs em todas as concentrações analisadas, e esta diminuição pode estar relacionada com morte celular induzida por autofagia, uma vez que uma diminuição nos moduladores apoptóticos, como BAX, está associada à morte celular autofágica, que ocorre via ativação de catepsinas, de maneira independente de caspases. Esta mesma analogia pode ser aplicada para a diminuição nos níveis de caspase-3, como foi observado para as linhagens C33-A (emodina) e HaCaT (fisciona) (GALLUZZI et al., 2012).

Alterações na cascata de sinalização PI3K/AKT têm sido citadas como uma importante adaptação das células tumorais para manterem seu *status* de elevada proliferação, e consequente sobrevivência; aumento na fosforilação de AKT em vários tipos tumorais tem sido reportado (SADEGHI et al., 2012). Quando os níveis de fosforilação de AKT (serina-473) foram analisados, observou-se que a emodina foi capaz de promover redução na ativação de AKT, em pelo menos uma das três concentrações analisadas, em todas as linhagens tumorais, sendo mais efetiva em HSC-3, seguida de C33-A e por fim em SiHa, sem promover alterações significativas em linhagem normal (HaCaT). Portanto, embora não tenham sido observadas diferenças na citotoxicidade entre as linhagens normais *versus* tumorais, a emodina não foi capaz de alterar a via PI3K/AKT na linhagem normal. Corroborando nossos resultados, tem sido descrito que a emodina é capaz de promover diminuição na fosforilação de ERK e AKT em células A549 (SU et al., 2005), SMMC-7721 (LIN et al., 2016) e HepG2 (CUI et al., 2016).

A fisciona não promoveu alterações significativas nos níveis de fosforilação de AKT nas linhagens de carcinoma de colo uterino, SiHa e C33-A, mas foi capaz de reduzir significativamente a ativação de AKT nas linhagens HSC-3, nas duas menores concentrações, e HaCaT, na menor concentração. Curiosamente, nestas linhagens, o tratamento com fisciona provoca um efeito dose-dependente inverso, sendo que o nível de fosforilação de AKT parece aumentar de maneira a acompanhar o aumento da concentração. Para emodina, o efeito observado tende a diminuir com o aumento de sua concentração.

Estudos recentes têm demonstrado que emodina é capaz de restaurar os níveis de fosforilação da AKT em células expostas ao estresse, entretanto, em concentrações comprovadamente não citotóxicas. Ahn e colaboradores (2016) demonstraram que o tratamento com emodina, em concentrações não citotóxicas, exerce efeito neuroprotetor contra apoptose induzida por glutamato em cultura de células neuronais e em camundongos, via aumento nos níveis de fosforilação de AKT. Emodina também foi capaz de promover inibição da apoptose e autofagia induzidas por TNF- α em mioblastos (C2C12) pelo aumento da ativação (fosforilação) da AKT, também em concentrações não citotóxicas (CHEN et al., 2016).

A via PI3K/AKT está intimamente associada aos sinais proliferativos desencadeados por mTOR. Esta proteína atua sob a forma de dois complexos proteicos: mTORC1, que é ativado via fosforilações *downstream* AKT (após sua ativação via fosforilação em Thr-308), e mTORC2, que funciona como ativador da AKT, promovendo sua fosforilação na Ser-473 (SHIMOBAYASHI; HALL, 2014). Toda esta cascata de ativações depende da formação de PIP3 (por ação de PI3K), que proporciona geração dos pontos de ancoramento na membrana plasmática, permitindo assim a ativação da via; o principal regulador desta via é PTEN, que

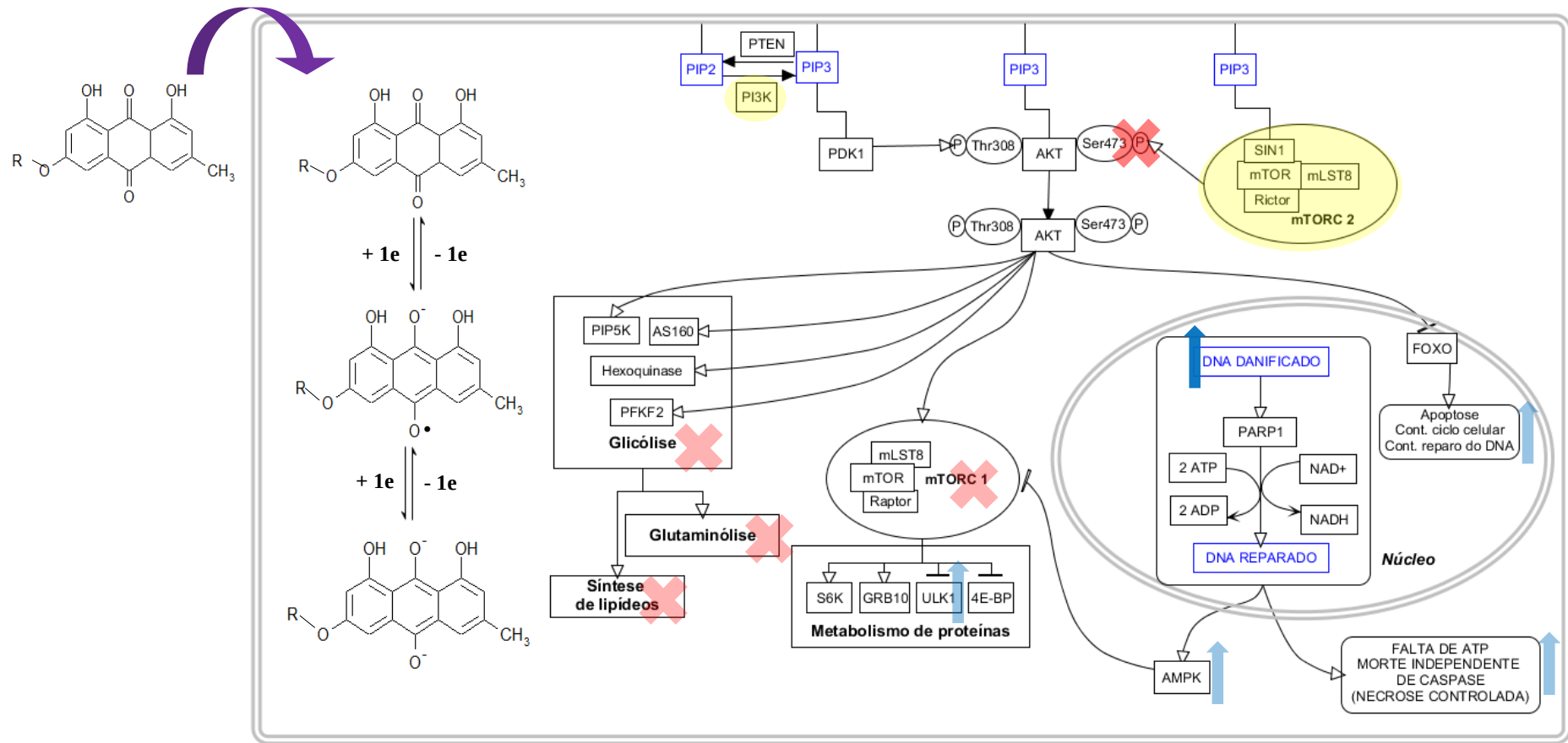
promove a defosforilação de PIP3 (SHIMOBAYASHI; HALL, 2014). Sabe-se que a linhagem C33-A possui uma mutação na subunidade catalítica da PI3K, que resulta em uma maior atividade de PI3K e consequente maior ativação de AKT (comprovada *in vitro*), além de mutação em PTEN, que induz um stop códon prematuro no gene, causando a ausência de expressão desta proteína, aumentando ainda mais a atividade da PI3K e AKT (RASHMI et al., 2014). Desta maneira, podemos sugerir que os principais alvos de emodina e fisciona que culminaram na redução dos níveis de fosforilação da AKT sejam mTORC2 e/ou PI3K. De fato, dados da literatura demonstram que aloe-emodina, uma antraquinona que também apresenta semelhança estrutural com emodina e fisciona, é capaz de se ligar ao complexo mTORC2 em células de câncer de próstata (PC3) e inibir sua atividade (LIU et al., 2012).

A indução da produção excessiva de ERON pode promover a depleção dos estoques celulares de ATP, uma vez que os sistemas redox GSH e Trx necessitam de ATP e NADPH para sua regeneração. A AMPK (proteína quinase dependente de AMP) é sensível a variações nas concentrações de AMP, e aumentos nestas concentrações promovem sua ativação, estimulando vias catabólicas, e ao mesmo tempo inibindo vias anabólicas, como a redução da síntese proteica via inibição de mTORC1. Ainda, a inibição de mTORC1 aumenta processo autofágico que, pode induzir morte celular independente de caspases (CARDACI et al., 2012). Desta maneira, as antraquinonas e o extrato bruto de *R. sphaerosperma* var. *pubescens* podem atuar também na inibição deste complexo, impedindo a continuação da proliferação e crescimento celular.

Neste trabalho, foram ainda realizados estudos computacionais de *docking* (Anexo II), para avaliação de interação das antraquinonas (e suas respectivas hidroquinonas) com mTOR, um possível alvo molecular das antraquinonas. Aloe-emodina foi utilizada como estrutura controle, por sabidamente atuar sobre mTOR. Os resultados estão apresentados no anexo II. Este estudo demonstrou que não existem diferenças na interação das antraquinonas e hidroquinonas com as proteínas analisadas, uma vez que apresentaram valores de energia muito semelhantes. Os alvos de mTOR estudados foram Ser-2481 (resíduo importante para a formação de mTORC2), Ser-2448 e Ser-1261 (formação de mTORC1 e 2) (TCHEVKINA E KOMELKOV, 2012). A molécula controle apresentou melhor atividade sobre os sítios de mTOR, entretanto, fisciona, emodina e suas respectivas hidroquinonas, (com exceção da hidroquinona da fisciona na Ser-2481), também apresentaram energias favoráveis, indicando a possível interação desses compostos com os resíduos de aminoácidos importantes para a formação dos complexos ativados. Interações destas moléculas com o resíduo Thr-308 da AKT também foram investigados via *docking*, visto que não foi possível seu estudo experimental.

Todas as moléculas apresentaram energia de interação favorável com este resíduo em AKT, indicando que este também pode ser um alvo para as antraquinonas, entretanto, dados experimentais devem ser obtidos para esta comprovação.

Figura 41. Mecanismo de morte celular induzido pelas antraquinonas emodina e fisciona.



Legenda: O ambiente oxidativo intracelular promove a conversão das antraquinonas (emodina, R=H e fisciona, R=OCH₃) na sua forma semiquinona, capaz de induzir danos oxidativo em macromoléculas, como o DNA, causando a ativação de enzimas de reparo, como PARP1, e consequentemente, aumentando o consumo de ATP (dados verificados pelos ensaios de TBARS e micronúcleo). As antraquinonas também promoveram a diminuição dos níveis de fosforilação da AKT na serina 473, o que provoca a diminuição de vias que estimulam a sobrevivência e proliferação celular, com o aumento do controle do ciclo celular e reparo do DNA e vias de morte celular por maior ativação dos fatores de transcrição da família FOXO. Ainda este estado de intenso consumo de ATP provoca a ativação de AMPK, que atua inibindo vias anabólicas e ativando vias catabólicas. Desta maneira, o estresse oxidativo amplificado pela presença das antraquinonas associado a inibição da ativação da AKT culminam na perda do perfil metabólico de sobrevivência tumoral e indução de morte celular, via apoptose e necrose controlada.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo utilizou extrato, frações e três antraquinonas isoladas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* em relação aos seus efeitos antioxidantes “in vitro”, bem como sobre células em células tumorais de colo uterino (com genoma do vírus HPV –SiHa, e sem – C33-A), e carcinoma oral de células escamosas (HSC-3) em cultura para avaliar o tipo de morte celular, atividade quimiopreventiva e potencial mutagênico.

De maneira geral, as antraquinonas, o extrato bruto de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* e suas frações apresentaram boa atividade antioxidante sobre as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio avaliadas, com exceção do peróxido de hidrogênio.

O crisofanol não foi citotóxico, e por isso sua capacidade de indução sobre a atividade de enzima quinona-redutase foi avaliada, e neste ensaio também não foi eficiente.

O extrato bruto de *R. sphaerosperma* var. *pubescens*, sua fração hexânica e as antraquinonas fisciona e emodina promoveram morte celular mista, por apoptose e necrose, independente de caspases.

Emodina e fisciona promoveram aumento nas espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) nas linhagens analisadas, além do aumento significativo de danos ao DNA sobre as linhagens SiHa e C33-A, sugerindo-se a formação do radical semiquinona, a partir de sua interação com EROs endógenas, como um dos mecanismos de ação citotóxico destas amostras, e responsável pela morte celular mista sem ativação de caspases.

Estas antraquinonas também promoveram redução nos níveis de fosforilação da AKT, indicando a supressão da via PI3K/AKT, importante para a sobrevivência e proliferação tumorais. A partir dos dados obtidos, podemos inferir que os principais alvos responsáveis por esta supressão sejam mTORC2 e/ou PI3K, entretanto, estudos ulteriores são necessários para comprovar as ações sobre estes alvos.

REFERÊNCIAS

- AHN, M.S., et al. Emodin from *Polygonum multiflorum* ameliorates oxidative toxicity in HT22 cells and deficits in photothrombotic ischemia. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 188, p.13–20, 2016.
- ALBERGHINA, L.; GAGLIO, D. Redox control of glutamine utilization in cancer. **Cell Death and Disease**. V. 5, p.1-9, 2014.
- AMMAR, R.B. et al. Anti-lipid peroxidation and induction of apoptosis in the erythroleukaemic cell line K562 by extracts from (Tunisian) L. (Rhamnaceae). **Natural Product Research**. V. 25 (11), p. 1047–1058, 2011.
- AMMAR, R.B. et al. Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1, nifuroxazide, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. **Chemico-Biological Interactions**. V.174, p.1–10, 2008.
- ARNHOLD, J. Free radicals – friends or foes? Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry** (Moscow), V.69 (1), p.4-9, 2004. **Translated from Biokhimiya**, V.69 (1), p.8-15, 2004.
- BARITAUD, M.; et al. Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. **Cell Cycle**. V.16, p.3166-3173, 2010.
- BHOURI, W.; et al. Induction of apoptosis in human lymphoblastoid cells by kaempferol 3-O-b-isorhamninoside and rhamnocitrin 3-O-b-isorhamninoside from *Rhamnus alaternus* L. (Rhamnaceae). **Cell Proliferation**. V.44, p. 283–290, 2011.
- BLAGOSKLONNY, M.V. Carcinogenesis, cancer therapy and chemoprevention. **Cell death and differentiation**. V.12, p.592–602, 2005.
- BLAGOSKLONNY, M.V. Prospective strategies to enforce selectively cell death in cancer cells. **Oncogene**. V.23, p.2967–2975, 2004.
- BLAGOSKLONNY, M.V. Target for cancer therapy: proliferating cells or stem cells. **Leukemia**. V.20, p.385–391, 2006.
- BOROUGHES, L.K.; DEBERARDINIS, R.J. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. **Nature Cell Biology**. V. 17 (4), p. 351-359, 2015.
- BORS, W.; MICHEL, C.; SARAN, M. Inhibition of the bleaching of the carotenoid crocin a rapid test for quantifying antioxidant activity. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 796, p. 312-319, 1984.
- BRESTEL, E.P. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. V.126 (1), p. 482-488, 1985.
- CAIRNS, R.A.; HARRIS, I.S.; MAK, T.W. Regulation of cancer cell metabolism. **Nature Reviews/Cancer**. V.11, p. 572-583, p. 85-95, 2011.

CARDACI, S.; FILOMENI, G.; CIRIOLO, M.R. Redox implications of AMPK-mediated signal transduction beyond energetic clues. **Journal of Cell Science**. V.125, p.2115–2125, 2012.

CHEN, D.; et al. Emodin attenuates TNF- α -induced apoptosis and autophagy in mouse C2C12 myoblasts through the phosphorylation of Akt. **International Immunopharmacology**. V.34, p.107–113, 2016.

CHING, T.L.; DE JONG, J.; BAST, A. A method for screening hypochlorous acid scavengers by inhibition of the oxidation of 5-thio-2-nitrobenzoic acid: application to anti-asthmatic drugs. **Analytical Biochemistry**. V.218, n.2, p.377–381, 1994.

CIANCIO, G.; POLLACK, A.; TAUPIER, M.A.; BLOCK, N.L.; IRVIN, G.L. Measurement of cell-cycle phase-specific cell death using Hoechst 33342 and propidium iodide: preservation by ethanol fixation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. V.36 (9), p.1147–52, 1988.

