



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA COMPARADA

IGOR VIVIAN DE ALMEIDA

**CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MONITORAMENTO DO
CICLO CELULAR E DA INDUÇÃO DE APOPTOSE, DOS ALCALOIDES
SANGUINARINA E CHELERITRINA, EM LINHAGENS CELULARES
TUMORAL (HepG2/C3A E MCF-7) E NÃO TUMORAL (MRC-5)
HUMANAS**

Maringá

2015

IGOR VIVIAN DE ALMEIDA

CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E MONITORAMENTO DO
CICLO CELULAR E DA INDUÇÃO DE APOPTOSE, DOS ALCALOIDES
SANGUINARINA E CHELERITRINA, EM LINHAGENS CELULARES
TUMORAL (HepG2/C3A E MCF-7) E NÃO TUMORAL (MRC-5)
HUMANAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Veronica Elisa Pimenta Vicentini

Maringá

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

A447c Almeida, Igor Vivian de
Citotoxicidade, genotoxicidade e monitoramento do ciclo celular e da indução de apoptose, dos alcaloides sanguinarina e cheleritrina, em linhagens celulares tumoral (HepG2/C3A e MCF-7) e não tumoral (MRC-5) humanas / Igor Vivian de Almeida. -- Maringá, 2015.
120 f. : il. color., figs., tabs.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Veronica Elisa Pimenta Vicentini.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada, 2015.

1. Agentes quimioterápicos - Câncer de mama - MCF-7. 2. Alcaloides benzo[c]fenantridinas - Sanguinarina. 3. Alcaloides benzo[c]fenantridinas - Cheleritrina. 4. Agentes quimioterápicos - Câncer de fígado - HepG2/C3A. 5. Agentes quimioterápicos - Fibroblasto de pulmão - MRC-5. 6. Morte celular - Apoptose. 7. Morte celular - Necrose. I. Vicentini, Veronica Elisa Pimenta, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada. III. Título.

CDD 21.ed. 572.8

AMMA-003031

FOLHA DE APROVAÇÃO

IGOR VIVIAN DE ALMEIDA

Citotoxicidade, genotoxicidade e monitoramento do ciclo celular e da indução de apoptose, dos alcaloides sanguinarina e cheleritrina, em linhagens celulares tumoral (HepG2/C3A e MCF-7) e não tumoral (MRC-5) humanas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biologia das Interações Orgânicas pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^a. Dr^a. Veronica Elisa Pimenta Vicentini
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Edson Luis Maistro
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Marília

Prof^a. Dr^a. Claudete Aparecida Mangolin
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 30 de outubro de 2015.

Local de defesa: Sala 5, Bloco H67, *campus* da Universidade Estadual de Maringá.

Dedico este trabalho...

Aos meus amados pais, **Hilario e Ivone**, pelo amor, carinho, porto seguro e por todos os valores que me passaram. Obrigado por acreditarem e confiarem em mim, pelo apoio, incentivo e dedicação constantes que foram e sempre serão imprescindíveis em todos os momentos da minha vida.

Agradecimentos

A minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Veronica Elisa Pimenta Vicentini**, pela dedicação ao ensino e à pesquisa, pela orientação segura, sinceridade e confiança em mim depositada, além de transmitir seus conhecimentos, suas experiências profissionais e de vida. Devo a você todo o sucesso profissional que obtive até hoje. Agradeço pelo incentivo constante e apoio desde o início da minha graduação, há quase 10 anos. Foi uma jornada longa e difícil, que se conclui com a realização deste sonho, mas que não se encerra. Ainda teremos muito trabalho pela frente, só espero não tomar mais tanto o tempo dos seus finais de semana. Muito obrigado por tudo!

Aos **Professores Dr. Mário Sérgio Mantovani, Dr. Edson Luis Maistro, Dra. Claudete Aparecida Mangolin e Dra. Maria Cláudia Colla Ruvolo Takasusuki**, que aceitaram o convite para participar da banca de avaliação deste trabalho, e pelas generosas contribuições para melhorá-lo.

A **Coordenação e Professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Comparada**, que contribuíram com ensinamentos, atenção e apoio para o meu crescimento profissional, e a secretária do PGB, **Estela**, por sua prestatividade, alegria e disposição.

Aos colegas do **Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular**, em especial os **Professores Dra. Michele Cristina Heck e Dr. Hélio Conte**, pela amizade e companheirismo, e a secretária **Merci**, por sua prestatividade, eficiência e disposição.

A minha preciosa irmã, **Vanessa**, pelo amor de irmã, apoio e incentivo, por apostar sempre no meu sucesso e também por ser uma inspiração para a carreira profissional que segui. Ter começado e quase terminado o Doutorado junto com você foi motivo de honra e muito orgulho para mim.

A **Titia Vivian**, que mesmo de longe, sempre zelou por mim com amor de mãe.

A equipe técnica do Laboratório de Mutagenese e Monitoramento Ambiental, **Rosinete e Rosângela**, e aos amigos, **Liliane, Mariana, Enilla, Jaqueline, Nilson, Fabíola, Matheus, Ana Clara, Daniele, Paulo**, pelo auxílio nos experimentos e companheirismo.

A Doutoranda **Bruna Biazi**, do Laboratório de Genética Toxicológica (UEL) e ao **Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani**, pelo auxílio prestado na realização dos experimentos com a citometria de fluxo.

Aos amigos de longa data, **Thiago, Elisângela e Eduardo, Marine e Danilo, Fabiana, Ana Carolina, Lilian, Poliana, Jean e Paulo**, pela amizade, que sempre torceram por mim e acompanharam todas as minhas alegrias e tristezas.

Aos que contribuíram para a realização deste trabalho.

E a **Deus**, pois sem ele, nada disso teria acontecido.

Meus sinceros agradecimentos.

Citotoxicidade, genotoxicidade e monitoramento do ciclo celular e da indução de apoptose, dos alcaloides sanguinarina e chelitrina, em linhagens celulares tumoral (HepG2/C3A e MCF-7) e não tumoral (MRC-5) humanas

RESUMO

A recorrência crescente de tumores em seres humanos e os graves efeitos secundários dos agentes quimioterápicos reduzem a eficácia clínica de uma grande variedade de substâncias anticarcinogênicas utilizadas rotineiramente. Por isso, há sempre uma constante necessidade de desenvolver e/ou descobrir drogas alternativas para o tratamento do câncer. Agentes quimioterápicos procedentes de plantas e derivados, têm se mostrado efetivos para o tratamento e prevenção desta doença. Os alcaloides quaternários benzo[c]fenantridinas, sanguinarina (SAN) e chelitrina (CHE), podem ser encontrados em diferentes plantas da família Papaveraceae (*Sanguinaria canadensis*, *Chelidonium majus*, *Macleaya cordata*), entre outras, e apresentam propriedades biológicas de interesse, como atividade citotóxica, genotóxica, antiproliferativa e apoptótica. Assim, o presente trabalho objetivou identificar os efeitos citotóxicos, genotóxicos, sobre a progressão do ciclo celular e apoptóticos dos alcaloides SAN e CHE, em diferentes linhagens celulares humanas. Foi observado que a SAN é citotóxica para células tumorais de hepatoma humano (HepG2/C3A) e fibroblastos não tumorais de pulmão humano (MRC-5), reduzindo efetivamente a viabilidade celular em diferentes tempos e concentrações. A análise da integridade da membrana plasmática mostrou que a linhagem tumoral é mais resistente à ação citotóxica do alcaloide. A análise do teste do cometa indicou que a SAN é mais genotóxica para a linhagem tumoral, enquanto que somente as concentrações mais elevadas apresentam o mesmo efeito sobre a linhagem não tumoral. A análise do ciclo celular indicou uma população de células da linhagem não tumoral em sub-G1, o que foi confirmado pelo ensaio de apoptose, em função da redução do percentual de células viáveis e do aumento de apoptose ou necrose. O alcaloide CHE é citotóxico para HepG2/C3A e MRC-5, reduzindo de maneira dose-dependente a viabilidade celular em diferentes tempos e concentrações. A análise da integridade da membrana plasmática mostrou que a CHE apresenta ação citotóxica para ambas as linhagens celulares. A análise do teste do cometa indicou que a CHE é mais genotóxica para a linhagem não tumoral, enquanto que somente concentrações maiores apresentam o mesmo efeito sobre a linhagem tumoral. A análise do ciclo celular não

identificou diferenças estatisticamente significativas na progressão da divisão celular em ambas as linhagens. Entretanto, o ensaio de apoptose mostrou que as maiores concentrações avaliadas reduziram o percentual de células viáveis e aumentaram o de apoptose inicial, nas duas linhagens. Os efeitos dos alcaloides SAN e CHE também foram avaliados em células de adenocarcinoma de mama (MCF-7). Foi observado que a SAN é citotóxica para células MCF-7, reduzindo efetivamente a viabilidade celular em diferentes tempos e concentrações, enquanto que a CHE foi citotóxica, mas não reduziu de forma efetiva a viabilidade celular. A análise da integridade da membrana plasmática mostrou que ambos alcaloides não interferiram na viabilidade celular e a análise do teste do cometa indicou que a SAN foi genotóxica para as células, enquanto que nenhuma das concentrações avaliadas do alcaloide CHE foi genotóxica. A análise do ciclo celular de MCF-7 tratadas com SAN não mostrou atrasos, mas indicou uma população maior em sub-G1, em decorrência de células apoptóticas ou necróticas, enquanto que a CHE não causou atrasos no ciclo celular e nem induziu um aumento de células em sub-G1. Desta forma, os resultados de citotoxicidade, genotoxicidade, análise de ciclo celular e indução de apoptose apresentados no presente estudo, sugerem que, possivelmente, os alcaloides SAN e CHE são promissores agentes para a avaliação de novas terapias relacionadas ao combate do câncer.

Palavras-chave: agentes quimioterápicos, alcaloides benzo[c]fenantridinas, câncer de mama, câncer de fígado, fibroblasto de pulmão, morte celular.

Cytotoxicity, genotoxicity, cell cycle monitoring and apoptosis induction of alkaloids sanguinarine and chelerythrine in human tumoral (HepG2/C3A and MCF-7) and non-tumoral (MRC-5) cell lines

ABSTRACT

The growing recurrence of tumors in human beings and severe side effects of chemotherapeutic agents reduce the clinical efficacy of a wide variety of anticarcinogenic substances routinely used. Therefore, there is always a constant need to develop and/or find alternative drugs for the treatment of cancer. Chemotherapeutic agents coming from plants and derivatives have proven effective in the treatment and prevention of this disease. Quaternary alkaloids benzo[c]phenanthridine, sanguinarine (SAN) and chelerythrine (CHE) can be found in different plants of the Papaveraceae family (*Sanguinaria canadensis*, *Chelidonium majus*, *Macleaya cordata*), among others, and have biological properties of interest, as activity, cytotoxic, genotoxic, antiproliferative and apoptotic. Thus, this study aimed to identify the cytotoxic, genotoxic, on the progression of the cell cycle and apoptotic of alkaloids SAN and CHE in different human cell lines. It was observed that SAN is cytotoxic to tumor cells of human hepatoma (HepG2/C3A) and non-tumor human lung fibroblast (MRC-5), effectively reducing cell viability at different times and concentrations. Analysis of membrane integrity showed that the tumor cell line is more resistant to the cytotoxic action of the alkaloid. The comet assay analysis indicated that the SAN is more genotoxic for the tumor cell line, whereas only the highest concentrations have the same effect on the non-tumor cell line. The cell cycle analysis indicated a population of non-tumor lineage cells in sub-G1, was confirmed by the apoptosis assay, due to the reduction in the percentage of viable cells and increased apoptosis or necrosis. The CHE alkaloid is cytotoxic to HepG2/C3A and MRC-5, reducing dose-dependent cell viability at different times and concentrations. Analysis of membrane integrity showed that CHE presents cytotoxic activity for both cell lines. The comet assay analysis indicated that the CHE, is more genotoxic for non-tumor cell line, while only higher concentrations have the same effect on the tumor cell line. The cell cycle analysis did not identify statistically significant differences in the progression of cell division in both strains. However, the apoptosis assay showed that the highest concentrations tested reduced the percentage of viable cells and increased the initial apoptosis, in both strains. The effects of alkaloids SAN and CHE were also

evaluated in breast adenocarcinoma cells (MCF-7). It was observed that the SAN is cytotoxic to MCF-7 cells, effectively reducing cell viability at different times and concentrations, while CHE was cytotoxic, but not effectively reduced cell viability. The analysis of plasmatic membrane integrity showed that both alkaloids did not affect the cell viability and the analysis of comet assay indicated that the SAN was genotoxic to cells, whereas none of the evaluated concentrations of alkaloid CHE was genotoxic. The cell cycle analysis of MCF-7 treated with SAN showed no delays, but indicated a greater population of sub-G1 as a result of apoptotic or necrotic cells, whereas CHE caused no delay in the cell cycle and did not induce an increase of cells in sub-G1. Thus, the results of cytotoxicity, genotoxicity, cell cycle analysis and apoptosis induction presented in this study suggest that possibly the alkaloids, SAN and CHE can be employed in the development of new therapies related to cancer treatment.

Keywords: benzo[c]phenanthridine alkaloids, breast cancer, cell death, chemotherapy agents, liver cancer, lung fibroblast.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 Câncer.....	13
2.1.1 Câncer de mama e fígado.....	15
2.2 Alcaloides de plantas.....	16
2.2.1 Sanguinarina e Chelitrina.....	18
2.3 Genética toxicológica.....	23
2.3.1 Citotoxicidade.....	24
2.3.2 Genotoxicidade.....	24
2.3.3 Indução de apoptose.....	25
2.4 Bioindicadores.....	26
2.4.1 Ensaio do MTT.....	26
2.4.2 Ensaio de Viabilidade Celular.....	28
2.4.3 Teste do Cometa.....	30
2.4.4 Análises por citometria de fluxo.....	32
2.4.5 Linhagens celulares.....	34
3. OBJETIVOS.....	38
3.1 Objetivo geral.....	38
3.2 Objetivos específicos.....	38
4. REFERÊNCIAS.....	38
CAPÍTULO 2	46
2.1 Artigo 1: O alcaloide sanguinarina causa um maior efeito citotóxico e genotóxico em células HepG2/C3A e apoptótico em células MRC-5, sem alterar o ciclo celular.....	46
CAPÍTULO 3	67
3.1 Artigo 2: Citotoxicidade, genotoxicidade e indução de apoptose, sem afetar o ciclo celular, do alcaloide chelitrina, em células HepG2/C3A e MRC-5.....	67
CAPÍTULO 4	87
4.1 Artigo 3: Diferentes efeitos citotóxicos, genotóxicos e sobre o ciclo celular, dos alcaloides sanguinarina e chelitrina, em células MCF-7.....	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS	107
ANEXO 1	108
ANEXO 2	116

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

1. INTRODUÇÃO

O câncer é um termo genérico para um amplo grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do organismo. Uma de suas características marcantes é a rápida proliferação de células malignas, que muitas vezes ultrapassam as próprias barreiras impostas pelo tecido, invadindo outras partes do corpo e se alastrando por diferentes órgãos, processo este descrito como metástase. As metástases são as principais causas de morte de indivíduos por câncer, ao redor do mundo (WHO, 2015).

A quimioterapia é uma estratégia essencial para o tratamento do câncer, mas a sua eficácia está restrita a fatores intrínsecos e também a resistência adquirida às drogas. Para contornar a quimiorresistência, inúmeras pesquisas têm focado na identificação de novas drogas que interfiram nos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento de tumores e metástases. A natureza é uma rica fonte de inspiração para a identificação e o desenvolvimento de novas drogas. Estima-se que aproximadamente 60% das drogas utilizadas na terapia do câncer são derivadas de fontes naturais ou obtidas através da síntese ou modificação estrutural de compostos naturais (DEBITON et al., 2003; SLANINOVÁ et al., 2014).

Diversos estudos mostraram que dentre as substâncias produzidas por plantas, um grupo de moléculas em especial, apresenta ação antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória, além de considerável atividade citotóxica e antiproliferativa, são chamados de alcaloides quaternários benzo[c]fenantridinas (QBAs). Dentro deste grupo, destacam-se duas substâncias, a sanguinarina (SAN) e a chelitrina (CHE), que apresentam um alto potencial biotecnológico para o desenvolvimento de novos agentes quimioterapêuticos. A ação destes compostos em nível celular está relacionada com a regulação de diversas vias metabólicas, que interferem na expressão gênica, por exemplo, e resultam em citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, citostase e apoptose, já demonstradas em diversas linhagens celulares tumorais humanas (HAMMEROVÁ et al., 2011; SLANINOVÁ et al., 2014).

Devido a poucos estudos comparativos da ação dos alcaloides SAN e CHE em células tumorais e não tumorais humanas, bem como seus efeitos em linhagens tumorais com elevada resistência à quimioterapia convencional (tumor de mama, por exemplo) ou com alta capacidade de metabolização (tumor de fígado, por exemplo), desenvolveu-se este trabalho com o intuito de verificar os efeitos citotóxicos, genotóxicos, monitoramento do ciclo celular e apoptóticos das referidas substâncias. Para tanto, avaliaram-se os seus efeitos sobre a atividade mitocondrial e integridade de membrana plasmática, genotoxicidade em nível de fragmentação

de DNA, análise do ciclo celular e indução de apoptose, nas linhagens celulares humanas tumorais HepG2/C3A e MCF-7, e não tumorais MRC-5.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Câncer

É de conhecimento geral que um dos maiores problemas de saúde pública mundial é o câncer. De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC), e da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012 (Tabela 1). A quantidade de casos de câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Nesses, os tipos de câncer mais frequentes na população masculina foram próstata, pulmão e cólon e reto; e mama, cólon e reto e pulmão entre as mulheres. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres. Em 2030, a carga global estimada será de 21,4 milhões de casos novos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas (INCA, 2014).

Tabela 1: Mortalidade por câncer ao redor do mundo, em 2012.

Tipo de câncer	Total de mortes
Pulmão	1.590.000
Fígado	745.000
Estômago	723.000
Colorretal	694.000
Mama	521.000
Esôfago	400.000

Fonte: WHO, 2015.

Importantes causas de doenças e mortes no Brasil, de 2010 a 2013, as neoplasias malignas representaram, em média, 13% dos óbitos de causa conhecida, de acordo com os dados do Sistema de Informações sobre Mortalidade, constituindo, assim, a segunda causa de morte na população (INCA, 2015). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, que foi válida

também para o ano de 2015 (Figura 1), aponta para a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma (182 mil casos novos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata (69 mil), mama feminina (57 mil), cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil), estômago (20 mil) e colo do útero (15 mil) (INCA, 2014).

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

Figura 1: Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014, por sexo, exceto pele não melanoma (INCA, 2014).

Com relação à doença, pode-se dizer que câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas caracterizadas pela perda do controle da proliferação celular e do ganho da capacidade de invasão de outros tecidos. O processo de carcinogênese é resultante do acúmulo de múltiplas mutações que culminam na insensibilidade de controle da célula cancerígena pelo ambiente celular local e pelo organismo como um todo (SARASIN, 2003). A progressão para o tumor maligno é governada por alterações essenciais na fisiologia celular, como auto-suficiência nos sinais de fatores de crescimento; insensibilidade aos sinais de fatores inibitórios de crescimento; evasão da apoptose; potencial replicativo ilimitado; sustento da angiogênese; invasão tecidual e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000); além de reprogramação do metabolismo energético celular e ativação dos mecanismos de evasão do sistema imunológico, aliados à instabilidade genômica e à inflamação, resultando em um microambiente favorável para o seu desenvolvimento (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Esses eventos são tradicionalmente separados em três fases: iniciação, promoção e progressão. Na fase de iniciação, ocorre o dano ao DNA por agentes químicos, físicos ou biológicos que predispõem essa célula danificada à instabilidade genética e alterações epigenéticas. A fase de promoção é aquela em que os promotores de tumor agem como mitógenos, induzindo a expansão de clones das células iniciadas. Também ocorrem eventos

genéticos e epigenéticos adicionais que levam ao acúmulo desses clones celulares. A progressão é caracterizada pelo desenvolvimento irreversível de mudanças macroscópicas e microscópicas pelas células já alteradas, genotípica e fenotipicamente, que agora possuem as características necessárias para a invasão e para a metástase (GESCHER et al., 2001).

2.1.1. Câncer de mama e fígado

O câncer de mama emerge como um problema de saúde pública cada vez mais preocupante em todo o mundo, devido ao crescente aumento nas taxas de incidência e mortalidade associadas a esta desordem. A cada ano, 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. No Brasil, a estimativa de novos casos para 2012 foi de 52.680, sendo, portanto, a maior causa de óbito por câncer na população feminina, e na região sul do país aparece em primeiro lugar entre as mulheres. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, estima-se que ocorram, por ano, mais de 1.050.000 casos novos de câncer de mama em todo o mundo (INCA, 2015).

Diversos estudos têm procurado esclarecer e identificar as causas e os possíveis fatores de risco relacionados ao câncer de mama. Alguns desses determinantes estão bem definidos em sua relação causal com a doença e outros ainda estão em fase de investigação. Dentre os principais fatores que predisõem ao câncer de mama, destacam-se: sexo feminino (pois pessoas do sexo masculino também podem ser acometidas), idade avançada, herança genética, histórico prévio de doença nas mamas, menarca precoce, menopausa tardia, nuliparidade, primeira gestação a termo após os 30 anos de idade, exposição à hormônios sexuais femininos, hiperplasia, e portadores de alteração no gene BCRA. Além destes, fatores ambientais tais como, tabagismo, ingestão dietética, sedentarismo e excesso de peso corpóreo, também têm sido investigados como fatores promotores de câncer de mama (PINHO; COUTINHO, 2007).

O câncer de mama é um sério problema de saúde. Apesar do advento de novas drogas e estratégias terapêuticas, existe ainda um número muito significativo de mulheres que morrem de câncer de mama, acompanhado pela progressão desta doença em metástases. Embora o câncer de mama metastático responda inicialmente à terapia hormonal, muitos pacientes apresentam recaídas. Neste contexto, a quimioterapia é normalmente prescrita quando há baixa responsividade na terapia hormonal. Apesar de a doxorrubicina e o paclitaxel serem geralmente, considerados como os medicamentos mais ativos contra o câncer de mama avançado, estes tratamentos são frequentemente descontinuados devido à toxicidade intolerável e/ou desenvolvimento de resistência à droga (KIM et al., 2008).

Apesar de não estar entre os dez tipos mais incidentes de câncer no Brasil, o carcinoma hepatocelular (ou hepatocarcinoma) ocorre em uma frequência três vezes maior em homens do que em mulheres, e representa a terceira maior causa de morte por câncer ao redor do mundo (ILAN, 2014). A faixa etária, com maior predomínio nos Estados Unidos e Europa, está localizada entre a 6ª e 7ª década, enquanto que, nas áreas de grande incidência (sudeste da Ásia, Japão e África do Sul), o tumor ocorre em pacientes mais jovens, entre a 3ª e 5ª década. Os tumores malignos de fígado podem ser divididos em dois tipos: câncer primário (que tem sua origem no próprio órgão) e secundário ou metastático (originado em outro órgão e que atinge também o fígado). Dentre os tumores originados no fígado, o mais frequente é o hepatocarcinoma, que é agressivo e ocorre em mais de 80% dos casos. No Brasil, foram registrados 8.100 casos de morte por este tipo de câncer, em 2011, sendo 4.556 homens e 3.544 mulheres (INCA, 2015).

As terapias atuais para o hepatocarcinoma, que envolvem a ressecção do órgão, transplante, radioterapia, quimioembolização ou quimioterapia com sorafenib, apresentam pouca eficácia em alguns casos e ainda estão distantes do ideal (ILAN, 2014). Assim, há uma necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas inovadoras e alternativas para o câncer que é resistente à terapia convencional. Para superar a resistência às drogas anticancerígenas, a terapia do câncer está tentando encontrar, entre diversas substâncias naturais biologicamente ativas, um agente citotóxico, apoptótico ou quimiopreventivo eficiente (KIM et al., 2008).

2.2. *Alcaloides de plantas*

Frente à necessidade de se identificar novas substâncias que auxiliem no tratamento de doenças como o câncer, a ciência encontrou uma fonte praticamente inesgotável de moléculas com alto potencial biológico: os vegetais. As plantas produzem um vasto número de metabólitos secundários, assim chamados porque esses metabólitos não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento e desenvolvimento básicos dos vegetais. Muitos destes produtos naturais das plantas desempenham um importante papel no processo de interação do vegetal com o ambiente, particularmente com o ambiente biótico, onde tais substâncias podem servir como agentes que atraem polinizadores ou dispersores de sementes, em defesa contra inimigos naturais ou parasitas, e ainda atuando como aleloquímicos, no processo de competição (KROYMANN, 2011).

Os compostos naturais das plantas determinam o odor e dão sabor aos vegetais, e podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais à saúde humana ou dos organismos que os ingerirem, o que

promove uma importante base para a pesquisa farmacêutica. Dezenas de milhares de metabólitos secundários de plantas já foram descritos. Por exemplo, cerca de 21 mil alcaloides, 22 mil terpenoides e 5 mil flavonoides e taninos já são conhecidos, mas isso representa muito provavelmente, apenas uma fração do que está presente na natureza (KROYMANN, 2011).

Sabe-se que cerca de 60% dos agentes utilizados como drogas para o tratamento do câncer são substâncias de origem natural. Além disso, diversos estudos mostraram que dentre os metabólitos secundários de plantas, um grupo de moléculas em especial, apresenta considerável atividade citotóxica e antiproliferativa, dos quais fazem parte os alcaloides quaternários benzo[c]fenantridinas (QBAs) (HAMMEROVÁ et al., 2011; SLANINOVÁ et al., 2014).

Este conjunto de substâncias forma um grupo relativamente pequeno de alcaloides derivados do nucleotídeo isoquinolina, que ocorre em muitas espécies de plantas das famílias Papaveraceae, Fumariaceae, Ranunculaceae e Rutaceae. Os mais comuns são os QBAs que apresentam em sua estrutura um átomo de nitrogênio quaternário, sendo que os mais representativos são a sanguinarina e a chelitrina, hoje disponíveis comercialmente para pesquisa (HAMMEROVÁ et al., 2011; SLANINOVÁ et al., 2014).

Os QBAs possuem um amplo espectro de atividades biológicas, dentre as quais, as atividades antimicrobianas, antifúngicas e anti-inflamatórias são as mais importantes aplicações práticas destes compostos. O seu uso também se dá na formulação de produtos higiênicos dentários, reduzindo a formação de placa bacteriana, e como aditivo alimentar em rações de aves, bovinos e suínos (DVORAK et al., 2006).

Os QBAs apresentam múltiplos alvos celulares, determinados particularmente por: (i) reações com radicais nucleofílicos e aniônicos dos aminoácidos dos peptídeos e das proteínas; (ii) formação de complexos moleculares com o DNA, por intercalação; (iii) inibição das proteínas quinases C, proteínas quinases C dependentes de cálcio ou fosfolipídeos, e proteínas quinases dependentes de AMP cíclico (DVORAK et al., 2006).

O potencial quimioterápico destes alcaloides pode ser atribuído à sua capacidade de ligação ao DNA. Estas moléculas com capacidade de se intercalar entre a dupla fita de DNA têm desempenhado um importante papel no tratamento dos mais diversos tipos de cânceres humanos. Diversos QBAs foram identificados como fortes agentes intercalantes de DNA. Alguns estudos mostraram que estes alcaloides exibem um equilíbrio estrutural, dependente de pH, entre as formas imino (carregada) e alcanolamina (ou pseudobase, descarregada). Foi demonstrado que as formas imino se ligam fortemente ao DNA por intercalação, com uma

maior especificidade para regiões ricas em GC, enquanto que as formas alcanolamina não se ligam ao DNA (BAI et al., 2006; HOSSAIN; KUMAR, 2009).

2.2.1. Sanguinarina e Cheliritrina

Os alcaloides sanguinarina (13-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]-1,3-dioxolo[4,5-i]phenanthridinium) e cheliritrina (1,2-dimethoxy-N-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridinium) apresentam estrutura molecular composta por 4 anéis benzênicos, com uma substituição para nitrogênio na posição 5, sendo que as diferenças encontram-se apenas nas substituições dos radicais R_3 e R_4 , como pode ser observado na Figura 2. Essas substâncias são metabolizadas por microsossomos de células hepáticas que contém o citocromo P450, e as formas oxidadas destes alcaloides podem formar adutos de DNA (KAMINSKY et al., 2006). Do ponto de vista químico, ambos alcaloides se interconvertem entre as formas catiônica e neutra (ou seja, hidroxilada e pseudobase), sendo que ambos penetram a membrana plasmática da célula no formato apolar de pseudobase (SLANINOVA et al., 2001).

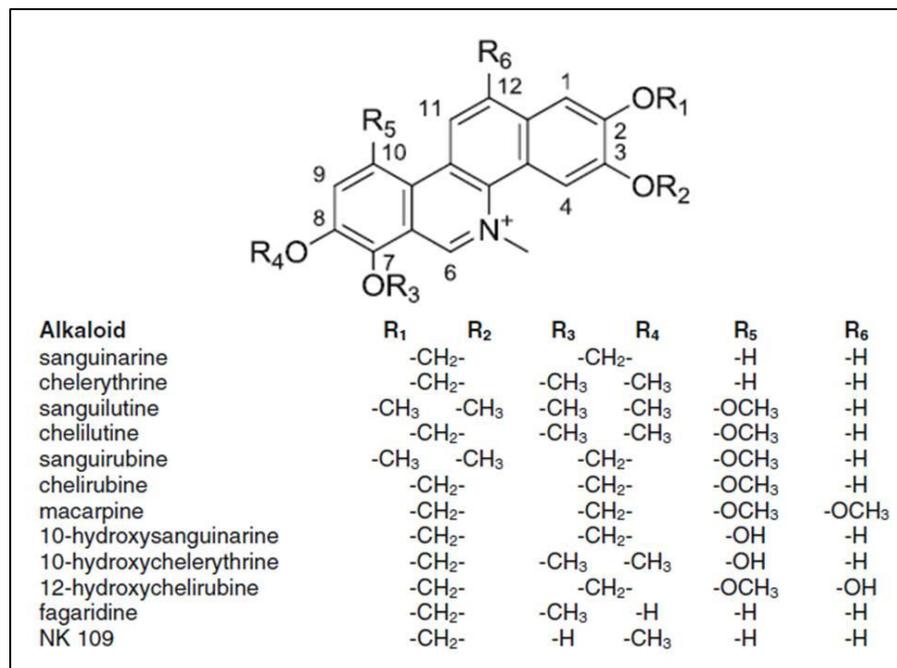


Figura 2: Estrutura geral dos principais QBAs. Fonte: SLANINOVA et al., 2014.

