

PRISCILA DE MATOS CÂNDIDO BACANI

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

CAMPO GRANDE

2016



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

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

PRISCILA DE MATOS CÂNDIDO BACANI

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

CAMPO GRANDE
2016



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

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

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention: Biologie

Ecole doctorale VAS

présentée par

Priscila DE MATOS CÂNDIDO BACANI

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

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

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

devant le jury composé de :

Dr Zaira DA ROSA GUTERRES

Professeur, UEMS, Mundo Novo / *rapporteur*

Dr Juliana Mara SERPELONI

Professeur, UEL, Londrina / *rapporteur*

Dr Nídia Cristiane YOSHIDA

Professeur, UFMS, Campo Grande / *examineur*

Dr Nathalie THERET

DR2 Inserm, U1085, Université de Rennes 1 /
examineur

Dr Susana Elisa MORENO

Professeur, UCDB, Campo Grande / *examineur*

Dr Renata Trentin PERDOMO

Professeur, UFMS, Campo Grande / *examineur*

Dr Walmir SILVA GARCEZ

Professeur, UFMS / *directeur de thèse*

Dr Georges BAFFET

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

PRISCILA DE MATOS CÂNDIDO BACANI

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

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

Orientadores:

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

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

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

CAMPO GRANDE

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

PRISCILA DE MATOS CÂNDIDO BACANI

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

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

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Aos meus avós Clarice e José, pelo carinho e amor.
A vocês dedico esta tese. Obrigada por estarem sempre por perto.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, conquistas e graças alcançadas.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

À Katia, pela amizade, auxílio e apoio constante.

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

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

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

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

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

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

REMERCIEMENTS

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

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

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

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

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

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

(Hamdallah ZEDAN, 2005)

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

RÉSUMÉ

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

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

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