CUI, Y.; et al. Involvement of PI3K/Akt, ERK and p38 signaling pathways in emodin mediated extrinsic and intrinsic human hepatoblastoma cell apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**. V.92, p. 26–37, 2016.

DUARTE, R.A.; MELLO, E.R.; ARAKI, C.; BOLZANI, V.S.; SILVA, D.H.S. REGASINI, L.O.; SILVA, T.G.A.; MORAIS, M.C.C.; XIMENES, V.F.; SOARES, C.P. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. **Tumor Biology**. V.31, P.513–522, 2010.

DYPBUKT, J.M.; BISHOP, C; BROOKS, W.M.; THONG, B.; ERIKSSON, H.; KETTLE, A. J. A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase. **Free Radical Biology & Medicine**. v.39, p. 1468 – 1477, 2005.

EARNSHAW, W.C.; MARTINS, L.M.; KAUFMANN, S.H. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. **Annual Review of Biochemistry**. V. 68, p.383–424, 1999.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**. V. 455, p. 81–95, 2000.

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

GOULART, M.O.F.; et al., Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions. **Bioelectrochemistry**. V.59, P.85– 87, 2003.

HAAN C, BEHRMANN I. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. **Journal of immunological methods**. V.10;318(1-2), p. 11–9, 2007.

HAMANAKA, R.B.; CHANDEL, N.S. Targeting glucose metabolism for cancer therapy. **Journal of Experimental Medicine** V. 209 (2), p. 211-215, 2012.

HAN, Y. et al. Physcion inhibits the metastatic potential of human colorectal cancer SW620 cells in vitro by suppressing the transcription factor SOX2. **Acta Pharmacologica Sinica**. V.37, p.264–275, 2016.

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

HASHIMOTO, Y.; SHIMADA, Y.; ITAMI, A. et al. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**. V.39 (15), p. 2239-2246, 2003.

HAZRA, B.; BISWAS, S.; MANDAL, N. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. V.8 (63), p.1-10, 2008.

HEIDEN, M.G.V.; CANTLEY, L.C.; THOMPSON, C.B. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. **Science**. V.324, p. 1029-1033, 2009.

HONG, J.; et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by physcion, an anthraquinone isolated from rhubarb (rhizomes of *Rheum tanguticum*), in MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Journal of Cancer Prevention**. V.19 (4), p. 273-278, 2014.

IGNEY, F.H.; KRAMMER, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nature Reviews Cancer**. V. 2, p.277-288, 2002.

IZHAKI, I. Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. **New Phytologist**. V.155, p. 205–217, 2002.

JONES, R.G.; THOMPSON, C.B. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. **Genes and Development**. V.23, p.537-548, 2009.

KANG, Y.-H.; PEZZUTO, JOHN M. Induction of quinone reductase as a primary screen for natural product anticarcinogens. **Methods in Enzymology**. V. 382, p. 380–414, 2004.

KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Assays for the Chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods Enzymology** V.233, p.502-512, 1994.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; HOCEVAR, B.A. Oxidative Stress and Oxidative Damage in Carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**. V.38, p.96-109, 2010.

KOLLAREDDY, M. et al. Regulation of nucleotide metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities. **Nature Communications**. V.6 (7389), p. 1-13, 2015.

KOOPMAN, G.; REUTELINGSPERGER, C.P.; KUIJTEN, G.A.; KEEHNEN, R.M.; PALS, S.T.; VAN OERS, M.H. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood**. V.84, p.1415-1420, 1994.

KREUZALER, P.; WATSON, C.J. Killing a cancer: what are the alternatives? **Nature Reviews Cancer**. V.12, p.411-424, 2012.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. V.227, p.680-685, 1970.

LIN, W.; et al. Emodin induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis through MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in vitro and in vivo. **Oncology reports**. V.36, p. 961-967, 2016.

LIU, J.; WANG, Z. Increased Oxidative Stress as a Selective Anticancer Therapy. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. V. 2015, p. 1-12, 2015.

LIU, K.; et al. Aloe-emodin suppresses prostate cancer by targeting the mTOR complex 2. **Carcinogenesis**. V. 33 (7), p. 1406–1411, 2012.

LIU, P.; CHENG, H., ROBERTS, T.M.; ZHAO, J.J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. **Nature reviews/Drug Discovery**. V.8, p.627-644, 2009.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**. V.193(1), p. 265-275, 1951.

MANET, I.; MANOLI, F.; ZAMBELLI, B.; et al. Complexes of the antitumoral drugs Doxorubicin and Sabarubicin with telomeric G-quadruplex in basket conformation: ground and excited state properties. **Photochemistry Photobiological Sciences**. V.10, p.1326–1337, 2011.

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

MARNETT, L.J.; RIGGINS, J.N.; WEST, J.D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein. **Journal of Clinical Investigation**. V.111, p.583-593, 2003.

MOREIRA, T.F. **Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. (Rhamnaceae)**. Curitiba, 2012. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná.

MOREIRA, T.F; OLIVEIRA, D.M.S.; ARRUDA, M.F.C.; et al. Lipid peroxidation inhibition by ethanolic extract and fractions from *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (Reissek) M.C. Johnst. (Rhamnaceae). **International Journal of Phytomedicine**. V. 5 (2), p.136-140, 2013.

NEIDLE, S.; THURSTON, D.E. Chemical approaches to the discovery and development of cancer therapies. **Nature Reviews Cancer**. V.5, p.285-296, 2005.

NG, L-T.; LIN, C-C.; LU, C-M. Antioxidative effects of 6-Methoxysorigenin and Its Derivatives from *Rhamnus nakaharai*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. V.55(3), p.382-384, 2007.

NIKOLETOPOULOU, V.; MARKAKI, M.; PALIKARAS, K.; TAVERNARAKIS, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Bioquímica et biophysica acta**. V. 1833, p.3448-3459, 2013.

NOGUTI, J.; ANDERSEN, M.L.; CIRELLI, C.; RIBEIRO, D.A. Oxidative stress, cancer, and sleep deprivation: is there a logical link in this association? **Sleep Breath**. 2013.

PEREZ, R.P.; et al. A Comparison of Clonogenic, Microtetrazolium and Sulforhodamine B Assays for Determination of Cisplatin Cytotoxicity in Human Ovarian carcinoma Cell Lines. **European Journal of Cancer**. V. 29A (3), p 395-399,1993.

RASHMI et al. AKT Inhibitors Promote Cell Death in Cervical Cancer through Disruption of mTOR Signaling and Glucose Uptake. **Plos One**. V.9 (4), p. 1-12, 2014.

SADEGHI, N.; GERBER, D.E. Targeting the PI3K pathway for cancer therapy. **Future Medicinal Chemistry**. V. 4(9), p. 1153–1169, 2012.

SCOTTI, L. et al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. V. 43(2), 2007.

SHIBAI-OGATA, A.; et al. Evaluation of high-throughput screening for in vitro micronucleus test using fluorescence-based cell imaging. **Mutagenesis**. V. 26 (6), p.709–719, 2011.

SHIMOBAYASHI, M.; HALL, M.N. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. **Nature reviews: molecular cell biology**. V.15, p. 155-162, 2014.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**. V. 82 (13), p. 1107–1112, 1990.

SOUSA, E.T.; et al. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Química Nova**. V. 39 (4), p. 486-495, 2016.

SPARKS, C.A.; GUERTIN, D.A. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. **Oncogene**. V.29, p. 3733–3744, 2010.

SRINIVAS, K.P.; et al. DEPTOR promotes survival of cervical squamous cell carcinoma cells and its silencing induces apoptosis through downregulating PI3K/AKT and by up-regulating p38 MAP kinase. **Oncotarget**. V. 7 (17), p. 24154- 24171, 2016.

SU, Y-T., et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. **Biochemical Pharmacology**. V.70, p.229–241, 2005.

TABOLACCI, C.; LENTINI, A.; MATTIOLI, P. et al. Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16–F10 melanoma cells. **Life Sciences**. V.87, p.316–324, 2010.

TCHEVKINA, E.; KOMELKOV, A. Protein Phosphorylation as a Key Mechanism of mTORC1/2 Signaling Pathways. In: HUANG, C. (Ed.) **Protein Phosphorylation in Human Health**. Rijeka, Croatia: InTech, 2012. Cap. 1. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/48274>.

TERENCIO, M.C.; SANZ, M.J.; PAYA, M. Antihypertensive action of a procyanidin glycoside from *Rhamnus lycioides*. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 31, p. 109–114, 1991.

TICE, R. R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. V.35 (3), p. 206–221, 2000.

TOWBIN, H., STAHELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. V.76(9), p.4350–4354, 1979.

VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in câncer. **Redox Biology**. V. 6, p.334–343, 2015.

VOIGT, W. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. **Methods in Molecular Medicine**. V. 110, p. 39–48, 2005.

WANG, Q.; et al. Physcion 8-O- β -glucopyranoside induces apoptosis, suppresses invasion and inhibits epithelial to mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. V.83, p.372–380, 2016.

WATANABE, N.; FORMAN, H.J. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. V. 411(1), p.145–157, 2003.

WEI, B-L.; LU, C-M.; TSAO, L-T.; WANG, J-P.; LIN, C-N. In Vitro Anti-Inflammatory Effects of Quercetin 3-O-Methyl Ether and Other Constituents from *Rhamnus* Species. **Planta Medica**. V. 67, 2001.

WIJESEKARA, I.; et al. Physcion from marine-derived fungus *Microsporium* sp. induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. **Microbiological Research**. V.169, p.255–261, 2014.

XIE, Q.; YANG, Y. Anti-proliferative of physcion 8-O- β -glucopyranoside isolated from *Rumex japonicas* Houtt. on A549 cell lines via inducing apoptosis and cell cycle arrest. **Complementary and Alternative Medicine**. V. 14 (377), p.1-10, 2014.

YEN, G. C.; LAI, H. H.; CHOU, H. Y. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. **Food Chemistry**. V. 74, p. 471-478, 2001.

ZAMRI, N.D.; et al. Antioxidative Effects of Germinated Brown Rice-Derived Extracts on H₂O₂-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. V.2014, p. 1-112, 2014.

ZGLICZYNSKI, J.M.; et al. Cholaramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 235, p. 419-424, 1971.

ZHANG, D.; et al. Upregulation of miR-124 by physcion 8-O- β -glucopyranoside inhibits proliferation and invasion of malignant melanoma cells via repressing RLIP76. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. V.84, p.166–176, 2016.

ZHANG, X.; et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. **Biochimica et Biophysica Acta**. V. 1813, p. 1978-1986, 2011.

ZHAO, Y.; BUTLER, E.B.; TAN, M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. **Cell Death and Disease**. V. 4, p.1-10; 2013.

ANEXO I

Tabela 1. Ensaio citomorfológico de viabilidade celular por exclusão com fluorocromos: Hoechst, iodeto de propídeo e diacetato de fluoresceína.

SiHa					
	Concentração (µg/mL)	Células viáveis (%)	Apoptose precoce (%)	Apoptose tardia (%)	Necrose (%)
DMSO	0,50%*	88,89 ± 0,95	6,17 ± 0,72	0,88 ± 0,13	4,054 ± 0,54
Doxorrubicina	50 (90 µM)	0,25 ± 0,11	15,22 ± 1,16	16,93 ± 0,87	67,6 ± 1,59
Curcumina	53 (100 µM)	6,932 ± 1,25	0,40 ± 0,39	46,03 ± 2,46	46,64 ± 2,48
EERs	25	64,45 ± 3,07	17,84 ± 1,58	2,486 ± 0,23	15,23 ± 1,86
	50	26,38 ± 2,40	11,66 ± 0,99	9,16 ± 1,01	52,81 ± 2,44
	100	0,35 ± 0,076	0,28 ± 0,08	57,8 ± 1,07	41,56 ± 1,06
HFRs	25	68,11 ± 3,58	5,796 ± 0,53	2,81 ± 0,33	23,29 ± 3,25
	50	60,52 ± 3,56	7,018 ± 1,02	3,32 ± 0,30	29,14 ± 3,02
	100	6,89 ± 1,31	0,36 ± 0,14	52,06 ± 1,75	40,69 ± 1,69
Emodina	12,5 (46,3 µM)	82,67 ± 1,24	3,54 ± 0,55	3,99 ± 0,30	9,806 ± 0,81
	25 (92,5 µM)	53,05 ± 1,57	14,08 ± 1,99	12,25 ± 1,08	20,61 ± 1,26
	50 (185,0 µM)	31,39 ± 2,03	12,54 ± 1,57	24,87 ± 1,23	31,21 ± 1,24
Fisciona	12,5 (43,8 µM)	89,22 ± 0,62	3,42 ± 0,28	1,57 ± 0,16	5,793 ± 0,46
	25 (87,5 µM)	73,59 ± 1,54	8,08 ± 0,59	4,73 ± 0,48	13,6 ± 1,18
	50 (175,0 µM)	53,01 ± 1,58	12,27 ± 0,86	10,82 ± 0,74	23,9 ± 1,20

(* = DMSO 0,5% - v/v)

C33-A					
	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Células viáveis (%)	Apoptose precoce (%)	Apoptose tardia (%)	Necrose (%)
DMSO	0,50%*	$88,75 \pm 1,74$	$2,794 \pm 0,57$	$0,481 \pm 0,19$	$7,97 \pm 1,37$
Doxorrubicina	50 (90 μM)	0 ± 0	$0,463 \pm 0,46$	$26,04 \pm 7,06$	$73,5 \pm 7,00$
Curcumina	53 (100 μM)	$18,74 \pm 3,24$	$8,341 \pm 3,09$	$2,647 \pm 1,22$	$70,27 \pm 4,12$
EERs	25	$31,49 \pm 2,01$	$51,85 \pm 2,23$	$0,974 \pm 0,25$	$15,69 \pm 1,98$
	50	$2,585 \pm 0,63$	$31,37 \pm 2,91$	$6,508 \pm 1,04$	$59,54 \pm 2,95$
	100	$1,266 \pm 0,88$	$0,48 \pm 0,22$	$14,05 \pm 1,48$	$84,21 \pm 1,83$
HFRs	25	$47,89 \pm 3,70$	$7,553 \pm 1,33$	$2,593 \pm 0,74$	$41,96 \pm 3,90$
	50	$28,71 \pm 2,33$	$11,07 \pm 3,03$	$3,933 \pm 0,92$	$56,28 \pm 3,43$
	100	$1,889 \pm 1,04$	$0,334 \pm 0,33$	$8,877 \pm 2,30$	$88,9 \pm 2,44$
Emodina	12,5 (46,3 μM)	$57,15 \pm 2,32$	$8,39 \pm 0,95$	$1,892 \pm 0,55$	$32,57 \pm 2,15$
	25 (92,5 μM)	$29,44 \pm 2,58$	$7,062 \pm 1,40$	$1,805 \pm 0,58$	$61,7 \pm 2,98$
	50 (185,0 μM)	$30,41 \pm 2,40$	$8,218 \pm 1,84$	$4,624 \pm 1,22$	$56,75 \pm 2,70$
Fisciona	12,5 (43,8 μM)	$69,87 \pm 3,02$	$10,11 \pm 1,66$	$0,734 \pm 0,27$	$19,28 \pm 3,15$
	25 (87,5 μM)	$62,57 \pm 2,68$	$6,227 \pm 1,25$	$2,34 \pm 0,60$	$28,86 \pm 2,12$
	50 (175,0 μM)	$26,74 \pm 3,28$	$5,279 \pm 2,11$	$1,809 \pm 0,87$	$66,17 \pm 3,55$

(* = DMSO 0,5% - v/v)

HSC-3					
	Concentração (µg/mL)	Células viáveis (%)	Apoptose precoce (%)	Apoptose tardia (%)	Necrose (%)
DMSO	0,50%*	78,77 ± 1,91	6,513 ± 0,56	4,411 ± 0,45	10,24 ± 1,36
Doxorrubicina	50 (90 µM)	2,419 ± 0,74	13,71 ± 2,36	36,52 ± 2,99	45,26 ± 3,25
Curcumina	53 (100 µM)	1,199 ± 0,33	75,7 ± 2,38	20,33 ± 2,27	2,77 ± 0,41
EERs	25	53,71 ± 1,42	37,09 ± 1,32	3,725 ± 0,49	5,38 ± 0,68
	50	34,38 ± 1,19	49,93 ± 1,38	5,768 ± 0,70	9,815 ± 1,05
	100	12,22 ± 1,15	50,86 ± 3,27	18,59 ± 2,66	18,13 ± 1,62
HFRs	25	76,48 ± 1,35	15,31 ± 1,00	3,028 ± 0,46	5,023 ± 0,72
	50	60,52 ± 2,67	19,94 ± 1,78	6,921 ± 0,80	12,53 ± 1,62
	100	45,8 ± 2,86	26,98 ± 1,88	10,14 ± 1,62	16,96 ± 2,13
Emodina	12,5 (46,3 µM)	80,61 ± 1,24	7,064 ± 0,73	3,878 ± 0,52	8,43 ± 0,71
	25 (92,5 µM)	73,27 ± 1,69	7,637 ± 0,73	4,396 ± 0,66	14,6 ± 1,22
	50 (185,0 µM)	48,67 ± 3,11	6,982 ± 0,90	16,13 ± 1,86	28,22 ± 2,19
Fisciona	12,5 (43,8 µM)	78,89 ± 1,55	11,25 ± 1,12	3,646 ± 0,44	6,115 ± 0,85
	25 (87,5 µM)	76,96 ± 1,59	13,51 ± 1,25	3,204 ± 0,53	6,181 ± 0,72
	50 (175,0 µM)	67,81 ± 2,39	16,69 ± 1,36	4,043 ± 0,86	11,37 ± 1,42