Dentre as plantas que apresentam os QBAs tetrassubstituídos sanguinarina (SAN) e cheliritrina (CHE), podem ser citadas: *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae, sanguinária, cuja seiva radicular e rizomas contém 4-7% destes alcaloides, e as raízes, com cerca de 1,8%), *Chelidonium majus* (Papaveraceae, celidônia ou celidônia maior, cujas raízes possuem 4,5%

destes alcaloides), e *Macleaya cordata* (Papaveraceae, papoula plumosa, cujas partes aéreas contém cerca de 3% destes alcaloides) (KOSINA et al., 2004). Também podem ser encontrados em *Dicranostigma lactuoides*, *Eschscholtzia californica* e *Macleaya microcarpa* (MALÍKOVÁ et al., 2006; SUCHOMELOVÁ et al., 2007). Em algumas plantas, os alcaloides SAN e CHE ainda são acompanhados pelos derivados pentassubstituídos sanguilutina, chelilutina, sanguirrubina e chelirrubina. As espécies *Stylophorum lasiocarpum* e *M. microcarpa* são fontes do alcaloide hexassubstituído macarpina (SUCHOMELOVÁ et al., 2007).

São diversos os mecanismos de ação que resultam em citotoxicidade. A citostase, por exemplo, está relacionada com a progressão do ciclo celular, e qualquer bloqueio em alguma destas etapas, pode ocasionar a morte celular programada. A interação com os microtúbulos é um mecanismo básico de citostase que causa atraso no ciclo celular em G2/M. Slaninova et al. (2001) observaram uma redução na rede de microtúbulos de células HeLa tratadas com SAN (IC₅₀=0,8µg/mL) ou CHE (IC₅₀=6,2µg/mL), enquanto que concentrações maiores por maior tempo de exposição resultaram na completa despolimerização dos microtúbulos. Entretanto, o mesmo efeito não foi observado para leveduras (até 100µg/mL). A forte ação inibidora da SAN foi justificada pela sua facilidade em atravessar a membrana plasmática da célula na forma de pseudobase (apolar).

Han et al. (2013) avaliaram a ação da SAN em diferentes linhagens celulares cancerígenas de bexiga humana por diferentes testes e verificaram que este alcaloide é citotóxico em concentrações de 0,6-1,5 µM, pelo teste do MTT, por 24h. Além disso, a concentração de 1,5µM induziu efetivamente apoptose (em média, 70% de células em sub-G1, pela análise do ciclo celular, e 50% de células apoptóticas, com exposição de fosfatidilserina). Os autores ainda constataram um aumento na expressão de genes pró-apoptóticos, caspases-8, -9 e -3, e maior produção de espécies reativas de oxigênio, evidenciando o potencial quimioterapêutico desta substância.

Tsukamoto et al. (2011) também avaliaram a atividade quimioterapêutica da SAN em células de carcinoma escamoso oral, e verificaram que o alcaloide possui atividade antiproliferativa, pelo teste do MTT (IC₅₀=1 µM), por 72h; suprime o crescimento independente de ancoragem; e induz apoptose pela ativação de caspases e alteração da razão Bcl-2/Bax, inibindo efetivamente o processo de tumorigênese.

O óleo de argemone, extraído das sementes de *Argemone mexicana* (cardo-santo ou papoula-mexicana), é um contaminante comum do óleo de mostarda, e contém significativas frações de SAN e dihidrossanguinarina. Estes alcaloides causam quadros graves de hidropsia

em humanos e são os responsáveis por sua elevada toxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade em camundongos, causada principalmente, pela geração de espécies reativas de oxigênio e sua capacidade de intercalar com o DNA (ANSARI et al., 2004, 2005, 2006).

Ahmad et al. (2000) compararam os efeitos citotóxicos e apoptóticos da SAN em células de carcinoma epidermoide humano (A431) e em queratinócitos normais humanos (NHEKs), e verificaram que a citotoxicidade é um evento dose-dependente da concentração do alcaloide avaliado para as células, pelo teste de exclusão com azul de trypan. Por sua vez, o estudo de apoptose por fragmentação do DNA mostrou que as células cancerígenas são mais sensíveis, uma vez que concentrações mais baixas (1-5 μM) de SAN induzem a quebra do material genético, enquanto que apenas concentrações mais elevadas (10 μM) apresentam igual efeito sobre as células normais. Em contraste, Debiton et al. (2003) identificou sensibilidade similar para a SAN em diferentes linhagens de células normais e tumorais.

Choi et al. (2009) demonstraram que concentrações subtóxicas de SAN (menores que 1 μM) são eficientes em sensibilizar células de adenocarcinoma humano para o tratamento com ligantes indutores de apoptose relacionados à fatores de necrose tumoral (TRAIL), indicando uma ação adjuvante desta substância ao tratamento quimioterapêutico convencional. Foi constatado que o co-tratamento com estas substâncias aumenta o número de células em apoptose, observada por citometria, além de causar um aumento na fragmentação do DNA.

A atividade citotóxica da CHE foi estudada por Zhang et al. (2011), em células de hepatoma humano (SMMC-7221). Os autores verificaram pelo teste do MTT que o tempo de exposição e a concentração afetam diretamente a viabilidade celular ($\text{IC}_{50} = 9,7, 6,3 \text{ e } 4,2 \mu\text{g/mL}$, em 24, 36 e 48 horas, respectivamente). Além disso, análises morfológicas e de citometria indicaram indução de apoptose por exposição de fosfatidilserina, atraso do ciclo celular em S e fragmentação de DNA. A despolarização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo *c*, ativação de caspases-3 e redução nos níveis de proteínas antiapoptóticas (família Bcl-2 e Bcl-xl) foram indicadas como as causas da indução de apoptose da CHE nesta linhagem celular.

Funakoshi et al. (2011) mostraram que CHE (0-20 μM) induz rapidamente a morte celular programada em células derivadas de cardiomiócitos (H9c2), até 8 minutos após a exposição ao alcaloide. A atividade proteolítica das caspases-9 e -3, mediadoras cruciais da via de apoptose mitocondrial, foi observada após 6 minutos de exposição das células ao alcaloide. Os autores propuseram que este efeito apoptótico rápido está relacionado com vias alternativas de morte celular ainda pouco caracterizadas, e não com a produção de espécies reativas de oxigênio, que ocorre nas mitocôndrias. Entretanto, Kumar e Acharya (2014) verificaram que a

indução de apoptose pela via mitocondrial é diretamente conduzida pela elevada produção de espécies reativas de oxigênio, em células DL de linfoma murino.

Kumar et al. (2015) observaram que o tratamento com CHE resulta na ativação da via de apoptose dependente da proteína p53, com aumento significativo nos níveis desta proteína e de seu mRNA, também em células DL. Ademais, o aumento de citocromo *c* citosólico, caspases-9 e -3 e fragmentação de DNA confirmaram a ativação de vias de apoptose independentes de p53 em células que não expressam esta proteína, sugerindo a utilização deste alcaloide para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de outros tipos de cânceres humanos.

Os metabólitos da biotransformação da CHE por enzimas de fase I e fase II, em cultura de hepatócitos humanos foram analisados por diferentes técnicas de cromatografia líquida e espectrometria de massa, por Vacek et al. (2013). Estes autores encontraram 11 e 5 metabólitos da CHE para enzimas de fase I e II, respectivamente, e 11 e 6 metabólitos da dihidrocheleritrina para enzimas de fase I e II, respectivamente. Os metabólitos mais abundantes da CHE (dihidrocheleritrina e sua forma desmetilada) tiveram sua citotoxicidade avaliada em cultura primária de hepatócitos humanos, pelos testes do MTT. Ambos os metabólitos não foram citotóxicos (0-50 μM), indicando uma diminuição dos efeitos tóxicos destes produtos da biotransformação da CHE.

Igualmente, dois alcaloides derivados da CHE isolados de raízes da planta medicinal africana *Zanthoxylum capense*, dihidrocheleritrina e 6-acetonildihidrocheleritrina, foram testados em células de carcinoma de cólon humano (HCT116). O primeiro alcaloide não foi citotóxico (5-50 μM , por 48h) pelo teste do MTT, enquanto que o segundo apresentou elevada citotoxicidade pelo mesmo teste, reduzindo em 95% a viabilidade celular (20 μM), além de induzir altas taxas de apoptose, com ativação de caspases-3 (MANSOOR et al., 2013).

Habermehl et al. (2006), estudando o efeito da droga anticâncer Ukrain[®] (Nowicky Pharma, Áustria), composta por QBAs isolados de *Chelidonium majus* (principalmente SAN, CHE, celidonina, protopina e alocriptopina), observaram potente efeito despolarizador da membrana mitocondrial e ativador de caspases, com consequente morte celular programada, em células de linfoma-T de Jurkat.

Kaminsky et al. (2008) verificaram que a indução de apoptose pelos alcaloides SAN e CHE em células de leucemia humana CEM-T, é acompanhada por um rápido acréscimo de citocromo *c* citosólico que precede a ativação de caspases-8, -9 e -3. Durante a indução de apoptose, os alcaloides rapidamente produziram espécies reativas de oxigênio, contribuindo para a perda do potencial de membrana mitocondrial, enquanto que a fração de proteínas Bax,

Bcl-2 e Bcl-XL não sofreram alterações significativas. Os autores também observaram uma intensa atividade genotóxica dos alcaloides pelo teste do cometa.

Hammerová et al. (2011), estudando os efeitos dos alcaloides SAN e CHE, observaram uma potente ação anti-proliferativa em células de melanoma maligno e uma forte atividade apoptótica, provavelmente mediada pelo decréscimo de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-xL, Mcl-1, XIAP), acompanhada por perda de potencial da membrana mitocondrial e clivagem de caspases-3. Este estudo também levou em consideração a atividade da proteína p53 nas células analisadas, porém a toxicidade dos alcaloides foi a mesma, independente da funcionalidade desta proteína.

Malíková et al. (2006) comparou os efeitos da SAN e CHE sobre linhagens normais de fibroblasto de gengiva e tumorais de próstata (DU-145 e LNCaP, respectivamente) e observou uma maior sensibilidade para os fibroblastos de DU-145 do que para LNCaP. SAN foi identificada como um inibidor da proteína survivina, que seletivamente mata células tumorais da próstata, mas não células epiteliais deste mesmo órgão (SUN et al., 2010).

SAN e outros extratos contendo QBAs exibem uma baixa toxicidade oral aguda ($LD_{50} = 1,7$ e $1,4$ g/kg, respectivamente, em ratos). Em estudos subcrônicos, poucas evidências de toxicidade relacionadas aos QBAs foram descritas (doses > 30 mg/kg/dia, em ratos e macacos) (WALTEROVA et al., 1995).

Chan (2011), avaliando os efeitos teratogênicos dos QBAs, mostrou que blastocistos de camundongos tratados com SAN ($0,5-2$ μ M) exibem um aumento significativo no número de células em apoptose e um correspondente decréscimo do número total de células que o constituem. Consequentemente, a taxa de implantação dos blastocistos tratados com SAN também foi menor que o observado para o controle.

Das et al. (2004) verificaram a habilidade da SAN em induzir clastogenicidade e dano ao DNA pelo aumento das trocas entre cromátides irmãs, em medula óssea de camundongos, por 24h. Doses de 5, 10 e 15 mg/kg de peso corpóreo não foram citotóxicas, mas induziram uma resposta positiva e dose-dependente para a clastogenicidade e para a frequência de trocas entre cromátides.

De Stefano et al. (2009) avaliaram a atividade antitumoral da SAN (5 mg/kg/dia) utilizando células de melanoma murino (B16) inoculadas em ratos e células de melanoma humano (A-375) inoculadas em camundongos imunodeficientes. Em ambos os casos, os tratamentos com SAN inibiram significativamente o crescimento do tumor em comparação ao controle. Além disso, SAN exibiu uma marcante atividade antiangiogênica e não foram observados efeitos colaterais ou toxicidade em decorrência do tratamento com o alcaloide.

Zdarilova et al. (2008), avaliaram a suplementação alimentar de ratos Wistar com partes aéreas de *Macleaya cordata*, que contém frações significativas de QBAs, nas concentrações de 100, 7.000 e 14.000 mg/kg de ração, por 90 dias. Foram monitorados os pesos corpóreos e de órgãos; marcadores clínicos e hematológicos; parâmetros de estresse oxidativo; morfologia da língua, fígado, íleo, rim e coração; e citocromo P450 total do fígado. Os resultados não mostraram diferenças significativas entre controles e tratamentos, exceto para o grupo que recebeu maior suplementação da planta, que apresentou maiores níveis de atividade no fígado para as enzimas antioxidantes glutatona redutase e superóxido dismutase.

A suplementação de rações para suínos com SAN e CHE (até 5mg/kg de peso corpóreo do animal, na proporção SAN/CHE 3:1) não acarretou em implicações aparentes na saúde destes animais. Após 90 dias de administração, os alcaloides foram quantificados em diferentes tecidos. A maior taxa de retenção foi detectada na gengiva (0,55mg/g) e no fígado (0,15mg/g), não sendo detectados nos músculos. A concentração plasmática de SAN foi de 0,11mg/mL. Não foram observadas diferenças hematológicas, bioquímicas ou histológicas quando os resultados de SAN foram comparados aos dos controles. Ainda no fígado, não foi detectada nenhuma evidência de adutos de DNA relacionados à SAN/CHE (KOSINA et al., 2004). Similarmente, Stiborova et al. (2008) avaliaram pelo teste do cometa o potencial genotóxico de rações suplementadas com os alcaloides SAN e CHE, e não encontraram danos ao DNA em linfócitos e hepatócitos de ratos Wistar, após 90 dias de administração.

2.3. Genética toxicológica

A avaliação da toxicidade genética e/ou atividade carcinogênica é um elemento essencial dos programas de monitoramento empregados para proteger a saúde humana. O estudo da genética toxicológica é vital para a avaliação dos agentes encontrados em diferentes cenários ambientais e ocupacionais (ar urbano, escapamentos de veículos, etc.), bens de consumo (corantes de tecido, pesticidas, produtos do tabaco, etc.), alimentos, aditivos alimentares e substâncias que entram em contato com alimentos (pesticidas, plastificantes, etc.), e produtos terapêuticos (medicamentos, produtos naturais para a saúde, dispositivos médicos, etc.). Além disso, um estudo detalhado da genotoxicidade pode proporcionar um entendimento mais profundo dos processos que estão relacionados à formação de lesões no DNA e a mutação (AVANCINI et al., 2015).

2.3.1. Citotoxicidade

As células respondem rapidamente ao estresse tóxico alterando as taxas metabólicas, o crescimento celular ou a transcrição genética para controlar suas funções celulares básicas. Assim, a citotoxicidade pode ser considerada como o potencial de um composto para induzir a citostase ou até mesmo a morte celular (EISENBRAND et al., 2002).

Desta forma, testes de citotoxicidade *in vitro* são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, ou seja, a capacidade intrínseca de um composto para provocar a morte de células como consequência dos danos nas funções celulares básicas. Testes de citotoxicidade também são necessários para definir a faixa de concentração a ser testada com relação aos parâmetros de genotoxicidade, mutagenicidade ou morte celular programada (EISENBRAND et al., 2002).

Existem compostos que apresentam elevada citotoxicidade, e assim, são capazes de inibir as divisões celulares. No caso de células em cultura, a citotoxicidade pode ser avaliada calculando-se o crescimento das células como uma estimativa de confluência, por meio de testes colorimétricos, por um teste de sobrevivência ou de eficiência na formação de colônias, entre outros (TAKAHASHI, 2003).

2.3.2. Genotoxicidade

A descoberta do DNA como o material genético por Avery, MacLeod e McCarthy (1944), e a descrição da sua estrutura por Watson e Crick (1953), indicou que o DNA é o alvo celular de diferentes agentes que podem provocar mutações (LOEB; HARRIS, 2008).

O DNA constantemente é atacado por agentes químicos, incluindo espécies reativas de oxigênio, fatores ambientais, agentes biológicos, vírus, e agentes físicos. Os danos que acometem o DNA estão associados com a etiologia de diversas doenças graves, dentre elas, lesões oxidativas que implicam no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, de envelhecimento, e a sua relevância patológica está em várias fases do processo carcinogênico (GYORI et al., 2014).

A integridade do DNA é fundamental para a sobrevivência e manutenção da homeostase celular. Assim, o DNA danificado por uma fonte exógena (por exemplo, produtos químicos ou irradiação) ou endógena (por exemplo, erros de replicação ou metabólitos reativos), desencadeia uma resposta de sinalização. Esta resposta aos danos pode reter o ciclo celular ou ativar o mecanismo de reparo adequado, mas se o dano for irreparável, pode levar à morte celular (STECHOW et al., 2014).

Desta forma, genotoxicidade é a capacidade que alguns agentes possuem de induzir alterações no material genético. Assim, agentes genotóxicos têm como propriedade causar lesões genômicas que são passíveis de correção pelo sistema de reparo de erros do DNA, no entanto, se não reparadas, podem resultar em mutações (GONTIJO; TICE, 2003; MAURICI et al., 2005; EASTMOND et al., 2009).

2.3.3. Indução de Apoptose

A morte celular programada, ou apoptose, é um processo geneticamente regulado que desempenha um papel essencial no desenvolvimento e homeostase dos organismos superiores, removendo harmonicamente células dos tecidos, sem ativação de processos inflamatórios. Falhas no controle deste mecanismo podem contribuir para o desenvolvimento de diversos tipos de doenças ou até mesmo de malignidades (HUSSAIN et al., 2007; SCHARPER; REUTELINGSPERGER, 2013).

A apoptose constitui um processo fisiológico de morte celular que envolve a ativação de complexos proteolíticos intracelulares. Neste cenário, proteases intracelulares especializadas intracelulares, conhecidas como caspases, são as responsáveis pelo processo de apoptose, que cliva uma gama de substratos celulares, levando a alterações morfológicas e finalmente à morte celular (FISCHER et al., 2003). Diversas evidências mostram que as caspases podem ser ativadas por sinais extrínsecos (dependentes de sinais específicos de morte que se ligam a receptores de membrana) ou intrínsecos (independentes de receptores de membrana, uma vez que essa rota é desencadeada por sinais mitocondriais) (HABERMEHL et al., 2006; SCHARPER; REUTELINGSPERGER, 2013).

A mitocôndria também desempenha um papel na atividade quimioterapêutica de uma série de substâncias relacionadas com a morte celular. Danos mitocondriais que envolvem a permeabilidade da membrana mitocondrial externa ativam uma série de eventos que conduzem a célula à morte. A ativação da via intrínseca de apoptose envolve a liberação de citocromo *c* e outros fatores pró-apoptóticos do espaço intermembranas. No citosol, o citocromo *c* se liga ao fator de ativação de proteases apoptóticas (APAF-1), formando o complexo conhecido como apoptossomo, que recruta e ativa procaspases-9, dando início à cascata de eventos que conduzem a apoptose (HABERMEL et al., 2006). Uma das consequências da disfunção mitocondrial é uma produção excessiva de espécies reativas de oxigênio. O oxigênio é inicialmente convertido no ânion superóxido e o estresse oxidativo resulta em danos de componentes celulares, incluindo outras estruturas mitocondriais, que eventualmente também podem induzir a apoptose. Diversas outras características das células apoptóticas, como a perda

de viabilidade celular, fragmentação do DNA ou condensação da cromatina são características úteis para monitorar a apoptose (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

A indução de apoptose é um mecanismo comum da ação citotóxica da maioria das drogas indutoras de dano ao DNA, e também das radiações. No entanto, as células tumorais são frequentemente caracterizadas por alterações em genes que codificam para proteínas sinalizadoras de sobrevivência ou apoptose. Neste sentido, um aumento nos níveis de proteínas anti-apoptóticas ou uma diminuição dos níveis de proteínas pró-apoptóticas, pode causar resistência adquirida ou intrínseca, contra a indução de apoptose por dano ao DNA, causado por drogas antineoplásicas ou radiações ionizantes, que deste modo, contribuem para a falha no tratamento e ao baixo prognóstico clínico. Assim, novas substâncias citotóxicas, antiproliferativas e apoptóticas ou que induzam rotas alternativas de morte celular, podem ser utilizadas para superar a resistência ao tratamento convencional de tumores (SCHOLZ et al., 2005; HABERMEHL et al., 2006).

2.4. Bioindicadores

O estudo epidemiológico do câncer e da maioria das doenças crônicas depende cada vez mais do uso de biomarcadores moleculares, ou seja, de parâmetros celulares ou bioquímicos que podem ser medidos de forma não invasiva, e que normalmente, dão uma indicação da exposição ocupacional ou ambiental de um indivíduo a agentes mutagênicos ou carcinogênicos. Nesse sentido, os biomarcadores podem fornecer informações sobre diferenças individuais de resistência a tais agentes, como os fatores genéticos e os fatores comportamentais. Em alguns casos, podem ainda, detectar fases precoces do desenvolvimento de doenças ou ainda indicar o risco no futuro (COLLINS et al., 2014).

2.4.1. Ensaio do MTT

Os ensaios de citotoxicidade em cultura de células podem ser baseados em ensaios colorimétricos, como é o caso do Ensaio do MTT. O MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) é um sal de tetrazólio que é reduzido para formazan (1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difenilformazan) por células vivas (MOSMANN, 1983; BERNAS; DOBRUCKI, 2002). Esse ensaio avalia a sobrevivência celular, pois, baseia-se na capacidade da succinato desidrogenase, uma enzima do ciclo de Krebs, ativa em mitocôndrias de células vivas, converter o sal tetrazólio, hidrossolúvel e de cor amarelada, em cristais de formazan, de coloração roxa. Portanto, somente células vivas conseguem fazer essa conversão, indicando

atividade mitocondrial e consequentemente, a viabilidade celular (COLLIER; PRITSOS, 2003) (Figuras 3 e 4).

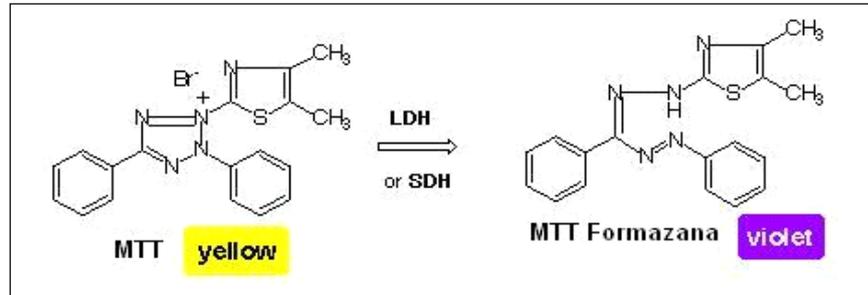


Figura 3: Conversão do sal tetrazólio pela succinato desidrogenase em cristais de formazan. Fonte: NGUYEN et al., 2013.

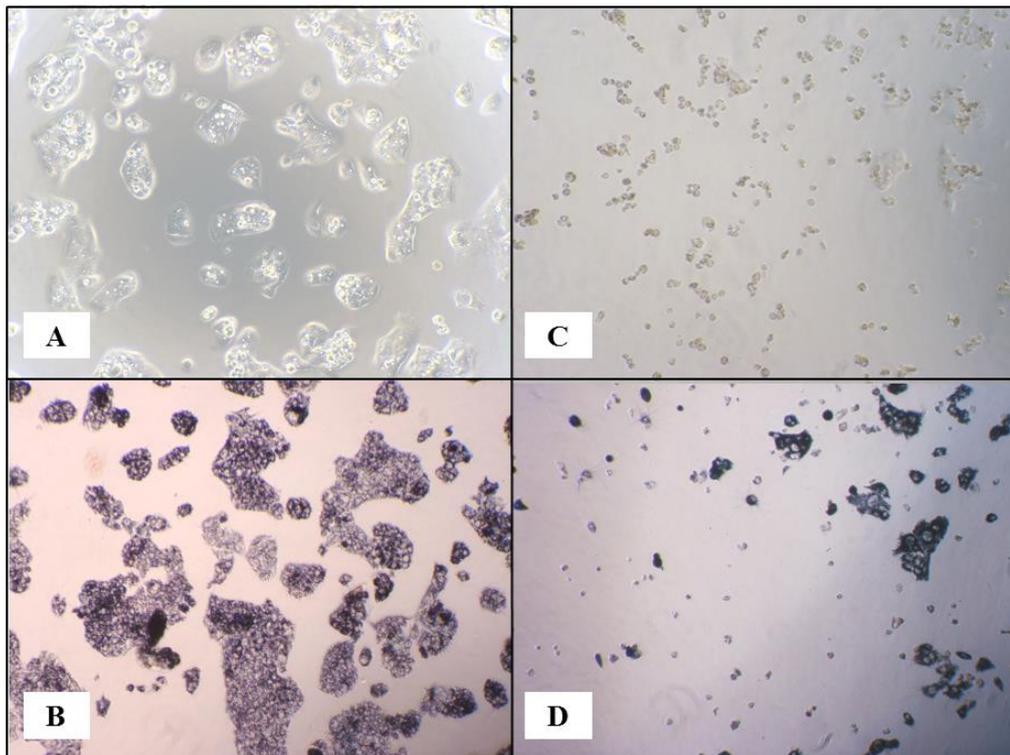


Figura 4: Teste de citotoxicidade do MTT em células HepG2/C3A, após 48 h. A: células do grupo controle; B: células do grupo controle posteriormente tratadas com MTT; C: células tratadas com o agente citotóxico metil metanossulfonato; D: células tratadas com o agente citotóxico metil metanossulfonato e posteriormente MTT. Aumento: 100x. Fonte: Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

Partindo deste pressuposto, o formazan produzido por suspensões celulares correlaciona-se diretamente com o número de células vivas metabolicamente ativas. Assim, o ensaio colorimétrico do MTT é utilizado como um ensaio para a proliferação celular.

Indiretamente, a morte celular pode ser quantificada pela determinação da porcentagem de células viáveis (CLEMENT et al., 1998).

Embora a redução do MTT seja geralmente atribuída à atividade da cadeia respiratória mitocondrial, ela também tem sido relacionada com as enzimas não mitocondriais, presentes no citoplasma ou em outros compartimentos citoplasmáticos (BERNAS; DOBRUCKI, 2002). Em uma linhagem de células derivadas de medula óssea verificou-se que a maior parte da redução de MTT celular ocorre no exterior da membrana mitocondrial interna. Em outro estudo, com uma linhagem de células derivadas de tumores de cérebro de rato, observou-se que o MTT não foi reduzido exclusivamente na mitocôndria, mas também em vesículas intracelulares, algumas das quais foram identificadas como endossomos e lisossomos. Além disso, foi observado que o MTT não se difunde através da membrana plasmática, mas é tomado por endocitose (LIU et al., 1997).

Contudo, Collier e Pritsos (2003) indicaram que os processos oxidativos, bem como outras cadeias mitocondriais enzimáticas de elétrons, possam ser responsáveis pela metabolização do MTT. Assim, o aumento da viabilidade celular é inversamente proporcional à quantidade de oxigênio reativo liberado pelas células. Deste modo, o ensaio de citotoxicidade do MTT é considerado um método rápido e confiável.

2.4.2. Ensaio de Viabilidade Celular

Os testes de citotoxicidade são de fundamental importância, pois são capazes de detectar compostos que induzem a morte celular por diversos mecanismos, revelando inúmeros compostos aos quais a exposição pode induzir a morte celular (LOVELAND *et al.*, 1992).

O ensaio de viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Trypan é uma das técnicas mais simples utilizadas para avaliar a citotoxicidade, pois este corante, ao penetrar a membrana plasmática das células, é transportado ativamente para fora do citoplasma das células viáveis, portanto, só consegue permanecer nas células caso haja a ruptura da membrana plasmática, um sinal característico que antecede a morte celular. As células vivas apresentam-se arredondadas, transparentes, com a membrana refringente e os limites nítidos (Figura 5). A contagem de células é determinada por amostragem, utilizando a câmara de Neubauer e microscópio de luz (SHMALZ, 1994).

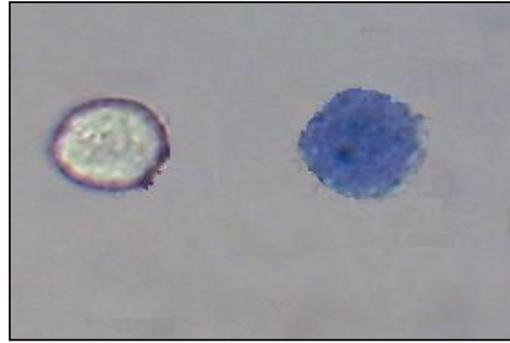


Figura 5: Célula HepG2/C3A viável (refringente) e não viável (azul), observadas ao microscópio de luz (400x).
Fonte: Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

Os testes de viabilidade também são importantes para a avaliação dos testes de genotoxicidade, ao mostrar se a população das células estudadas é satisfatória (>80%); se o tratamento com o possível agente genotóxico pode estar causando a morte celular, impedindo a verificação da ação genotóxica; ou ainda, se o agente interfere na velocidade do ciclo celular, interferindo na curva de crescimento por atrasos no ciclo, ou indução de apoptose, ou seja, o comportamento celular frente às condições do ambiente ao qual estão expostas (EISENBRAND et al., 2002; DITTMAR et al., 2012).

A estimativa da viabilidade de uma população de células pode também ser mensurada por citometria de fluxo a partir de um princípio bastante simples: células mortas sofrem lesão de membrana. Células que morrem pela via necrótica, diferentemente da via apoptótica, perdem rapidamente a integridade da membrana, dando passagem a corantes fluorescentes solúveis (como o iodeto de propídeo), que podem substituir ou complementar o método de exclusão com azul de trypan. Assim, a diferença de fluorescência entre células viáveis e mortas pode ser rapidamente obtida pela citometria de fluxo (WEAVER, 1998) (Figura 6).

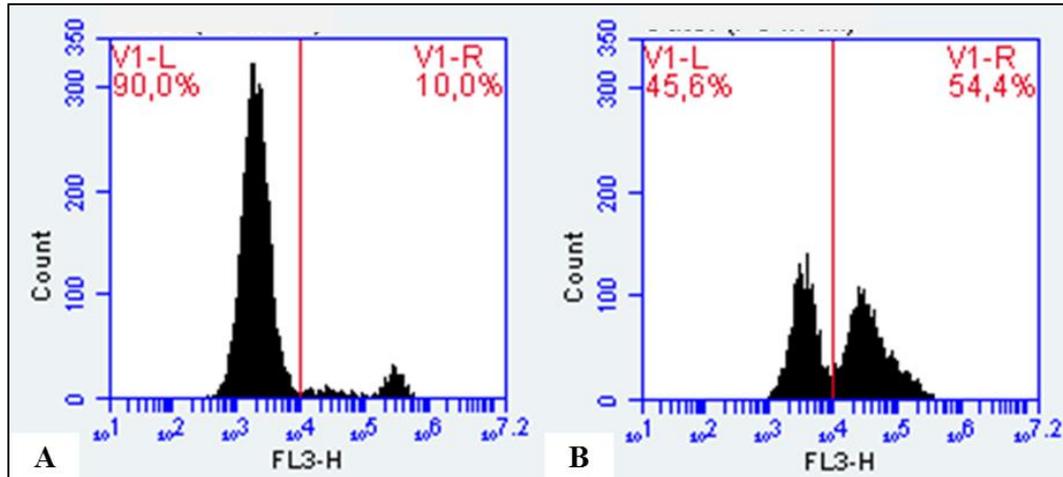


Figura 6: Análise da integridade da membrana plasmática em células HepG2/C3A por captação de iodeto de propídeo, em citometria de fluxo (V1-L: células viáveis, menor fluorescência; V1-R: células inviáveis, maior fluorescência). A: controle; B: tratamento com o agente citotóxico camptotecina. Fonte: Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

2.4.3. Teste do Cometa

O teste do cometa, também conhecido como eletroforese de célula única em gel (*Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE*), é um método simples, sensível e confiável para o estudo de danos ao DNA induzidos por agentes físicos, químicos e biológicos (OSTLING; JOHANSON, 1984; OLIVE; BANÁTH, 2006). A técnica se baseia na incorporação de células em agarose e lisadas, seguida por eletroforese. Durante a eletroforese, fragmentos de DNA, que apresentam carga negativa, migram através de um gel de agarose em resposta a um campo elétrico. A extensão da migração do DNA depende diretamente do dano presente nas células (TICE et al., 2000). Após a corrida eletroforética, os danos podem ser visualizados sob a forma de cometa, pelo fato do DNA danificado e fragmentado migrar para o ânodo.

Ostling e Johanson (1984) introduziram o método de eletroforese em microgel para medir quebras no DNA sob condição de pH neutro. No entanto, enquanto as condições neutras para a lise e eletroforese permitem a detecção de quebras de cadeia dupla, não permitem a detecção das quebras de cadeia simples. Muitos agentes induzem de cinco a duas mil vezes mais quebras de fita simples do que de fita dupla, portanto, condições neutras não são tão sensíveis como condições alcalinas na detecção de danos no DNA. Condições alcalinas também resultam na degradação de RNA, que poderia interferir na quantificação das amostras coradas com brometo de etídio. Dessa forma, a avaliação de danos no DNA em células individuais em condições alcalinas, otimiza a desnaturação do DNA e a sua migração, permitindo assim, uma avaliação de quebras de cadeia simples em locais álcali-lábeis (SINGH et al., 1988). Assim, o

ensaio do cometa na forma alcalina foi rapidamente adotado para uso em testes de genotoxicidade, tanto *in vivo* quanto *in vitro* e se mantém na sua forma mais comumente utilizada (COLLINS et al., 2014).

Além disso, o teste do cometa oferece vantagens consideráveis quando comparado a outros métodos de citogenética usados na detecção de danos no DNA, tais como, estudo de trocas entre cromátides irmãs, teste do micronúcleo e aberração cromossômica. Não há necessidade de que as células estejam em um estado de divisão para detectar o dano (JHA, 2008). Em razão disso, é amplamente utilizado na genética toxicológica, biomonitoramento, estudos nutricionais e estudos de câncer, por ser relativamente simples, flexível, de resultados rápidos e pequenas quantidades da substância teste são suficientes para conduzir um experimento (TICE et al., 2000).

A análise dos cometas gerados pode ser feita visualmente ou de maneira automatizada, com programas computacionais próprios. De acordo com Collins (2004), existe grande concordância entre os resultados obtidos pelas duas maneiras de análise.

Os cometas podem ser classificados em: classe 0 – nucleoides não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleoides com cauda menor que o diâmetro do nucleoide; classe 2 – nucleoides com cauda de tamanho entre uma e duas vezes o diâmetro do nucleoide; classe 3 – nucleoides com cauda duas vezes maior que o diâmetro do nucleoide (SPEIT et al., 2006) (Figura 7).

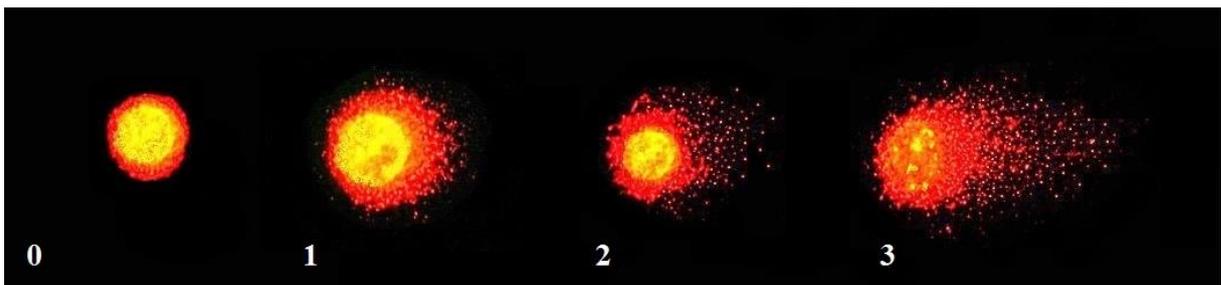


Figura 7: Microscopia de fluorescência de células MRC-5 submetidas à eletroforese. Os cometas estão classificados de acordo com o nível de danos: classes 0, 1, 2 e 3 (1000x). Fonte: Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

Algumas células quando expostas a agentes que fragmentam o DNA nem sempre apresentam migração no formato de cometa, após a eletroforese. Nesses casos, formam-se pequenas caudas com grande quantidade de DNA presente na cauda, e não no nucleoide. Estas são muitas vezes referidas como “nuvens” ou “ouriços”, e acreditava-se que esses cometas representavam células mortas, apoptóticas ou necróticas. No entanto, elas simplesmente

representam células com altos níveis de danos, mas ainda com potencialidade de reparo e consistente com a viabilidade. Assim, o cometa “ouriço” é um termo erroneamente considerado, por muitos, como sinônimo de morte celular, o que deve ser possivelmente abandonado. Assim, a presença de cometas “ouriço” não é um sinal de citotoxicidade, dessa forma, testes de genotoxicidade devem ser sempre acompanhados por um ensaio de citotoxicidade de confiança (LORENZO et al., 2013; COLLINS et al., 2014).

2.4.4. Análises por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica amplamente empregada para o estudo de células individuais, que consiste na marcação de estruturas específicas (ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos, lipídeos, etc.) com fluoróforos ou corantes fluorescentes, cuja emissão é captada e quantificada. Esta técnica tem contribuído significativamente para o conhecimento do ciclo celular, normalmente levando em consideração a quantidade de DNA. Os estudos podem ser realizados com corantes específicos para o DNA, como o iodeto de propídeo, sendo que a fluorescência emitida é proporcional à quantidade de DNA presente nas células (JAYAT; RATNAUD, 1993).

Para uma população em crescimento exponencial, algumas células têm quantidade 2C de DNA (fases G0 e G1); algumas têm quantidade 4C de DNA (fases G2 e M); e outras têm quantidade intermediária entre 2C e 4C (fase S), uma vez que ainda estão em fase de síntese de DNA (JAYAT; RATNAUD, 1993). Células em sub-G1 são consideradas mortas em decorrência da apoptose ou necrose (Figura 8).

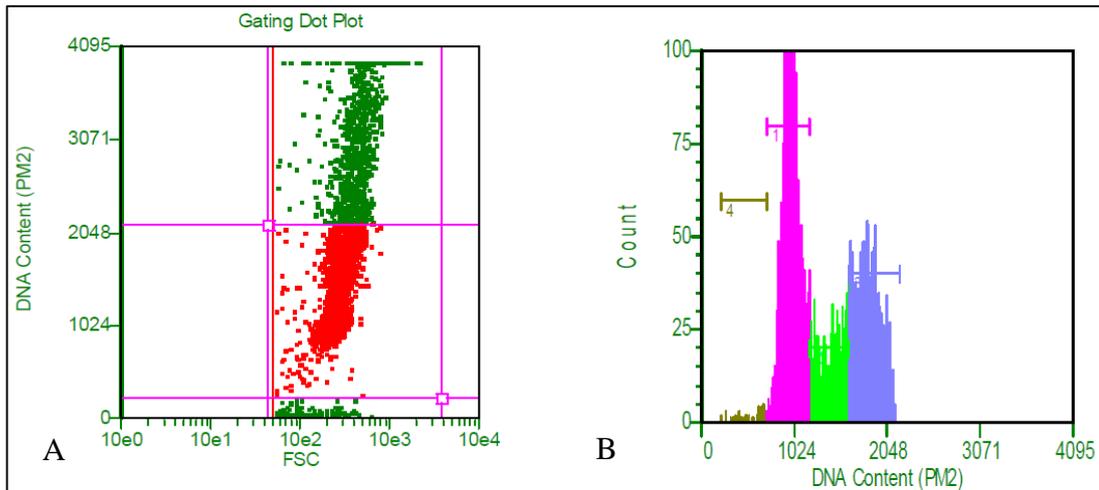


Figura 8: Dot plot (A) e histograma (B) da quantidade de DNA marcado com iodeto de propídeo, em células HepG2/C3A, analisadas por citometria de fluxo. Em A, a área em vermelho corresponde à população de células contabilizadas; as áreas em verde não foram contabilizadas. Em B: pico marrom: células em sub-G1; pico rosa: células em G1; pico verde: células em S; pico azul: células em G2/M. Fonte: Laboratório de Mutagenese e Monitoramento Ambiental.

As células podem atrasar temporariamente o ciclo celular nos diferentes pontos de checagem com o objetivo de: (i) reparar o dano celular; (ii) dissipar sinais de estresse celular exógenos; (iii) disponibilidade de fatores de crescimento essenciais, hormônios ou nutrientes. O monitoramento dos pontos de checagem também pode resultar na ativação das vias de morte celular programada caso os danos celulares não possam ser devidamente reparados. Falhas nos pontos de checagem do ciclo celular podem resultar em mutações gênicas, danos cromossômicos e aneuploidias, contribuindo para os processos de tumorigênese (MALUMBERS; BARBACID, 2009).

O ensaio com anexina V detecta a apoptose pela identificação da perda de assimetria da bicamada fosfolipídica da membrana plasmática de culturas de células, tecidos e embriões. Trata-se de uma proteína com 35-36 kDa dependente de Ca^{2+} que se liga forte e especificamente à resíduos de fosfatidilserina, expostos no folheto externo da membrana plasmática já no início da apoptose. Antes da externalização de fosfatidilserina, já houve a ativação da cascata de eventos bioquímicos que caracterizam a apoptose inicial (fragmentação do DNA, compactação da cromatina) e culminam na apoptose tardia (encolhimento e fragmentação celular, formação dos corpos apoptóticos) (FRANGIONI, 2003; VANGESTEL et al., 2011)

A anexina V não é capaz de marcar células viáveis porque esta molécula não consegue atravessar a bicamada fosfolipídica das células, entretanto, pode marcar células necróticas. Assim, a dupla-marcação com corantes para ácidos nucleicos, impermeáveis à membrana

(iodeto de propídeo, 7-aminoactinomicina D [7-AAD], azul de trypan), contribui para a discriminação dos diferentes estágios de apoptose e necrose (BALAJI et al., 2013).

Desta forma, a técnica de citometria de fluxo pode ser eficientemente aplicada para a quantificação e diferenciação de células apoptóticas e necróticas, marcadas com anexina V e 7-AAD, por exemplo. Células viáveis apresentarão marcação negativa para anexina V e 7-AAD; células em apoptose inicial apresentarão marcação positiva para anexina V e negativa para 7-AAD, células em apoptose tardia/mortas apresentarão dupla-marcação positiva para anexina V e 7-AAD; e células necróticas apresentarão marcação negativa para anexina V e positiva para 7-AAD (VAN ENGLAND et al., 1998) (Figura 9).

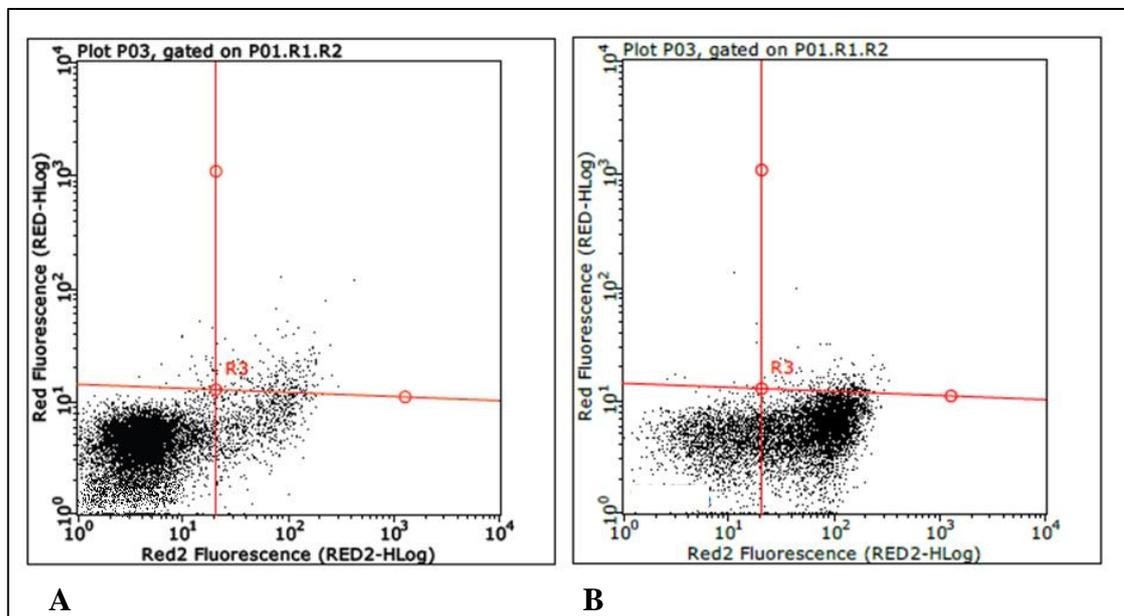


Figura 9: Análise da indução de apoptose por citometria de fluxo com anexina V em células HepG2/C3A. A: grupo controle; B: tratamento com o agente apoptótico camptotecina. Quadrante inferior esquerdo: células viáveis; quadrante inferior direito: células em apoptose inicial; quadrante superior direito: células em apoptose tardia; quadrante superior esquerdo: células em necrose. Fonte: Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

2.4.5. Linhagens celulares

Estudos *in vitro*, em modelos animais e em humanos têm contribuído para identificar um grande número de agentes que podem ser capazes de reduzir o risco do desenvolvimento de câncer e de outras doenças relacionadas a eventos mutacionais (DE FLORA; FERGUSON, 2005).

A linhagem celular HepG2/C3A (Figura 10) é um subclone patentado da linhagem de hepatócitos humanos HepG2 e, dentre suas peculiaridades, está a capacidade de reter as características biológicas do fígado adulto. A linhagem HepG2 modula a expressão de genes *in*

in vitro, e em resposta ao aumento da densidade da cultura, ela muda de um fenótipo fetal durante a fase de crescimento *log*, sub-confluentes, a um fenótipo de fígado maduro após atingir confluência e expressar várias enzimas funcionais do citocromo P450 (KELLY; DARLINGTON, 1989). A atividade das enzimas responsáveis pela metabolização dos xenobióticos nas células HepG2 é similar ou apenas um pouco mais baixa do que a atividade das mesmas em hepatócitos humanos. Devido à competência metabólica, a linhagem celular HepG2 e suas derivadas, têm sido utilizadas como modelos experimentais em muitos estudos, especialmente em ensaios de toxicidade. As vantagens de usar a linhagem celular HepG2/C3A, incluem a estabilidade, a facilidade de proliferação, e a possibilidade de manutenção por longo prazo (CHEN et al., 2001).

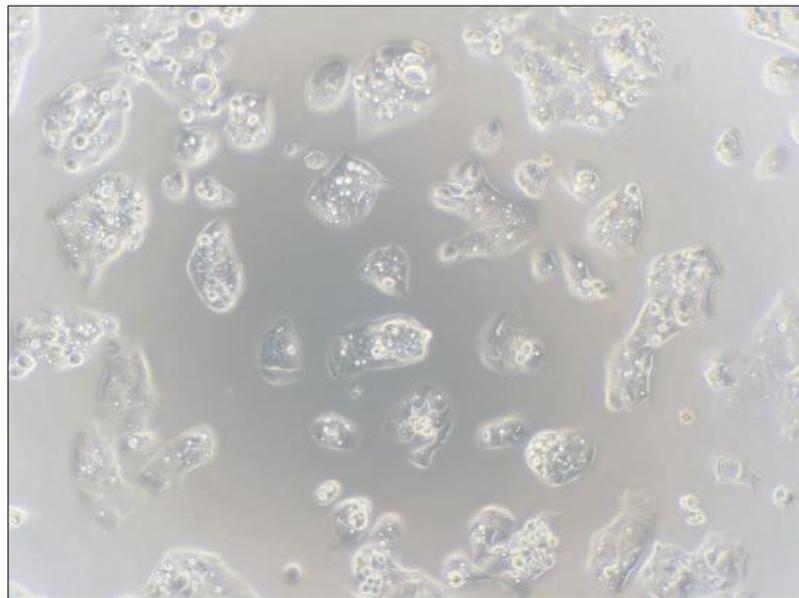


Figura 10: Células de hepatoma humano, HepG2/C3A, observadas ao microscópio de luz (100x). Fonte: Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

A linhagem celular MCF-7 (Figura 11) foi isolada na década de 1970 a partir da efusão pleural do tecido de um adenocarcinoma de mama maligno, de uma mulher caucasiana, com 69 anos de idade, em Detroit-USA, no *Michigam Cancer Foundation*, por isso o nome MCF-7. Esse tipo celular é muito utilizado para estudos do câncer de mama, pois mesmo sendo uma linhagem transformada, manteve as características do tecido epitelial glandular de origem. Entre essas características, destaca-se a capacidade de processar estrogênio, na forma de estradiol, por meio de receptores de estrogênio no citoplasma da célula. Além disso, outra característica marcante dessa linhagem é a sensibilidade à proteína citoqueratina e por isso, quando cultivadas *in vitro*, as células MCF-7 crescem em monocamada, formando cúpulas, de

aspecto abaulado, e seu crescimento pode ser interrompido pelo fator de necrose tumoral alfa (LACROIX; LECLERCQ, 2004).

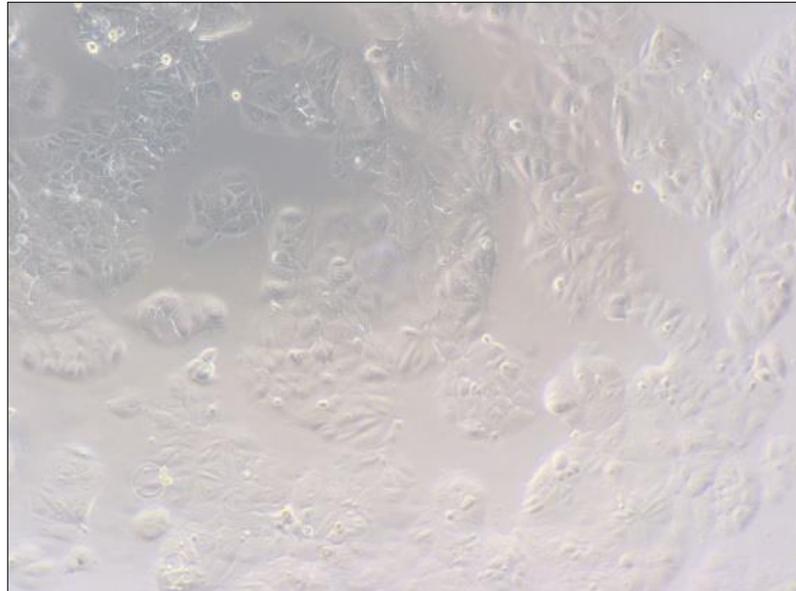


Figura 11: Células de adenocarcinoma de mama maligno, MCF-7, observadas ao microscópio de luz (100x).
Fonte: Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

A linhagem celular MRC-5 (Figura 12) foi isolada em 1966, e é um tipo de fibroblasto de pulmão não tumoral, aderente, que cresce em monocamada, derivado de tecido pulmonar normal de um embrião caucasiano do sexo masculino, com 14 semanas de gestação. Esse tipo celular é muito utilizado na área clínica, para cultivo e isolamento de vírus, além do desenvolvimento de vacinas (JACOB; JONES; BAILLE, 1970; FRIEDMAN; KOROPCHANK, 1977).

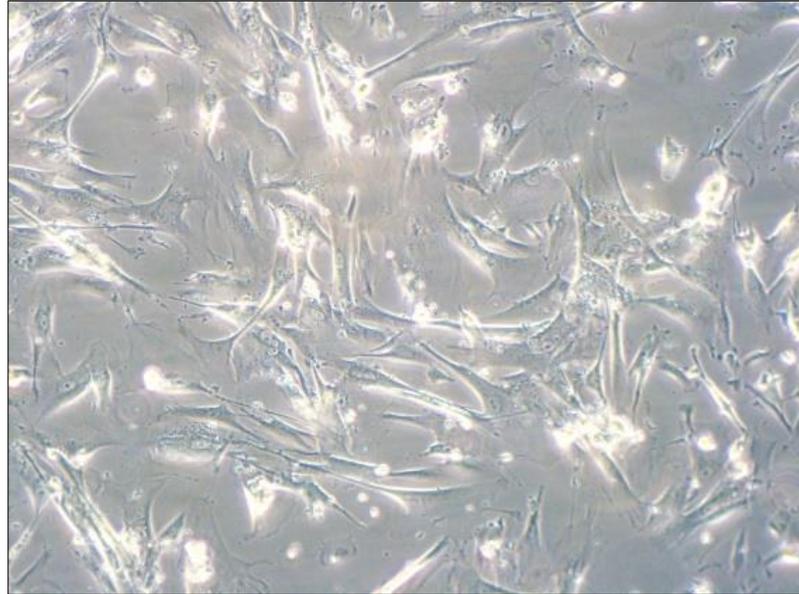


Figura 12: Fibroblastos de pulmão não tumorais, MRC-5, observadas ao microscópio de luz (100x). Fonte: Laboratório de Mutagênese e Monitoramento Ambiental.

Frente ao exposto, em decorrência do aumento na frequência de tumores em seres humanos e os severos efeitos secundários dos medicamentos quimioterapêuticos convencionais utilizados no tratamento do câncer, além do desenvolvimento de resistência ou a baixa responsividade, torna-se necessário identificar novas substâncias químicas, naturais ou sintéticas, que possam auxiliar no combate ao câncer. Além disso, é desejável que este efeito tóxico não ocorra, ou pelo menos que ocorra em menor intensidade, nas células sadias do organismo. Devido a poucos estudos comparativos da ação dos alcaloides sanguinarina e cheleritrina em células tumorais e não tumorais humanas, bem como seus efeitos em linhagens tumorais com elevada resistência à quimioterapia convencional (tumor de mama), este trabalho foi desenvolvido com o intuito de verificar os efeitos citotóxicos, genotóxicos, sobre o ciclo celular e apoptóticos das referidas substâncias, avaliando o seu efeito sobre a atividade mitocondrial e integridade de membrana plasmática, genotoxicidade em nível de fragmentação de DNA, análise da progressão do ciclo celular e indução de apoptose, nas linhagens celulares tumorais HepG2/C3A e MCF-7, e não tumorais MRC-5, humanas.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo geral*

Avaliar o efeito citotóxico, genotóxico, sobre o ciclo de divisão celular e apoptose dos alcaloides quaternários benzo[c]fenantridinas, sanguinarina e cheleritrina, em linhagem celular tumoral humana de hepatoma (HepG2/C3A) e de adenocarcinoma de mama (MCF-7), e em linhagem não tumoral de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5).

3.2. *Objetivos específicos*

Avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade, influência sobre o ciclo de divisão celular e indução de apoptose do alcaloide quaternário benzo[c]fenantridina sanguinarina, em linhagem celular tumoral de hepatoma humano (HepG2/C3A) e linhagem não tumoral de fibroblastos de pulmão (MRC-5).

Analisar a citotoxicidade, genotoxicidade, influência sobre o ciclo de divisão celular e indução de apoptose do alcaloide quaternário benzo[c]fenantridina cheleritrina, em linhagem celular tumoral de hepatoma humano (HepG2/C3A) e linhagem não tumoral de fibroblastos de pulmão (MRC-5).

Comparar a citotoxicidade, genotoxicidade e influência sobre o ciclo de divisão celular dos alcaloides quaternários benzo[c]fenantridinas, sanguinarina e cheleritrina, em linhagem celular tumoral humana de adenocarcinoma de mama (MCF-7).

4. REFERÊNCIAS

AHMAD, N.; GUPTA, S.; HUSAIN, M.M.; HEISKANEN, K.M.; MUKHTAR, H. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 1524-1528, 2000.

ANSARI, K.M.; CHAUHAN, L.K.S.; DHAWAN, A.; KHANNA, S.K.; DAS, M. Unequivocal evidence of genotoxic potential of argemone oil in mice. **International Journal of Cancer**, v. 112, p. 890-895, 2004.

ANSARI, K.M.; DHAWAN, A.; KHANNA, S.K.; DAS, M. *In vivo* DNA damaging potential of sanguinarine alkaloid, isolated from argemone oil, using alkaline Comet assay in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 147-153, 2005.

ANSARI, K.M.; DHAWAN, A.; KHANNA, S.K.; DAS, M. Protective effect of bioantioxidants on argemone oil/sanguinarine alkaloid induced genotoxicity in mice. **Cancer Letters**, v. 244, p. 109-118, 2006.

AVANCINI, D.; MENZIES, G.E.; MORGAN, C.; WILLS, J.; JOHNSON, G.E.; WHITE, P.A.; LEWIS, P.D. MutAIT: an online genetic toxicology data portal and analysis tools. **Mutagenesis**, v. 00, p. 1-6, 2015. doi:10.1093/mutage/gev050

BAI, L.P.; ZHAO, Z.Z.; CAI, Z.; JIANG, Z.H. DNA-binding affinities and sequence selectivity of quaternary benzophenanthridine alkaloids sanguinarine, chelerythrine, and nitidine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 5439–5445, 2006.

BALAJI, N.; DEVY, A.S.; SUMATHI M.K.; VIDYALAKSHMI, S.; KUMAR, G.S.; D'SILVA, S. Annexin v – affinity assay: apoptosis detection system in granular cell ameloblastoma. **Journal of International Oral Health**, v. 5, p. 25–30, 2013.

BERNAS, T.; DOBRUCKI, J. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. **Cytometry**, v. 47, p. 236-242, 2002.

CHAN, W.H. Embryonic toxicity of sanguinarine through apoptotic processes in mouse blastocysts. **Toxicology Letters**, v. 205, p. 285– 292, 2011.

CHEN, J.P.; YU, S.C.; LIU, H.S.; FU, S.H.; HSU, B.R.S. In vitro evaluation of growth and anabolism for C3A/HepG2 hepatoma cells with logistic equation and linear regression expression. **Transplantation Proceedings**, v. 33, p. 656-657, 2001.

CHOI, W.Y.; JIN, C.Y.; HAN, M.H.; KIM, G.Y.; KIM, N.D.; LEE, W.H.; KIM, S.K.; CHOI, Y.H. Sanguinarine sensitizes human gastric adenocarcinoma AGS cells to TRAIL-mediated apoptosis via down-regulation of AKT and activation of caspase-3. **Anticancer Research**, v. 29, p. 4457-4466, 2009.

CLEMENT, M.V.; HIRPARA, J.L.; CHAWDHURY, S.H.; PERVAIZ, S. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells. **Blood**, v. 92, p. 996-1002, 1998.

COLLIER, A.C.; PRITSOS, C.A. The mitochondrial uncouple dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochemistry & Pharmacy**. 66: 281-287, 2003.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; ROJAS, E.; DHAWAN, A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETTI, M.; SPEIT, G.; BONASSI, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Reviews in Mutation Research**. 759: 27-39, 2014.

DAS, A.; MUKHERJEE, A.; CHAKRABARTI, J. Sanguinarine: an evaluation of in vivo cytogenetic activity. **Mutation Research**, v. 563, p. 81–87, 2004.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. **Mutation Research**, v. 591, p. 8-15, 2005.

DE STEFANO, I.; RASPAGLIO, G.; ZANNONI, G.F.; TRAVAGLIA, D.; PRISCO, M.G.; MOSCA, M.; FERLINI, C.; SCAMBIA, G.; GALLO, D. Antiproliferative and antiangiogenic

effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 1374–1381, 2009.

DEBITON, E.; MADELMONT, J.C.; LEGAULT, J.; BARTHOMEUF, C. Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 51, p. 474–482, 2003.

DITTMAR, R.; POTIER, E.; ZANDVOORT, M.; ITO, K. Assessment of cell viability in three-dimensional scaffolds using cellular auto-fluorescence. **Tissue Engineering, Part C: Methods**, v. 18, n. 3, p. 198-204, 2012.

DVORAK, Z.; SOVADINOVÁ, I.; BLÁHA, L.; GIESY, J.P.; ULRICHOVA, J. Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine do not affect transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor: Analyses in rat hepatoma cell line H4IIE.luc. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1466–1473, 2006.

EASTMOND, D.A.; HARTWIG, A.; ANDERSON, D.; ANWAR, W.A.; CIMINO, M.C.; DOBREV, I.; DOUGLAS, G.R.; NOHMI, T.; PHILLIPS, D.H.; VICKERS, C. Mutagenicity testing for chemical risk assessment: update of the WHO/IPCS Harmonized Scheme. **Mutagenesis**. 24: 341-349, 2009.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BALLS, M.; BLAAUBOER, B.J.; BOOBIS, A.; CARERE, A.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J.C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**. v. 40, p. 193–236, 2002.

FISCHER, U.; JANICKE, R.U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. **Cell Death Differentiation**, v. 10, n. 1, p. 76-100, 2003.

FRANGIONI, J.V. *In vivo* near-infrared fluorescence imaging. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p. 626–634, 2003.

FRIEDMAN, H.M.; KOROPCHAK, C. Comparison of WI-38, MRC-5, and IMR-90 cell strains for isolation of viruses from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 4, p. 368-371, 1978.

FUNAKOSHI, T.; AKI, T.; NAKAYAMA, H.; WATANUKI, Y.; IMORI, S.; UEMURA, K. Reactive oxygen species-independent rapid initiation of mitochondrial apoptotic pathway by chelerythrine. **Toxicology in Vitro**, v. 25, p. 1581–1587, 2011.

GESCHER, A.J.; SHARMA, R.A.; STEWARD, W.P. Cancer chemoprevention by dietary constituents: a tale of failure and promise. **The Lancet Oncology**, v. 2, p. 371-379, 2001.

GONTIJO, A.M.M.C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**, Canoas: ULBRA, p. 173-200, 2003.

GYORI, B.M.; VENKATACHM, G.; THIAGARAJAN, P.S.; HSU, D.; CLEMENT, M.V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. **Redox Biology**, v. 2, p. 457-465, 2014.

HABERMEHL, D.; KAMMERER, B.; HANDRICK, R.; ELDH, T.; GRUBER, C.; CORDES, N.; DANIEL, P.T.; PLASSWILM, L.; BAMBERG, M.; BELKA, C.; JENDROSSEK, V. Proapoptotic activity of Ukrain is based on Chelidonium majus L. alkaloids and mediated via a mitochondrial death pathway. **BMC Cancer**, v. 6, n. 14, p. 1-22, 2006.

HAMMEROVÁ, J.; ULDRIJAN, S.; TÁBORSKÁ, E.; SLANINOVÁ, I. Benzo[c]phenanthridine alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status. **Journal of Dermatological Science**, v. 62, p. 22-35, 2011.

HAN, M.H.; KIM, G.Y.; YOO, Y.H.; CHOI, Y.H. Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction. **Toxicology Letters**, v. 220, n. 2, p. 157-66, 2013.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.

HOSSAIN, M.; KUMAR, G.S. DNA binding of benzophenanthridine compounds sanguinarine versus ethidium: Comparative binding and thermodynamic profile of intercalation. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 41, p. 764–774, 2009.