(* = DMSO 0,5% - v/v)

HaCaT					
	Concentração (µg/mL)	Células viáveis (%)	Apoptose precoce (%)	Apoptose tardia (%)	Necrose (%)
DMSO	0,50%*	78,25 ± 1,61	16,75 ± 1,26	1,454 ± 0,23	3,395 ± 0,72
Doxorrubicina	50 (90 µM)	1,952 ± 0,81	5,58 ± 1,26	28,99 ± 2,29	63,48 ± 2,74
Curcumina	53 (100 µM)	1,162 ± 0,41	45,05 ± 2,14	21,61 ± 1,12	32,18 ± 1,65
EERs	25	51,03 ± 2,52	23,6 ± 2,27	3,147 ± 0,49	22,22 ± 3,34
	50	23,51 ± 1,92	41,39 ± 3,75	3,305 ± 0,45	31,8 ± 4,45
	100	3,295 ± 0,51	35,83 ± 4,59	8,734 ± 0,66	52,12 ± 4,40
HFRs	25	70,29 ± 1,46	17,49 ± 1,36	2,508 ± 0,43	9,561 ± 1,43
	50	58,55 ± 2,49	22,26 ± 1,89	2,427 ± 0,33	16,62 ± 2,13
	100	48,3 ± 2,74	22,68 ± 2,13	7,092 ± 0,80	21,88 ± 1,89
Emodina	12,5 (46,3 µM)	67,43 ± 2,62	13,94 ± 0,68	3,69 ± 0,53	14,89 ± 2,29
	25 (92,5 µM)	57,37 ± 2,84	18,38 ± 1,10	6,291 ± 1,08	17,94 ± 2,40
	50 (185,0 µM)	37,89 ± 2,35	30,02 ± 2,35	7,026 ± 0,64	25,06 ± 1,88
Fisciona	12,5 (43,8 µM)	72,74 ± 2,15	19,11 ± 1,87	1,339 ± 0,25	6,725 ± 1,68
	25 (87,5 µM)	64,81 ± 2,68	21,49 ± 1,89	4,459 ± 0,63	9,146 ± 0,91
	50 (175,0 µM)	68,11 ± 2,42	19,53 ± 1,36	3,25 ± 0,39	9,075 ± 1,10

(* = DMSO 0,5% - v/v)

Tabela 2. Ensaio de morte celular por anexina-V

SiHa					
	Concentração (µg/mL)	Células viáveis (%)	Apoptose precoce (%)	Apoptose tardia (%)	Necrose (%)
DMSO	0,50%*	87,23 ± 1,51	5,391 ± 0,62	4,854 ± 0,92	1,99 ± 1,58
Doxorrubicina	50 (90 µM)	0 ± 0	0 ± 0	23,57 ± 2,02	76,43 ± 2,02
Curcumina	53 (100 µM)	0 ± 0	0 ± 0	98,94 ± 0,74	1,064 ± 0,74
EERs	25	1,051 ± 0,31	0 ± 0	14,1 ± 1,39	84,85 ± 1,45
	50	0 ± 0	0,05 ± 0,057	39,57 ± 2,84	60,37 ± 2,84
	100	0 ± 0	0 ± 0	26,01 ± 1,87	73,99 ± 1,87
HFRs	25	19,91 ± 2,26	0,791 ± 0,69	18,52 ± 1,62	60,78 ± 2,82
	50	5,288 ± 0,91	0,019 ± 0,01	36,42 ± 2,80	58,27 ± 2,73
	100	0,873 ± 0,61	0 ± 0	40,95 ± 3,00	58,27 ± 3,14
Emodina	12,5 (46,3 µM)	28,87 ± 1,82	0,232 ± 0,16	8,672 ± 1,35	62,23 ± 2,24
	25 (92,5 µM)	22,43 ± 1,58	0,065 ± 0,06	10,36 ± 0,79	67,14 ± 1,59
	50 (185,0 µM)	8,422 ± 1,15	0 ± 0	41,95 ± 1,90	49,63 ± 1,78
Fisciona	12,5 (43,8 µM)	53,64 ± 2,29	3,82 ± 0,76	15,59 ± 1,38	26,95 ± 2,08
	25 (87,5 µM)	34,31 ± 2,02	1,603 ± 0,37	22,24 ± 1,71	41,85 ± 2,04
	50 (175,0 µM)	19,75 ± 1,56	0,731 ± 0,28	35,51 ± 1,58	44,01 ± 1,93

(* = DMSO 0,5% - v/v)

C33-A					
	Concentração (µg/mL)	Células viáveis (%)	Apoptose precoce (%)	Apoptose tardia (%)	Necrose (%)
DMSO	0,50%*	73 ± 1,77	10,5 ± 0,89	11,52 ± 1,31	6,756 ± 0,89
Doxorrubicina	50 (90 µM)	0 ± 0	0 ± 0	27,46 ± 2,25	72,54 ± 2,25
Curcumina	53 (100 µM)	0,277 ± 0,27	0,105 ± 0,10	93,36 ± 3,16	1,467 ± 0,84
EERs	25	1,427 ± 0,60	0 ± 0	38,36 ± 3,15	60,21 ± 3,15
	50	0,04 ± 0,049	0,09 ± 0,049	63,62 ± 3,34	36,33 ± 3,34
	100	0,167 ± 0,16	0 ± 0	56,39 ± 4,84	43,44 ± 4,80
HFRs	25	1,427 ± 0,60	0 ± 0	44,48 ± 4,05	37,7 ± 4,01
	50	0,04 ± 0,049	0,04 ± 0,049	49,02 ± 3,50	39,87 ± 3,48
	100	0,167 ± 0,16	0 ± 0	76,96 ± 3,11	20,27 ± 3,08
Emodina	12,5 (46,3 µM)	22,23 ± 2,74	6,449 ± 1,62	41,92 ± 3,72	29,41 ± 2,92
	25 (92,5 µM)	17,64 ± 2,45	6,306 ± 1,15	50,22 ± 4,57	41,08 ± 4,61
	50 (185,0 µM)	22,73 ± 4,24	2,348 ± 0,95	49,45 ± 4,52	25,47 ± 3,61
Fisciona	12,5 (43,8 µM)	46,18 ± 4,20	16,47 ± 2,23	31,06 ± 3,86	6,287 ± 2,17
	25 (87,5 µM)	38,89 ± 4,49	7,742 ± 1,76	38,41 ± 4,68	14,96 ± 2,88
	50 (175,0 µM)	27,92 ± 3,27	8,739 ± 1,30	45,9 ± 3,63	17,44 ± 3,76

(* = DMSO 0,5% - v/v)

HSC-3					
	Concentração (µg/mL)	Células viáveis (%)	Apoptose precoce (%)	Apoptose tardia (%)	Necrose (%)
DMSO	0,50%*	82,64 ± 1,53	5,986 ± 1,45	8,055 ± 0,80	11,24 ± 1,36
Doxorrubicina	50 (90 µM)	0,989 ± 0,32	0,055 ± 0,05	41,94 ± 3,02	58,06 ± 3,02
Curcumina	53 (100 µM)	19,0 ± 3,03	37,03 ± 1,70	90,75 ± 1,87	0,853 ± 0,32
EERs	25	9,803 ± 0,65	0,099 ± 0,06	12,26 ± 1,24	77,84 ± 1,10
	50	2,024 ± 0,28	0 ± 0	23,27 ± 1,70	74,7 ± 1,65
	100	0,274 ± 0,11	0 ± 0	41,17 ± 1,93	58,56 ± 1,91
HFRs	25	44,41 ± 2,75	19,16 ± 2,59	14,36 ± 2,16	22,06 ± 2,24
	50	30,09 ± 1,82	6,071 ± 1,01	24 ± 2,97	39,85 ± 2,48
	100	7,083 ± 1,42	0,906 ± 0,30	23,93 ± 2,37	68,08 ± 2,77
Emodina	12,5 (46,3 µM)	43,79 ± 2,05	26,08 ± 2,92	11,2 ± 1,24	18,93 ± 2,10
	25 (92,5 µM)	28,89 ± 1,88	27,54 ± 2,47	22,24 ± 1,46	21,34 ± 2,47
	50 (185,0 µM)	23,0 ± 1,36	33,91 ± 2,07	30,44 ± 1,80	12,66 ± 1,47
Fisciona	12,5 (43,8 µM)	41,16 ± 2,28	36,54 ± 3,21	9,592 ± 0,82	12,71 ± 1,60
	25 (87,5 µM)	34,15 ± 1,96	38,52 ± 2,35	16,32 ± 1,23	11,02 ± 1,22
	50 (175,0 µM)	14,43 ± 1,77	36,34 ± 3,80	23,05 ± 1,87	26,18 ± 4,05

(* = DMSO 0,5% - v/v)

HaCaT					
	Concentração (µg/mL)	Células viáveis (%)	Apoptose precoce (%)	Apoptose tardia (%)	Necrose (%)
DMSO	0,50%*	74,03 ± 2,09	3,985 ± 0,45	13,94 ± 1,5	7,815 ± 1,03
Doxorrubicina	50 (90 µM)	1,3 ± 0,54	0 ± 0	24,73 ± 2,06	75,27 ± 2,06
Curcumina	53 (100 µM)	2,263 ± 1,49	0,711 ± 0,47	96,15 ± 1,56	0,874 ± 0,22
EERs	25	0,3588 ± 0,08	0 ± 0	28,21 ± 2,75	71 ± 2,70
	50	0,054 ± 0,03	0 ± 0	32,46 ± 3,32	67,44 ± 3,31
	100	0 ± 0	0 ± 0	42,63 ± 3,38	57,35 ± 3,37
HFRs	25	31,8 ± 1,72	1,537 ± 0,22	37,05 ± 2,62	33,83 ± 3,03
	50	15,65 ± 0,76	0,786 ± 0,17	43,64 ± 3,25	39,25 ± 3,04
	100	1,57 ± 0,81	0 ± 0	50,79 ± 3,46	47,94 ± 3,50
Emodina	12,5 (46,3 µM)	12,96 ± 0,78	0 ± 0	29,73 ± 2,64	57,86 ± 2,73
	25 (92,5 µM)	7,985 ± 0,62	0,025 ± 0,01	31,81 ± 2,54	56,11 ± 2,08
	50 (185,0 µM)	3,981 ± 0,50	0,031 ± 0,02	39,85 ± 2,96	53,89 ± 2,60
Fisciona	12,5 (43,8 µM)	38,37 ± 1,54	4,768 ± 0,29	31,92 ± 2,75	26,36 ± 2,83
	25 (87,5 µM)	19,53 ± 1,03	6,768 ± 0,47	42,95 ± 3,41	24,5 ± 2,39
	50 (175,0 µM)	0,506 ± 0,28	0 ± 0	59,53 ± 4,14	25,96 ± 2,34

(* = DMSO 0,5% - v/v)

ANEXO II

Estudo computacional de *Docking* proteína-ligante para mTOR e AKT

Para análise da interação das antraquinonas fisciona e emodina e suas respectivas hidroquinonas com as proteínas mTOR e AKT. Aloe-emodina foi utilizada como molécula padrão por interagir com mTOR.

As sequências das proteínas foram obtidas, em formato .fasta, do banco de dados UNIPROT (www.uniprot.org). Após obtenção das sequências, as mesmas foram moldadas por homologia pelo aplicativo online HHpred (*Homology detection & structure prediction by HMM-HMM comparison*) no site <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/hhpred>, para obtenção da estrutura proteica em 3D (formato .pdb). As estruturas químicas em 3D dos compostos foram desenhadas no aplicativo online ChEMBL (*European Bioinformatics Institute* - www.ebi.ac.uk/chembl/), e salvos em formato .mol.

Para verificar a interação proteína-ligante, através da comparação dos valores de energia, foi utilizado o programa ArgusLab. 4.0.1 (*Mark Thompson and Planaria Software LLC*), no modo GADock/ligante flexível. Quanto menor o valor da energia, maior probabilidade da interação ser verdadeira. Os valores de energia obtidos para cada resíduo das proteínas estudadas estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Energia de ligação proposta por *docking* proteína-ligante.

ENERGIA (kcal/mol)				
	mTOR			AKT
ANTRAQUINONA	SER-2481	SER-1261	SER-2448	THR-308
Aloe-emodina	-10.0078	-6.7867	-11.9324	-9.86334
Emodina	-6.71081	-7.22442	-11.5219	-10.2081
Fisciona	-6.76269	-6.82691	-11.2127	-10.2082
HIDROQUINONA				
Aloe-emodina	-6.72218	-6.99709	-11.9979	-9.87685
Emodina	-6.71664	-7.06028	-11.6109	-10.1964
Fisciona	-4.94605	-7.24038	-11.4401	-10.2141

Legenda: Estudo computacional de *docking* ligante-proteína. Proteína mTOR, analisada nos resíduos SER-2481, SER-1261 e SER-2448. Proteína AKT, analisada no resíduo THR-308. Aloe-emodina foi utilizada como estrutura padrão (atividade constatada experimentalmente sobre mTOR). Para obtenção dos valores de melhor energia, foi utilizado o programa ArgusLab. 4.0.1 (*Mark Thompson and Planaria Software LLC*), no modo GADock/ligante flexível. Quanto menor o valor da energia, maior probabilidade da interação ser verdadeira.

CAPÍTULO 2

Emodin, physcion and crude extract of *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* induce mixed cell death by increase in the oxidative stress and inhibition of AKT in tumor cervical and oral squamous carcinoma cell lines

Thais Fernanda Moreira¹, Juliana Maria Sorbo¹, Felipe de Oliveira Souza¹, Barbara Colatto Fernandes¹, Fernanda Maria Marins Ocampos², Daniella Maria Soares de Oliveira², Carlos Alberto Arcaro¹, Renata Pires de Assis¹, Andersson Barison³, Obdulio Gomes Miguel², Amanda Martins Baviera¹, Christianne Pienna Soares¹, Iguatemy Lourenço Brunetti¹ *

¹ Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University - UNESP, Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 - s/n, Campos Ville, 14800-903, Araraquara, São Paulo, Brazil. E-mail: tf.moreira@yahoo.com.br; julianasorbo@gmail.com; felipebiomedicina@hotmail.com; barbara.colatto@gmail.com; carlos_arcaro@hotmail.com; renatapires_17@hotmail.com; baviera@fcar.unesp.br; soarescp@hotmail.com.

² Department of Pharmacy, Federal University of Paraná - UFPR, 3400 Prefeito Lothário Meissner Avenue, Jardim Botânico, 80210-170 - Curitiba, Paraná, Brazil. E-mail: fernanda_ocampos@yahoo.com.br; dani_mso@yahoo.com.br; obdulio@ufpr.br.

³ Department of Chemistry, Federal University of Paraná - UFPR, 210 Cel. Francisco H. dos Santos Avenue, Jardim das Américas, 81531-990 - Curitiba, Paraná, Brazil. Email: anderbarison@gmail.com.

*** Corresponding author**

Iguatemy Lourenço Brunetti - Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, São Paulo State University - Rodovia Araraquara Jaú, Km 01 - s/n, Campos Ville, CEP 14800-903, Araraquara, São Paulo, Brazil

Phone: +55 16 3301 5703 Fax: +55 16 3322 0073. E-mail: brunetti@fcar.unesp.br

ABSTRACT: *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, a native species in Brazil is popularly known as “fruto-de-pombo” and there are few reports about its pharmacological properties. Chrysophanol, physcion and emodin have been identified in this species. The aims of this study were to verify the scavenging capability on reactive oxygen and nitrogen species; cell death inducing ability and their mechanisms, as well as identifies AKT signaling changes; by emodin, physcion and ethanolic crude extract from *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* treatments in cervical tumor cells (SiHa and C33-A), and oral squamous cell carcinoma (HSC-3). Emodin showed the best scavenger of NO[•] and O₂^{•-}, and all samples were equality effective in HOCl/OCl⁻ capture. Emodin, physcion and ethanolic crude extract had cytotoxic effect on SiHa, C33-A, HSC-3 and HaCaT, with mixed cell death (apoptosis and necrosis), independent of caspases pathway. Emodin, physcion and the ethanolic crude extract increased intracellular oxidative stress and DNA damage. Emodin, physcion and the crude extract decreased the activation of AKT. Death induction mechanisms promoted by emodin, physcion and the ethanolic crude extract of *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* should be mediated by an increase of the intracellular oxidative stress, DNA damage, and suppression of the AKT activity, important signaling process for cell survival.