HUSSAIN, A.R.; AL-JOMAH, N.A.; SIRAJ, A.K.; MANOGARAN, P.; AL-HUSSEIN, K.; ABUBAKER, J.; PLATANIAS, L.C.; AL-KURAYA, K.S.; UDDIN, S. Sanguinarine-dependent induction of apoptosis in primary effusion lymphoma cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 8, p. 3888-3897, 2007.

ILAN, Y. Immune therapy for hepatocellular carcinoma. **Hepatology International**, v. 8, p. 499-504, 2014.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 21/08/2015.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>> Acesso em: 21/08/2015.

JACOBS, J.P.; JONES, C.M.; BAILLE, J.P. Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5. **Nature**, v. 227, n. 5254, p. 168-70, 1970.

JAYAT, C.; RATINAUD, M.H. Cell cycle analyses by flow cytometry: Principles and applications. **Biology of the Cell**, v. 78, p. 15-25, 1993.

KAMINSKY, V.O.; LOOTSIK, M.D.; STOIKA, R.S. Correlation of the cytotoxic activity of four different alkaloids, from *Chelidonium majus* (greater celandine), with their DNA intercalating properties and ability to induce breaks in the DNA of NK/Ly murine lymphoma cells. **Central European Journal of Biology**, v. 1, n. 1, p. 2–15, 2006.

KAMINSKY, V.O.; LIN, K.W.; FILYAK, Y.; STOIKA, R. Differential effect of sanguinarine, chelerythrine and chelidonine on DNA damage and cell viability in primary mouse spleen cells and mouse leukemic cells. **Cell Biology International**, v. 32, p. 271-277, 2008.

KELLY, J.H.; DARLINGTON, G.J. Modulation of the liver specific phenotype in the human hepatoblastoma line HepG2. *In vitro Cell Development and Biology*, v. 25, n. 2, p. 217-22, 1989.

KIM, S.; LEE, T.J.; LEEM, J.; CHOI, K.S.; PARK, J.W.; KWON, T.K. Sanguinarine-induced apoptosis: generation of ROS, down-regulation of Bcl-2, c-FLIP, and synergy with TRAIL. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 104, p. 895–907, 2008.

KOSINA, P.; WALTEROVÁ, D.; ULRICHOVÁ, J.; LICHNOVSKY, V.; STIBOROVÁ, M.; RYDLOV, H.; VICAR, J.; KRECMAN, V.; BRABEC, M.J.; SIMÁNEK, V. Sanguinarine and chelerythrine: assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment. *Food and Chemical Toxicology*, v. 42, p. 85–91, 2004.

KROYMANN, J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 14, p. 246–251, 2011.

KUMAR, S.; ACHARYA, A. Chelerythrine induces reactive oxygen species-dependent mitochondrial apoptotic pathway in a murine T cell lymphoma. *Tumor Biology*, v. 35, p. 129–140, 2014.

KUMAR, S.; TOMAR, M.S.; ACHARYA, A. Activation of p53-dependent/-independent pathways of apoptotic cell death by chelerythrine in a murine T cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma*, v. 56, n. 6, p. 1846-1855, 2015.

LACROIX, M; LECLERCQ, G. Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Research and Treatment*, v. 83, n. 3, p. 249-289, 2004.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT, D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of Neurochemical*, v. 69, p. 581-593, 1997.

LOEB, L.A.; HARRIS, C.C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective. *Cancer Research*, v. 68, p. 6863-6872, 2008.

LORENZO, Y.; COSTA, S.; COLLINS, A.R.; AZQUETA, A. The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis*, v. 28, n. 4, p. 427-432, 2013.

LOVELAND, B.E.; JOHNS, T.G.; MACKAY, I.R.; VAILLANT, F.; WANG, Z.X.; HERTZOG, P.J. Validation of the MTT dye assay for enumeration of cells in proliferative and antiproliferative assays. *Biochemistry International*, v. 27, n. 3, p. 501-510, 1992.

MALÍKOVÁ, J.; ZDARILOVÁ, A.; HLOBILKOVÁ, A.; ULRICHOVÁ, J. The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine. *Cell Biology & Toxicology*, v. 22, p. 439–453, 2006.

MALUMBERS, M.; BARBACID, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nature Review Cancer*, v. 9, p. 153-166, 2009.

MANSOOR, T.A.; BORRALHO, P.M.; LUO, X.; MULHOVO, S.; RODRIGUES, C.M.P.; FERREIRA, M.J.U. Apoptosis inducing activity of benzophenanthridine-type alkaloids and 2-

arylbenzofuran neolignans in HCT116 colon carcinoma cells. **Phytomedicine**, v. 20, p. 923–929, 2013.

MAURICI, D.; AARDEMA, M.; CORVI, R.; KLEBER, M.; KRUL, C.; LAURENT, C.; LOPRIENO, N.; PASANEN, M.; PFUHLER, S.; PHILLIPS, B.; SABBIONI, E.; SANNER, T.; VANPARYS, P. Genotoxicity and mutagenicity. **Alternatives to Laboratory Animals**. 33(1): 117-130, 2005.

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

NGUYEN, K.; PREMASEKHARAN, G.; YUEN, A.; FORMAN, H.J.; LEPPERT, V. **The Role of Nanoparticle Surface Chemistry in Alveolar Macrophage Inflammatory Response**. 2013 GEM Bionanotechnology Summer Institute. University of California, 2013. Disponível em: <<https://nanohub.org/resources/19092/watch?resid=19107>>, Acesso em 28/08/2015.

OLIVE, P.L.; BANÁTH, J.P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. **Nature Protocols**, v. 1, p. 23-29, 2006.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysics Research Communications**, v. 123, p. 291–298, 1984.

PINHO, V.F.S.; COUTINHO, E.S.F. Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, n. 5, p. 1061-1069, 2007.

SARASIN, A. An overview of the mechanisms of mutagens and carcinogens. **Mutation Research**, v. 544, p. 99-106, 2003.

SCHAPER, F.L.W.V.J.; REUTELINGSPERGER, C.P. ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin A5 in Oncology: Evaluating Efficacy of Anti-Cancer Therapies. **Cancers**, v. 5, p. 550-568, 2013.

SCHOLZ, C.; WIEDER, T.; STARCK, L.; ESSMANN, F.; SCHULZE-OSTHOFF, K.; DORKEN, B.; DANIEL, P.T. Arsenic trioxide triggers a regulated form of caspase-independent necrotic cell death via the mitochondrial death pathway. **Oncogene**, v. 24, n. 11, p. 1904-1913, 2005.

SHMALZ, G. Use of cells cultures for toxicity testing of dental materials - advantages and limitations. **Journal Dentist**, v. 22, p. 6-11, 1994.

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, p. 184-191, 1988.

SLANINOVÁ, I.; PENCIKOVÁ, K.; URBANOVÁ, J.; SLANINA, J.; TÁBORSKA, E. Antitumour activities of sanguinarine and related alkaloids. **Phytochemistry Review**, v. 13, p. 51–68, 2014.

SLANINOVA, I.; TABORSKA, E.; BOCHORAKOVA, H.; SLANINA, J. Interaction of benzo[c]phenanthridine and protoberberine alkaloids with animal and yeast cells. **Cell Biology and Toxicology**, v. 17, p. 51–63, 2001.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v. 314, p. 275-286, 2006.

STECHOW, L.; WATER, B.; DANEN, E.H.J. Unraveling the DNA damage response signaling network through RNA interference screening. In: KLEIJANS, J. **Toxicogenomics-Based Cellular Models: Alternatives to Animal Testing for Safety Assessment**. Oxford: Elsevier, p. 35-54, 2014.

STIBOROVA, M.; VOSTALOVA, J.; ZDARILOVA, A.; ULRICHOVA, J.; HUDECEK, J.; TSCHIRNER, K.; SIMANEK, V. *Macleaya cordata* extract and sangrovit® genotoxicity: assessment in vivo. **Biomedical Papers of the Medical Faculty, Universitatis Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 152, n. 1, p. 35–39, 2008.

SUCHOMELOVÁ, J.; BOCHORÁKOVÁ, H.; PAULOVÁ, H.; MUSIL, P.; TÁBORSKÁ, E. HPLC quantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family Papaveraceae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses**, v. 44, p. 283–287, 2007.

SUN, M.; LOU, W.; CHUN, J.Y.; CHO, D.S.; NADIMINTY, N.; EVANS, C.P.; CHEN, J.; YUE, J.; ZHOU, Q.; GAO, A.C. Sanguinarine suppresses prostate tumor growth and inhibits survivin expression. **Genes Cancer**, v. 1, p. 283–292, 2010.

TAKAHASHI, C.S. Testes citogenéticos in vitro e aneuploidia. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. p. 151-168.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKIVYF. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutageneses**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TSUKAMOTO, H.; KONDO, S.; MUKUDAI, Y.; NAGUMO, T.; YASUDA, A.; KURIHARA, Y.; KAMATANI, T.; SHINTANI, S. Evaluation of anticancer activities of benzo[c]phenanthridine alkaloid sanguinarine in oral squamous cell carcinoma cell line. **Anticancer Research**, v. 31, p. 2841-2846, 2011.

VACEK, J.; PAPOUSKOVÁ, B.; KOSINA, P.; GALANDÁKOVÁ, A.; ULRICHOVÁ, J. Mass spectrometric investigation of chelerythrine and dihydrochelerythrine biotransformation patterns in human hepatocytes. **Journal of Chromatography B**, v. 941, p. 17–24, 2013.

VAN ENGLAND, M.; NEILAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELINGSPERGER, C.P.M. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p. 1-9, 1998.

VANGESTEL, C.; PEETERS, M.; MEES, G.; OLTENFREITER, R.; BOERSMA, H.H.; ELSINGA, P.H.; REUTELINGSPERGER, C.; VAN DAMME, N.; DE SPIEGELEER, B.; VAN DE WIELE, C. *In vivo* imaging of apoptosis in oncology: An update. **Molecular Imaging**, v. 10, p. 340–358, 2011.

WALTEROVA, D.; ULRICHOVA, J.; VALKA, I.; VICAR, J.; VAVRECKOVA, C.; TABORSKA, E.; HARJRADER, R.J.; MEYER, D.L.; CERNA, H.; SIMANEK, V. Benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine: biological activities and dental care applications. **Acta Universitatis Palacki**, v. 139, p. 7–16, 1995.

WEAVER, J.L. Estimation of cell viability by flow cytometry. **Flow Cytometry Protocols**, v. 91, p. 77-83, 1998.

WHO – World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int>> Acesso em: 20/08/2015.

ZDARILOVA, A.; VRUBLOVA, E.; VOSTALOVA, J.; KLEJDUS, B.; STEJSKAL, D.; PROSKOVA, J.; KOSINA, P.; SVOBODOVA, A.; VECERA, R.; HRBAC, J.; CERNOCHOVA, D.; VICAR, J.; ULRICHOVA, J.; SIMANEK, V. Natural feed additive of *Macleaya cordata*: Safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 3721–3726, 2008.

ZHANG, Z.F.; GUO, Y.; ZHANG, J.B.; WEI, X.H. Induction of apoptosis by chelerythrine chloride through mitochondrial pathway and Bcl-2 family proteins in human hepatoma SMMC-7721 cell. **Archives of Pharmacal Research**, v. 34, n. 5, p. 791-800, 2011.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **News Physiology Science**, v. 19, p. 124–128, 2004.

CAPÍTULO 2

2.1. Artigo 1

O alcaloide sanguinarina causa um maior efeito citotóxico e genotóxico em células HepG2/C3A e apoptótico em células MRC-5, sem alterar o ciclo celular

Artigo formatado segundo as normas da revista
Toxicology Letters.

O alcaloide sanguinarina causa um maior efeito citotóxico e genotóxico em células HepG2/C3A e apoptótico em células MRC-5, sem alterar o ciclo celular

Igor Vivian de Almeida, Veronica Elisa Pimenta Vicentini.

Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

* **Autor Correspondente:** Igor Vivian de Almeida. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular - Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo 5790, Bloco H67 (11), Jardim Universitário, CEP: 87020-900 - Maringá - Paraná - Brasil. Telefones: +55-44-3011-4342; +55-44-3011-4687. Fax: +55-44-3011-4893. e-mail: igoralmeida.bio@gmail.com

Resumo

A Sanguinarina (SAN) é um alcaloide natural derivado das raízes de *Sanguinaria canadensis* e de outras espécies de plantas da família Papaveraceae, reconhecida por apresentar diversas propriedades biológicas, que incluem atividade genotóxica, antiproliferativa e apoptótica, o que lhe garante elevado potencial quimioterapêutico. O presente trabalho objetivou avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade, influência sobre o ciclo de divisão celular e indução de apoptose, em células tumorais e não tumorais humanas. Foi observado que a SAN é citotóxica para células tumorais de hepatoma humano (HepG2/C3A) e fibroblastos não tumorais de pulmão humano (MRC-5), reduzindo efetivamente a viabilidade celular (menor que 80%) a partir da concentração de 5 μM , em 24 ou 48 h, para a linhagem tumoral; e 7,5 μM (24 h) ou 2,5 μM (48 h), para a linhagem não tumoral, pelo teste do MTT. A análise da integridade da membrana plasmática mostrou que a linhagem tumoral é mais resistente à ação citotóxica do alcaloide do que a linhagem não tumoral. Apesar disso, a análise do teste do cometa indicou que a SAN é mais genotóxica para a linhagem tumoral, com aumento significativo de danos a partir da concentração de 1 μM , enquanto que somente concentrações maiores que 2,5 μM apresentam o mesmo efeito sobre a linhagem não tumoral. A análise do ciclo celular indicou uma população significativamente maior de células da linhagem não tumoral em sub-G1 (7,5 μM), o que foi confirmado pelo teste de indução de apoptose com anexina V, em função da redução do percentual de células viáveis e do aumento de apoptose, em ambas as concentrações avaliadas (2,5 ou 7,5 μM), e de necrose (2,5 μM). Ambos os efeitos não foram observados na linhagem tumoral. Assim, estes resultados indicam que, em função da concentração, a linhagem não tumoral apresentou maior resistência aos efeitos citotóxicos e genotóxicos do alcaloide SAN, quando comparada a linhagem tumoral. Apesar da maior sensibilidade das células MRC-5 aos efeitos apoptóticos desta substância, este fator não desqualifica a SAN como um agente potencial para o desenvolvimento de novas terapias relacionadas ao combate do câncer.

Palavras-chave: alcaloide benzo[c]fenantridina, fibroblasto de pulmão, fragmentação do DNA, hepatoma humano, viabilidade celular.

1. Introdução

Produtos naturais, em especial alcaloides de plantas, ocupam uma posição crucial entre as drogas empregadas na terapia do câncer. Sanguinarina (SAN – 13-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]-1,3-dioxolo[4,5-i]phenanthridinium) é um alcaloide benzo[c]fenantridina que ocorre em muitas espécies de plantas das famílias Papaveraceae, Fumariaceae, Ranunculaceae e Rutaceae (HAMMEROVÁ et al., 2011; SLANINOVÁ et al., 2014) (Fig. 1). A SAN é tipicamente encontrada na seiva radicular, raízes e rizomas de *Sanguinaria canadensis* (Papaveraceae), os rizomas contêm 4-7% destes alcaloides, e as raízes, cerca de 1,8%), raízes de *Chelidonium majus* (Papaveraceae), e partes aéreas de *Macleaya cordata* (Papaveraceae) (KOSINA et al., 2004). Também pode ser encontrada em *Dicranostigma lactuoides*, *Eschscholtzia californica* e *Macleaya microcarpa* (MALÍKOVÁ et al., 2006; SUCHOMELOVÁ et al., 2007). O óleo de argemone, extraído das sementes de *Argemone mexicana* (cardo-santo ou papoula-mexicana), é um contaminante comum do óleo de mostarda, e contém significativas frações de SAN e dihidrossanguinarina. Estes alcaloides causam quadros graves de hidropisia em humanos e são os responsáveis por sua elevada toxicidade, mutagenicidade e genotoxicidade em camundongos, causada principalmente, pela geração de espécies reativas de oxigênio e sua capacidade de intercalação com o DNA (ANSARI et al., 2004, 2005, 2006).

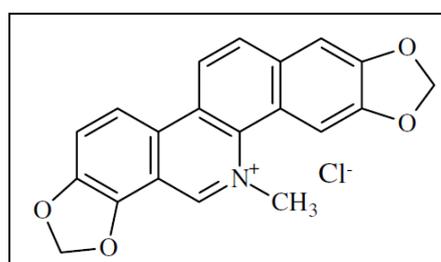


Figura 1 - Apresentação comercial da molécula de sanguinarina (Fonte: DVORAK et al., 2006).

Diversas propriedades biológicas já foram relatadas para a SAN, como a atividade citotóxica, genotóxica, antiproliferativa e apoptótica (KAMINSKY et al., 2008; HAMMEROVÁ et al., 2011; TSUKAMOTO et al., 2011; HAN et al., 2013), caracterizando-a como uma nova substância com potencial terapêutico para o câncer. Agentes quimioterapêuticos ideais são substâncias que matam as células tumorais enquanto são menos prejudiciais para as células normais. A sensibilidade diferencial em células tumorais e não tumorais da SAN já foi discutida em alguns trabalhos. Ahmad et al. (2000) compararam os efeitos apoptóticos da SAN em células de carcinoma epidermoide humano (A431) e em

queratinócitos normais humanos (NHEKs), e verificaram que as células cancerígenas são mais sensíveis à indução de apoptose do que as células normais. SAN foi identificada como um inibidor da proteína survivina, que seletivamente mata células tumorais da próstata, mas não células epiteliais deste mesmo órgão (SUN et al., 2010). Diferentemente disso, Malíková et al. (2006a) compararam os efeitos da SAN sobre linhagens normais de fibroblasto de gengiva e tumorais de próstata (DU-145 e LNCaP), observando uma maior sensibilidade para os fibroblastos do que para a linhagem tumoral. Em contraste, Debiton et al. (2003) identificaram sensibilidade similar para a SAN em diferentes linhagens de células normais e tumorais.

Considerando que as diferentes respostas celulares induzidas pelo alcaloide SAN podem variar em função das características particulares de cada linhagem celular analisada, o presente estudo objetivou avaliar a sensibilidade diferencial entre as células tumorais de hepatocarcinoma humano (HepG2/C3A) e não tumorais de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5), avaliando os efeitos citotóxicos, genotóxicos, sobre o ciclo celular e apoptóticos induzidos pela SAN, *in vitro*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Agentes químicos

Sanguinarina (SAN – *sanguinarine chloride hydrate*, 98%) foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO, EUA) e diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) para o preparo de uma solução estoque, e posteriormente diluída em meio de cultura completo no momento do uso, em diferentes concentrações. A concentração final de DMSO nas culturas celulares não ultrapassou 0,01% e testes prévios não indicaram qualquer indício de toxicidade. DMSO (99,7%), metil metanossulfonato (MMS – 99%), camptotecina (CPT – 90%), RNase A e iodeto de propídeo (94%) também foram adquiridos da Sigma. Azul de trypan (0,4% Cat. N°. 15250-061), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM – Cat. N°. 12800-017), soro bovino fetal (SBF Cat. N°. 12657-029), *Antibiotic/Antimycotic* (Cat. N°. 15240-062) e MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium bromide] (98% Cat. N°. M-6494) foram adquiridos da Gibco® Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). *FlowCollect® Annexin Red Kit* para o ensaio de apoptose foi adquirido da Merck Millipore (Billerica, MA, EUA).

2.2. Culturas celulares

As linhagens celulares tumorais de hepatocarcinoma humano, HepG2/C3A (Cat. N°. 0291), e não tumorais de fibroblastos de pulmão humano, MRC-5 (Cat. N°. 0180), foram obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, livres de contaminação por micoplasma.

As linhagens foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm² (TPP) contendo meio de cultura completo (DMEM suplementado com 10% de SBF e 1 mL/L de solução antibiótica/antimicótica), e mantidas em incubadora de CO₂ (5%), com umidade de 95%, à 37°C. Nestas condições, o ciclo celular de ambas as linhagens é de aproximadamente 24 horas. Para os experimentos foram utilizadas células em fase de crescimento logarítmico.

2.3. Teste de citotoxicidade – MTT

Para o teste de citotoxicidade foi realizado o ensaio do MTT, de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço foram semeadas 1x10⁴ células HepG2/C3A ou MRC-5, com exceção dos poços controle sem células (branco). Após estabilização, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100 µL de meio completo nos grupos: controle (CTR), e tratamentos: agente citotóxico (MMS 50 µM) e SAN (0,100; 0,125; 0,500; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 20 µM). Após 24 ou 48 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura, acrescido de MTT (0,2 mg/mL). A placa foi incubada por mais 4 h antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100 µL de DMSO, para solubilização dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Labtech) a 550nm. A viabilidade celular foi estimada com base na absorbância do controle ($Ab_{tratamento}/Ab_{controle} \times 100$). Os experimentos foram realizados em triplicata, em duas repetições técnicas.

2.4. Análise da viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de trypan

A análise da viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de trypan foi realizada em paralelo com o teste do cometa (ver subitem *Teste do cometa*). Após a colheita das células, 20 µL de suspensão celular foram misturados com igual volume de azul de trypan 0,4%, depositados sobre uma lâmina, coberta com lamínula, e analisada ao microscópio de luz. Foram contabilizadas 100 células por amostra, diferenciando células viáveis (citoplasma translúcido e membrana refringente) de não viáveis (citoplasma corado em azul). Somente os tratamentos com viabilidade superior a 80% foram considerados.

2.5. Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo

Neste teste, foram semeadas 2x10⁵ células em microplacas de 6 poços. Após 24 h de estabilização, as células receberam meio de cultura completo (CTR), agente citotóxico (CPT 4 µM), ou SAN (HepG2/C3A: 0,5 e 2,5 µM; MRC-5: 2,5 e 7,5 µM). Após 24 h de exposição, as células foram colhidas e ressuspensas em 200 µL de PBS, ao qual foi adicionado 5 µL de

iodeto de propídeo (2 µg/mL), de acordo com Lima (2005). A integridade da membrana foi verificada em nível de captação e ligação do corante com o DNA celular, usando-se o citômetro BD Accuri® C6 (Becton-Dickinson), sendo contabilizadas 5×10^3 células em cada caso (excitação: 488 nm, filtro: 610/20). Foram realizados três experimentos independentes.

2.6. Ensaio do cometa

Este ensaio consiste na lise de células fixadas em gel de agarose para posterior eletroforese, com objetivo de promover a migração de fragmentos de DNA, permitindo assim, sua identificação (TICE et al., 2000). Para este ensaio foram semeadas 5×10^5 células HepG2/C3A ou MRC-5 em 5 mL de meio de cultura completo. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio completo novo nos grupos: CTR e tratamentos: agente genotóxico (MMS 75 µM), ou SAN (HepG2/C3A: 0,5, 1,0 e 2,5 µM; MRC-5: 2,5, 5,0 e 7,5 µM). Após 3 h de exposição, as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas (300 µL, 0,1%), centrifugadas (1250 rpm, 5 min) e ressuspensas em 0,5 mL de meio de cultura. Em um microtubo foram homogeneizados 20 µL de suspensão celular e 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%, 37° C), depositando este material em uma lâmina pré-gelatinizada com agarose (1,5%), cobrindo com lamínula. Após 20 min, a lamínula foi removida e procedeu-se a lise (NaCl 2,5 M, 100 EDTA mM, Tris 10 mM, pH 10; 1% Triton X-100, 10% DMSO), por 90 min. As lâminas foram depositadas em uma solução tampão alcalina de eletroforese (NaOH 10 N e EDTA 200 mM, pH 13, 20 min), antes da eletroforese (25 V, 300 mA, 20 min). Subsequentemente, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 M, pH 7,5, 15 min) e coradas com 30 µL de brometo de etídeo (2 µg/mL).

A análise foi feita em microscopia de fluorescência (*laser* de excitação 420-490 nm e filtro de barreira 520 nm). A determinação dos danos foi feita por análise visual e a classificação foi dividida em quatro categorias: classe 0 – nucleoides não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleoides com cauda menor que o diâmetro do nucleoide; classe 2 – nucleoides com cauda de tamanho entre uma e duas vezes o diâmetro do nucleoide; classe 3 – nucleoides com cauda duas vezes maior que o diâmetro do nucleoide. Células que apresentaram o nucleoide totalmente fragmentado não foram contabilizadas. No total, foram analisadas 100 células por lâmina de três experimentos independentes. O índice de danos (ID) foi baseado no comprimento da migração do DNA e calculado como segue: $ID = N_1 + (2 \times N_2) + (3 \times N_3)$, onde N_1 , N_2 e N_3 representam, respectivamente, células com classes de danos 1, 2 e 3.

2.7. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Para analisar possíveis atrasos no ciclo celular induzidos pela SAN, as células tumorais e não tumorais humanas foram coradas com iodeto de propídeo e quantificadas em citometria de fluxo, de acordo com a quantidade de DNA que possuem. Neste teste, foram semeadas 2×10^5 células em microplacas de 6 poços. Após 24 h de estabilização, as células receberam meio de cultura completo (CTR), agente citotóxico (CPT 4 μM), ou SAN (HepG2/C3A: 0,5 e 2,5 μM ; MRC-5: 2,5 e 7,5 μM). Após 24 h de exposição, as células foram colhidas e ressuspensas em 100 μL de PBS, ao qual foi adicionado 5 μL de RNase A (2 mg/mL, 37° C, 30 min), 200 μL de lise (0,02 g de citrato de sódio, 20 μL de Triton X-100, 20 mL PBS) e 5 μL de iodeto de propídeo (50 $\mu\text{g/mL}$, no gelo, no escuro, 30 min). O conteúdo de DNA das células foi determinado usando-se o citômetro Guava EasyCyte[®] (Merck Millipore), sendo contabilizados 5×10^3 eventos em cada caso (excitação: 488 nm, filtro: 610/20). Células em G1 tem quantidade 2C de DNA; células em G2/M tem quantidade 4C de DNA; células em S tem quantidade intermediária entre 2C e 4C, uma vez que ainda estão replicando o material genético; e células em sub-G1 são consideradas apoptóticas ou necróticas. Os histogramas foram analisados com o *software* disponibilizado pelo fabricante. Foram realizados três experimentos independentes.

2.8. Análise da indução de apoptose por citometria de fluxo (anexina V-CF647/7-AAD)

A exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática das células em apoptose foi medida pela detecção com o *kit* de anexina V, um anticorpo conjugado com CF647, um fluoróforo vermelho, além de 7-aminoactinomicina D (7-AAD), que só é captado por células em apoptose tardia ou necróticas. Neste teste, foram semeadas 2×10^5 células em microplacas de 6 poços. Após 24 h de estabilização, as células receberam meio de cultura completo (CTR), agente apoptótico (CPT 4 μM), ou SAN (HepG2/C3A: 0,5 e 2,5 μM ; MRC-5: 2,5 e 7,5 μM). Após 24 h de exposição, as células foram colhidas e ressuspensas em 200 μL de tampão de ligação, foi adicionado 5 μL de anexina V (15 min, ao abrigo da luz), seguidos de 5 μL de 7-AAD. Foram contabilizadas 5×10^3 células em citometria de fluxo (Guava EasyCyte[®], Merck Millipore) (anexina V: excitação em 633 nm, filtro 660/20; 7-AAD: excitação em 488, filtro 695/40). Foram consideradas células viáveis aquelas que apresentaram marcação negativa para anexina V e 7-AAD; células em apoptose inicial com marcação positiva para anexina V e negativa para 7-AAD, células em apoptose tardia/mortas com dupla-marcação positiva para anexina V e 7-AAD; e células necróticas com marcação negativa para anexina V e positiva para 7-AAD. Foram realizados três experimentos independentes.

2.9. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão, submetidos à análise de variância (*one way ANOVA*), seguida do teste de Dunnett, pelo *software GrafPad® Prism 5*. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de *p* foi menor que 0,05.

3. Resultados

3.1. SAN é citotóxica para células HepG2/C3A e MRC-5

A citotoxicidade da SAN foi avaliada pelo teste do MTT, em células humanas tumorais HepG2/C3A e não tumorais MRC-5. A Tabela 1 apresenta as médias das absorbâncias e desvio padrão, bem como a viabilidade celular, estimada com base na absorbância do controle (CTR=100%). Todas as concentrações de SAN avaliadas (0,100 a 20 µM) para a linhagem tumoral HepG2/C3A reduziram significativamente a absorbância, quando comparadas ao CTR, no tempo de 24 h. Para 48 h, as concentrações de 2,5 a 20 µM também reduziram a absorbância, entretanto, a viabilidade celular só foi inferior à 80% a partir da concentração de 5 µM, em ambos os tempos, indicando citotoxicidade. Para a linhagem não tumoral MRC-5, somente as concentrações de 7,5 a 20 µM reduziram significativamente a absorbância em 24 h, enquanto que todas as concentrações (0,100 a 20 µM) apresentaram este efeito no tempo de 48 h. Por sua vez, a viabilidade celular só foi inferior a 80% a partir das concentrações de 7,5 e 2,5 µM, para 24 e 48 h, respectivamente, indicando citotoxicidade. Ainda, destaca-se a concentração de 5 µM, que apresentou 90 e 72% de viabilidade para a linhagem não tumoral, enquanto que a viabilidade da linhagem tumoral foi de apenas 42 e 44%, respectivamente, nos tempos de 24 e 48 h, chegando a apenas 15% no tempo de 48 h (SAN 10 µM), enquanto que a viabilidade das células não tumorais, no mesmo tempo e concentração, foi de 59%. O tratamento com o agente citotóxico MMS (50 µM) reduziu a viabilidade celular para 53 e 44% para as células tumorais, e 37 e 30% para as células não tumorais, após 24 e 48 h, respectivamente.

Tabela 1: Absorbância média, desvio padrão (DP) e percentual de viabilidade de células HepG2/C3A e MRC-5, tratadas com o alcaloide sanguinarina, por 24 e 48 h, pelo teste do MTT.

Grupos	HepG2/C3A				MRC-5			
	Absorbância Média ± DP		Viabilidade Celular (%)		Absorbância Média ± DP		Viabilidade Celular (%)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
CTR	0,796 ± 0,029	1,125 ± 0,044	100	100	0,849 ± 0,023	1,177 ± 0,046	100	100
MMS 50 µM	0,419* ± 0,034	0,499* ± 0,021	53	44	0,311* ± 0,023	0,349* ± 0,029	37	30
0,100 µM	0,719* ± 0,016	1,112 ± 0,078	90	99	0,812 ± 0,019	1,050* ± 0,054	96	89
0,125 µM	0,735* ± 0,055	1,129 ± 0,074	92	100	0,819 ± 0,044	1,053* ± 0,077	96	89
0,250 µM	0,716* ± 0,037	1,131 ± 0,024	90	101	0,808 ± 0,010	1,040* ± 0,101	95	88
0,500 µM	0,707* ± 0,023	1,069 ± 0,043	89	95	0,812 ± 0,068	1,046* ± 0,038	96	89
1 µM	0,709* ± 0,019	1,078 ± 0,027	89	96	0,798 ± 0,021	1,027* ± 0,046	94	87
2,5 µM	0,644* ± 0,029	0,998* ± 0,029	81	89	0,788 ± 0,031	0,907* ± 0,042	93	77
5 µM	0,333* ± 0,054	0,493* ± 0,104	42	44	0,766 ± 0,037	0,848* ± 0,013	90	72
7,5 µM	0,161* ± 0,012	0,196* ± 0,036	20	17	0,667* ± 0,069	0,785* ± 0,028	79	67
10 µM	0,149* ± 0,009	0,169* ± 0,019	19	15	0,613* ± 0,046	0,689* ± 0,041	72	59
20 µM	0,147* ± 0,011	0,161* ± 0,015	18	14	0,166* ± 0,014	0,158* ± 0,013	20	13

Grupos: controle (CTR), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 50 µM), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina (SAN: 0,100; 0,125; 0,500; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 20 µM); 1x10⁴ células HepG2/C3A ou MRC-5 por poço, incubadas por 24 e 48 h, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR (p<0,05).

3.2. SAN não afeta a integridade da membrana plasmática de células HepG2/C3A

A integridade da membrana plasmática foi verificada, em paralelo com o teste do cometa (3 h de exposição), pelo método de exclusão com o azul de trypan e pela captação de iodeto de propídeo (24 h de exposição), por citometria de fluxo. Considerando a exclusão com azul de trypan (Fig. 2), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os tratamentos com SAN em células tumorais HepG2/C3A (viabilidade celular > 88,3%), quando

comparadas ao controle (92,3%). Para a linhagem não tumoral MRC-5, as concentrações de 5,0 e 7,5 μM foram citotóxicas quando comparadas ao controle (91,7%), embora a viabilidade celular observada ainda fosse maior que 80%. O agente MMS foi citotóxico para células tumorais (74,3%), mas não respondeu para a linhagem não tumoral (89,0%).

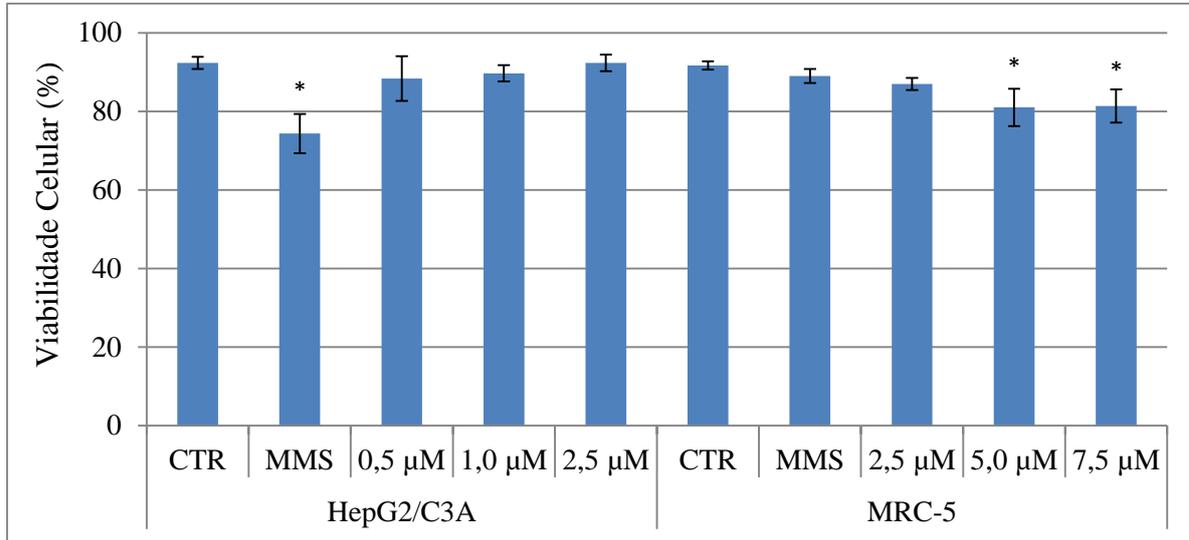


Figura 2: Viabilidade celular média e desvio padrão pelo teste do azul de trypan de células HepG2/C3A e MRC-5, tratadas com o alcaloide sanguinarina, por 3 h. Grupos: controle (CTR), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 75 μM), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina (SAN – HepG2/C3A: 0,5, 1,0 e 2,5 μM ; MRC-5: 2,5, 5,0 e 7,5 μM); 5×10^5 células HepG2/C3A ou MRC-5 por frasco, $n=3$.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

A eliminação do iodeto de propídeo captado só acontece nas células vivas, enquanto que aquelas que sofreram algum tipo de lesão de membrana durante o tratamento, permanecem coradas. A análise por citometria de fluxo (Fig. 3) revelou que a SAN não foi citotóxica nas concentrações de 0,5 e 2,5 μM (92,5 e 88,5%, respectivamente) para células tumorais, quando comparadas ao CTR (90,8%); e 2,5 e 7,5 μM (97,0 e 96,5%, respectivamente) para as células não tumorais, quando comparadas ao CTR (97,3%), após 24 h de exposição. O agente citotóxico CPT (4 μM) respondeu positivamente para a linhagem celular tumoral, reduzindo a viabilidade celular para 41%, mas não comprometeu a integridade da linhagem não tumoral (96%).

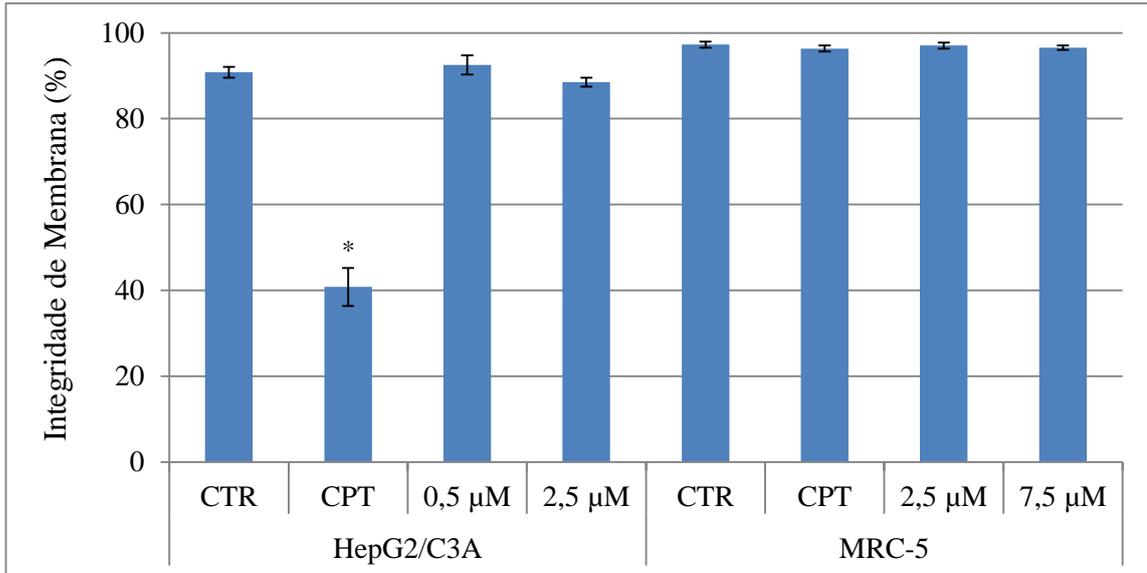


Figura 3: Integridade da membrana plasmática média e desvio padrão da captação de iodeto de propídeo de células HepG2/C3A e MRC-5, tratadas com o alcaloide sanguinarina, por 24 h. Grupos: controle (CTR), agente citotóxico camptotecina (CPT 4 µM), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina (SAN – HepG2/C3A: 0,5 e 2,5 µM; MRC-5: 2,5 e 7,5 µM); 2×10^5 células HepG2/C3A ou MRC-5 por poço, $n=3$.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

3.3. Células HepG2/C3A são mais sensíveis ao efeito genotóxico da SAN

O teste do cometa foi realizado para verificar o potencial genotóxico da SAN em células tumorais e não tumorais humanas (Tabela 2). Foram selecionadas as seguintes concentrações de SAN: 0,5, 1,0 e 2,5 µM para a linhagem tumoral; e 2,5, 5,0 e 7,5 µM para a linhagem não tumoral. A análise do índice de danos revelou atividade genotóxica, estatisticamente significativa, para as concentrações de 1,0 e 2,5 µM, na linhagem HepG2/C3A (ID=34 e 42, respectivamente), bem como para as concentrações de 5,0 e 7,5 µM, na linhagem MRC-5 (ID=154 e 61, respectivamente). Além disso, o potencial genotóxico para a concentração de 5,0 µM foi até maior do que o observado para 7,5 µM na linhagem MRC-5, com elevada ocorrência de danos das classes de cometas 2 e 3 (5,0 µM=34 e 21; e 7,5 µM=11 e 1, respectivamente). Entretanto, a análise morfológica das células MRC-5, tratadas com 7,5 µM de SAN, evidenciou uma elevada frequência de nucleoides atípicos, que não foram contabilizados em nenhuma das classes avaliadas (Fig. 4). O tratamento com o agente genotóxico MMS (75 µM) também resultou em um aumento significativo de danos (ID=106 e 80, para células tumorais e não tumorais, respectivamente), quando comparados ao controle (ID=10 e 18, para células tumorais e não tumorais, respectivamente).

Tabela 2: Classes de cometas, índice de danos (ID) e desvio padrão (DP) de células HepG2/C3A e MRC-5, tratadas com o alcaloide sanguinarina, por 3 h.

Linhagem celular	Grupos	Classes de Cometa \pm DP				ID \pm DP
		0	1	2	3	
HepG2/C3A	CTR	90,33	9,33	0,33	0,00	10,00
		\pm 5,03	\pm 4,51	\pm 0,58	\pm 0,00	\pm 5,57
	MMS 75 μ M	1,67	92,00	5,33	1,00	105,67*
		\pm 0,58	\pm 2,65	\pm 2,08	\pm 0,00	\pm 1,53
	0,5 μ M	79,33	19,67	1,00	0,00	21,67
		\pm 3,21	\pm 2,31	\pm 1,00	\pm 0,00	\pm 4,16
	1,0 μ M	68,33	29,33	2,33	0,00	34,00*
		\pm 7,51	\pm 6,66	\pm 2,31	\pm 0,00	\pm 8,89
2,5 μ M	63,00	32,33	4,67	0,00	41,67*	
	\pm 7,94	\pm 6,66	\pm 4,16	\pm 0,00	\pm 10,79	
MRC-5	CTR	84,00	14,00	2,00	0,00	18,00
		\pm 7,00	\pm 6,56	\pm 1,00	\pm 0,00	\pm 7,55
	MMS 75 μ M	29,33	61,33	9,00	0,33	80,33*
		\pm 16,07	\pm 12,74	\pm 4,58	\pm 0,58	\pm 19,86
	2,5 μ M	76,33	15,33	6,67	1,67	33,67
		\pm 6,03	\pm 2,89	\pm 6,66	\pm 2,08	\pm 16,80
	5,0 μ M	21,00	24,00	34,00	20,67	154,00*
		\pm 12,29	\pm 4,58	\pm 11,14	\pm 2,31	\pm 26,85
7,5 μ M	52,67	35,33	10,67	1,33	60,67*	
	\pm 6,11	\pm 11,24	\pm 4,62	\pm 1,53	\pm 5,77	

Grupos: controle (CTR), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 75 μ M), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina (SAN – HepG2/C3A: 0,5, 1,0 e 2,5 μ M; MRC-5: 2,5, 5,0 e 7,5 μ M); 5×10^5 células HepG2/C3A e MRC-5 por frasco, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

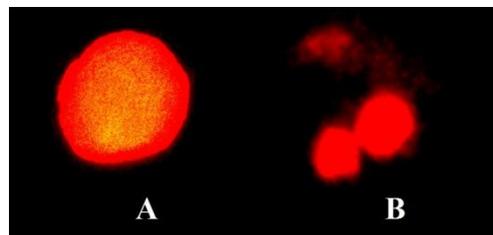


Figura 4: Nucleoide normal (A) e atípico (B), observados em células MRC-5, tratadas com SAN-7,5 μ M.

3.4. SAN induz uma população de células e MRC-5 em sub-G1

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo foi realizada para verificar possíveis atrasos no processo de divisão celular, induzidos pela SAN (Fig. 5). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de 0,5 μ M (sub-G1=0,8%,

G1=52%, S=21,8%, G2/M=27,1%) e 2,5 μ M (sub-G1=1,7%, G1=50,6%, S=18,4%, G2/M=29,2%) para as células tumorais, quando comparadas ao controle (sub-G1=0,9%, G1=51,7%, S=20,3%, G2/M=27,1%). A concentração de 2,5 μ M também não alterou o ciclo das células não tumorais (sub-G1= 1,4%, G1=61,6%, S=22,9%, G2/M=14,2%), quando comparadas ao controle (sub-G1=0,8%, G1=62,1%, S=21,4%, G2/M=15,6%), mas 7,5 μ M induziu uma população significativamente maior de células em sub-G1 (sub-G1=12,6%, G1=61,1%, S=14,5% G2/M=11,8%). A mesma população de sub-G1 foi identificada no tratamento com CTP (sub-G1=14,7%, G1=48,2%, S=14,2%, G2/M=22,8%), na linhagem tumoral, mas não houve resposta para a linhagem não tumoral (sub-G1=1,3%, G1=63,3%, S=23,5%, G2/M=11,6%).

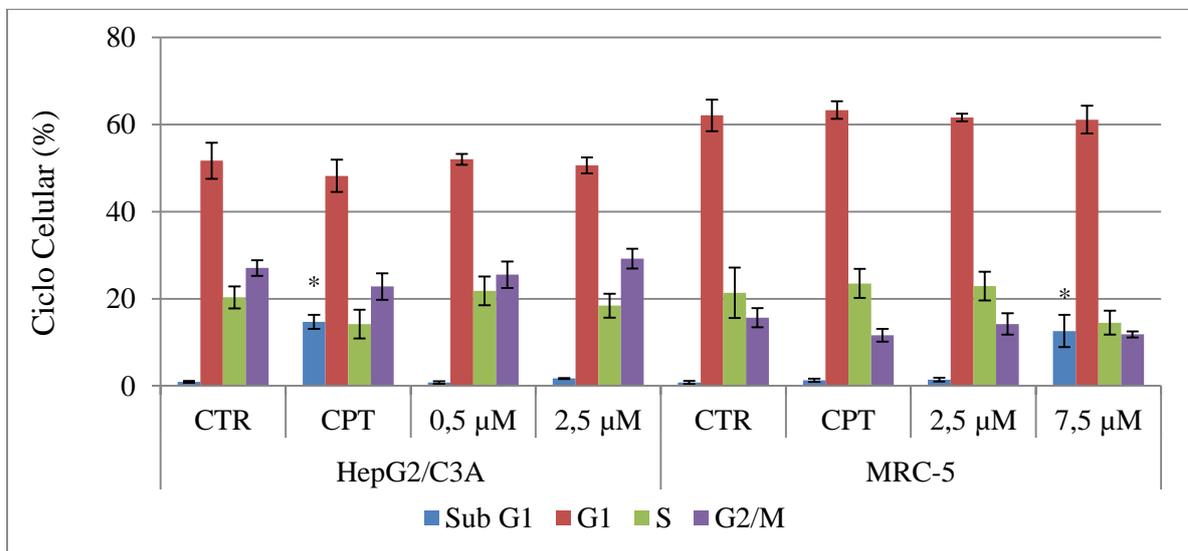


Figura 5: Percentual médio e desvio padrão do ciclo celular de células HepG2/C3A e MRC-5 em diferentes etapas do ciclo celular, tratadas com o alcaloide sanguinarina, por 24 h. Grupos: controle (CTR), agente citotóxico camptotecina (CPT 4 μ M), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina (SAN – HepG2/C3A: 0,5 e 2,5 μ M; MRC-5: 2,5 e 7,5 μ M); 2×10^5 células HepG2/C3A ou MRC-5 por poço, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR (p<0,05).

3.5. Células MRC-5 são mais sensíveis à indução de apoptose pela SAN

A análise da indução de apoptose pelo teste da anexina V, em citometria de fluxo, revelou que nenhuma das concentrações avaliadas de SAN em células tumorais (0,5 e 2,5 μ M) foi capaz de ativar as vias de morte celular programada, uma vez que não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os percentuais de células vivas, em apoptose inicial, em apoptose tardia ou necróticas, dos tratamentos e controle. Para a linhagem não tumoral, a concentração de 2,5 μ M de SAN reduziu significativamente o número de células

viáveis de 84% (controle) para 68%, aumentou o número de células em apoptose inicial de 11 para 21%, e aumentou o número de células necróticas de 3 para 8%. Já a concentração de 7,5 μ M, reduziu o percentual de células viáveis para 29%, e aumentou o número de células em apoptose inicial e tardia para 56 e 12%, respectivamente. O agente indutor de apoptose CPT respondeu positivamente para a linhagem tumoral, reduzindo o percentual de células viáveis de 90% (CTR) para 26%, e aumentando o número de células em apoptose inicial de 9 para 71%. Já a CPT não respondeu significativamente para a linhagem não tumoral (Tabela 3).

Tabela 3: Percentual médio e desvio padrão de células HepG2/C3A e MRC-5 viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia ou necróticas, tratadas com o alcaloide sanguinarina, por 24 h.

Linhagem celular	Grupos	Células viáveis (A)	Apoptose inicial (B)	Apoptose tardia (C)	Total de células apoptóticas (B+C)	Células necróticas (D)
HepG2/C3A	CTR	89,5 \pm 1,7	8,5 \pm 1,6	1,7 \pm 0,4	10,3 \pm 2,0	0,2 \pm 0,1
	CPT	26,4 \pm 1,2*	71,3 \pm 0,9*	2,2 \pm 0,3	73,5 \pm 1,2*	0,1 \pm 0,1
	0,5 μ M	90,1 \pm 1,4	7,9 \pm 0,6	1,8 \pm 0,6	9,6 \pm 1,2	0,3 \pm 0,2
	2,5 μ M	85,8 \pm 4,6	12,3 \pm 4,3	1,7 \pm 0,5	14,1 \pm 4,8	0,2 \pm 0,1
MRC-5	CTR	84,0 \pm 1,4	11,3 \pm 1,6	1,4 \pm 0,5	12,7 \pm 2,1	3,4 \pm 0,9
	CPT	75,4 \pm 3,8	17,5 \pm 4,4	2,5 \pm 0,4	20,0 \pm 4,8	4,6 \pm 1,1
	2,5 μ M	67,7 \pm 6,3*	20,9 \pm 5,5*	3,9 \pm 1,7	24,8 \pm 7,2*	7,6 \pm 1,0*
	7,5 μ M	28,8 \pm 4,0*	55,9 \pm 2,3*	12,1 \pm 3,6*	68,0 \pm 5,9*	3,3 \pm 0,2

Grupos: controle (CTR), agente citotóxico camptotecina (CPT 4 μ M), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina (SAN – HepG2/C3A: 0,5 e 2,5 μ M; MRC-5: 2,5 e 7,5 μ M); 2×10^5 células HepG2/C3A ou MRC-5 por poço, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

4. Discussão

A pesquisa da terapia do câncer tem tentado encontrar um agente quimioterapêutico mais adequado, ou seja, uma substância que mate, preferencialmente, células tumorais ou que seja menos prejudicial para células não tumorais. Poucos estudos na literatura têm discutido a sensibilidade diferencial dos alcaloides benzo[c]fenantridinas para células tumorais e não tumorais (SLANINOVÁ et al., 2014).

O teste de citotoxicidade do MTT, que avalia a atividade de enzimas mitocondriais, e, conseqüentemente, a viabilidade celular, mostrou que as células tumorais foram mais sensíveis à ação do alcaloide, uma vez que a partir da concentração de 2,5 μ M (24 h: 81%; 48 h: 89%) foi observada uma redução expressiva na viabilidade celular (5 μ M – 24 h: 42%; 48 h: 44%),

enquanto que as células não tumorais foram mais resistentes (5 μM : 90% e 7,5 μM : 79%, em 24 h; e 1 μM : 87% e 2,5 μM : 77%, em 48 h). De acordo com Vrba et al. (2004) e Qi et al. (2013), a citotoxicidade da SAN foi significativamente reduzida em hepatócitos de ratos e humanos após o pré-tratamento com indutores de enzimas de fase I (citocromo P450), que atuam nos processos de desintoxicação celular, o que não ocorreu nas linhagens analisadas no presente estudo, ainda que cultivadas *in vitro*, expressam as mesmas enzimas de metabolização.

Corroboram ainda com os resultados do presente trabalho os dados apresentados por Cecen et al. (2014), que também encontraram atividade citotóxica da SAN para diferentes linhagens de neuroblastoma humano (5 μM); Chang et al. (2007), para células KB (2 μM); Han et al. (2013) para diferentes linhagens de câncer de bexiga (0,6 μM); todos pelo teste do MTT, por 24 h. De acordo com estes autores, a citotoxicidade está normalmente relacionada com a perda de potencial de membrana da mitocôndria, e consequente liberação de citocromo *c*, além da formação de espécies reativas de oxigênio. Barreto et al. (2003) identificaram que a SAN inibe diretamente a enzima succinato desidrogenase, comprometendo a atividade mitocondrial em camundongos. Estes mecanismos, com ação isolada ou conjunta, podem ter contribuído para a citotoxicidade da SAN observada, preferencialmente, em células tumorais humanas, uma vez que todas as concentrações avaliadas (0,1 a 20 μM) foram citotóxicas, enquanto que somente concentrações de 7,5 a 20 μM tiveram o mesmo efeito na linhagem não tumoral, no tempo de 24 h.

A exclusão pelo método do azul de trypan não indicou citotoxicidade em nenhuma das condições avaliadas para a linhagem tumoral. Entretanto, Ahsan et al. (2007) verificaram que concentrações de 0,2 a 10 μM de SAN por 24 h, reduziram significativamente a viabilidade de células tumorais de pâncreas, de maneira dose-dependente, pelo mesmo teste. Burgeiro et al. (2013) também verificaram que a SAN (3 μM) induziu rapidamente a morte de células de melanoma humano, duas horas após a exposição. Ahmad et al. (2000) verificaram que a citotoxicidade é um evento dose-dependente da concentração (1 a 10 μM) e que o alcaloide é mais tóxico para células de carcinoma epidermoide humano do que para queratinócitos normais. Essas diferenças encontradas por este autor quando comparadas aos presentes resultados, podem estar relacionadas com a metabolização do alcaloide, que pode variar em função das enzimas que são expressas pela linhagem celular em questão, aumentando ou diminuindo a citotoxicidade do composto.

Apesar da redução da viabilidade celular nas concentrações de 5,0 e 7,5 μM para a linhagem não tumoral, observada no ensaio com o azul de trypan, os resultados da análise por citometria mostraram que nenhuma das concentrações testadas de SAN comprometeu a

integridade da membrana plasmática das linhagens celulares avaliadas, mantendo um elevado percentual de viabilidade celular. Justifica-se o observado pela proliferação celular que ocorreu durante as 24 h de exposição ao alcaloide e o maior valor amostral analisado, que aumenta a confiabilidade do teste. O tratamento com CPT ou SAN não comprometeu a integridade da membrana plasmática da linhagem MRC-5, o que poderia sugerir uma ausência de resposta na análise por citometria. Para mostrar que o tratamento realmente não afetou a linhagem, a mesma suspensão celular analisada foi submetida à lesão mecânica (agitação em vórtex por 5 s), o que comprovou uma redução significativa da viabilidade (35%) e boa responsividade do teste com o iodeto de propídeo (dados não inclusos nos resultados). Não foram encontrados mais trabalhos na literatura que utilizem esta ferramenta para análise da toxicidade da SAN.

Com base nos dados de citotoxicidade analisados em nível de atividade mitocondrial e integridade da membrana plasmática nas HepG2/C3A e MRC-5, procedeu-se a investigação do efeito genotóxico do alcaloide pelo teste do cometa. A análise dos dados indicou que a SAN induziu danos ao DNA de maneira dose-dependente para as células tumorais humanas. Além disso, as concentrações de 1,0 e 2,5 μM de SAN foram genotóxicas para a linhagem tumoral, mas 2,5 μM não apresentou o mesmo efeito para a linhagem não tumoral. Corroboram com estes resultados o trabalho de Ahmad et al. (2000), que mostrou que células cancerígenas são mais sensíveis ao alcaloide (1-5 μM), enquanto que somente concentrações maiores que 10 μM apresentam efeito genotóxico para células normais. Em contraste, Debiton et al. (2003) identificaram sensibilidade similar para a SAN em diferentes linhagens de células normais e tumorais. Suportam ainda o potencial genotóxico do alcaloide os trabalhos de Ansari et al. (2005), que identificaram o efeito genotóxico da SAN em células sanguíneas e da medula óssea de camundongos; De Stefano et al. (2009), em células de melanoma (0,1-5 μM); e Gatti et al. (2014), em células tumorais não-pequenas de pulmão (3 μM).

As concentrações de 5,0 e 7,5 μM de SAN, avaliadas em células não tumorais MRC-5 foram significativamente genotóxicas, induzindo um elevado índice de fragmentação de DNA. A primeira concentração, em especial, induziu um número expressivo de cometas de classes 1, 2 e 3, enquanto que a segunda concentração induziu um maior número de cometas de classe 1 e, além disso, uma elevada frequência de nucleoides atípicos, bastante semelhantes a corpos apoptóticos, que não puderam ser contabilizados neste ensaio.

Considerando então que os efeitos genotóxicos e a fragmentação do DNA podem estar relacionados com a indução de apoptose, no teste com anexina V foi observado que a SAN induziu um maior número de células em apoptose inicial e necrose (2,5 μM), e apoptose inicial e tardia (7,5 μM) apenas para a linhagem não tumoral, enquanto que as concentrações de 0,5 e

2,5 μM não tiveram o mesmo efeito sobre a linhagem tumoral. A análise do ciclo celular confirmou este resultado porque o alcaloide induziu uma população significativa de células não tumorais em sub-G1 (SAN 7,5 μM =12,6%, em relação ao CTR=0,7%), indicando a presença de células em apoptose/mortas após 24 h de exposição. Diversos autores também identificaram a atividade apoptótica da SAN em diferentes linhagens celulares, pelo ensaio com anexina V ou TUNEL: Ahsan et al. (2007), em carcinoma de pâncreas (0,2-10 μM); Chang et al. (2007), em células KB derivadas de HeLa (0,1-3 μM); Han et al. (2013), em células da bexiga (1,5 μM); Kalogris et al. (2014), em células basais de carcinoma de mama (1,5-3 μM), entre outros. Os mecanismos de indução de apoptose descritos por estes autores foram relacionados à formação de espécies reativas de oxigênio, ativação de caspases, despolarização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo *c* e regulação de proteínas pró- e anti-apoptóticas, que também podem ter contribuído para a atividade apoptótica observada em células MRC-5.

Além disso, a apoptose também pode ser conduzida em resposta a danos no material genético, normalmente relacionados com a ativação da proteína p53, que regula a expressão de genes pró-apoptóticos. Fortalecem esta hipótese os resultados de Han et al. (2013), ao verificarem que a SAN (1,5 μM) induz efetivamente a apoptose (em média, 70% de células em sub-G1, pela análise do ciclo celular, e 50% de células apoptóticas, com exposição de fosfatidilserina). Os autores ainda constataram um aumento na expressão de genes pró-apoptóticos, caspases-8, -9 e -3, e maior produção de espécies reativas de oxigênio, em células tumorais de bexiga.

A comparação entre os diferentes resultados obtidos nos tratamentos com a sanguinarina sugere a ausência de indução de apoptose em células tumorais, possivelmente pelos mecanismos de: manutenção da integridade da membrana plasmática; ativação do sistema de reparo, que corrigiu a fragmentação do DNA (efeito genotóxico) observada no teste do cometa; e continuidade do ciclo celular. Diferentemente disso, na linhagem não tumoral, a atividade apoptótica foi fortemente induzida, apesar da maior resistência ao alcaloide para a citotoxicidade e genotoxicidade quando comparada à linhagem tumoral. A sanguinarina pode ter contribuído para a redução da atividade das enzimas mitocondriais, resultando em um aumento de espécies reativas de oxigênio, perda de potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo *c*, e consequente ativação da via intrínseca de apoptose.

5. Conclusão

Neste trabalho foi observado que os sistemas-teste celulares HepG2/C3A (tumoral) e MRC-5 (não tumoral) são eficientes para o estudo da citotoxicidade e genotoxicidade induzidas,

in vitro, podendo ser utilizados em estudos comparativos, atingindo os objetivos propostos. Apesar da linhagem não tumoral ter se mostrado mais sensível à indução de apoptose pelo tratamento com o alcaloide, este fator não desqualifica a sanguinarina como um agente potencial para o desenvolvimento de novas terapias relacionadas ao combate de neoplasias malignas. A identificação de vias moleculares de ação nestas e em outras linhagens celulares certamente contribuirão para uma melhor compreensão dos efeitos citotóxicos e genotóxicos desta substância.

6. Referências

AHMAD, N.; GUPTA, S.; HUSAIN, M.M.; HEISKANEN, K.M.; MUKHTAR, H. Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. **Clinical Cancer Research**, v. 6, p. 1524-1528, 2000.

AHSAN, H.; REAGAN-SHAW, S.; BREUR, J.; AHMAD, N. Sanguinarine induces apoptosis of human pancreatic carcinoma AsPC-1 and BxPC-3 cells via modulations in Bcl-2 family proteins. **Cancer Letters**, v. 249, p. 198–208, 2007.

ANSARI, K.M.; CHAUHAN, L.K.S.; DHAWAN, A.; KHANNA, S.K.; DAS, M. Unequivocal evidence of genotoxic potential of argemone oil in mice. **International Journal of Cancer**, v. 112, p. 890–895, 2004.

ANSARI, K.M.; DHAWAN, A.; KHANNA, S.K.; DAS, M. *In vivo* DNA damaging potential of sanguinarine alkaloid, isolated from argemone oil, using alkaline Comet assay in mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, p. 147–153, 2005.

ANSARI, K.M.; DHAWAN, A.; KHANNA, S.K.; DAS, M. Protective effect of bioantioxidants on argemone oil/sanguinarine alkaloid induced genotoxicity in mice. **Cancer Letters**, v. 244, p. 109–118, 2006.

BARRETO, M.C.; PINTO, R.E.; ARRABAÇA, J.D.; PAVÃO, M.L. Inhibition of mouse liver respiration by *Chelidonium majus* isoquinoline alkaloids. **Toxicology Letters**, v. 146, p. 37–47, 2003.

BURGEIRO, A.; BENTO, A.C.; GAJATE, C.; OLIVEIRA, P.J.; MOLLINEDO, F. Rapid human melanoma cell death induced by sanguinarine through oxidative stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 705, p. 109–118, 2013.

CECEN, E.; ALTUN, Z.; ERCETIN, P.; AKTAS, S.; OLGUN, N. Promoting effects of sanguinarine on apoptotic gene expression in human neuroblastoma cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 21, p. 9445-9451, 2014.

CHANG, M.C.; CHAN, C.P.; WANG, Y.J.; LEE, P.H.; CHEN, L.I.; TSAI, Y.L.; LIN, B.R.; WANG, Y.L.; JENG, J.H. Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 128, p. 143–151, 2007.

DE STEFANO, I.; RASPAGLIO, G.; ZANNONI, G.F.; TRAVAGLIA, D.; PRISCO, M.G.; MOSCA, M.; FERLINI, C.; SCAMBIA, G.; GALLO, D. Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 1374–1381, 2009.