KEYWORDS: *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*, emodin, physcion, cytotoxicity, mutagenicity, oxidative stress.

Chemical compounds: Chrysophanol (PubChem CID: 10208), Emodin (PubChem CID: 3220), Physcion (PubChem CID: 10639).

Abbreviations ¹

¹ **Abbreviations:** Ethanolic crude extract (EERs), Hexanic fraction (HFRs), chloroform fraction (CFRs), ethyl acetate fraction (EAFRs), from stems of *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*.

1. INTRODUCTION

The coordinated control of energetic metabolism, proliferation and cell survival is highly dependent on the level of activation of AKT (protein kinase B, PKB). The super activity of this pathway is described in tumor cells and contributes to the continuous flow of substrates through the glycolytic pathway (the Warburg effect). PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) has been recognized as a tumor suppressor by inhibiting the PI3K/AKT pathway [1,2,3]. AKT also directly regulates the cell cycle and proliferation by acting on CDKI (kinase dependent cyclin inhibitor), such as p21 and p27, and indirectly by modulating the levels of cyclin D1 and p53. AKT also acts on the control of transcription factors FoxO (Forkhead box O), promoting its phosphorylation and inactivation. FoxO factors act directly on the cell cycle, DNA repair and apoptosis; inactivation of FoxO promotes the decrease in the expression of negative regulators of the cell cycle, such as the protein related to retinoblastoma, p130, CDKI and p27 [4].

In the metabolic state of transformed cells, reactive oxygen and nitrogen species (RONS) occur abundantly. The effects of RONS can vary depending on their concentrations in the cells; therefore, transformed cells control RONS levels via antioxidant defenses, especially with the increased production of NADPH (by glutamine metabolism and pentose phosphate pathway) and GSH regeneration [5,6].

Consequently, the inhibition in the PI3K/AKT pathway culminates in the loss of regulation of mechanisms involved in tumor proliferation and survival, so appearing as an important therapeutic target for tumor suppression. The association of compounds able to enhance the induction of oxidative stress and promoting alterations in PI3K/AKT pathway in tumor cells may be useful in inducing cell death of transformed cells.

The genus *Rhamnus* includes species with great pharmacological importance. Anti-inflammatory, antioxidant, antihypertensive, antimutagenic and apoptosis-inducing activities have been described for species of *Rhamnus* genus [7, 8, 9].

Extracts and fractions from leaves and stems of *R. sphaerosperma* var. *pubescens* showed antioxidant activity, with inhibition of lipid peroxidation in our previous studies. Chrysophanol, physcion and emodin were isolated from the ethanolic extract of *R. sphaerosperma* var. *pubescens* stems, besides stigmasterol and sitosterol (phytosterols) in our previous studies. Emodin has been found in several species of *Rhamnus* genus, showing significant results in preliminary trials for antitumor therapies, such as inhibition of cell proliferation, induction of apoptosis and prevention of metastasis [10, 11]. Anthraquinones have a chemical structure similar to anthracyclines, a class of chemotherapeutic agents, like doxorubicin, which shows effectiveness in several types of tumors [12].

Anthraquinones have chemical properties useful for specific molecular targets in the treatment of various diseases, mainly cancer that, combined with molecular modeling and other chemical tools, can contribute for the improvement of the therapeutic arsenal. In this way, the species *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* presents a diversity of components, and becomes promising for the prospection of chemotherapeutic agents. Thus, our study identified different responses for the capture capability of reactive oxygen and nitrogen species; cell death induction and its mechanisms; AKT phosphorylation after the treatments with emodin, physcion or ethanolic crude extract from *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* in cervical tumor cells (SiHa and C33-A), and oral squamous cell carcinoma (HSC-3).

2. Material and methods

2.1. Equipaments and chemicals

Deuterated solvent chloroform (CDCl_3) from Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, USA). NMR spectra were recorded on a BrukerAvance III 600[®] (Bruker, Billerica, MA, USA).

Ultrapure water (Millipore system, USA). DMSO (99,9%), trolox, gallic acid, quercetin, curcumin, ascorbic acid, catalase, doxorubicin, Dulbecco's Modified Eagle Medium, Ham F10 and F12 nutrient mixtures, hydrocortisone penicillin and streptomycin solution, sodium bicarbonate, kanamycin, fluorogenic substrate for caspase-3 (Ac-Asp-Met-Gln-Asp-AMC), fluorescein isothiocyanate, dithiothreitol, Tris, sodium dodecyl sulfate, β -mercaptoethanol, aprotinin, PMSF, leupeptin, sodium orthovanadate, NaOCl, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, potassium iodide, NADH, phenazinemetasulfate, nitroblue tetrazolium, sulfanilic acid, N- (1-naphthalenediamine), cytochalasin B and trypsin were purchased from Sigma Aldrich[®]. Fetal bovine serum (Cultilab, Brazil), fluorescein diacetate, propidium iodide and Hoechst 33342 (Invitrogen[®]), annexin-V conjugated with FITC (*Life Technologies*[®]). Sodium pyrophosphate, sodium fluoride, sodium nitroprusside (Merck[®]).

Antibodies anti-AKT, anti-p-[Ser-473]-AKT, anti-caspase-3, anti-rabbit conjugated with horseradish peroxidase (1:1000) were purchased from Cell Signaling and anti-GAPDH were purchased from CusAB.

The capture assays were performed in a microplate spectrophotometer *PowerWave XS2* (BIOTEK[®]). For micronuclei, annexin-V and cytomorphological assays were used IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare[®]). The TBARS assay was performed in a microplate spectrofluorimeter *Synergy 5* (BIOTEK[®]). The comet assay was performed in a Nikon microscope model ECLIPSE 50i, coupled with a Nikon camera model DS-Ri1 (Nikon Instruments Inc., Japan). For western blot analysis were used a Bio-Rad miniature gel

apparatus and miniature transfer apparatus (Mini-Protean, BioRad Laboratories); and C-Digit Blot Scanner (LI-COR).

2.2. Plant material, isolation and identification

The plant species was collected at the Federal University of Paraná (25°26'52"S49°14'21"W), during the morning, in May 2011 and July 2013 and the botanical determination was carried out at the Municipal Botanical Museum of Curitiba (Paraná, Brazil).

Dry and powdered stems of *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* were subjected to extraction with absolute ethanol, and the ethanolic crude extract (EERs) was partitioned in a liquid-liquid partition with hexane (hexanic fraction – HFRs), chloroform (chloroformic fraction – CFRs) and ethyl acetate (ethyl acetate fraction – EAFRs). Both methods were performed in Soxhlet equipment, at 60°C. The hexanic fraction was subjected to a column chromatograph with silica gel 60 and mobile phase composed of hexane and ethyl acetate, ethyl acetate and methanol, with gradients of increasing polarities (starting from 100% hexane to 100% ethyl acetate, and from 100% ethyl acetate to 80% methanol).

2.3. RONS Capture assays

2.3.1. O₂^{•-} capture assay

This method is based on the *in vitro* formation of non-enzymatic reactions between nicotinamide adenine dinucleotide reduced (NADH) and phenazinemetassulfate (PMS) and oxygen dissolved in the medium. The formed reactive species promotes the reduction of nitrobluetetrazolium (NBT) generating a formazane salt, which is quantified by spectrophotometry (560 nm). The assay was performed in sodium pyrophosphate buffer (25mM, pH 8.3), with PMS (0,372mM), NBT (0,6mM), NADH (1,56mM), different

concentrations of the samples, with final reaction volume of 300 μ L. After incubation in the dark at room temperature, for 7 minutes, the absorbance was monitored at 560nm [13].

2.3.2.HOCl/OCl⁻ capture assay

The HOCl/OCl⁻ has the ability to oxidize the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), and generates a blue staining compound, detected at 652nm. Initially the OCl⁻ concentration was determined by its molar extinction coefficient ($\epsilon = 350\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ at 292 nm) (MORRIS et al.,1966). The TMB solution (2.8mM) was prepared from its dissolution in dimethylformamide (50%, v/v), 0.8 M acetic acid (49%, v/v) and 0.01 M potassium iodide (1%, v/v). The reaction was started by incubation of the samples at different concentrations, diluted in sodium phosphate buffer (50 mM, pH 7.4) with HOCl/OCl⁻ (30 μ M), and revealed with TMB (2.8 mM), with final reaction volume of 300 μ L [14, 15, 16].

2.3.3.NO[•] capture assay

The nitric oxide, generated from the dissolution of sodium nitroprusside in aqueous solution with pH 7.4, reacts with the oxygen of the medium forming nitrate and nitrite. The concentration of the nitrite formed is determined, spectrophotometrically, from the reaction with the Griess reagent: 1.0% (w/v) sulfanilic acid, 0.1% (w/v) N- (1-naphthalenediamine) and 2.5% (v/v) phosphoric acid, at 540nm. The samples were incubated at different concentrations with sodium nitroprusside (4 mM) in sodium phosphate buffer (20 mM, pH 7.4) for 150 minutes at room temperature. After the reaction time, the Griess reagent was added, with a final reaction volume of 300 μ L and the absorbance measured at 540nm [17].

2.4. Assays for cell death

2.4.1. Cell culture

The cell lines SiHa (ATCC® HTB35™), C33-A (ATCC® HTB31™) and HaCaT (CLS 300493) were grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with Ham-F10 (F-10 Ham Nutrient Mixture). The HSC-3 cell line (JCRB: JCR 0623) was grown in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) with Ham-F12 (F-12 Ham Nutrient Mixture), hydrocortisone (0.4µg/L) and ascorbic acid (50mg/L). All media were supplemented with fetal bovine serum (10%), penicillin (100U/ml), streptomycin (100µg/ml) and amphotericin B (0.25mg/L), kanamycin (0,1g/L) and HEPES (5,96g/L). Cultures occurred in a sterile atmosphere at 37°C under 5% CO₂.

In this study emodin, physcion, ethanolic extract and hexane fraction from *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* stems were used for cell death mechanisms studies. The work concentrations were established by Sulphorrodamine B assay (data not showed). Chrysophanol did not show cytotoxicity for all cell lines studied.

2.4.2. Cytomorphological viability assay with Hoechst, propidium iodide and fluorescein diacetate

The cells were plated (5x10³ cells/well) in 96 well plates for 24h and the treatments were performed by 12h or 24h. After the treatment period, the plate was centrifuged at 1,258g, and each well was washed with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged again in the same conditions. The distinction between viable cells and dead cells in apoptosis and necrosis was performed by adding a solution (100 µL/well) containing fluorescein diacetate (3.5µg/mL), propidium iodide (2.5µg/mL) and Hoechst 33342 (1.5µg/ml) in PBS. After incubation for 10 minutes at room temperature in the dark, the images were acquired and analyzed using the apparatus IN Cell Analyzer 2000 [18].

2.4.3. Annexin-V cell death assay

The cells were plated (5×10^3 cells/well) in 96 well plates for 24h and the treatments were performed by 12h or 24h. After the treatment period, the plate was centrifuged at 1,258g, and each well was washed with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged again in the same conditions. After washing, 100 μ L/well of annexin-V binding buffer (10mM HEPES, 140mM NaCl and 2.5M CaCl_2) containing annexin-V/FITC (1.3 μ g/mL) and Hoechst 33342 (1.6 μ g/mL) were added, followed by incubation for 15 minutes at 4°C under the dark. After incubation, 20 μ L/well of propidium iodide (1 μ g/mL, diluted in the same buffer) was added. The images were acquired and analyzed using the IN Cell Analyser 2000 [19].

2.4.4. Caspase-3 activity assay

The cells were plated (1×10^4 cells/well) in 96 well plates for 24h and the treatments were performed by 6h. After the treatment period, the plate was centrifuged at 1,258 g, and each well was washed with phosphate buffered saline (PBS) and centrifuged again in the same conditions. After washing, the cells were permeabilized with 0.5% (w/v) saponin solution (dissolved in culture medium containing 5mM DTT and 2mM EDTA) for 10 minutes. After the permeabilization step, a solution with caspase-3 specific fluorogenic substrate (20 μ M caspase-3 substrate) and propidium iodide (2.5 μ g/mL), for nuclear staining, was added (100 μ L/well). The images were immediately acquired and analyzed using IN Cell Analyzer 2000 [20].

2.4.5. Western blotting analysis

The cells were plated (8×10^5 cells/well) in 6 well plates for 24h and the treatments were performed by 24h. After the treatment period, the cells were washed with PBS and lysed with lysis solution containing Tris (125 mM, pH 6.8), sodium dodecyl sulfate (10%, w/v), β -mercaptoethanol (1%, v/v), protease inhibitors (5 μ g/mL aprotinin, 1 mM PMSF, 2.34 mM

leupeptin) and phosphatase inhibitors (10 mM sodium pyrophosphate, 100 mM sodium fluoride and 10 mM sodium orthovanadate). After lysis, the cell contents were heated to 95°C for 8 minutes, and the samples were stored at -80°C until use, and an aliquot was separated for quantification of total proteins by the Lowry method [21].

The cell lysates were separated by 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [22]. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham™ Protran™ – GE Health Care) [23], and blocked for 1 h at room temperature with 10% non-fat dried milk dissolved in Tris buffered saline with Tween-20 (10 mM Tris, 125 mM NaCl e 0.1% Tween 20). The membranes were then incubated overnight at 4°C with specific primary antibodies: anti-AKT (1:500), anti-p-[Ser-473]-AKT (1:500), anti-caspase-3 (1:1000) and anti-GAPDH (1:1000). After washing (Tris buffered saline with Tween-20), the membranes were incubated with the secondary antibodies (HRP-conjugated anti-rabbit) for 1 h at room temperature. After washing, the membranes were revealed using chemiluminescent substrate (5mM luminol, 8mM hydrogen peroxide, 4mM p-iodophenylboronic acid, 0.1M Tris-HCl, pH 8.8) [24], in a C-Digit Blot Scanner and LI-COR Image Studio 4.0 software.

2.5. Oxidative damage analysis

2.5.1. TBARS assay

The cells were plated (2×10^5 cells/well) in 24 well plates for 24h and the treatments were performed by 24h. After the treatment, the culture medium of each well (200 μ L) was used to quantify TBARS from the reaction with 800 μ L of thiobarbituric acid (0.8% - w/v) diluted with acetic acid (20% - v/v) and sodium dodecyl sulfate (8.1% - w/v). The tubes were incubated at 95°C for 60 minutes, and the fluorescence intensity was measured with excitation and emission wavelengths of 510 and 553 nm, respectively. 1,1,3,3-tetramethoxypropane was used as a standard and the results were expressed as μ M of TBARS [25].

2.6. DNA damage analysis

2.6.1. Micronucleus assay

The cells were plated (4×10^3 cells/well) in 96 well plates for 24h and the treatments were performed by 24h. After the treatment period, the wells were washed with PBS and incubated with cytochalasin B ($6 \mu\text{g/ml}$) for 36 hours at 37°C to block the cytokinesis stage, allowing the observation of multinucleated cells. After this step, the cells were fixed with absolute ethanol for 30 minutes and stained with fluorescein isothiocyanate (FITC) ($1 \mu\text{g/mL}$) for 1 h, for cytoplasmic staining, and with Hoechst 33342 ($10 \mu\text{g/mL}$), for DNA staining, during 30 minutes. The images were acquired and analyzed using the IN Cell Analyser 2000 [26].

2.6.2. Comet assay

The cells were plated (1×10^5 cells/well) in 24 well plates for 24h and the treatments were performed by 6h. The comet assay was performed as described by Singh et al. [27] and Tice et al. [28]. For each test (samples and respective concentrations) 50 cells were analyzed by the software, TriTek CometScore TM version 1.5. The percentage (%) of DNA in the tail was used for the analysis of the amount of fragmented DNA [29].

2.7. Statistical analysis

For the cell death and caspase activity assays, the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey post-test was applied. For the micronucleus, TBARS and western blotting assays, the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-keuls post-test was applied. For the comet assay, the Kruskal-Wallis test with a Dunn post-test was applied. GraphPad prism 6.0 software was used in these analyses.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Chrysophanol, emodin and physcion were isolated from *R. sphaerosperma* var. *pubescens*

The crude ethanolic extract of *R. sphaerosperma* and its fractions were submitted to hydrogen magnetic resonance analysis (^1H NMR). The ^1H NMR spectra showed peaks corresponding to anthraquinone nuclei, except in the ethyl acetate fraction. After column chromatography of the hexane fraction, three crystalline samples were isolated and identified (^1H NMR) as chrysophanol (1,8-dihydroxy-3-methylanthraquinone), physcion (1,8-dihydroxy-6-methoxy-3-methylanthraquinone) and emodin (1,6,8-trihydroxy-3-methylanthraquinone). The chemical shift and coupling constant values of the ^1H NMR spectra for the anthraquinones are shown in the table 1. This is the first time, as far as we know, that these compounds are isolated in *R. sphaerosperma* var. *pubescens*, but they are very common on genus *Rhamnus*.

Table 1. Chemical shift values and coupling constants of ^1H NMR spectra for chrysophanol, emodin and physcion.

Position	Chemical shift (ppm) ^1H		
	Chrysophanol	Emodin	Physcion
1 (C)–OH	12.09	12.21 (s)	12.10 (s)
2 (CH)	7.09 (m)	7.08 (dq; $J=1.6\text{Hz}$ e 0.8Hz)	7.07 (m)
3 (Methyl)	2.46 (s)	2.45 (dd; $J=0.8\text{Hz}$ e 0.5Hz)	2.45 (s)
4 (CH)	7.65 (m)	7.60 (dq; $J=1.6\text{Hz}$ e 0.5Hz)	7.62 (m)
5 (CH)	7.81 (d; $J=7.8\text{Hz}$)	7.23 (d; $J=2.41$)	7.35 (d; $J=2.61\text{Hz}$)
6 (CH)	7.68(dd; $J=8.5\text{Hz}$ e 7.8Hz)	-	-
6 (Methoxyl)	-	-	3.93 (s)
7 (CH)	7.28 (d; $J=8.5\text{Hz}$)	6.63 (d; $J=2.4\text{Hz}$)	6.67 (d. $J= 2.60\text{Hz}$)
8 (C)–OH	12.11 (s)	12.31 (s)	12.29 (s)

J = coupling constant; d = doublet; dd = double doublet; dq = double quartet; s = singlet; t = triplet, m = multiplet.

3.2. Samples from *R. sphaerosperma* var. *pubescens* showed capture capacity for $\text{O}_2^{\cdot-}$, HOCl/OCl^- and $\text{NO}^{\cdot}$

The effective concentration that promotes 50% of inhibition (EC_{50}) in the capture of the reactive species was calculated by linear regression. These values of samples and standards were statistically compared for each test, and the lower EC_{50} value indicated the greater effectiveness. Curcumin and quercetin showed higher efficiency for all reactive species analyzed. Gallic acid showed lower efficiency against $\text{NO}^{\cdot}$, and trolox showed higher EC_{50} (lower efficiency) in the capture of HOCl/OCl^- and $\text{O}_2^{\cdot-}$, but no activity on $\text{NO}^{\cdot}$ (table 2).

Emodin showed better capture capacity of $O_2^{\bullet-}$ and $NO^{\bullet}$, while other anthraquinones were not active for this species. In the capture assay of $HOCl/OCl^-$ there were no statistical significances among anthraquinones. Few structural differences are observed in these compounds: the presence of an electron-donor group (methoxyl) in physcion structure worsens the capture efficiency of the studied reactive species in comparison with an electron withdraw (hydroxyl) in Meta position of emodin structure. The quinone nucleus of the anthraquinones has recognized redox capacity, with intermediate formation of the semiquinone radical and subsequent stabilization in hydroquinone [30, 31, 32].

The ethyl acetate fraction of *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* (EAFRs) was more efficient for $HOCl/OCl^-$ and $NO^{\bullet}$ capture, and the crude extract (EERs) presented statistical equality with this fraction for $O_2^{\bullet-}$, these samples being the most effective of *R. sphaerosperma* var. *pubescens*.

For the ethanolic crude extract and fractions, the presence of anthraquinones in their composition did not influence the capture capacity, since the ethyl acetate fraction (without anthraquinones), presented better efficacy compared to the other fractions with anthraquinone compounds, and was equivalent to the crude extract. Thus, it is possible that the capture effect of the ethanolic crude extract and its fractions is due to the synergism of compounds not yet identified with the anthraquinones.

Table 2. Capture capacity for $O_2^{\cdot-}$, HOCl/OCl $^-$ and NO $^{\cdot}$.

	EC ₅₀ (µg/mL)		
	O ₂ $^{\cdot-}$	HOCl/OCl $^-$	NO $^{\cdot}$
Curcumin	59.45 ± 5.85 b	0.5336 ± 0.081 b	15.69 ± 1.03 b
Gallic acid	18.81 ± 0.46 c	0.2843 ± 0.02 b	604.5 ± 52.52 a
Quercetin	13.48 ± 0.23 c	0.2594 ± 0.04 b	4.411 ± 1.69 c
Trolox	436.6 ± 9.39 a	4.578 ± 0.14 a	-
EERs	100.5 ± 0.68 d	3.195 ± 0.09 c	95.43 ± 8.73 d
HFRs	409.5 ± 26.36 a	4.99 ± 0.15 a	152.5 ± 4.11 e
CFRs	348.7 ± 12.02 e	3.028 ± 0.25 c	148.2 ± 10.34 e
EAFRs	144.7 ± 10.67 d	2.323 ± 0.12 d	49.7 ± 13.79 f

	EC ₅₀ (µM)		
	O ₂ $^{\cdot-}$	HOCl/OCl $^-$	NO $^{\cdot}$
Curcumin	112.9 ± 11.14 b	1.014 ± 0.15 b	30.62 ± 2.01 b
Gallic acid	110.6 ± 2.72 b	1.672 ± 0.10 b	3556 ± 309 a
Quercetina	44.61±0.75 c	0.8583 ± 0.14 b	14.59 ± 5.58 b
Trolox	1813 ± 52.81 a	17.82 ± 0.55 a	-
Emodin	140.8 ± 1.44 d	26.56 ± 0.74 c	52.03 ± 4.28 c
Physcion	-	33.1 ± 4.06 c	377 ± 16.71 d
Chrysophanol	-	23.56 ± 1.12 c	243 ± 18.3 e

Results are expressed as mean of the EC₅₀ ± standard error (M ± SE), analyzed by one-way ANOVA with Tukey post-test (different letters represent statistical difference) (- = no activity).

3.2.1. Emodin, physcion, EERs and HFRs induced mixed cell death independent of caspase-3 activation

The cytotoxic profile of *R. sphaerosperma* var. *pubescens* was analyzed against different normal cell lines (HaCaT) or tumor cell lines (SiHa, C33-A and HSC-3) by the sulforhodamine B assay (data not shown). Chrysophanol and the EAFRs did not exert toxic effects on the evaluated cell lines, while emodin, physcion, ethanolic crude extract (EERs)

and its hexanic fraction (HFRs) showed the best cytotoxic effects, and therefore, they were selected for the other cell death assays.

Emodin was studied at concentrations of 46.3 to 185.0 μM (12.5 to 50.0 $\mu\text{g/mL}$); physcion at concentrations of 43.8 to 175.0 μM (12.5 to 50.0 $\mu\text{g/mL}$); the ethanolic crude extract (EERs) and its hexane fraction (HFRs) were evaluated at concentrations of 25.0 to 100.0 $\mu\text{g/mL}$. For the SiHa and C33-A cell lines, the time of treatment was 24h, and for HSC-3 and HaCaT cell lines, 12h. The positive controls, curcumin induced predominantly apoptosis, and doxorubicin induced necrosis, for all cell lines.

All tested samples showed a mixed cell death profile for the SiHa cell line, with the presence of cells that were classified morphologically and biochemically in apoptosis (early or late) and necrosis; emodin was more effective than physcion (Figure 1).

For C33-A cells, in the cytomorphological assay, it was observed cell death predominantly with necrosis features, while in the annexin-V assay, the presence of apoptosis was observed. All samples were more efficient in C33-A cell line than in SiHa, except for physcion. (figure 2).

In HSC-3 cells, EERs was more effective than HFRs, with mixed death. The anthraquinones were less efficient than EERs and HFRs, while emodin and physcion were not different in this cell line, with mixed cell death induction (Figura 3).

The cell death induced in HaCaT (normal cell line) was mixed, with apoptosis and necrosis, except for EERs that induced necrosis in all tested concentrations. All samples were more toxic in HaCaT than HSC-3 (tumor cell line), after 12 h of treatment (Figure 4).

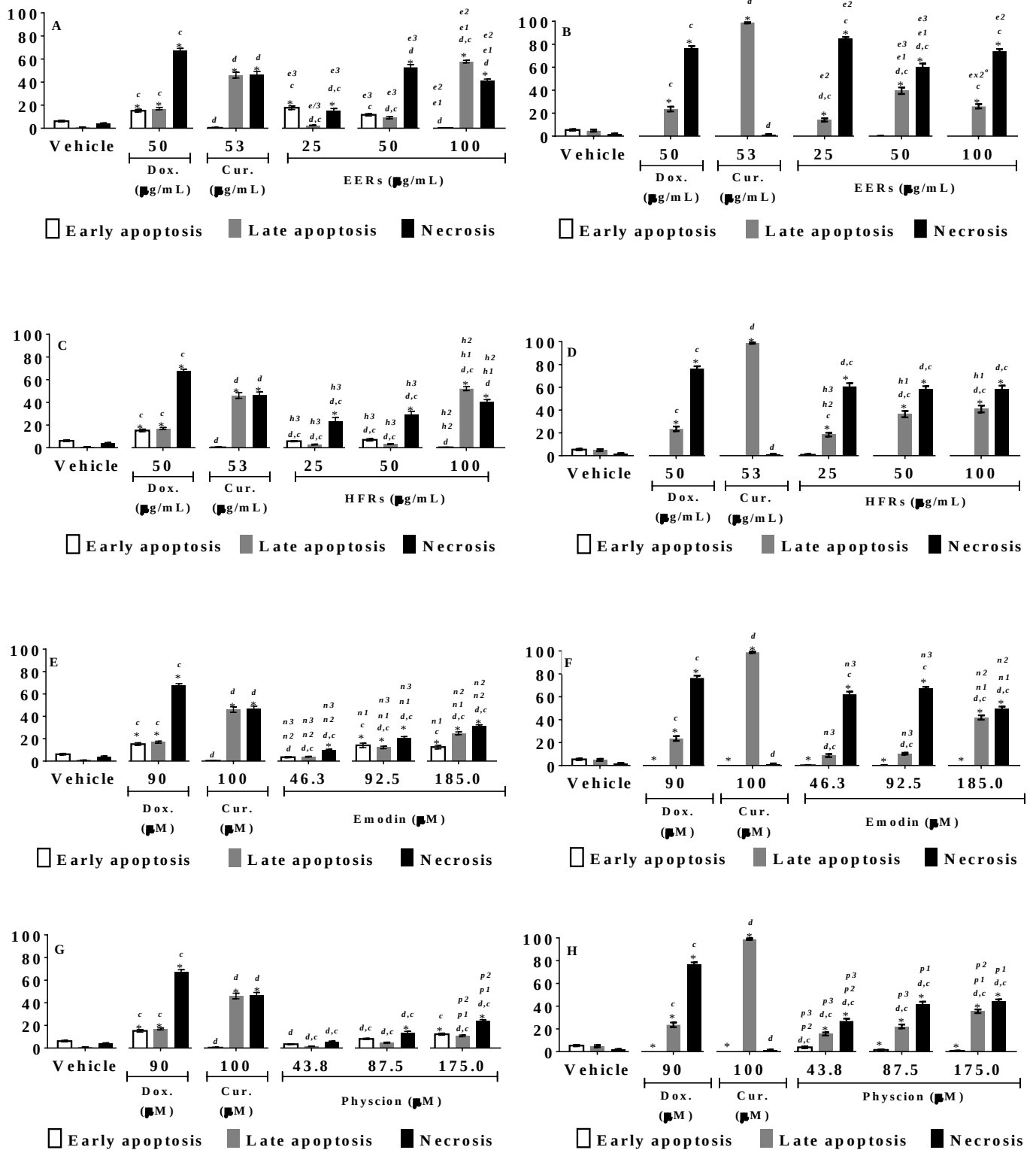


Figure 1. Cell death analysis in SiHa cells. Cyto-morphological viability assay for (A) EERs, (C) HFRs, (E) Emodin, (G) Physcion. Annexin-V assay for (B) EERs, (D) HFRs, (F) Emodin, (H) Physcion. Comparison with significant statistical difference between treatments: Vehicle (*), doxorubicin (d), curcumin (c), EERs 25µg/mL (e1), EERs - 50µg/mL (e2), EERs - 100µg/mL (e3), HFRs - 25µg/mL (h1), HFRs - 50µg/mL (h2), HFRs - 100µg/mL (h3), emodin 46.3µM (n1), emodin - 92.8µM (n2), emodin - 185.0µM (n3), physcion - 43.8µM (p1), physcion - 87.5µM (p2), physcion - 175.0µM (p3) and cell status: early apoptosis, late apoptosis, and necrosis. Results are expressed as mean of three independent experiments $\pm$ standard error (M $\pm$ SE), analyzed by one-way ANOVA with Tukey post-test, $p \leq 0.05$.

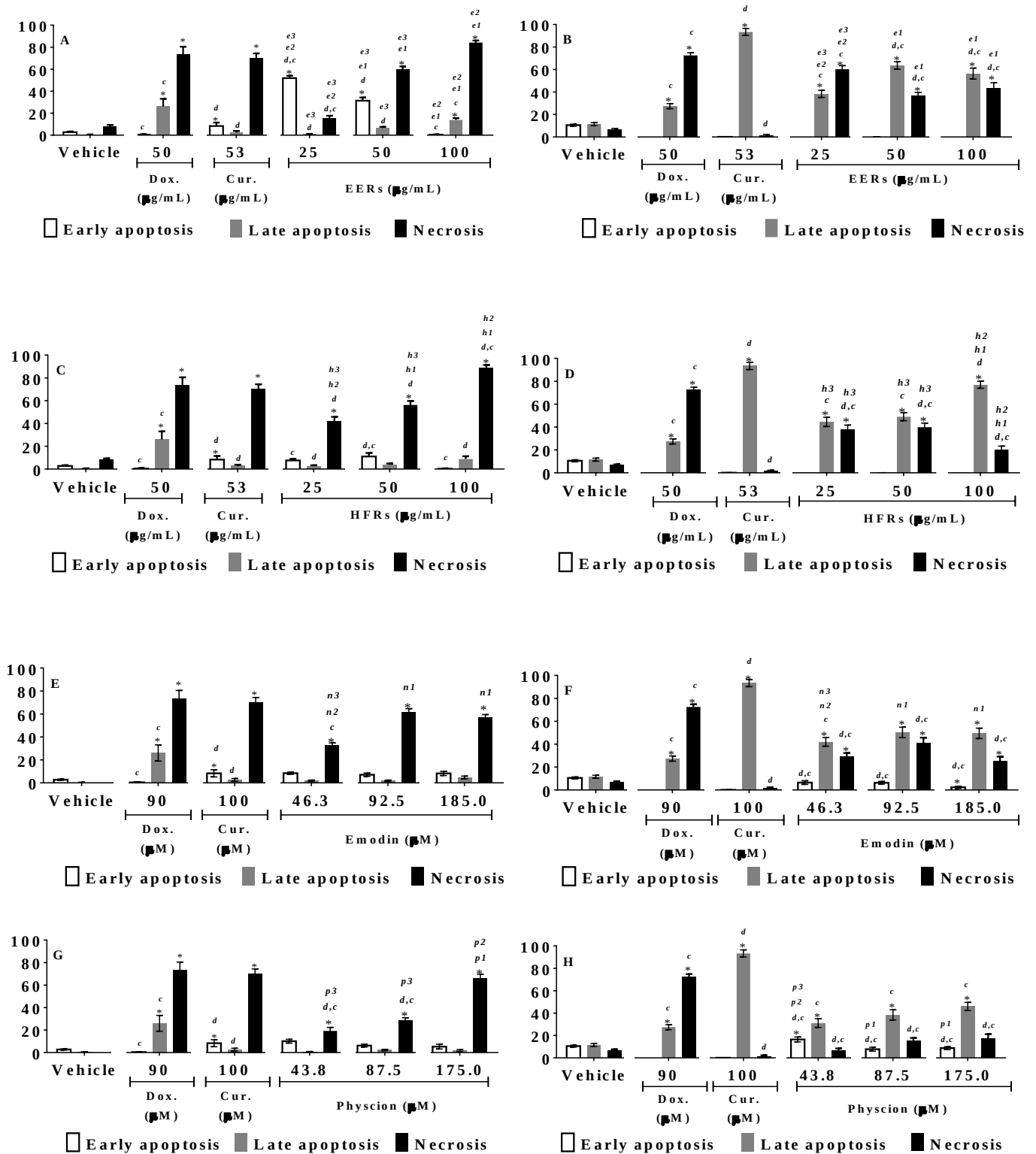


Figure 2. Cell death analysis in C33-A cells. Cytomorphological viability assay for (A) EERs, (C) HFRs, (E) Emodin, (G) Physcion. Annexin-V assay for (B) EERs, (D) HFRs, (F) Emodin, (H) Physcion. Comparison with significant statistical difference between treatments: Vehicle (*), doxorubicin (d), curcumin (c), EERs 25µg/mL (e1), EERs - 50µg/mL (e2), EERs - 100µg/mL (e3), HFRs - 25µg/mL (h1), HFRs - 50µg/mL (h2), HFRs - 100µg/mL (h3), emodin 46.3µM (n1), emodin - 92.8µM (n2), emodin - 185.0µM (n3), physcion - 43.8µM (p1), physcion - 87.5µM (p2), physcion - 175.0µM (p3) and cell status: early apoptosis, late apoptosis, and necrosis. Results are expressed as mean of three independent experiments $\pm$ standard error ($M \pm SE$), analyzed by one-way ANOVA with Tukey post-test, $p \leq 0.05$.