DEBITON, E.; MADELMONT, J.C.; LEGAULT, J.; BARTHOMEUF, C. Sanguinarine-induced apoptosis is associated with an early and severe cellular glutathione depletion. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 51, p. 474–482, 2003.

DVORAK, Z.; SOVADINOVÁ, I.; BLÁHA, L.; GIESY, J.P.; ULRICHOVA, J. Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine do not affect transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor: Analyses in rat hepatoma cell line H4IIE.luc. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 1466–1473, 2006.

GATTI, L.; COSSA, G.; TINELLI, S.; CARENINI, N.; ARRIGHETTI, N.; PENNATI, M.; COMINETTI, D.; CESARE, M.; ZUNINO, F.; ZAFFARONI, N.; PEREGO, P. Improved Apoptotic Cell Death in Drug-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Based Treatments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 348, p. 360–371, 2014.

HAMMEROVÁ, J.; ULDRIJAN, S.; TÁBORSKÁ, E.; SLANINOVÁ, I. Benzo[c]phenanthridine alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status. **Journal of Dermatological Science**, v. 62, p. 22-35, 2011.

HAN, M.H.; KIM, G.Y.; YOO, Y.H.; CHOI, Y.H. Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction. **Toxicology Letters**, v. 220, n. 2, p. 157-66, 2013.

KALOGRIIS, C.; GARULLI, C.; PIETRELLA, L.; GAMBINI, V.; PUCCIARELLI, S.; LUCCI, C.; TILIO, M.; ZABALETA, M.E.; BARTOLACCI, C.; ANDREANI, C.; GIANGROSSI, M.; IEZZI, M.; BELLETTI, B.; MARCHINI, C.; AMICI, A. Sanguinarine suppresses basal-like breast cancer growth through dihydrofolate reductase inhibition. **Biochemical Pharmacology**, v. 90, p. 226–234, 2014.

KAMINSKY, V.O.; LIN, K.W.; FILYAK, Y.; STOIKA, R. Differential effect of sanguinarine, chelerythrine and chelidonine on DNA damage and cell viability in primary mouse spleen cells and mouse leukemic cells. **Cell Biology International**, v. 32, p. 271-277, 2008.

KOSINA, P.; WALTEROVÁ, D.; ULRICHOVÁ, J.; LICHNOVSKY, V.; STIBOROVÁ, M.; RYDLOV, H.; VICAR, J.; KRECMAN, V.; BRABEC, M.J.; SIMÁNEK, V. Sanguinarine and chelerythrine: assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 85–91, 2004.

LIMA, T.M. Citometria de fluxo. In: PERES, C.M.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005, 283p.

MALÍKOVÁ, J.; ZDARILOVA, A.; HLOBILKOVA, A. Effects of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis. **Biomedical Papers of the Medical Faculty Universitatis Palacky Olomouc Czech Republic**, v. 150, n. 1, p. 5–12, 2006.

MALÍKOVÁ, J.; ZDARILOVÁ, A.; HLOBILKOVÁ, A.; ULRICHOVÁ, J. The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine. **Cell Biology & Toxicology**, v. 22, p. 439–453, 2006a.

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

QI, X.Y.; LIANG, S.C.; GE, G.B.; LIU, Y.; DONG, P.P.; ZHANG, J.W.; WANG, A.X.; HOU, J.; ZHU, L.L.; YANG, L.; TU, C.X. Inhibitory effects of sanguinarine on human liver cytochrome P450 enzymes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 56, p. 392–397, 2013.

SLANINOVÁ, I.; PENCIKOVÁ, K.; URBANOVÁ, J.; SLANINA, J.; TÁBORSKA, E. Antitumour activities of sanguinarine and related alkaloids. **Phytochemistry Review**, v. 13, p. 51–68, 2014.

SUCHOMELOVÁ, J.; BOCHORÁKOVÁ, H.; PAULOVÁ, H.; MUSIL, P.; TÁBORSKÁ, E. HPLC quantification of seven quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids in six species of the family Papaveraceae. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analyses**, v. 44, p. 283–287, 2007.

SUN, M.; LOU, W.; CHUN, J.Y.; CHO, D.S.; NADIMINTY, N.; EVANS, C.P.; CHEN, J.; YUE, J.; ZHOU, Q.; GAO, A.C. Sanguinarine suppresses prostate tumor growth and inhibits survivin expression. **Genes Cancer**, v. 1, p. 283–292, 2010.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKIVYF. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutageneses**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TSUKAMOTO, H.; KONDO, S.; MUKUDAI, Y.; NAGUMO, T.; YASUDA, A.; KURIHARA, Y.; KAMATANI, T.; SHINTANI, S. Evaluation of anticancer activities of benzo[c]phenanthridine alkaloid sanguinarine in oral squamous cell carcinoma cell line. **Anticancer Research**, v. 31, p. 2841-2846, 2011.

VRBA, J.; KOSINA, P.; ULRICHOVÁ, J.; MODRIANSKÝ, M. Involvement of cytochrome P450 1A in sanguinarine detoxication. **Toxicology Letters**, v. 151, p. 375–387, 2004.

CAPÍTULO 3

3.1. Artigo 2

Citotoxicidade, genotoxicidade e indução de apoptose, sem afetar o ciclo celular, do alcaloide cheleritrina, em células HepG2/C3A e MRC-5

Artigo formatado segundo as normas da revista
British Journal of Cancer.

Citotoxicidade, genotoxicidade e indução de apoptose, sem afetar o ciclo celular, do alcaloide cheleritrina, em células HepG2/C3A e MRC-5

Igor Vivian de Almeida, Veronica Elisa Pimenta Vicentini.

Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

* **Autor Correspondente:** Igor Vivian de Almeida. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular - Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo 5790, Bloco H67 (11), Jardim Universitário, CEP: 87020-900 - Maringá - Paraná - Brasil. Telefones: +55-44-3011-4342; +55-44-3011-4687. Fax: +55-44-3011-4893. e-mail: igoralmeida.bio@gmail.com

Resumo

A Chelitrina (CHE), um alcaloide benzo[c]fenantridina, é o principal componente ativo da planta medicinal *Macleaya cordata*, entre outras plantas da família Papaveraceae, cujas propriedades farmacológicas incluem ação antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória e apoptótica, que atualmente vem sendo muito estudada por suas propriedades anticancerígenas. O presente trabalho objetivou avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade, influência sobre o ciclo de divisão celular e indução de apoptose, em células tumorais e não tumorais humanas. Foi observado que a CHE é citotóxica para células tumorais de hepatoma humano (HepG2/C3A) e fibroblastos não tumorais de pulmão humano (MRC-5), reduzindo de maneira dose-dependente, em sua maioria, a viabilidade celular (menor que 80%) a partir da concentração de 12,5 μM , para a linhagem tumoral; e 10 μM , para a linhagem não tumoral, em 24 e 48 h, pelo teste do MTT. A análise da integridade da membrana plasmática mostrou que a CHE apresenta ação citotóxica para ambas as linhagens celulares analisadas, pelos testes do azul de trypan (HepG2/C3A: 7,5 e 12,5 μM ; MRC-5: 10 μM) e iodeto de propídeo (HepG2/C3A: 12,5 μM). A análise do teste do cometa indicou que a CHE é mais genotóxica para a linhagem não tumoral, com aumento significativo de danos ao DNA nas concentrações de 5 e 10 μM , enquanto que somente a concentração de 12,5 μM apresentou o mesmo efeito sobre a linhagem tumoral. A análise do ciclo celular não identificou diferenças estatisticamente significativas na progressão da divisão celular em ambas as linhagens utilizadas. Apesar disso, o teste de indução de apoptose com anexina V, mostrou que as concentrações de 10 e 12,5 μM reduziram o percentual de células viáveis e aumentaram o de apoptose inicial, nas linhagens não tumoral e tumoral, respectivamente. Assim, apesar da linhagem não tumoral MRC-5, de modo geral, ter se mostrado mais sensível ao tratamento com o alcaloide, a CHE ainda possui efeitos significativos reduzindo a viabilidade, induzindo a fragmentação do DNA e a apoptose na linhagem tumoral HepG2/C3A.

Palavras-chave: alcaloide benzo[c]fenantridina, fibroblasto de pulmão, hepatoma humano, viabilidade celular.

1. Introdução

Os compostos naturais das plantas determinam o odor e dão sabor aos vegetais, e podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais à saúde humana, o que promove uma importante base para a pesquisa farmacêutica. Dezenas de milhares de metabólitos secundários de plantas já foram descritos, por exemplo, cerca de 21 mil alcaloides, 22 mil terpenoides e 5 mil flavonoides e taninos já são conhecidos, mas isso representa, muito provavelmente, apenas uma fração do que está presente na natureza (Kroymann, 2011). Recentemente, numerosas pesquisas têm sido feitas buscando identificar nas plantas novos agentes que possam ser utilizados na terapia do câncer. Uma das plantas que têm recebido atenção especial é a *Macleaya cordata*, originária da China, extensivamente utilizada na medicina tradicional chinesa para o tratamento de feridas, artrite, reumatismo, doenças venéreas e o câncer (Zhang et al., 2012).

A cheleritrina (CHE – 1,2-dimethoxy-N-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridinium), um alcaloide benzo[c]fenantridina, é o principal componente ativo de *M. cordata*, mas também pode ser encontrada em *M. microcarpa*, *Chelidonium majus* e *Sanguinaria canadensis* (Fig. 1). Suas propriedades farmacológicas incluem ação antimicrobiana, antifúngica e anti-inflamatória (Kosina et al., 2004; Zdarilova et al., 2008). Este alcaloide tem sido utilizado para inibir a proteína quinase C, que desempenha um papel crucial no crescimento celular, diferenciação e apoptose (Vrba et al., 2008); inibir proteínas antiapoptóticas, favorecendo a morte celular programada (Vogler et al., 2009); e inibir a enzima succinato desidrogenase mitocondrial, favorecendo a produção de espécies reativas de oxigênio (Barreto et al., 2003).

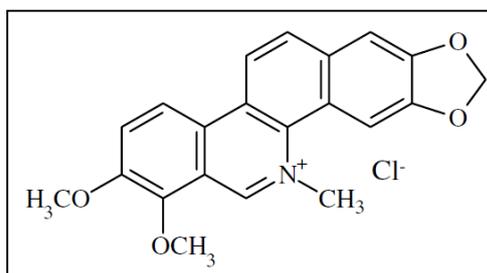


Figura 1 - Apresentação comercial da molécula de cheleritrina (Fonte: Dvorak et al., 2006).

Os efeitos citotóxicos da CHE também estão relacionados com a alteração do potencial de membrana mitocondrial, favorecendo a liberação de citocromo *c* e ativação de caspases, sendo este um dos mecanismos iniciadores da apoptose (Matkar et al., 2008; Funakoshi et al., 2011). Diversos trabalhos também mostraram a relação direta da atividade antitumoral mediada

pela CHE, principalmente pela indução de apoptose, em diferentes linhagens, como células de hepatoma humano (Zhang et al., 2011); células tumorais de estômago (Zhang et al., 2012); e linfoma T (Kumar et al., 2013).

Apesar de muitos autores apontarem a CHE como um potencial quimioterapêutico, é desejável que a toxicidade deste alcaloide seja maior em células tumorais do que em células normais. A literatura é escassa em estudos comparativos neste sentido. Malíková et al. (2006b) compararam os efeitos da CHE sobre linhagens normais de fibroblasto de gengiva e tumorais de próstata (DU-145 e LNCaP), observando uma maior sensibilidade para os fibroblastos do que para a linhagem tumoral.

Assim, considerando que as respostas celulares induzidas pelo alcaloide CHE podem variar em função das características intrínsecas da linhagem celular analisada, o presente estudo objetivou identificar a sensibilidade entre as células tumorais de hepatocarcinoma humano (HepG2-C3A) e não tumorais de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5), avaliando os efeitos citotóxicos, genotóxicos, sobre o ciclo celular e apoptóticos induzidos pelo alcaloide CHE, *in vitro*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Agentes químicos

Chelerytrina (CHE – *chelerytrine chloride*, 95%) foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO, EUA) e diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) para o preparo de uma solução estoque, e posteriormente diluída em meio de cultura completo no momento do uso, em diferentes concentrações. A concentração final de DMSO nas culturas celulares não ultrapassou 0,01% e testes prévios não indicaram qualquer indício de toxicidade. DMSO (99,7%), metil metanossulfonato (MMS – 99%), camptotecina (CPT – 90%), RNase A e iodeto de propídeo (94%) também foram adquiridos da Sigma. Azul de trypan (0,4% Cat. N°. 15250-061), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM – Cat. N°. 12800-017), soro bovino fetal (SBF Cat. N°. 12657-029), *Antibiotic/Antimycotic* (Cat. N°. 15240-062) e MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium bromide] (98% Cat. N°. M-6494) foram adquiridos da Gibco® Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA). *FlowCollect® Annexin Red Kit* para o ensaio de apoptose foi adquirido da Merck Millipore (Billerica, MA, EUA).

2.2. Culturas celulares

As linhagens celulares tumorais de hepatocarcinoma humano, HepG2/C3A (Cat. N°. 0291), e não tumorais de fibroblastos de pulmão humano, MRC-5 (Cat. N°. 0180), foram

obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, livres de contaminação por micoplasma. As linhagens foram cultivadas em frascos de cultura de 25cm² (TPP) contendo meio de cultura completo (DMEM suplementado com 10% de SBF e 1 mL/L de solução antibiótica/antimicótica), e mantidas em incubadora de CO₂ (5%), com umidade de 95%, à 37°C. Nestas condições, o ciclo celular de ambas as linhagens é de aproximadamente 24 horas. Para os experimentos foram utilizadas células em fase de crescimento logarítmico.

2.3. Teste de citotoxicidade – MTT

Para o teste de citotoxicidade foi realizado o ensaio do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dipheniltetrazolium bromide], de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço foram semeadas 1x10⁴ células HepG2/C3A ou MRC-5, com exceção dos poços controle sem células (branco). Após estabilização, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100 µL de meio completo nos grupos: controle (CTR), e tratamentos: agente citotóxico (MMS 50 µM) e CHE (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 e 20,0 µM). Após 24 ou 48 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura, acrescido de MTT (0,2 mg/mL). A placa foi incubada por mais 4 h antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100 µL de DMSO, para solubilização dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Labtech) a 550nm. A viabilidade celular foi estimada com base na absorbância do controle ($Abs_{tratamento}/Abs_{controle} \times 100$). Os experimentos foram realizados em triplicata, em duas repetições técnicas.

2.4. Análise da viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de trypan

A análise da viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de trypan foi realizada em paralelo com o teste do cometa (ver subitem *Teste do cometa*). Após a colheita das células, 20 µL de suspensão celular foram misturados com igual volume de azul de trypan 0,2%, depositados sobre uma lâmina, coberta com lamínula, e analisada ao microscópio de luz. Foram contabilizadas 100 células por amostra, diferenciando células viáveis (citoplasma translúcido e membrana refringente) de não viáveis (citoplasma corado em azul). Somente os tratamentos com viabilidade superior a 80% foram considerados.

2.5. Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo

Células que morrem pela via necrótica, diferentemente da via apoptótica, perdem rapidamente a integridade da membrana plasmática, dando passagem a corantes fluorescentes

solúveis, como o iodeto de propídeo. Neste teste, foram semeadas 2×10^5 células em microplacas de 6 poços. Após 24 h de estabilização, as células receberam meio de cultura completo (CTR), agente citotóxico (CPT 4 μM), ou CHE (HepG2/C3A: 2,5 e 12,5 μM ; MRC-5: 1 e 10 μM). Após 24 h de exposição, as células foram colhidas e ressuspensas em 200 μL de PBS, ao qual foi adicionado 5 μL de iodeto de propídeo (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A integridade da membrana foi verificada em nível de captação e ligação do corante com o DNA celular, usando-se o citômetro BD Accuri[®] C6 (Becton-Dickinson), sendo contabilizadas 5×10^3 células em cada caso. Foram realizados três experimentos independentes.

2.6. Ensaio do cometa

Este ensaio consiste na lise de células fixadas em gel de agarose para posterior eletroforese, com objetivo de promover a migração de fragmentos de DNA, permitindo assim, sua identificação (Tice et al., 2000). Para este ensaio foram semeadas 5×10^5 células HepG2/C3A ou MRC-5 em 5 mL de meio de cultura completo. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio completo novo nos grupos: CTR e tratamentos: agente genotóxico (MMS 75 μM), ou CHE (HepG2/C3A: 2,5, 7,5 e 12,5 μM ; MRC-5: 1, 5 e 10 μM). Após 3 h de exposição, as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas (300 μL , 0,1%), centrifugadas (1250 rpm, 5 min) e ressuspensas em 0,5 mL de meio de cultura. Em um microtubo foram homogeneizados 20 μL de suspensão celular e 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%, 37° C), depositando este material em uma lâmina pré-gelatinizada com agarose (1,5%), cobrindo com lamínula. Após 20 min, a lamínula foi removida e procedeu-se a lise (NaCl 2,5 M, 100 EDTA mM, Tris 10 mM, pH 10; 1% Triton X-100, 10% DMSO), por 90 min. As lâminas foram depositadas em uma solução tampão alcalina de eletroforese (NaOH 10 N e EDTA 200 mM, pH 13, 20 min), antes da eletroforese (25 V, 300 mA, 20 min). Subsequentemente, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 M, pH 7,5, 15 min) e coradas com 30 μL de brometo de etídeo (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

A análise foi feita em microscopia de fluorescência (filtro de excitação 420-490 nm e filtro de barreira 520 nm). A determinação dos danos foi feita por análise visual e a classificação foi dividida em quatro categorias: classe 0 – nucleoides não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleoides com cauda menor que o diâmetro do nucleoide; classe 2 – nucleoides com cauda de tamanho entre uma e duas vezes o diâmetro do nucleoide; classe 3 – nucleoides com cauda duas vezes maior que o diâmetro do nucleoide. Células que apresentaram o nucleoide totalmente fragmentado não foram contabilizadas. No total, foram analisadas 100 células por lâmina de três experimentos independentes. O índice de danos (ID) foi baseado no

comprimento da migração do DNA e calculado como segue: $ID = N_1 + (2 \times N_2) + (3 \times N_3)$, onde N_1 , N_2 e N_3 representam, respectivamente, células com classes de danos 1, 2 e 3.

2.7. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Para analisar possíveis atrasos no ciclo celular induzidos pela CHE, as células tumorais e não tumorais humanas foram coradas com iodeto de propídeo e quantificadas em citometria de fluxo, de acordo com a quantidade de DNA que possuem. Neste teste, foram semeadas 2×10^5 células em microplacas de 6 poços. Após 24 h de estabilização, as células receberam meio de cultura completo (CTR), agente citotóxico (CPT 4 μM), ou CHE (HepG2/C3A: 2,5 e 12,5 μM ; MRC-5: 1 e 10 μM). Após 24 h de exposição, as células foram colhidas e ressuspensas em 100 μL de PBS, ao qual foi adicionado 5 μL de RNase A (2 mg/mL, 37° C, 30 min), 200 μL de lise (0,02 g de citrato de sódio, 20 μL de Triton X-100, 20 mL PBS) e 5 μL de iodeto de propídeo (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, no gelo, no escuro, 30 min). O conteúdo de DNA das células foi determinado usando-se o citômetro Guava EasyCyte® (Merck Millipore), sendo contabilizados 5×10^3 eventos (488 nm) em cada caso. Células em G1 tem quantidade 2C de DNA; células em G2/M tem quantidade 4C de DNA; células em S tem quantidade intermediária entre 2C e 4C, uma vez que ainda estão replicando o material genético; e células em sub-G1 são consideradas apoptóticas ou necróticas. Os histogramas foram analisados com o *software* disponibilizado pelo fabricante. Foram realizados três experimentos independentes.

2.8. Análise da indução de apoptose por citometria de fluxo (anexina V-CF647/7-AAD)

A exposição de fosfatidilserina no folheto externo da membrana plasmática das células em apoptose foi medida pela detecção com o *kit* de anexina V, um anticorpo conjugado com CF647, um fluoróforo vermelho, além de 7-aminoactinomicina D (7-AAD), que só é captado por células em apoptose tardia ou necróticas. Neste teste, foram semeadas 2×10^5 células em microplacas de 6 poços. Após 24 h de estabilização, as células receberam meio de cultura completo (CTR), agente apoptótico (CPT 4 μM), ou CHE (HepG2/C3A: 2,5 e 12,5 μM ; MRC-5: 1 e 10 μM). Após 24 h de exposição, as células foram colhidas e ressuspensas em 200 μL de tampão de ligação, foi adicionado 5 μL de anexina V (15 min, ao abrigo da luz), seguidos de 5 μL de 7-AAD. Foram contabilizadas 5×10^3 células em citometria de fluxo (Guava EasyCyte®, Merck Millipore). Foram consideradas células viáveis aquelas que apresentaram marcação negativa para anexina V e 7-AAD; células em apoptose inicial com marcação positiva para anexina V e negativa para 7-AAD, células em apoptose tardia/mortas com dupla-marcação

positiva para anexina V e 7-AAD; e células necróticas com marcação negativa para anexina V e positiva para 7-AAD. Foram realizados três experimentos independentes.

2.9. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão, submetidos à análise de variância (*one way ANOVA*), seguida do teste de Dunnett, pelo *software GrafPad® Prism 5*. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de *p* foi menor que 0,05.

3. Resultados

3.1. A citotoxicidade da CHE é dependente do tempo e concentração

A citotoxicidade da CHE foi avaliada pelo teste do MTT, em células humanas tumorais HepG2/C3A e não tumorais MRC-5. A tabela 1 apresenta as médias das absorbâncias e desvio padrão, bem como a viabilidade celular, estimada com base na absorbância do controle (CTR=100%). Com relação à absorbância, as menores concentrações de CHE avaliadas (0,1 a 2,5 μM) não foram citotóxicas para a linhagem tumoral HepG2/C3A, nos tempos de 24 e 48 h. Já as concentrações de 5 a 20 μM foram citotóxicas, dose-dependentes, em ambos os tempos de tratamento, apresentando uma diferença estatisticamente significativa quando comparada ao CTR. Todavia, a viabilidade celular só foi inferior a 80% a partir da concentração de 12,5 μM , em ambos os tempos. Para a linhagem não tumoral MRC-5, as concentrações de 0,1 a 7,5 μM não foram citotóxicas em 24 h, enquanto que as concentrações de 10 a 20 μM apresentaram diferenças estatisticamente significativas, dose-dependentes, quando comparadas ao CTR. No tempo de 48 h, todas as concentrações avaliadas de CHE (0,1 a 20 μM) apresentaram atividade citotóxica para esta linhagem celular. Apesar disso, a viabilidade celular só foi inferior à 80% para as concentrações de 10 a 20 μM . O tratamento com o agente citotóxico MMS (50 μM) reduziu a viabilidade celular para 52 e 48% para as células tumorais, e 37 e 30% para as células não tumorais, após 24 e 48 h, respectivamente.

Tabela 1: Absorbância média, desvio padrão (DP) e percentual de viabilidade de células HepG2/C3A e MRC-5, tratadas com o alcaloide cheleritina, por 24 e 48 h, pelo teste do MTT.

	HepG2/C3A				MRC-5			
	Absorbância Média ± DP		Viabilidade Celular (%)		Absorbância Média ± DP		Viabilidade Celular (%)	
Grupos	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
CTR	1,063 ± 0,039	1,236 ± 0,048	100	100	0,849 ± 0,023	1,177 ± 0,046	100	100
MMS	0,558* ± 0,040	0,594* ± 0,068	52	48	0,311* ± 0,023	0,349* ± 0,029	37	30
0,1 µM	0,998 ± 0,053	1,188 ± 0,064	94	96	0,776 ± 0,022	0,991* ± 0,029	91	84
0,5 µM	1,010 ± 0,031	1,162 ± 0,037	95	94	0,772 ± 0,031	0,995* ± 0,028	91	84
1 µM	1,045 ± 0,036	1,170 ± 0,049	98	95	0,777 ± 0,025	1,001* ± 0,046	91	85
2,5 µM	1,007 ± 0,056	1,194 ± 0,081	95	97	0,767 ± 0,052	1,010* ± 0,019	90	86
5 µM	0,939* ± 0,036	1,079* ± 0,054	88	87	0,787 ± 0,035	1,034* ± 0,052	93	88
7,5 µM	0,975* ± 0,040	1,083* ± 0,035	92	88	0,771 ± 0,025	0,981* ± 0,051	91	83
10 µM	0,932* ± 0,056	1,019* ± 0,040	88	82	0,611* ± 0,068	0,838* ± 0,069	72	71
12,5 µM	0,835* ± 0,062	0,929* ± 0,064	79	75	0,590* ± 0,104	0,866* ± 0,065	70	74
15 µM	0,636* ± 0,041	0,674* ± 0,083	60	55	0,307* ± 0,077	0,380* ± 0,135	36	32
20 µM	0,490* ± 0,060	0,305* ± 0,036	46	25	0,227* ± 0,015	0,206* ± 0,005	27	17

Grupos: controle (CTR), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 50 µM), diferentes concentrações do alcaloide cheleritina (CHE: 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10; 12,5; 15 e 20 µM); 1×10^4 células HepG2/C3A ou MRC-5 por poço, incubadas por 24 e 48 h, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

3.2. CHE compromete a integridade da membrana plasmática de células HepG2/C3A e MRC-5

A integridade da membrana plasmática foi verificada, em paralelo com o teste do cometa (3 h de exposição), pelo método de exclusão com o azul de trypan e pela captação de iodeto de propídeo (24 h de exposição), por citometria de fluxo. Considerando a exclusão com azul de trypan (Figura 2), foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os tratamentos com CHE em células tumorais HepG2/C3A nas concentrações de 7,5 e 12,5 µM (viabilidade celular de 75 e 63%, respectivamente), quando comparadas ao controle (92%).

Para a linhagem não tumoral MRC-5, somente a concentração de 10 μM foi citotóxica (70%) quando comparada ao controle (92%). O agente MMS foi citotóxico para células tumorais (74%), mas não respondeu para a linhagem não tumoral (89%).

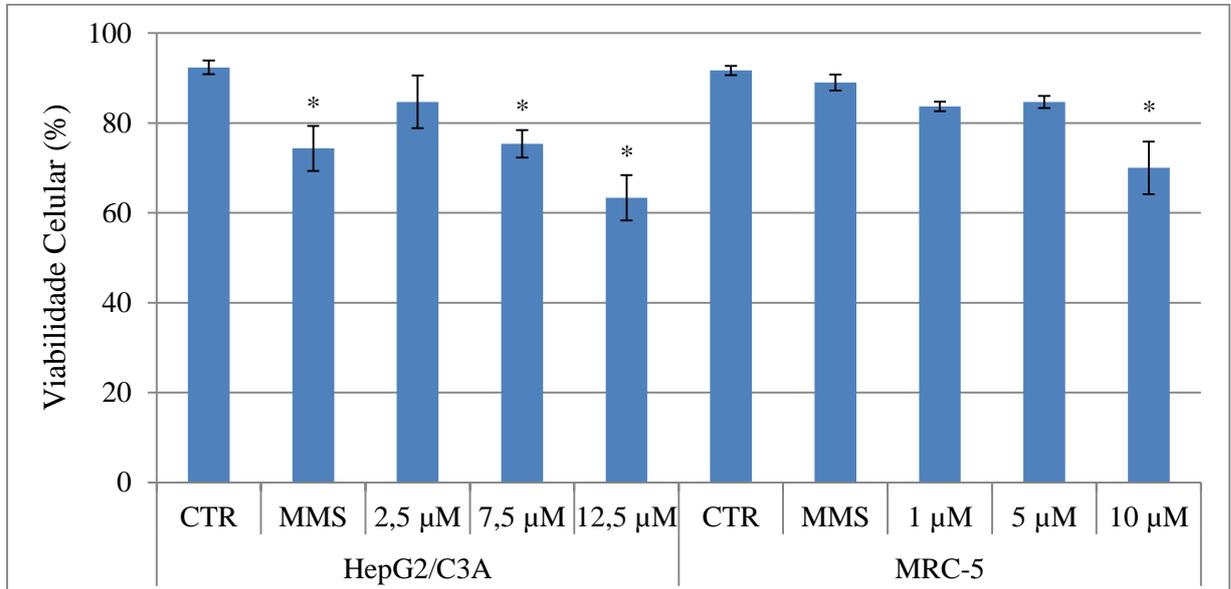


Figura 2: Viabilidade celular média e desvio padrão de células HepG2/C3A e MRC-5, tratadas com o alcaloide cheleritrina, por 3 h. Grupos: controle (CTR), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 75 μM), diferentes concentrações do alcaloide cheleritrina (CHE – HepG2/C3A: 2,5, 7,5 e 12,5 μM ; MRC-5: 1, 5 e 10 μM); 5×10^5 células HepG2/C3A ou MRC-5 por frasco, $n=3$.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

A eliminação do iodeto de propídeo captado só acontece nas células vivas, enquanto que aquelas que sofreram algum tipo de lesão de membrana durante o tratamento, permanecem coradas. A análise por citometria de fluxo (Figura 3) revelou que a CHE foi citotóxica na concentração de 12,5 μM (83%) para células tumorais, quando comparadas ao CTR (91%). Para as células não tumorais, as concentrações de 1 e 10 μM não apresentaram atividade citotóxica, com viabilidade igual a do CTR (97%), após 24 h de exposição. O agente citotóxico CPT (4 μM) respondeu positivamente para a linhagem celular tumoral, reduzindo a viabilidade celular para 41%, mas não comprometeu a integridade da linhagem não tumoral (96%).