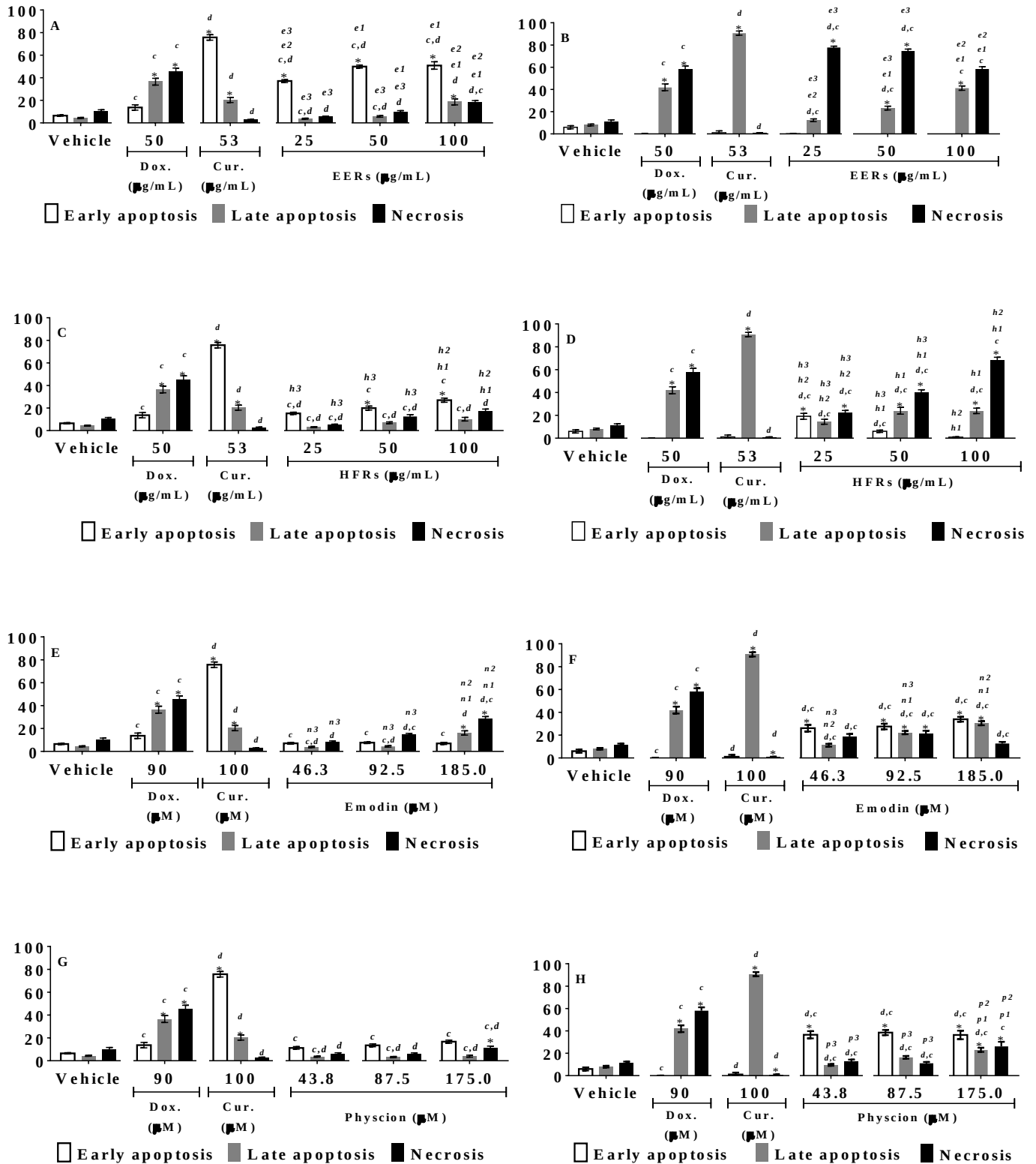


Figure 3. Cell death analysis in HSC-3 cells. Cytomorphological viability assay for (A) EERs, (C) HFRs, (E) Emodin, (G) Physcion. Annexin-V assay for (B) EERs, (D) HFRs, (F) Emodin, (H) Physcion. Comparison with significant statistical difference between treatments: Vehicle (*), doxorubicin (d), curcumin (c), EERs 25µg/mL (e1), EERs - 50µg/mL (e2), EERs - 100µg/mL (e3), HFRs - 25µg/mL (h1), HFRs - 50µg/mL (h2), HFRs - 100µg/mL (h3), emodin 46.3µM (n1), emodin - 92.8µM (n2), emodin - 185.0µM (n3), physcion - 43.8µM (p1), physcion - 87.5µM (p2), physcion - 175.0µM (p3) and cell status: early apoptosis, late apoptosis, and necrosis. Results are expressed as mean of three independent experiments $\pm$ standard error (M $\pm$ SE), analyzed by one-way ANOVA with Tukey post-test, $p \leq 0.05$.

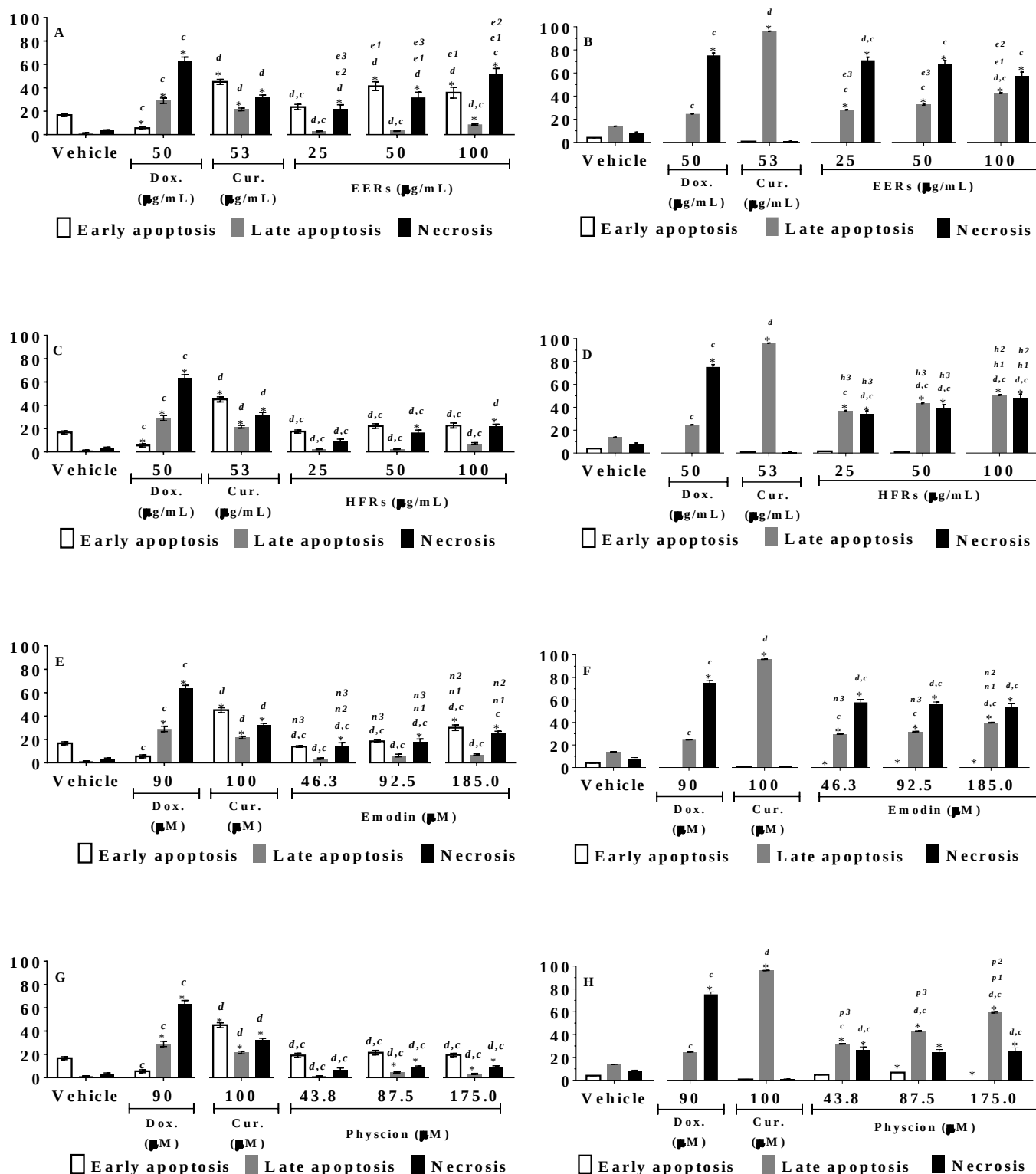


Figure 4. Cell death analysis in HaCaT cells. Cyto-morphological viability assay for (A) EERs, (C) HFRs, (E) Emodin, (G) Physcion. Annexin-V assay for (B) EERs, (D) HFRs, (F) Emodin, (H) Physcion. Comparison with significant statistical difference between treatments: Vehicle (*), doxorubicin (d), curcumin (c), EERs 25µg/mL (e1), EERs - 50µg/mL (e2), EERs - 100µg/mL (e3), HFRs - 25µg/mL (h1), HFRs - 50µg/mL (h2), HFRs - 100µg/mL (h3), emodin 46.3µM (n1), emodin - 92.8µM (n2), emodin - 185.0µM (n3), physcion - 43.8µM (p1), physcion - 87.5µM (p2), physcion - 175.0µM (p3) and cell status: early apoptosis, late apoptosis, and necrosis. Results are expressed as mean of three independent experiments $\pm$ standard error (M $\pm$ SE), analyzed by one-way ANOVA with Tukey post-test, $p \leq 0.05$.

Caspase-3 activity, a hallmark of classical apoptosis, was evaluated. Treatments with the anthraquinones, EERs and HFRs did not promote significant changes in caspase-3 activity, thus, it can be suggested that the cell death occurs independently of caspase-3 pathway, and the morphological and biochemical alterations observed can be due activation of other biochemical pathways. Only the cells treated with curcumin showed activation of caspase-3; the treatment with doxorubicin did not change the caspase-3 activity (Figure 5).

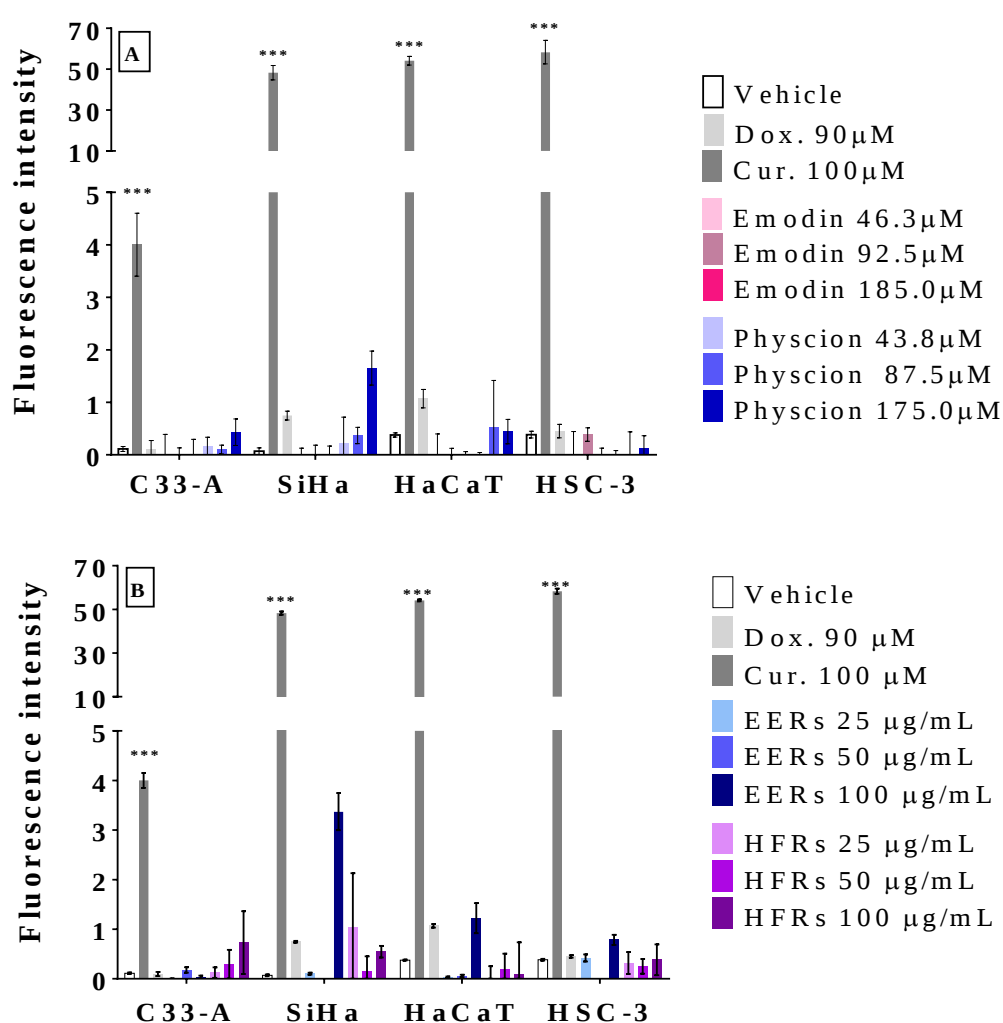


Figure 5. Caspase 3 activity assay. SiHa, C33-A, HSC-3 and HaCaT after treatment for 6 h with (A) emodin, physcion, (B) EERs and HFRs. Results are expressed as mean cell fluorescence intensity of three independent experiments $\pm$ standard error ($M \pm SE$), analyzed by one-way ANOVA with Tukey post-test (Statistically significant difference compared to vehicle control group: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

This study describes, for the first time, a cell death promoted by complexes mixtures as extract and fractions from *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens*. However, emodin and physcion have been previously related for cell death capacity. In lung tumor cells, A549, H460 and CH27, emodin (10 μ M) inhibited cell growth after 48 h of treatment, and induced apoptosis (50 μ M), with DNA fragmentation, and activation of caspases (2, 3 and 9) after 12h of treatment in A549 cells [33]. Cell death dependent of caspases also was observed in Bu 25TK (cervical cell line), SMMC-7721 and HepG2 (hepatocellular carcinomas) [34, 35].

Some studies have demonstrated cytotoxic effect of physcion, dependent of caspases activation, and cell cycle arrest in HeLa (cervical cancer cells), SW620 (colorectal cancer) and MDA-MB-231 (breast cancer) [36, 37, 38]. Studies with a glycosylated form of physcion, physcion-8-O- β glycopyranoside, have also shown an important cytotoxic activity in HepG2, A549 and HEM (human melanoma cells) [39, 40, 41].

Thus, in this study, emodin and physcion induced a mixed cell death, independent of caspases, in cervical cell lines (SiHa and C33-A), after 24 h of treatment, and in squamous carcinoma cell line (HSC-3) and transformed keratinocytes (HaCaT), after 12h of treatment.

3.2.6. Emodin, physcion and EERs increased intracellular oxidative stress

The literature have been associated the toxic effect of emodin and physcion with an increase in the intracellular RONS, thus promoting deregulation of mitochondrial membrane potential and activation of cell death [33, 35, 36, 39]. Therefore, the levels of thiobarbituric acid reactive species were quantified after the treatment of the cells with emodin, physcion and EERs.

Emodin promoted an increase of TBARS levels, in comparison with the control (DMSO 0.5%), in all lines, but in C33-A and HSC-3, only the highest emodin concentration showed significance. Physcion caused a significant increase in TBARS levels for SiHa, C-33A and HaCaT, only at the highest concentration, and no changes were observed for HSC-3. In SiHa,

C33-A and HaCaT, EERs promoted an increase of TBARS, whereas for HSC-3, at lower EERs concentration, the amount of TBARS was reduced (figure 6).

These data suggest that the formation of the semiquinone radical, from the interaction with endogenous RONS, may be a possible mechanism of the cytotoxicity related to these anthraquinones, since they were able to capture such species in chemical assays. Moreover, the better capture capacity presented by emodin compared with physcion can corroborate with its better cytotoxic activity.

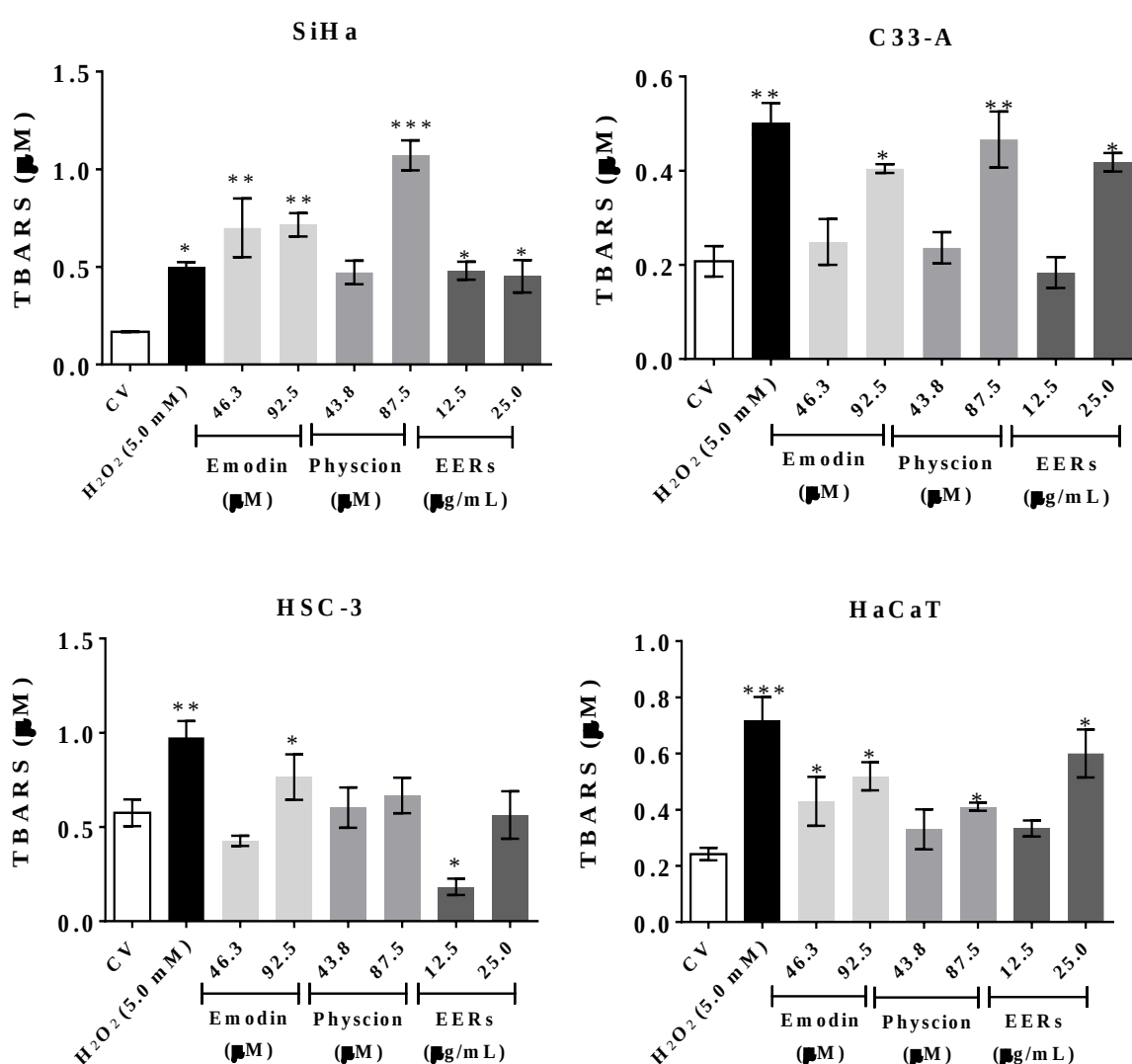


Figure 6. TBARS assay in SiHa, C33-A, HSC-3 and HaCaT. 24h treatment with emodin, physcion and EERs. H₂O₂ as positive control (5.0 mM). Results are expressed as mean of TBARS concentration (product formed after the reaction of the extracellular medium with thiobarbituric acid in at 95°C for 60 minutes) of three independent experiments $\pm$ standard error ($M \pm SE$), analyzed by one-way ANOVA and Newman-keuls post-test (statistically significant difference compared to the vehicle control group: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

Su et al. [33] observed a decrease of the cytotoxic effects of emodin after the pretreatment of A549 cells with the antioxidants, ascorbic acid and N-acetyl cysteine. In addition, an increase in the RONS concentrations promoted by glycosylate form of physcion in HepG2 cells, induced the activation of AMP-activated protein kinase (AMPK), resulting in the downregulation of DNA methyl transferase 1 (DNMT1), which is mediated by the transcription factor Sp1. DNMT1 is responsible for DNA methylation and its high expression has been reported as the cause of the silencing of some tumor suppressor genes in various types of carcinomas [39].

3.2.7. Emodin, physcion and chrysophanol promoted irreparable damage to the DNA of cervical cancer cells

The anthraquinones chrysophanol, emodin, and physcion were mutagenic only in SiHa and C33-A cells, after 24h treatment, at all tested concentrations. In HSC-3 and HaCaT cells, only the treatment with hydrogen peroxide (positive control) showed an increase of the chromosomal aberrations. These results are showed in table 2. The comet assay (figure 7) was carried out in SiHa and C33-A, to verify the induction of reversible damage (DNA strands breaks). Only emodin showed significant genotoxicity in SiHa, but not in C33-A cells.

Taken together, data from the micronucleus and comet assays suggest that chrysophanol and physcion caused mutagenic damage, by promoting errors during cell division (increase of micronuclei formation). On the other hand, emodin caused breaks in DNA strands of SiHa cell line, as well as promoted chromosomal segregation errors (increase of micronuclei formation). Therefore, damages promoted by emodin in SiHa DNA are more intense than those induced by chrysophanol and physcion. There were no differences among anthraquinones for other cell lines.

In addition, under conditions of oxidative stress, certain biomolecules are relevant targets of RONS, such as DNA. The enzyme poly ADP-ribose polymerase 1 (PARP-1) binds

to damaged DNA to synthesize the poly ADP-ribose on proteins involved in DNA repair, with use of NAD^+ . When the damage is limited, the DNA can be repaired and NAD^+ levels are regenerated using ATP; however, if the DNA damage is not repaired, the cells die by apoptosis, in a caspase dependent manner. On the other hand, when damage is extensive, a frequent activation of PARP-1 depletes NAD^+ and the ATP stores, and the cells do not activate the caspase pathway (which are ATP-dependent), and necrosis occurs [42]. Thus, the excessive activation of PARP-1 to repair the constant DNA damage (verified in the micronucleus and comet assay) induced by the oxidative stress, provoked by the treatment with emodin and physcion, may be related to the caspase-independent death.

Table 3. Micronuclei assay.

	Micronuclei frequency (%)			
	SiHa	C33-A	HSC-3	HaCaT
DMSO (1%)	0.939 ± 0.09	0.617 ± 0.03	4.16 ± 0.54	0.177 ± 0.02
H₂O₂ (0.1mM)	1.916 ± 0.32*	1.190 ± 0.16**	9.33 ± 0.63*	1.198 ± 0.27***
Chrysophanol				
3.125 µg/mL (12.3 µM)	3.894 ± 0.33***	0.757 ± 0.20	3.913 ± 0.69	0.228 ± 0.18
6.25 µg/mL (24.5 µM)	2.832 ± 0.21***	1.129 ± 0.05**	2.655 ± 0.063	0.066 ± 0.02
12.5 µg/mL (49.1µM)	2.431 ± 0.2**	1.403 ± 0.07***	2.706 ± 0.9	0.151 ± 0.09
Emodin				
3.125 µg/mL (11.6 µM)	2.120 ± 0.13*	0.932 ± 0.08*	4.720 ± 0.82	0.181 ± 0.06
6.25 µg/mL (23.2µM)	2.428 ± 0.36**	1.318 ± 0.13***	4.246 ± 1.23	0.296 ± 0.16
12.5 µg/mL (46.3µM)	3.528 ± 0.19***	1.081 ± 0.04**	2.789 ± 1.63	0.102 ± 0.018
Physcion				
3.125 µg/mL (10.9µM)	1.699 ± 0.26*	1.298 ± 0.06**	5.723 ± 0.96	0.478 ± 0.21
6.25 µg/mL (21.9µM)	1.990 ± 0.27*	1.246 ± 0.12**	4.794 ± 1.02	0.421 ± 0.091
12.5µg/mL (43.8µM)	1.896 ± 0.17*	1.143 ± 0.15**	4.915 ± 0.76	0.239 ± 0.19

Hydrogen peroxide (0.1 mM) as positive control and DMSO (1%) as vehicle control. Mean ± standard error of the number of micronuclei found in three independent experiments on cells. All cells were analyzed by the IN Cell Analyzer 2000 (GE Healthcare) software. (* P≥0.05; ** p≥0.01; *** p≥0.001 compared to vehicle control analyzed by ANOVA and Newman-Keuls post-test).

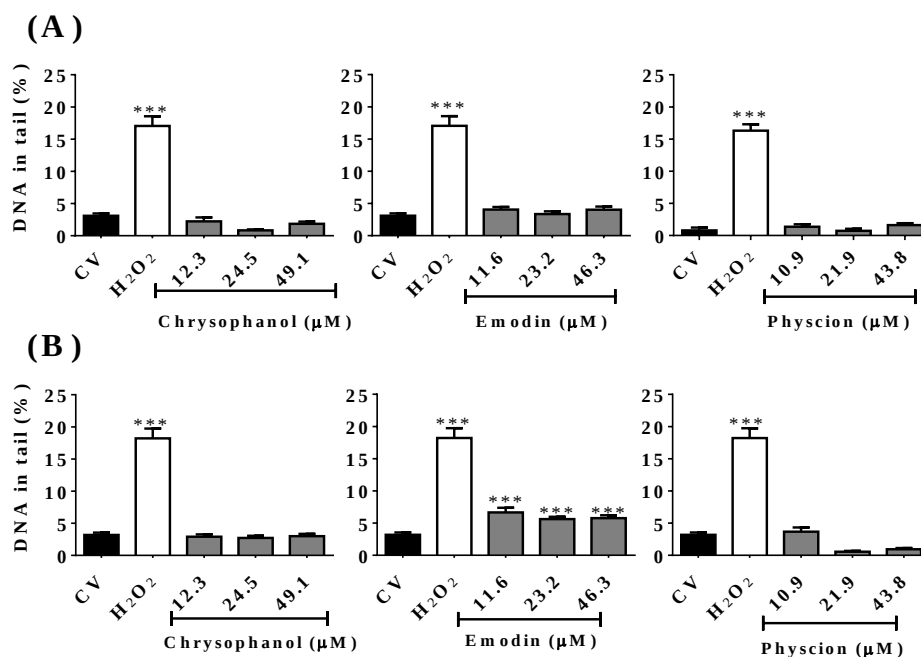


Figure 7. Comet assay for SiHa and C33-A. Evaluation of genotoxicity of chrysophanol, emodin and physcion. H₂O₂ (0.1mM) as positive control and CV: vehicle control (1% DMSO). (***) = statistically significant difference for $p \geq 0.001$, analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn post-test).

3.2.8. Emodin, physcion and EERs changed the levels of BAX and BCL-2 in SiHa cells and the levels of caspase-3 in SiHa, C33-A, HSC-3 and HaCaT cells

The levels of BAX and BCL-2 were studied only for the SiHa cell line, and the levels of caspase-3 were evaluated for all studied cells. In SiHa, the levels of BCL-2 (anti-apoptotic protein) were decreased after the treatments with emodin (all tested concentrations) or EERs (at the highest concentration), corroborating with the cell death experiments where apoptosis and necrosis were observed. The levels of BAX (pro-apoptotic protein) were increased after the treatment with 92.5 μM of emodin, whereas the treatment with EERs caused a decrease in BAX levels (Figure 8). Furthermore, the decrease in the BAX levels observed for EERs may be related with autophagy-induced cell death, since the decrease in the apoptotic modulators, such as BAX, has been associated with autophagy cell death, which occurs via activation of cathepsins, without caspase activation [43]. Caspase-3 levels were increased in the HSC-3 with emodin, physcion and EERs. In SiHa, only emodin, at the highest concentration,

increased the levels of caspases-3. Interestingly, emodin decreased the levels of caspase-3 in both C33-A and HaCaT cells (Figure 8).

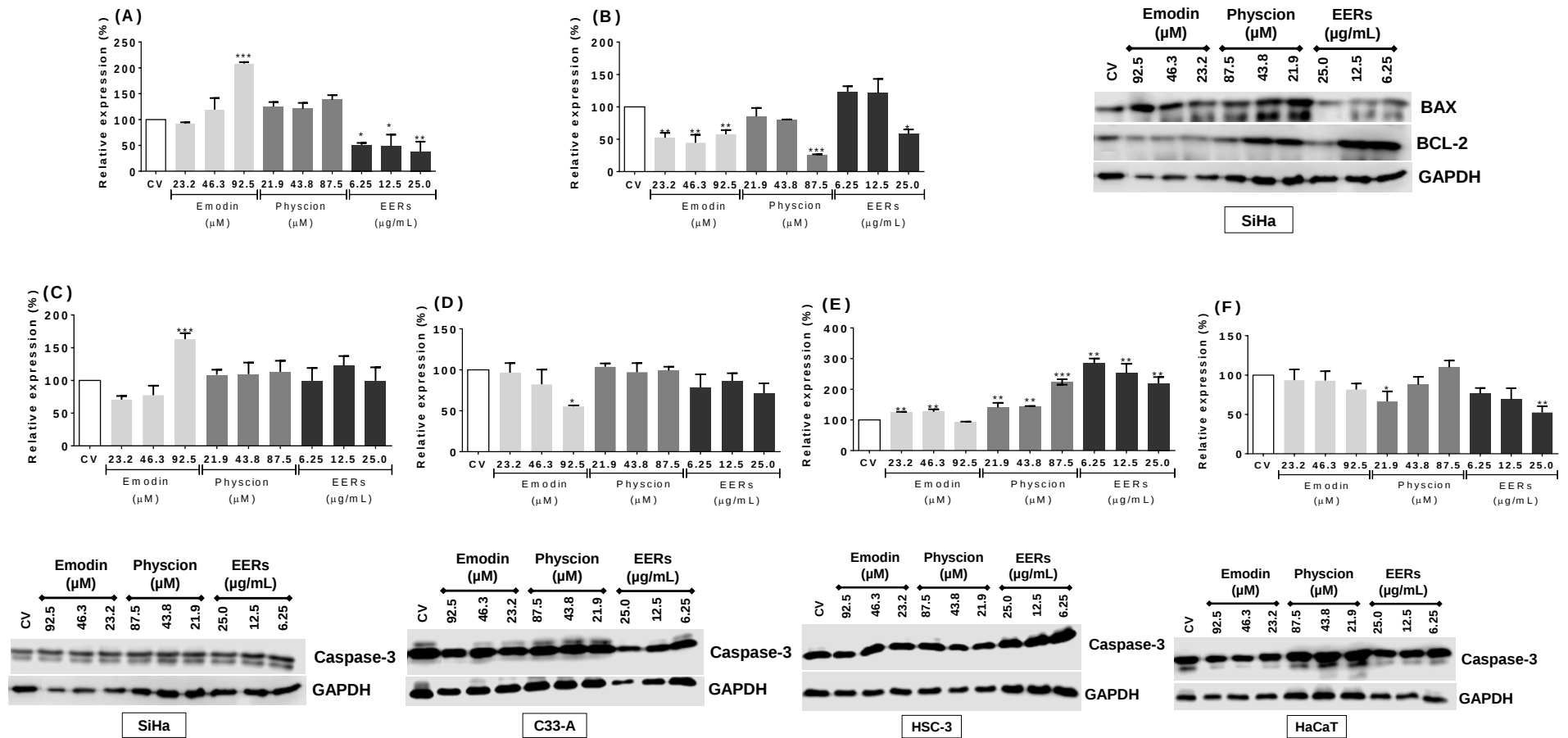


Figure 8. Levels of BAX, BCL-2 and caspases-3. (A) BAX (B) BCL-2; (C) caspases-3 for SiHa; (D) caspases-3 for C33-A; (E) caspases-3 for HSC-3 and (F) caspases-3 for HaCaT. Results are expressed as mean of electrophoretic bands densitometry, corrected for the control of cells treated with DMSO 0.5% (v/v) (CV), of two independent experiments $\pm$ standard error (M $\pm$ SE), analyzed by One-way ANOVA with Newman-keuls post-test (Statistically significant difference compared to CV: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

3.2.9. Emodin, physcion and EERs reduced the activation of AKT

The AKT phosphorylation levels (serine-473 residue) were analyzed for all cell lines.