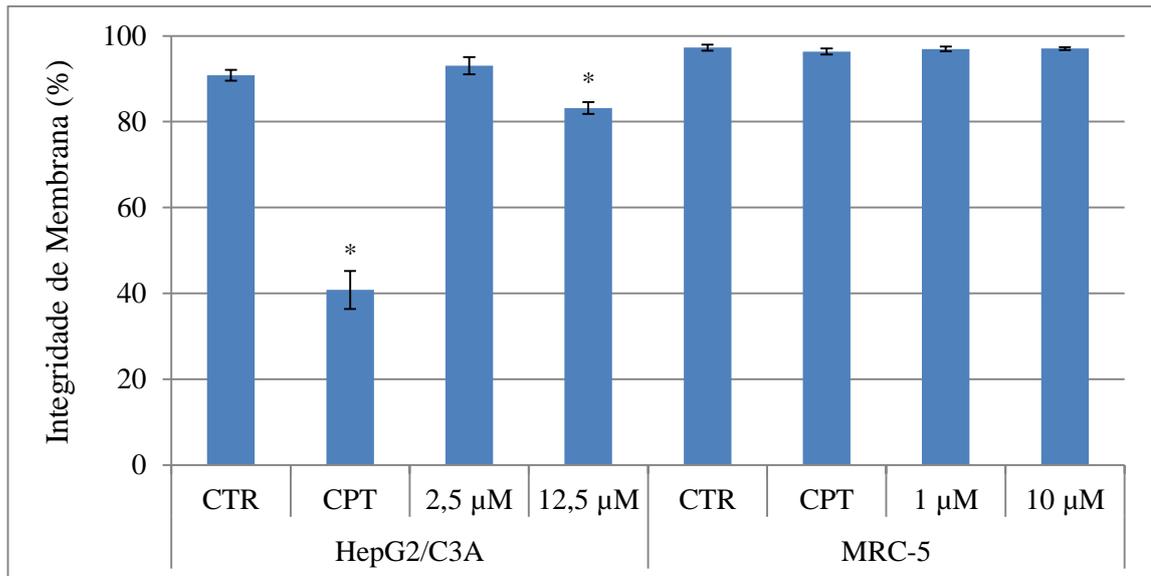


Figura 3: Integridade da membrana plasmática média e desvio padrão de células HepG2/C3A e MRC-5, tratadas com o alcaloide chelitrina, por 24 h. Grupos: controle (CTR), agente citotóxico camptotecina (CPT 4 µM), diferentes concentrações do alcaloide chelitrina (CHE – HepG2/C3A: 2,5 e 12,5 µM; MRC-5: 1 e 10 µM); 2×10^5 células HepG2/C3A ou MRC-5 por poço, $n=3$.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

3.3. CHE induz danos ao DNA preferencialmente em células não tumorais

O teste do cometa foi realizado para verificar o potencial genotóxico da CHE em células tumorais e não tumorais humanas (Tabela 2). A análise do índice de danos (ID) revelou atividade genotóxica, estatisticamente significativa, para a concentração de 12,5 µM, na linhagem HepG2/C3A (ID=35), bem como para as concentrações de 5 e 10 µM, na linhagem MRC-5 (ID=60 e 97, respectivamente). O tratamento com o agente genotóxico MMS (75 µM) também resultou em um aumento significativo de danos (ID=106 e 80, para células tumorais e não tumorais, respectivamente), quando comparados ao controle (ID=10 e 18, respectivamente).

Tabela 2: Classes de cometas, índice de danos (ID) e desvio padrão (DP) de células HepG2/C3A e MRC-5, tratadas com o alcaloide chelitrina, por 3 h.

Linhagem celular	Grupos	Classes de Cometa \pm DP				ID \pm DP
		0	1	2	3	
HepG2/C3A	CTR	90,33	9,33	0,33	0,00	10,00
		$\pm 5,03$	$\pm 4,51$	$\pm 0,58$	$\pm 0,00$	$\pm 5,57$
	MMS	1,67	92,00	5,33	1,00	105,67*
		$\pm 0,58$	$\pm 2,65$	$\pm 2,08$	$\pm 0,00$	$\pm 1,53$
	2,5 μ M	72,00	26,00	2,00	0,00	30,00
		$\pm 3,46$	$\pm 2,65$	$\pm 2,65$	$\pm 0,00$	$\pm 5,57$
7,5 μ M	77,00	19,67	3,33	0,00	26,33	
	$\pm 2,65$	$\pm 2,08$	$\pm 2,52$	$\pm 0,00$	$\pm 4,73$	
12,5 μ M	71,67	23,00	4,33	1,00	34,67*	
	$\pm 6,51$	$\pm 10,15$	$\pm 5,77$	$\pm 1,73$	$\pm 11,06$	
MRC-5	CTR	84,00	14,00	2,00	0,00	18,00
		$\pm 7,00$	$\pm 6,56$	$\pm 1,00$	$\pm 0,00$	$\pm 7,55$
	MMS	29,33	61,33	9,00	0,33	80,33*
		$\pm 16,07$	$\pm 12,74$	$\pm 4,58$	$\pm 0,58$	$\pm 19,86$
	1 μ M	72,33	16,77	9,33	1,67	40,33
		$\pm 11,15$	$\pm 6,03$	$\pm 4,62$	$\pm 2,08$	$\pm 18,50$
5 μ M	61,67	22,67	9,33	6,33	60,33*	
	$\pm 8,50$	$\pm 6,43$	$\pm 3,06$	$\pm 1,53$	$\pm 10,97$	
10 μ M	29,67	47,33	19,67	3,33	96,67*	
	$\pm 3,21$	$\pm 9,29$	$\pm 6,66$	$\pm 5,77$	$\pm 21,13$	

Grupos: controle (CTR), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 75 μ M), diferentes concentrações do alcaloide chelitrina (CHE – HepG2/C3A: 2,5, 7,5 e 12,5 μ M; MRC-5: 1, 5 e 10 μ M); 5×10^5 células HepG2/C3A e MRC-5 por frasco, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

3.4. CHE não interfere no ciclo celular de células tumorais e não tumorais

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo foi realizada para verificar possíveis atrasos no ciclo celular, induzidos pela CHE (Figura 4). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de 2,5 μ M (sub-G1=1,3%, G1=49,1%, S=18%, G2/M=31,6%) e 12,5 μ M (sub-G1=1,3%, G1=60%, S=12%, G2/M=26,4%) para as células tumorais, quando comparadas ao CTR (sub-G1=0,9%, G1=51,7%, S=20,3%, G2/M=27,1%). A CHE também não alterou o ciclo das células não tumorais (1 μ M: sub-G1=0,5%, G1=62,9%, S=23,3%, G2/M=13,3%; e 10 μ M: sub-G1=1,9%, G1=60,9%, S=21,6%, G2/M=15,4%), quando comparadas ao CTR (sub-G1=0,8%, G1=62,1%, S=21,4%, G2/M=15,6%). O tratamento com a CPT induziu uma população estatisticamente significativa de células em sub-G1 para a linhagem tumoral (sub-G1=14,7%, G1=48,2%, S=14,2%,

G2/M=22,8%), mas não houve resposta para a linhagem não tumoral (sub-G1=1,3%, G1=63,3%, S=23,5%, G2/M=11,6%).

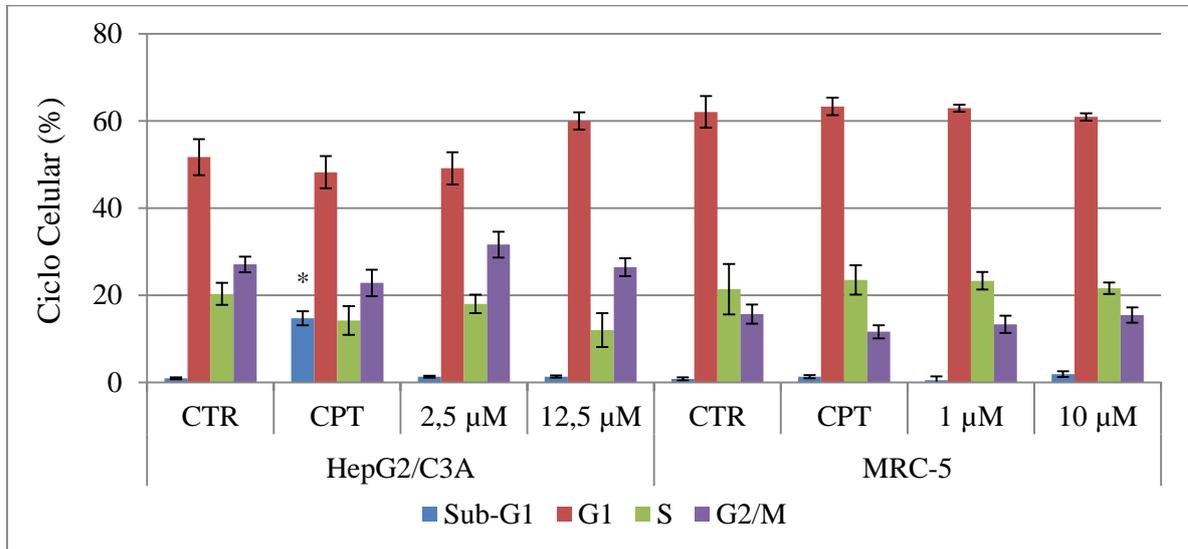


Figura 4: Percentual médio e desvio padrão de células HepG2/C3A e MRC-5 em diferentes etapas do ciclo celular, tratadas com o alcaloide chelitrina, por 24 h. Grupos: controle (CTR), agente citotóxico camptotecina (CPT 4 μM), diferentes concentrações do alcaloide chelitrina (CHE – HepG2/C3A: 2,5 e 12,5 μM; MRC-5: 1 e 10 μM); 2x10⁵ células HepG2/C3A ou MRC-5 por poço, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR (p<0,05).

3.5. CHE induz apoptose em células não tumorais

A análise da indução de apoptose pelo teste da anexina V, em citometria de fluxo, mostrou que a CHE na concentração de 12,5 μM foi capaz de induzir apoptose em células tumorais HepG2/C3A, reduzindo significativamente o número de células viáveis (de 90 para 82%), e aumentando o número de células em apoptose inicial (de 9 para 16%), quando comparada ao CTR. Da mesma forma, na linhagem não tumoral MRC-5, a concentração de 10 μM reduziu significativamente o número de células viáveis (de 84% para 64%) e aumentou o número de células em apoptose inicial (de 11 para 29%). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os percentuais de células em apoptose tardia ou necrose em nenhum dos casos. O agente indutor de apoptose CPT respondeu positivamente para a linhagem tumoral, reduzindo o percentual de células viáveis de 90% para 26%, e aumentando o número de células em apoptose inicial de 9 para 71%. Já a CPT não respondeu significativamente para a linhagem não tumoral.

Tabela 3: Percentual médio e desvio padrão de células HepG2/C3A e MRC-5 viáveis, em apoptose inicial, em apoptose tardia ou necróticas, tratadas com o alcaloide cheleritrina, por 24 h.

Linagem celular	Grupos	Células viáveis (A)	Apoptose inicial (B)	Apoptose tardia (C)	Total de células apoptóticas (B+C)	Células necróticas (D)
HepG2/C3A	CTR	89,5 ± 1,7	8,5 ± 1,6	1,7 ± 0,4	10,3 ± 2,0	0,2 ± 0,1
	CPT	26,4 ± 1,2*	71,3 ± 0,9*	2,2 ± 0,3	73,5 ± 1,2*	0,1 ± 0,1
	2,5 µM	92 ± 3,4	6,6 ± 2,9	1,3 ± 0,5	7,9 ± 3,4	0,2 ± 0,1
	12,5 µM	82,2 ± 2,5*	15,8 ± 2,4*	1,9 ± 0,2	17,7 ± 2,6*	0,1 ± 0,0
MRC-5	CTR	84,0 ± 1,4	11,3 ± 1,6	1,4 ± 0,5	12,7 ± 2,1	3,4 ± 0,9
	CPT	75,4 ± 3,8	17,5 ± 4,4	2,5 ± 0,4	20,0 ± 4,8	4,6 ± 1,1
	1 µM	80,4 ± 2,7	14,8 ± 1,8	1,4 ± 0,5	16,2 ± 2,3	3,4 ± 0,6
	10 µM	64,4 ± 3,7*	29,4 ± 3,5*	2,3 ± 0,6	31,7 ± 4,1*	3,7 ± 0,3

Grupos: controle (CTR), agente citotóxico camptotecina (CPT 4 µM), diferentes concentrações do alcaloide cheleritrina (CHE – HepG2/C3A: 2,5 e 12,5 µM; MRC-5: 1 e 10 µM); 2x10⁵ células HepG2/C3A ou MRC-5 por poço, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR (p<0,05).

4. Discussão

No presente estudo, o teste de citotoxicidade do MTT, que avalia a atividade de enzimas mitocondriais, e, conseqüentemente, a viabilidade celular, mostrou que a CHE exerce citotoxicidade em função do tempo e concentração avaliados. Enquanto a linhagem tumoral tolerou concentrações da ordem de 0,1 a 2,5 µM, sem redução significativa da viabilidade celular, a linhagem não tumoral teve sua viabilidade significativamente comprometida após 48 h de exposição, em todas as concentrações avaliadas, mesmo sendo mais resistente nas primeiras 24 h do tratamento nas concentrações abaixo de 10 µM. A CHE também apresentou um efeito dose-resposta para a linhagem tumoral (a partir de 7,5 µM) e não tumoral (a partir de 5 µM), reduzindo significativamente a viabilidade celular com o aumento da concentração. A biotransformação da CHE em metabólitos mais hidrossolúveis e menos tóxicos, realizada principalmente pelas enzimas de fase I e II, expressas significativamente por células HepG2/C3A e em nível basal pela linhagem MRC-5, não contribuiu para a redução da citotoxicidade exercida pelo alcaloide. Da mesma forma, Vacek et al. (2013) identificaram que a CHE (10 µM) é citotóxica em cultura primária de hepatócitos humanos, reduzindo significativamente a viabilidade celular, mas que seus metabólitos mais abundantes (dihidrocheleritrina e sua forma desmetilada) não apresentam efeito citotóxico significativo (0,39-50 µM), pelo teste do MTT.

Corroboram ainda com os presentes resultados os trabalhos de Maliková et al. (2006b), que também encontraram atividade citotóxica da CHE para diferentes linhagens tumorais de próstata; Hammerová et al. (2011), em diferentes linhagens de melanoma maligno; Zhang et al. (2011), em células de hepatoma humano; Zhang et al. (2012), em células tumorais de estômago; Kumar et al. (2013) e Kumar e Acharya (2014), em células de linfoma de Dalton, todos pelo teste do MTT. De acordo com estes autores, a citotoxicidade da CHE está normalmente relacionada com a perda de potencial de membrana da mitocôndria, e conseqüente liberação de citocromo *c*, além da formação de espécies reativas de oxigênio. Barreto et al. (2003) identificaram que a CHE inibe diretamente a enzima succinato desidrogenase, comprometendo a atividade mitocondrial em camundongos. Estes mecanismos, com ação isolada ou conjunta, podem ter contribuído para a citotoxicidade dose-dependente da CHE observada tanto em células tumorais quanto não tumorais humanas (a partir das concentrações de 10 e 7,5 μM , respectivamente), investigadas no presente trabalho.

A verificação da integridade da membrana plasmática confirmou a citotoxicidade observada para as maiores concentrações avaliadas no teste do MTT. A exclusão pelo método do azul de trypan (3 h de exposição ao alcaloide) indicou citotoxicidade em células tumorais (7,5 e 12,5 μM) e não tumorais (10 μM), com viabilidade celular inferior a 80%. Vacek et al. (2013) também observaram uma redução de 25% na viabilidade de hepatócitos, e Kaminsky et al. (2008), mais de 90% em células leucêmicas humanas tratadas com CHE, por 24 h, pelo mesmo teste. O ensaio de captação de iodeto de propídeo, analisado por citometria de fluxo, também indicou que a concentração de 12,5 μM de CHE, para a linhagem tumoral, reduziu significativamente a viabilidade celular comparada ao CTR, apesar do valor da viabilidade ter sido superior a 80%. Desta forma, o percentual de integridade da membrana plasmática foi maior que 80% em todos os tratamentos, o que motivou a investigação do potencial genotóxico do alcaloide pelo teste do cometa.

Os tratamentos com CPT ou CHE não comprometeram a integridade da membrana plasmática da linhagem MRC-5, o que poderia sugerir uma ausência de resposta na análise por citometria. Para mostrar que a linhagem realmente não foi afetada pelo tratamento, a mesma suspensão celular analisada foi submetida à lesão mecânica (agitação em vórtex por 5 s), o que comprovou uma redução significativa da viabilidade (42%) e boa responsividade do teste com o iodeto de propídeo (dados não inclusos nos resultados). Kaminsky et al. (2008) também utilizaram esta ferramenta para análise da toxicidade da CHE, observando uma redução significativa na viabilidade de células de leucemia humana tratadas com o alcaloide (10 μM =70%, aproximadamente), após 12 h de exposição.

No que diz respeito ao potencial genotóxico do alcaloide, a análise dos dados indicou que a CHE induziu danos ao DNA na maior concentração avaliada (12,5 μM) para a linhagem tumoral, e de maneira dose-dependente para todas as concentrações avaliadas (1 a 10 μM), para as células não tumorais. Além disso, a linhagem não tumoral se mostrou mais sensível ao tratamento com o alcaloide, enquanto que a linhagem tumoral foi mais resistente ao efeito genotóxico. Corroboram com nossos resultados o trabalho de Malíková et al. (2006b), que mostraram que células tumorais de próstata são mais resistentes ao alcaloide (até 30 μM), enquanto concentrações maiores que 2 μM apresentam efeito genotóxico para fibroblastos normais. Suportam ainda estes resultados os trabalhos de Kaminsky et al. (2008), que identificaram o efeito genotóxico da CHE em células de leucemia humana; Zhang et al. (2011), em hepatócitos; Zhang et al. (2012), em células tumorais de estômago; e Kumar et al. (2013), em linfoma humano. Entretanto, Kosina et al. (2004) e Stiborova et al. (2008) não encontraram danos ao DNA em linfócitos e hepatócitos de ratos Wistar, alimentados com ração suplementada com CHE, também pelo teste do cometa.

A fragmentação do DNA evidenciada pelo teste do cometa pode estar relacionada com a interação direta do alcaloide CHE com a molécula de DNA. Stiborová et al. (2002) e Li et al. (2012) demonstraram por diferentes técnicas que a CHE atua como um agente intercalante ou até mesmo como um grampo que se liga fortemente ao DNA celular, o que pode favorecer quebras de fita dupla durante o processo de replicação, explicando, por exemplo, o aparecimento de fragmentos de DNA nas caudas dos cometas.

Assim, é possível que a citotoxicidade e a genotoxicidade induzidas pela CHE estejam relacionadas também com o percentual de apoptose observado no teste com anexina V. Verificou-se que as mesmas concentrações citotóxicas/genotóxicas de CHE (HepG2/C3A: 12,5 μM ; MRC-5: 10 μM) induziram significativamente um maior número de células em apoptose inicial em ambas as linhagens celulares. Os efeitos apoptóticos deste alcaloide foram confirmados por Wan et al. (2007), em fibroblastos murinos; Yang et al. (2008), em osteossarcoma; Zhang et al. (2011), em hepatoma; Kumar et al. (2013) e Kumar e Acharya (2014), em linfoma de Dalton. Os mecanismos de indução de apoptose descritos pelos autores foram relacionados à formação de espécies reativas de oxigênio, ativação de caspases, despolarização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo *c* e regulação de proteínas pró- e anti-apoptóticas.

Apesar dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e apoptóticos exercidos pela CHE em células HepG2/C3A e MRC-5, a análise do ciclo celular não revelou atrasos significativos na progressão da divisão destas células, diferentemente do que foi observado no trabalho de Zhang

et al. (2011), onde a CHE induziu um acúmulo significativo de células de hepatoma humano (SMMC-7721) na fase S e um aumento na população de sub-G1, em decorrência da apoptose. Foi demonstrado também que as atividades da CHE são específicas para cada tipo celular, e que a CHE pode induzir respostas diferentes *in vitro*, sugerindo que os mecanismos moleculares de indução de toxicidade e apoptose dependem da linhagem celular avaliada (Malikova et al., 2006a; Vrba et al., 2008).

Os resultados aqui apresentados mostraram que o alcaloide chelitrina apresenta ação: citotóxica, reduzindo a viabilidade celular pela indução de danos em nível mitocondrial e sobre a membrana plasmática das células; genotóxica, causando fragmentação do DNA; e apoptótica, pela exposição de fosfatidilserina na superfície de células tumorais (HepG2/C3A) e não tumorais (MRC-5) humanas, mas sem provocar atrasos no ciclo celular. Além disso, foi observado que os sistemas-teste celulares são eficientes para o estudo da citotoxicidade e genotoxicidade induzida, *in vitro*, podendo ser utilizados em estudos comparativos, atingindo os objetivos propostos neste trabalho. Apesar da linhagem não tumoral MRC-5, de modo geral, ter se mostrado mais sensível ao tratamento com o alcaloide, a CHE ainda possui efeitos significativos reduzindo a viabilidade, induzindo a fragmentação do DNA e a apoptose na linhagem tumoral HepG2/C3A, dando margem para a continuidade deste estudo, e identificação dos mecanismos de ação desta substância com potencial para o combate ao câncer.

5. Referências

- Barreto MC, Pinto RE, Arrabaça JD, Pavão ML (2003) Inhibition of mouse liver respiration by *Chelidonium majus* isoquinoline alkaloids. *Toxicol Let* **146**: 37–47
- Dvorak Z, Sovadinová I, Bláha L, Giesy, JP, Ulrichova J (2006) Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine do not affect transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor: Analyses in rat hepatoma cell line H4IIE.luc. *Food and Chem Toxicol* **44**: 1466–1473
- Funakoshi T, Aki T, Nakayama H, Watanuki Y, Imori S, Uemura K (2011) Reactive oxygen species-independent rapid initiation of mitochondrial apoptotic pathway by chelerythrine. *Toxico in Vitro* **25**: 1581–1587
- Hammerová J, Uldrijan S, Táborská E, Slaninová I (2011) Benzo[c]phenanthridine alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status. *J Dermatol Sci* **62**: 22-35
- Kaminsky VO, Lin KW, Filyak Y, Stoika R (2008) Differential effect of sanguinarine, chelerythrine and chelidonine on DNA damage and cell viability in primary mouse spleen cells and mouse leukemic cells. *Cell Bio Inter* **32**: 271-277
- Kosina P, Walterová D, Ulrichová J, Lichnovsky V, Stiborová M, Rydlov H, Vicar J, Krecman V, Brabec MJ, Simánek V (2004) Sanguinarine and chelerythrine: assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment. *Food Chem Toxicol* **42**: 85–91
- Kroymann J (2011) Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. *Cur Op Plant Bio* **14**: 246–251

- Kumar S, Acharya, A (2014) Chelerythrine induces reactive oxygen species-dependent mitochondrial apoptotic pathway in a murine T cell lymphoma. *Tumor Bio* **35**: 129–140
- Kumar S, Deepak P, Kumar S, Gautam PK, Acharya A (2013) A benzophenanthridine alkaloid, chelerythrine induces apoptosis *in vitro* in a Dalton's lymphoma. *J Cancer Res Ther*, **9**: 693–700
- Li JF, Li BH, Wu YB, Shuang S, Dong C, Choi MM (2012) Luminescence and binding properties of two isoquinoline alkaloids chelerythrine and sanguinarine with ctDNA. *Spectrochimica Acta Part A: Mol Biomol Spectro* **95**: 80–85
- Malikova J, Zdarilova A, Hlobilkova A (2006a) Effects of sanguinarine and chelerythrine on the cell cycle and apoptosis. *Biomed P Med Fac, Universitatis Palacky Olomouc Czech Republic* **150**: 5–12
- Malíková J, Zdarilová A, Hlobilková A, Ulrichová J (2006b) The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine. *Cell Bio Toxicol* **22**: 439–453
- Matkar SS, Wrischnik LA, Hellmann-Blumberg U (2008) Production of hydrogen peroxide and redox cycling can explain how sanguinarine and chelerythrine induce rapid apoptosis. *Arch Biochem Biophys* **477**: 43–52
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* **65**: 55–63
- Stiborová M, Simánek V, Frei E, Hobza P, Ulrichová J (2002) DNA adduct formation from quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine as revealed by the ³²P-postlabeling technique. *Chem Bio Inter* **140**: 231–242
- Stiborova M, Vostalova J, Zdarilova A, Ulrichova J, Hudecek J, Tschirner K, Simanek V (2008) Macleaya cordata extract and sangrovit® genotoxicity: assessment *in vivo*. *Biomed P Med Fac, Universitatis Palacky Olomouc Czech Republic* **152**: 35–39
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki F (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Env Mol Mut* **35**: 206–221
- Vacek J, Papousková B, Kosina P, Galandáková A, Ulrichová J (2013) Mass spectrometric investigation of chelerythrine and dihydrochelerythrine biotransformation patterns in human hepatocytes. *J Chrom B* **941**: 17–24
- Vogler M, Weber K, Dinsdale D, Schmitz I, Schulze-Osthoff K, Dyer MJS, Cohen GM (2009) Different forms of cell death induced by putative BCL2 inhibitors. *Cell Death Dif* **16**: 1030–1039
- Vrba J, Dolezel P, Vicar J, Modriansky M, Ulrichova J (2008) Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells. *Toxicol in Vitro* **22**: 1008–1017
- Wan KF, Chan SL, Sukumaran SK, Lee MC, Yu VC (2008) Chelerythrine induces apoptosis through a Bax/Bak-independent mitochondrial mechanism. *J Bio Chem* **283**: 8423–8433
- Yang R, Piperdi S, Gorlick R (2008) Activation of the RAF/mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase pathway mediates apoptosis induced by chelerythrine in osteosarcoma. *Clin Cancer Res* **14**: 6396–6404
- Zdarilova A, Vrublova E, Vostalova J, Klejdus B, Stejskal D, Proskova J, Kosina P, Svobodova A, Vecera R, HRBAC J, Cernochova D, Vicar J, Ulrichova J, Simanek V (2008) Natural feed additive of Macleaya cordata: Safety assessment in rats a 90-day feeding experiment. *Food Chem Toxicol* **46**: 3721–3726
- Zhang Z, Guo Y, Zhang L, Zhang J, Wei X (2012) Chelerythrine chloride from *Macleaya cordata* induces growth inhibition and apoptosis in human gastric cancer BGC-823 cells. *Acta Pharm Sin B* **2**: 464–471

Zhang ZF, Guo Y, Zhang JB, Wei XH (2001) Induction of apoptosis by chelerythrine chloride through mitochondrial pathway and Bcl-2 family proteins in human hepatoma SMMC-7721 cell. *Arch Pharm Res* **34**: 791-800

CAPÍTULO 4

4.1. Artigo 3

Diferentes efeitos citotóxicos, genotóxicos e sobre o ciclo celular, dos alcaloides sanguinarina e cheleritrina, em células MCF-7

Artigo formatado segundo as normas da revista
British Journal of Cancer.

Diferentes efeitos citotóxicos, genotóxicos e sobre o ciclo celular, dos alcaloides sanguinarina e chelitrina, em células MCF-7

Igor Vivian de Almeida, Veronica Elisa Pimenta Vicentini.

Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

* **Autor Correspondente:** Igor Vivian de Almeida. Departamento de Biotecnologia, Genética e Biologia Celular - Universidade Estadual de Maringá. Avenida Colombo 5790, Bloco H67 (11), Jardim Universitário, CEP: 87020-900 - Maringá - Paraná - Brasil. Telefones: +55-44-3011-4342; +55-44-3011-4687. Fax: +55-44-3011-4893. e-mail: igoralmeida.bio@gmail.com

Resumo

O câncer de mama é um crescente problema de saúde pública. Por ser bastante agressivo e altamente resistente às terapias convencionais, esta doença está relacionada com uma elevada taxa de mortalidade ao redor do mundo. Sanguinarina (SAN) e Chelitrina (CHE) são dois alcaloides de plantas extraídos de *Sanguinaria canadensis*, *Chelidonium majus* e *Macleaya cordata*, que vêm sendo muito estudados por suas propriedades citotóxicas, genotóxicas, antiproliferativas e apoptóticas. O presente trabalho objetivou avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e influência sobre o ciclo de divisão celular, em células tumorais de adenocarcinoma de mama humano. Foi observado que a SAN é citotóxica para células MCF-7 a partir da concentração de 7,5 μM , em ambos os tempos avaliados (24 e 48 h), reduzindo efetivamente a viabilidade celular (menor que 80%) a partir da concentração de 10 μM , em 24 h, e 7,5 μM , em 48 h, pelo teste do MTT. A CHE, por sua vez, foi citotóxica nas concentrações de 10 e 20 μM (48 h), mas não comprometeu a viabilidade celular. A análise da integridade da membrana plasmática mostrou que ambos alcaloides não interferiram na viabilidade celular, pelos testes do azul de trypan e captação de iodeto de propídeo, uma vez que a viabilidade celular manteve-se elevada ($\geq 80\%$). A análise do teste do cometa indicou que a SAN foi genotóxica para as células tumorais, com um aumento significativo de dano classe 1, na concentração de 10 μM , enquanto que nenhuma das concentrações avaliadas do alcaloide CHE (1 a 20 μM) foi genotóxica. A análise do ciclo celular não indicou atrasos causados pelos dois alcaloides, mas 10 μM de SAN induziu uma população de células MCF-7 em sub-G1, em decorrência de um percentual significativamente maior de células apoptóticas ou necróticas. Assim, os resultados de citotoxicidade, genotoxicidade e monitoramento do ciclo celular apresentados no presente trabalho sugerem que o alcaloide quaternário benzo[c]fenantridina SAN, quando comparado à CHE, apresenta maior potencial para o desenvolvimento de novas terapias de combate ao câncer de mama.

Palavras-chave: alcaloides benzo[c]fenantridinas, apoptose, câncer de mama, viabilidade celular.

1. Introdução

Câncer é a designação dada ao conjunto de manifestações patológicas caracterizadas pela perda do controle da proliferação celular e do ganho da capacidade de invasão de outros tecidos. A progressão para o tumor maligno é governada por alterações essenciais na fisiologia celular, como auto-suficiência nos sinais de fatores de crescimento; insensibilidade à fatores inibitórios de crescimento; instabilidade genômica; evasão da apoptose; potencial replicativo ilimitado; invasão tecidual e metástase (Sarasin, 2003; Hanahan; Weinberg, 2011).

O câncer de mama emerge como um problema de saúde pública cada vez mais preocupante em todo o mundo, devido ao crescente aumento nas taxas de incidência e mortalidade associadas a esta desordem. A cada ano, 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde, estima-se que ocorram, por ano, mais de 1.050.000 casos novos de câncer de mama em todo o mundo (INCA, 2015, Park et al., 2014). Apesar do advento de novas drogas, existe ainda um número muito significativo de mulheres que morrem de câncer de mama, acompanhado pela progressão em metástases. Apesar da doxorrubicina e o paclitaxel serem geralmente, considerados como os medicamentos mais ativos contra o câncer de mama avançado, estes tratamentos são frequentemente descontinuados devido à toxicidade intolerável e/ou desenvolvimento de resistência à droga (Kim et al., 2008).

Sabe-se que cerca de 60% dos agentes utilizados como drogas para o tratamento do câncer são substâncias de origem natural. Além disso, diversos estudos mostraram que um grupo de moléculas em especial, apresenta considerável atividade antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, citotóxica e antiproliferativa: os alcaloides quaternários benzo[c]fenantridinas (QBAs), que ocorrem em muitas espécies de plantas das famílias Papaveraceae (*Sanguinaria canadensis*, *Chelidonium majus*, *Macleaya cordata*, entre outras), Fumariaceae, Ranunculaceae e Rutaceae (Kosina et al., 2004; Hammerová et al., 2011; Slaninová et al., 2014).

Os alcaloides sanguinarina (SAN – 13-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]-1,3-dioxolo[4,5-i]phenanthridinium) e cheleritina (CHE – 1,2-dimethoxy-N-methyl[1,3]benzodioxolo[5,6-c]phenanthridinium) são os dois principais QBAs mais estudados devido ao seu elevado potencial quimioterapêutico (Fig. 1). Recentemente, diversos estudos têm focado nos efeitos destas substâncias na terapia do câncer. SAN e CHE podem interagir diretamente com a molécula de DNA e apresentam atividade citotóxica, antiproliferativa, genotóxica e apoptótica para diferentes linhagens celulares (Ahmad et al.,

2000; Ansari et al., 2006; Kaminsky et al., 2008; Hammerová et al., 2011; Tsukamoto et al., 2011; Kumar et al., 2015).