Emodin reduced the AKT phosphorylation levels at least with one of the three tested concentrations, in all tumor cell lines, being more effective in HSC-3, followed by C33-A and SiHa, without promoting significant changes in normal cell line (HaCaT) (Figure 9). Corroborating our findings, studies demonstrated that emodin promoted a decrease in the phosphorylation of ERK and AKT in A549 cells [33], SMMC-7721 [34] and HepG2 [35].

Physcion did not promote significant changes in the AKT phosphorylation levels in tumor cervical cells (SiHa and C33-A), but significantly reduced the AKT phosphorylation in the HSC-3, at the two lowest concentrations, and in the HaCaT, at the lower concentration (Figure 9). EERs reduced the phosphorylation of AKT in C33-A and HaCaT cells, at all tested concentrations, however, did not promote significant changes in AKT phosphorylation in HSC-3 and SiHa (Figure 9).

The PI3K/AKT pathway is closely associated with proliferative signals triggered by mTOR (mammalian target of rapamycin). mTOR acts via two protein complexes: mTORC1, which is activated by AKT (after its activation via Thr-308 phosphorylation), and mTORC2, which activate AKT via phosphorylation in Ser-473 [44]. C33-A cell line has a mutation in the catalytic subunit of PI3K, which results in a greater activity of PI3K and consequent greater activation of AKT. C33-A also has a mutation in PTEN, which induces a premature stop codon in the gene, causing the absence in its expression, culminating in a further increase in the activity of PI3K and AKT [45]. Interesting, emodin and EERs were able to reduce the activation of AKT in C33-A cells, i.e., in a cell line that has a superstimulation of this pathway.

Alltogether, it can be suggested that the major targets of emodin and physcion are mTORC2 and/or PI3K, inhibiting these components, culminating in the reduction of AKT phosphorylation. Indeed, data from the literature showed that aloe-emodin, an anthraquinone

that also exhibits structural similarity with emodin and physcion, is able to bind to mTORC2 complex in prostate cancer cells (PC3), inhibiting its activity [46].

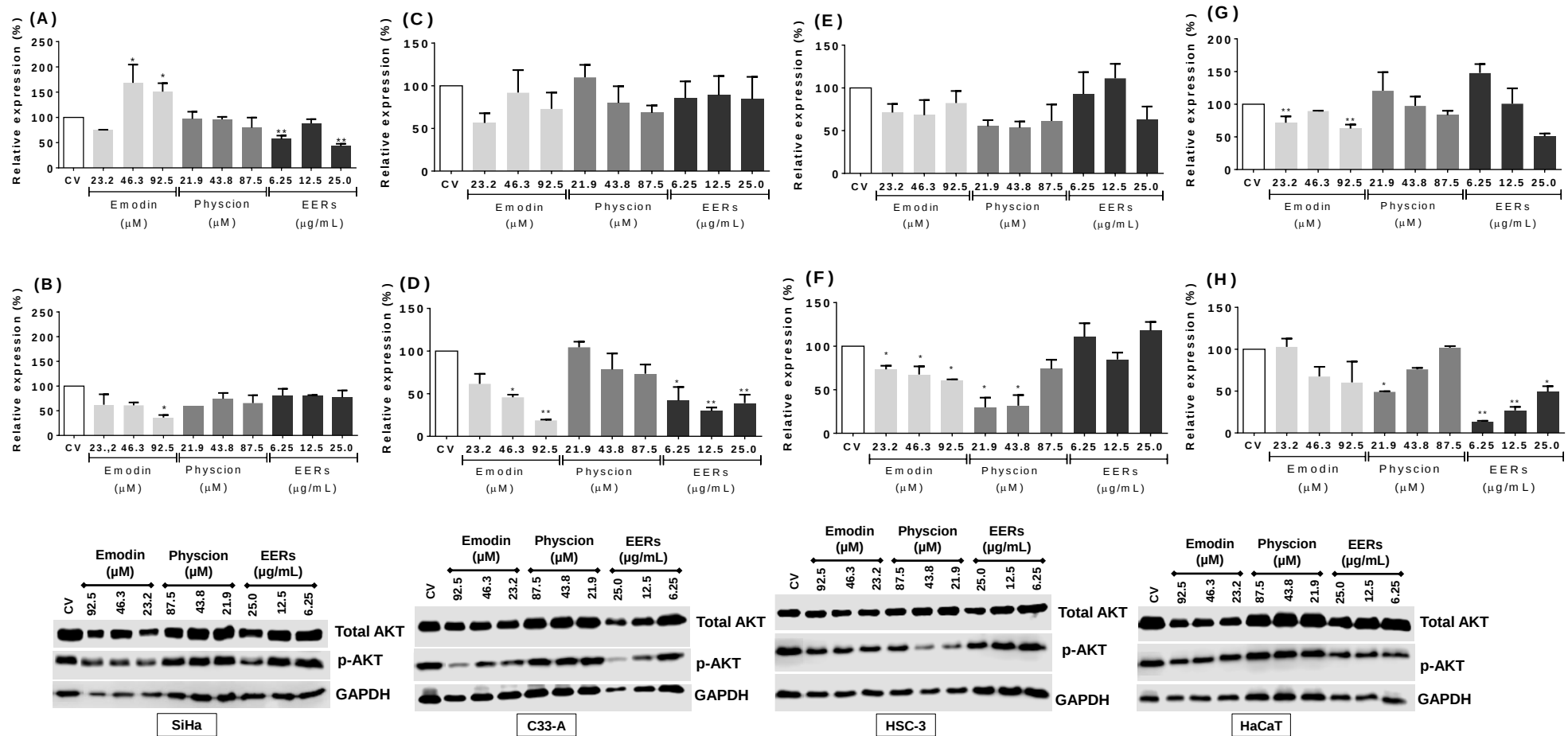


Figure 9. Levels of AKT and phosphorylation of AKT in ser-473. (A) total AKT and (B) p-AKT for SiHa; (C) total AKT and (D) p-AKT for C33-A; (E) total AKT and (F) p-AKT for HSC-3 (G) total AKT and (H) p-AKT for HaCaT. Results are expressed as mean of electrophoretic bands densitometry, corrected for the control of cells treated with DMSO 0.5% (v/v) (CV), of two independent experiments $\pm$ standard error ($M \pm SE$), analyzed by One-way ANOVA with Newman-keuls post-test (Statistically significant difference compared to CV: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$).

4. CONCLUSION

The anthraquinones, crude extracts and fractions of *Rhamnus sphaerosperma* var. *pubescens* showed important antioxidant activity against reactive oxygen and nitrogen species.

EERs, HFRs, emodin and physcion promoted mixed cell death of SiHa, C33-A, HSC-3 and HaCaT by apoptosis and necrosis, independent of caspases. Chrysophanol was not cytotoxic.

EERs, emodin and physcion promoted an increase in the thiobarbituric acid reactive species in all normal and tumor cell lines. In addition, a significant increase of DNA damage was observed in SiHa and C33-A cells, suggesting that the semiquinone radical, formed after the interaction of these compounds with endogenous RONS, probably participates in the cytotoxic caused by these samples, and can be also responsible for mixed cell death without activation of caspases.

Emodin, physcion and EERs also caused a reduction in the AKT phosphorylation at serine-473, indicating an inhibition of the PI3K/AKT pathway, important for tumor survival and proliferation. It can be suggested that the main targets responsible for the AKT inhibition are the upstream targets mTORC2 and/or PI3K.

Acknowledgments

The authors would like to thank Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq), Apoio ao Desenvolvimento Científico da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (PADC/FCFAR/UNESP), and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for financial support.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

- [1] R.G. Jones; C.B. Thompson. Tumor suppressors and cell metabolism: a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 23 (2009) 537-548.
- [2] P. Liu; H. Cheng; T.M. Roberts; J.J. Zhao. Targeting the phosphoinositide 3-kinase pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 8 (2009) 627-644.
- [3] M. Kollareddy; et al. Regulation of nucleotide metabolism by mutant p53 contributes to its gain-of-function activities. *Nat Commun.* 6 (7389) (2015) 1-13.
- [4] X. Zhang; et al. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1813 (2011) 1978-1986.
- [5] R.A. Cairns; I.S. Harris; T.W. Mak. Regulation of cancer cell metabolism. *Nat Rev Cancer.* 11 (2011) 85-95.
- [6] L. Alberghina; D. Gaglio. Redox control of glutamine utilization in cancer. *Cell Death Dis.* 5 (2014) 1-9.
- [7] B-L. Wei; C-M. Lu; L-T. Tsao; J-P. Wang; C-N. Lin. In Vitro Anti-Inflammatory Effects of Quercetin 3-O-Methyl Ether and Other Constituents from *Rhamnus* Species. *Planta Med.* 67 (2001).
- [8] R.B. Ammar; et al. Anti-lipid peroxidation and induction of apoptosis in the erythroleukaemic cell line K562 by extracts from (Tunisian) *L.* (Rhamnaceae). *Nat Prod Res.* 25 (11) (2011) 1047–1058.
- [9] R.B. Ammar; et al. Antioxidant activity and inhibition of aflatoxin B1, nifuroxazide, and sodium azide-induced mutagenicity by extracts from *Rhamnus alaternus* L. *Chem Biol Interact.* 174 (2008) 1–10.
- [10] C. Tabolacci; A. Lentini; P. Mattioli; et al. Antitumor properties of aloe-emodin and induction of transglutaminase 2 activity in B16–F10 melanoma cells. *Life Sci.* 87 (2010) 316–324.

- [11] I. Izhaki. Emodin – a secondary metabolite with multiple ecological functions in higher plants. *New Phytologist*. 155 (2002) 205–217.
- [12] I. Manet; F. Manoli; B. Zambelli; et al. Complexes of the antitumoral drugs Doxorubicin and Sabarubicin with telomeric G-quadruplex in basket conformation: ground and excited state properties. *Photochem. Photobiol. Sci.* 10 (2011) 1326–1337.
- [13] B. Hazra; S. Biswas; N. Mandal. Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. *BMC Complement Altern Med.* 8 (63) (2008) 1-10.
- [14] J.M. Dypbukt; C. Bishop; W.M. Brooks; B. Thong; H. Eriksson; A.J.A. Kettle. A sensitive and selective assay for chloramines production by myeloperoxidase. *Free Radic Biol Med.* 39 (2005) 1468 – 1477.
- [15] A.J. Kettle; C.C. Winterbourn. Assays for the Chlorination activity of myeloperoxidase. *Methods Enzymol.* 233 (1994) 502-512.
- [16] J.M. Zgliczynski; et al. Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Biochim Biophys Acta.* 235(1971) 419-424.
- [17] G.C. Yen; H.H. Lai; H.Y. Chou. Nitric oxide scavenging and antioxidant effects of *Uraria crinita* root. *Food Chem.* 74 (2001) 471-478.
- [18] Y. Hashimoto; Y. Shimada; A. Itami; et al. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in human oesophageal squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer.* 39 (15) (2003) 2239-2246.
- [19] R.A. Duarte; E.R. Mello; C. Araki; V.S. Bolzani; D.H.S. Silva; L.O. Regasini; T.G.A. Silva; M.C.C. Moraes; V.F. Ximenes; C.P. Soares. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. *Tumor Biol.* 31 (2010) 513-522.
- [20] W.C. Earnshaw; L.M. Martins; S.H. Kaufmann. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 68 (1999) 383-424.

- [21] O.H. Lowry; N.J. Rosebrough; A.L. Farr; R.J. Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*193(1) (1951) 265-275.
- [22] U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nat.* 227 (1970) 680-685.
- [23] H. Towbin; T. Staehelin; J. Gordon. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9) (1979) 4350-4354.
- [24] C. Haan; I. Behrmann. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *Journal of immunological methods.* 10;318(1-2) (2007) 11-19.
- [25] N.D. Zamri; et al. Antioxidative Effects of Germinated Brown Rice-Derived Extracts on H₂O₂-Induced Oxidative Stress in HepG2 Cells. *Evid Based Complement Alternat Med.*2014 (2014) 1-12.
- [26] A. Shibai-Ogata; et al. Evaluation of high-throughput screening for in vitro micronucleus test using fluorescence-based cell imaging. *Mutagenesis.* 26 (6) (2011) 709–719.
- [27] N.P. Singh; M.T. McCoy; R.R. Tice; E.L. Schneider. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res.* 175 (1988) 184–191.
- [28] R.R. Tice; E. Agurell; D. Anderson; et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 35 (3) (2000) 206–221.
- [29] P. Moller. The Alkaline Comet Assay: Towards Validation in Biomonitoring of DNA Damaging Exposures. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 98 (2005) 336–345.
- [30] M.O.F. Goulart; et al., Electrochemical study of oxygen interaction with lapachol and its radical anions. *Bioelectrochemistry.* 59 (2003) 85– 87.
- [31] N. Watanabe; H.J. Forman. Autoxidation of extracellular hydroquinones is a causative event for the cytotoxicity of menadione and DMNQ in A549-S cells. *Arch Biochem Biophys.* 411(1) (2003) 145–157.

- [32] E.T. Sousa; et al. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. *Quim. Nova.* 39 (4) (2016) 486-495.
- [33] Y.T. Su; et al. Emodin induces apoptosis in human lung adenocarcinoma cells through a reactive oxygen species-dependent mitochondrial signaling pathway. *Biochem Pharmacol.* 70 (2015) 229–241.
- [34] W. Lin; et al. Emodin induces hepatocellular carcinoma cell apoptosis through MAPK and PI3K/AKT signaling pathways in vitro and in vivo. *Oncol Rep.* 36 (2016) 961-967.
- [35] Y. Cui; et al. Involvement of PI3K/Akt, ERK and p38 signaling pathways in emodin mediated extrinsic and intrinsic human hepatoblastoma cell apoptosis. *Food Chem Toxicol.* 92 (2016) 26-37.
- [36] I. Wijesekara; et al. Physcion from marine-derived fungus *Microsporium* sp. induces apoptosis in human cervical carcinoma HeLa cells. *Microbiol Res.* 169 (2014) 255– 261.
- [37] Y. Han; et al. Physcion inhibits the metastatic potential of human colorectal cancer SW620 cells in vitro by suppressing the transcription factor SOX2. *Acta Pharmacol Sin.* 37 (2016) 264–275.
- [38] J. Hong; et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis by physcion, an anthraquinone isolated from rhubarb (rhizomes of *Rheum tanguticum*), in MDA-MB-231 human breast cancer cells. *J Cancer Prev.* 19 (4) (2014) 273-278.
- [39] Q. Wang; et al. Physcion 8-O- β -glucopyranoside induces apoptosis, suppresses invasion and inhibits epithelial to mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. *Biomed Pharmacother.* 83 (2016) 372–380.
- [40] D. Zhang; et al. Upregulation of miR-124 by physcion 8-O- β -glucopyranoside inhibits proliferation and invasion of malignant melanoma cells via repressing RLIP76. *Biomed Pharmacother.* 84 (2016) 166–176.

- [41] Q. Xie; Y. Yang. Anti-proliferative of physcion 8-O- β -glucopyranoside isolated from *Rumex japonicas* Houtt. on A549 cell lines via inducing apoptosis and cell cycle arrest. BMC Complement Altern Med. 14 (377) (2014) 1-10.
- [42] M. Baritaud; et al. Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. Cell Cycle. 16 (2010) 3166-3173.
- [43] L. Galluzzi; et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. Cell Death Differ. 19 (2012) 107-120.
- [44] M. Shimobayashi; M.N. Hall. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. Nat Rev Mol Cell Biol. 15 (2014) 155-162.
- [45] R. Rashmi et al. AKT Inhibitors Promote Cell Death in Cervical Cancer through Disruption of mTOR Signaling and Glucose Uptake. Plos One. 9 (4) (2014) 1-12.
- [46] K. Liu; et al. Aloe-emodin suppresses prostate cancer by targeting the mTOR complex 2. Carcinogenesis. 33 (7) (2012) 1406–1411.