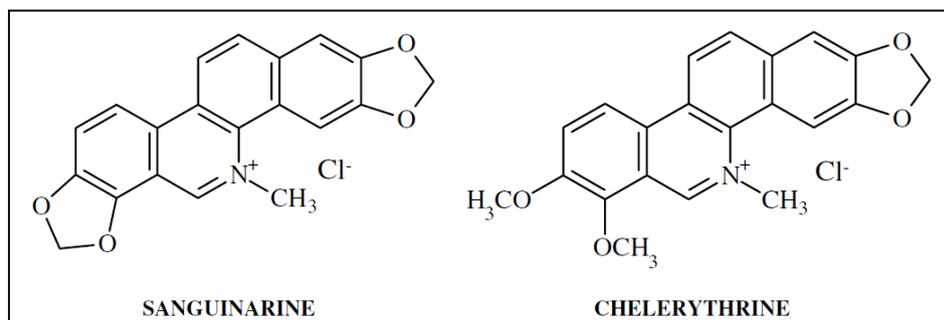


Figura 1 - Apresentação comercial das moléculas de sanguinarina e chelerritrina (Fonte: Dvorak et al., 2006).

Han et al. (2013) verificaram que a SAN é citotóxica e induz a apoptose por atrasos no ciclo celular e exposição de fosfatidilserina, em diferentes linhagens tumorais de bexiga. Os autores ainda constataram um aumento na expressão de genes pró-apoptóticos, caspases-8, -9 e -3, e maior produção de espécies reativas de oxigênio, evidenciando o potencial quimioterapêutico desta substância. Choi et al. (2009) demonstraram que concentrações subtóxicas de SAN (menores que 1 μ M) são eficientes em sensibilizar células de adenocarcinoma humano para o tratamento com ligantes indutores de apoptose relacionados à fatores de necrose tumoral, indicando uma ação adjuvante desta substância ao tratamento quimioterapêutico convencional do câncer de mama.

Zhang et al. (2011) verificaram que a CHE reduz significativamente a viabilidade de células de hepatoma humano, além de induzir atraso no ciclo celular em S, fragmentação de DNA e apoptose, por despolarização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo *c*, ativação de caspases-3 e redução nos níveis de proteínas antiapoptóticas. Igualmente, Funakoshi et al. (2011) mostraram que a CHE induz rapidamente a apoptose em cardiomiócitos, até 8 minutos após a exposição ao alcaloide. A atividade proteolítica das caspases-9 e -3, mediadoras cruciais da via de apoptose mitocondrial, foi observada após 6 minutos de exposição das células ao alcaloide.

Assim, considerando os alcaloides SAN e CHE como candidatos para a terapia do câncer de mama, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de investigar seus efeitos citotóxicos, genotóxicos e sobre a progressão do ciclo celular, em células tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7), *in vitro*.

2. Materiais e Métodos

2.1. Agentes químicos

Sanguinarina (SAN – *sanguinarine chloride hydrate*, 98%) e chelerytrina (CHE – *chelerytrine chloride*, 95%) foram adquiridas da Sigma (St. Louis, MO, EUA) e diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) para o preparo de uma solução estoque, e posteriormente diluídas em meio de cultura completo no momento do uso, em diferentes concentrações. A concentração final de DMSO nas culturas celulares não ultrapassou 0,01% e testes prévios não indicaram qualquer indício de toxicidade. DMSO (99,7%), metil metanossulfonato (MMS – 99%), camptotecina (CPT – 90%), RNase A e iodeto de propídeo (94%) também foram adquiridos da Sigma. Azul de trypan (0,4% Cat. N°. 15250-061), *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM – Cat. N°. 12800-017), soro bovino fetal (SBF Cat. N°. 12657-029), *Antibiotic/Antimycotic* (Cat. N°. 15240-062) e MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium bromide] (98% Cat. N°. M-6494) foram adquiridos da Gibco® Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA).

2.2. Culturas celulares

A linhagem celular de adenocarcinoma de mama MCF-7 (Cat. N°. 0162) foi obtida junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro, livres de contaminação por micoplasma. A linhagem foi cultivada em frascos de cultura de 25cm² (TPP) contendo meio de cultura completo (DMEM suplementado com 10% de SBF e 1 mL/L de solução antibiótica/antimicótica), e mantida em incubadora de CO₂ (5%), com umidade de 95%, à 37°C. Nestas condições, o ciclo celular é de aproximadamente 24 horas. Para os experimentos foram utilizadas células em fase de crescimento logarítmico.

2.3. Teste de citotoxicidade – MTT

Para o teste de citotoxicidade foi realizado o ensaio do MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-il)-2,5-dipheniltetrazolium bromide], de acordo com o protocolo sugerido por Mosmann (1983), com modificações. Foram utilizadas placas de cultura celular de 96 poços, onde em cada poço foram semeadas 1×10^4 células MCF-7, com exceção dos poços controle sem células (branco). Após estabilização, o meio de cultura foi descartado e adicionou-se 100 µL de meio completo nos grupos: controle (CTR) e tratamentos: agente citotóxico (MMS 50 µM), SAN ou CHE (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0 e 20,0 µM). Após 24 ou 48 h de incubação, o meio de cultura foi substituído por 100 µL de meio de cultura, acrescido de MTT (0,2 mg/mL). A placa foi incubada por mais 4 h antes do descarte do meio contendo MTT, seguido da adição de 100

μL de DMSO, para solubilização dos cristais de formazan. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (Labtech) a 550nm. A viabilidade celular foi estimada com base na absorbância do controle ($Ab_{\text{tratamento}}/Ab_{\text{controle}} \times 100$). Os experimentos foram realizados em triplicata, em duas repetições técnicas.

2.4. Análise da viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de trypan

A análise da viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de trypan foi realizada em paralelo com o teste do cometa (ver subitem *Teste do cometa*). Após a colheita das células, 20 μL de suspensão celular foram misturados com igual volume de azul de trypan 0,2%, depositados sobre uma lâmina, coberta com lamínula, e analisada ao microscópio de luz. Foram contabilizadas 100 células por amostra, diferenciando células viáveis (citoplasma translúcido e membrana refringente) de não viáveis (citoplasma corado em azul). Somente os tratamentos com viabilidade superior a 80% foram considerados.

2.5. Análise da viabilidade celular por citometria de fluxo

Neste teste, foram semeadas 2×10^5 células em microplacas de 6 poços. Após 24 h de estabilização, as células receberam meio de cultura completo (CTR), agente citotóxico (CPT 4 μM), SAN (1 e 10 μM) ou CHE (1 e 20 μM). Após 24 h de exposição, as células foram colhidas e ressuspensas em 200 μL de PBS, ao qual foi adicionado 5 μL de iodeto de propídeo (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A integridade da membrana foi verificada em nível de captação e ligação do corante com o DNA celular, usando-se o citômetro BD Accuri[®] C6 (Becton-Dickinson), sendo contabilizadas 5×10^3 células em cada caso. Foram realizados três experimentos independentes.

2.6. Ensaio do cometa

Este ensaio consiste na lise de células fixadas em gel de agarose para posterior eletroforese, com objetivo de promover a migração de fragmentos de DNA, permitindo assim, sua identificação (Tice et al., 2000). Para este ensaio foram semeadas 5×10^5 células em 5 mL de meio de cultura completo. Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio completo novo nos grupos: CTR e tratamentos: agente genotóxico (MMS 75 μM), SAN (1, 5 e 10 μM) ou CHE (1, 10 e 20 μM). Após 3 h de exposição, as células foram lavadas duas vezes com PBS, tripsinizadas (300 μL , 0,1%), centrifugadas (1250 rpm, 5 min) e ressuspensas em 0,5 mL de meio de cultura. Em um microtubo foram homogeneizados 20 μL de suspensão celular e 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão (0,5%, 37° C), depositando este material em uma lâmina pré-gelatinizada com agarose (1,5%), cobrindo com lamínula. Após 20 min, a

lamínula foi removida e procedeu-se a lise (NaCl 2,5 M, 100 EDTA mM, Tris 10 mM, pH 10; 1% Triton X-100, 10% DMSO), por 90 min. As lâminas foram depositadas em uma solução tampão alcalina de eletroforese (NaOH 10 N e EDTA 200 mM, pH 13, 20 min), antes da eletroforese (25 V, 300 mA, 20 min). Subsequentemente, as lâminas foram neutralizadas (Tris 0,4 M, pH 7,5, 15 min) e coradas com 30 µL de brometo de etídeo (2 µg/mL).

A análise foi feita em microscopia de fluorescência (filtro de excitação 420-490 nm e filtro de barreira 520 nm). A determinação dos danos foi feita por análise visual e a classificação foi dividida em quatro categorias: classe 0 – nucleoides não danificados e que não apresentam cauda; classe 1 – nucleoides com cauda menor que o diâmetro do nucleoide; classe 2 – nucleoides com cauda de tamanho entre uma e duas vezes o diâmetro do nucleoide; classe 3 – nucleoides com cauda duas vezes maior que o diâmetro do nucleoide. Células que apresentaram o nucleoide totalmente fragmentado não foram contabilizadas. No total, foram analisadas 100 células por lâmina de três experimentos independentes. O índice de danos (ID) foi baseado no comprimento da migração do DNA e calculado como segue: $ID = N_1 + (2 \times N_2) + (3 \times N_3)$, onde N_1 , N_2 e N_3 representam, respectivamente, células com classes de danos 1, 2 e 3.

2.7. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

Para analisar possíveis atrasos no ciclo celular induzidos pelos alcaloides, as células de adenocarcinoma de mama foram coradas com iodeto de propídeo e quantificadas em citometria de fluxo, de acordo com a quantidade de DNA que possuem. Neste teste, foram semeadas 2×10^5 células em microplacas de 6 poços. Após 24 h de estabilização, as células receberam meio de cultura completo (CTR), agente citotóxico (CPT 4 µM), SAN (1 e 10 µM) ou CHE (1 e 20 µM). Após 24 h de exposição, as células foram colhidas e ressuspensas em 100 µL de PBS, ao qual foi adicionado 5 µL de RNase A (2 mg/mL, 37° C, 30 min), 200 µL de lise (0,02 g de citrato de sódio, 20 µL de Triton X-100, 20 mL PBS) e 5 µL de iodeto de propídeo (50 µg/mL, no gelo, no escuro, 30 min). O conteúdo de DNA das células foi determinado usando-se o citômetro Guava EasyCyte® (Merck Millipore), sendo contabilizados 5×10^3 eventos (488 nm) em cada caso. Células em G1 tem quantidade 2C de DNA; células em G2/M tem quantidade 4C de DNA; células em S tem quantidade intermediária entre 2C e 4C, uma vez que ainda estão replicando o material genético; e células em sub-G1 são consideradas apoptóticas ou necróticas. Os histogramas foram analisados com o *software* disponibilizado pelo fabricante. Foram realizados três experimentos independentes.

2.8. Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão, submetidos à análise de variância (*one way ANOVA*), seguida do teste de Dunnett, pelo *software GrafPad® Prism 5*. As diferenças foram consideradas sendo estatisticamente significativas quando o valor de *p* foi menor que 0,05.

3. Resultados

3.1. Teste de citotoxicidade – MTT

A citotoxicidade dos QBAs SAN e CHE foi avaliada pelo teste do MTT, em células tumorais de adenocarcinoma de mama MCF-7. A tabela 1 apresenta as médias das absorbâncias e desvio padrão, bem como a viabilidade celular, estimada com base na absorbância do controle (CTR=100%). Com relação à absorbância, somente as concentrações de 7,5 a 20 μM de SAN foram citotóxicas, com efeito dose-dependente, em ambos os tempos. Apesar disso, a viabilidade celular só foi inferior a 80% para 7,5 μM (78%), no tempo de 48 h, e para as concentrações de 10 μM (73 e 63%) e 20 μM (46 e 27%), nos tempos de 24 e 48 h, respectivamente. Para o alcaloide CHE, somente as absorbâncias nas concentrações de 10 e 20 μM foram significativamente menores do que o observado para o CTR, no tempo de 48 h, ainda que a viabilidade celular tenha sido de 93 e 92%, respectivamente. O tratamento com o agente citotóxico MMS (50 μM) reduziu significativamente a viabilidade celular para 70 e 64%, respectivamente, após 24 e 48 h de exposição.

Tabela 1: Absorbância média, desvio padrão (DP) e percentual de viabilidade de células MCF-7, tratadas com o alcaloide sanguinarina ou cheleritrina, por 24 e 48 h, pelo teste do MTT.

Grupos	Sanguinarina				Cheleritrina			
	Absorbância Média ± DP		Viabilidade Celular (%)		Absorbância Média ± DP		Viabilidade Celular (%)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
CTR	0,978 ± 0,031	1,235 ± 0,094	100	100	0,978 ± 0,031	1,235 ± 0,094	100	100
MMS	0,682* ± 0,058	0,796* ± 0,056	70	64	0,682* ± 0,058	0,796* ± 0,056	70	64
0,1 µM	1,037 ± 0,042	1,292 ± 0,083	105	104	0,963 ± 0,057	1,160 ± 0,049	98	96
0,5 µM	1,044 ± 0,032	1,273 ± 0,087	105	102	0,944 ± 0,044	1,157 ± 0,032	97	96
1 µM	1,021 ± 0,044	1,277 ± 0,045	103	102	0,971 ± 0,047	1,166 ± 0,034	99	96
2,5 µM	0,986 ± 0,047	1,265 ± 0,082	100	101	0,953 ± 0,038	1,162 ± 0,046	97	96
5 µM	0,952 ± 0,027	1,158 ± 0,089	97	94	0,982 ± 0,054	1,160 ± 0,050	100	96
7,5 µM	0,861* ± 0,033	0,965* ± 0,073	88	78	0,982 ± 0,039	1,158 ± 0,041	100	96
10 µM	0,717* ± 0,046	0,783* ± 0,081	73	63	0,981 ± 0,025	1,122* ± 0,028	100	93
20 µM	0,447* ± 0,021	0,337* ± 0,075	46	27	0,948 ± 0,034	1,111* ± 0,053	97	92

Grupos: controle (CTR), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 50 µM), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina ou cheleritrina (0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10 e 20 µM); 1x10⁴ células MCF-7 por poço, incubadas por 24 e 48 h, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR (p<0,05).

3.2. Viabilidade celular em nível de integridade da membrana plasmática

A integridade da membrana plasmática foi verificada em paralelo com o teste do cometa (3 h de exposição) pelo método de exclusão com o azul de trypan e pela captação de iodeto de propídeo (24 h de exposição), por citometria de fluxo. Considerando a exclusão com azul de trypan (Figura 2), não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para os tratamentos com SAN em células tumorais MCF-7 (viabilidade celular > 88,7%), quando comparadas ao controle (91%). O alcaloide CHE apresentou efeito dose-dependente, mas somente a concentração de 20 µM foi significativamente menor que o CTR, reduzindo a viabilidade celular para 80%, sendo este considerado o percentual mínimo de viabilidade aceitável. O agente MMS foi citotóxico para células tumorais, reduzindo significativamente a viabilidade celular para 58,7%.

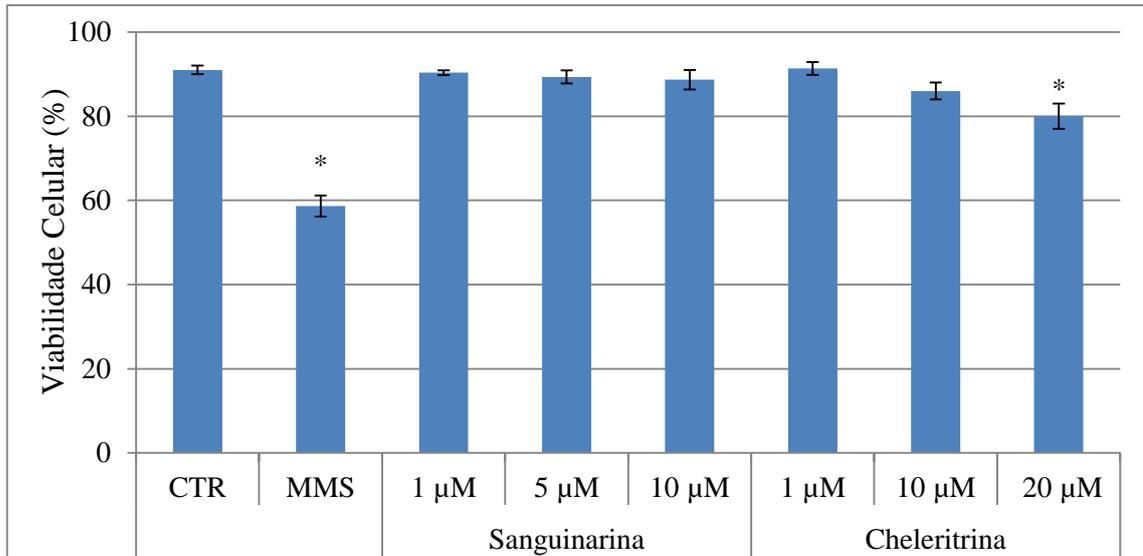


Figura 2: Viabilidade celular média e desvio padrão de células MCF-7, tratadas com o alcaloide sanguinarina ou chelitrina, por 3 h. Grupos: controle (CTR), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 75 μM), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina (1, 5 e 10 μM) ou chelitrina (1, 10 e 20 μM); 5×10^5 células MCF-7 por frasco, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

A eliminação do iodeto de propídeo captado só acontece nas células vivas, enquanto que aquelas que sofreram algum tipo de lesão de membrana durante o tratamento, permanecem coradas. A análise por citometria de fluxo (Figura 3) revelou que a SAN reduziu significativamente a viabilidade na concentração de 10 μM, quando comparada ao CTR, embora a viabilidade celular tenha se mantido em 91,8%, quando comparada ao CTR (95,3%), após 24 h de exposição. O alcaloide CHE não respondeu para a linhagem MCF-7 nas concentrações de 1 ou 20 μM, após 24 h de exposição, com viabilidade celular de 94,7 e 93,8%, respectivamente. O agente citotóxico CPT (4 μM) também reduziu significativamente este parâmetro, quando comparado ao CTR, porém a viabilidade celular foi de 91,9%.

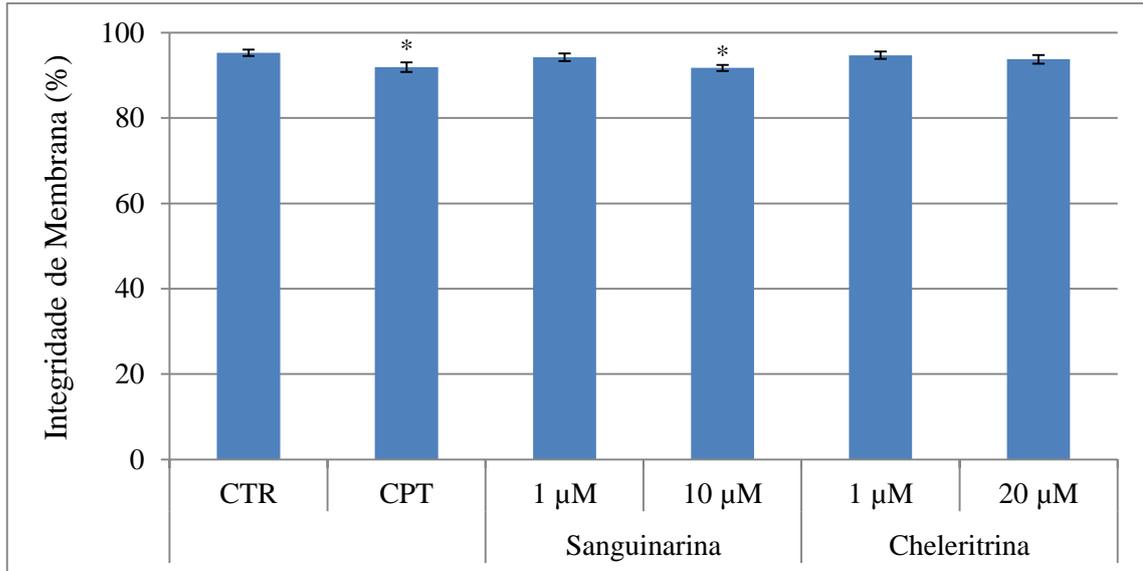


Figura 3: Integridade da membrana plasmática média e desvio padrão de células MCF-7, tratadas com o alcaloide sanguinarina ou chelitrina, por 24 h. Grupos: controle (CTR), agente citotóxico camptotecina (CPT 4 µM), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina (1 e 10 µM) ou chelitrina (1 e 20 µM); 2×10^5 células MCF-7 por poço, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

3.3. Ensaio do cometa

O teste do cometa foi realizado para verificar o potencial genotóxico dos alcaloides SAN e CHE em células tumorais MCF-7 (tabela 2). A análise do índice de danos revelou atividade genotóxica, estatisticamente significativa, para a concentração de 10 µM de SAN (ID=52), quando comparado ao CTR (ID=17), em virtude de uma maior incidência de cometas classe 1. Já os tratamentos com CHE, nas concentrações de 1 a 20 µM, não induziram uma diferença estatisticamente significativa nos índices de danos observados (1 µM=29, 10 µM=35 e 20 µM=36), quando comparados ao CTR. O tratamento com o agente genotóxico MMS (75 µM) também resultou em um aumento significativo de danos (ID=101), quando comparado ao CTR.

Tabela 2: Classes de cometas, índice de danos (ID) e desvio padrão (DP) de células MCF-7, tratadas com o alcaloide sanguinarina ou cheleritrina, por 3 h.

Alcaloide	Grupos	Classes de Cometa \pm DP				ID \pm DP
		0	1	2	3	
	CTR	80,13 \pm 7,77	16,00 \pm 5,57	0,33 \pm 0,58	0,00 \pm 0,00	16,67 \pm 5,51
	MMS	5,00 \pm 3,61	88,67 \pm 2,31	6,33 \pm 3,79	0,00 \pm 0,00	101,33* \pm 7,02
	1 μ M	75,67 \pm 11,37	20,00 \pm 12,49	3,33 \pm 1,53	1,00 \pm 1,00	29,67 \pm 10,62
Sanguinarina	5 μ M	76,33 \pm 15,01	19,00 \pm 14,93	4,33 \pm 2,08	0,33 \pm 0,58	28,67 \pm 15,31
	10 μ M	51,67 \pm 23,44	44,67 \pm 22,03	3,67 \pm 2,31	0,00 \pm 0,00	52,00* \pm 24,98
	1 μ M	74,33 \pm 7,64	22,67 \pm 8,14	2,67 \pm 1,15	0,33 \pm 0,58	29,00 \pm 7,55
Cheleritrina	10 μ M	68,67 \pm 13,01	27,67 \pm 12,50	3,33 \pm 0,58	0,33 \pm 0,58	35,33 \pm 13,58
	20 μ M	67,33 \pm 20,60	28,33 \pm 19,86	4,00 \pm 1,73	0,00 \pm 0,00	36,33 \pm 22,19

Grupos: controle (CTR), agente citotóxico metil metanossulfonato (MMS 75 μ M), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina (1, 5 e 10 μ M) ou cheleritrina (1, 10 e 20 μ M); 5×10^5 células MCF-7 por frasco, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

3.4. Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo foi realizada para verificar possíveis atrasos no processo de divisão celular, induzidos pelos alcaloides SAN e CHE (Figura 4). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de SAN 1 μ M (sub-G1=2,7%, G1=57,8%, S=21,3%, G2/M=18,2%), quando comparadas ao CTR (sub-G1=2,6%, G1=58,4%, S=20,4%, G2/M=18,7%). Já a concentração de SAN 10 μ M induziu um aumento estatisticamente significativo de células MCF-7 somente em sub-G1 (sub-G1=6,1%, G1=61,5%, S=18,3%, G2/M=14,3%). Em contrapartida, as concentrações de 1 ou 20 μ M de CHE não alteraram o ciclo de divisão celular da linhagem tumoral MCF-7, sendo os percentuais encontrados, estatisticamente iguais ao CTR (1 μ M: sub-G1= 2,1%, G1=57,8%, S=18,7%, G2/M=21,8%; e 20 μ M: sub-G1=2,4%, G1=59,7%, S=20,5%, G2/M=17,4%). A CPT também induziu significativamente uma população de células MCF-7 apenas em sub-G1 (sub-G1=9,5%, G1=57,1%, S=14,6%, G2/M=18,8%).

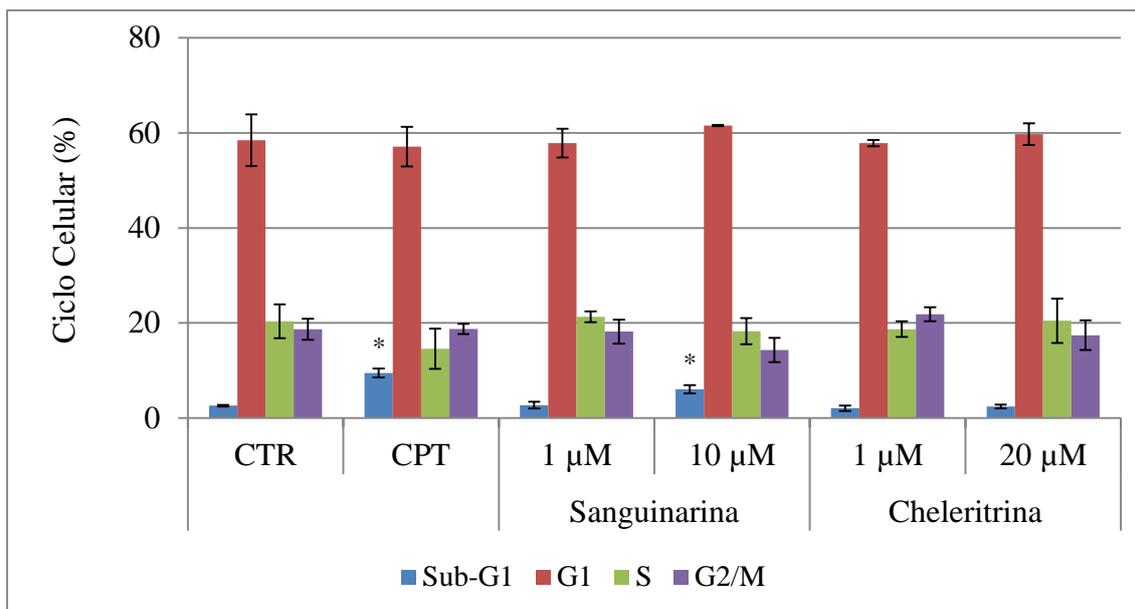


Figura 4: Percentual médio e desvio padrão de células MCF-7 em diferentes etapas do ciclo celular, tratadas com o alcaloide sanguinarina ou chelitrina, por 24 h. Grupos: controle (CTR), agente citotóxico camptotecina (CPT 4 µM), diferentes concentrações do alcaloide sanguinarina (1 e 10 µM) ou chelitrina (1 e 20 µM); 2×10^5 células MCF-7 por poço, n=3.

*Diferença estatisticamente significativa em relação ao CTR ($p < 0,05$).

4. Discussão

O câncer de mama é a principal causa de morte por câncer entre mulheres ao redor do mundo. Apesar do desenvolvimento de novas terapias, a taxa de mortalidade por esta doença não foi reduzida. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias para tratamentos mais efetivos é de extrema importância, e o uso de fitoquímicos como agentes quimioterapêuticos tem recebido grande atenção devido à sua baixa toxicidade para o organismo e baixo custo de obtenção (Park et al., 2014).

No presente estudo, foi demonstrado que a SAN possui efeito citotóxico sobre as células de adenocarcinoma de mama (MCF-7), a partir da concentração de 7,5 µM, observada pelo teste do MTT. A redução da viabilidade celular, neste caso, pode ter ocorrido uma vez que foi demonstrado que a SAN inibe diretamente a enzima succinato desidrogenase, comprometendo a atividade mitocondrial em camundongos (Barreto et al., 2003). A redução da atividade mitocondrial está diretamente relacionada com uma maior geração de espécies reativas de oxigênio intracelular, que comprometem o metabolismo da célula, perda do potencial de membrana mitocondrial, liberação de citocromo *c* e ativação de via intrínseca de apoptose, o que já foi demonstrado por diversos autores, em diversas linhagens celulares (Chang et al., 2007; Han et al., 2013; Cecen et al., 2014).

A atividade citotóxica da SAN não foi observada no teste de exclusão com azul de trypan. Entretanto, a verificação da integridade da membrana plasmática pela captação de iodeto de propídeo indicou que a concentração de 10 μM foi diferente do CTR, porém com viabilidade celular maior que 88%. Diferentemente destes resultados, Ahmad et al. (2000), Ahsan et al. (2007) e Burgeiro et al. (2013) verificaram que a SAN reduz significativamente a viabilidade de células humanas de carcinoma epidermoide, melanoma e células tumorais de pâncreas, respectivamente, de maneira dose-dependente. Essas diferenças de toxicidade podem estar relacionadas com a metabolização do alcaloide, que pode variar em função das enzimas que são expressas pela linhagem celular em questão, interferindo na citotoxicidade do composto.

Com base nos resultados da concentração de 10 μM de SAN, procedeu-se a análise da genotoxicidade pelo teste do cometa. A fragmentação do DNA evidenciada por este teste pode estar relacionada com a interação direta do alcaloide com a molécula de DNA. Stiborová et al. (2002) e Li et al. (2012) demonstraram que a SAN atua como um agente intercalante ou até mesmo como um grampo que se liga fortemente ao DNA celular, favorecendo quebras de fita dupla durante o processo de replicação, explicando o aparecimento de fragmentos de DNA nas caudas dos cometas. Corroboram ainda com os resultados aqui apresentados os trabalhos de Ansari et al. (2005), que identificaram o efeito genotóxico da SAN em células sanguíneas e da medula óssea de camundongos; De Stefano et al. (2009), em células de melanoma; e Gatti et al. (2014), em células tumorais não-pequenas de pulmão.

Ainda que os efeitos genotóxicos observados no teste do cometa sejam passíveis de reparo (Lorenzo et al., 2013; Collins et al., 2014), é possível que os danos induzidos ao DNA estejam correlacionados a atrasos na progressão do ciclo celular. Assim, a análise da quantidade do DNA de células em diferentes etapas do ciclo celular, por citometria de fluxo, mostrou que a SAN (10 μM) induziu uma população de células MCF-7 em sub-G1, caracterizando morte celular por apoptose ou necrose. Está de acordo com o presente resultado o trabalho de Chang et al. (2007), que mostrou que a SAN induz células KB em sub-G1 após 6 h de exposição a este alcaloide (2 μM), em função do aumento da apoptose.

A CHE, por sua vez, não apresentou efeito citotóxico para células MCF-7, com viabilidade mínima de 92% (20 μM), no tempo de 48 h, pelo teste do MTT. No ensaio com azul de trypan (3 h e exposição), a contração de 20 μM reduziu significativamente a viabilidade celular para 80%. Contudo, na análise por citometria (24 h de exposição), a mesma concentração não foi citotóxica, provavelmente em decorrência da proliferação celular e do maior número de células contabilizadas. Diferem destes resultados os trabalhos de Malíková et

al. (2006), Hammerová et al. (2011), Zhang et al. (2011) e Kumar e Acharya (2014), que encontraram atividade citotóxica da CHE para linhagens tumorais de próstata, melanoma, hepatoma e linfoma de Dalton. Barreto et al. (2003) identificaram que a CHE diminui a atividade da succinato desidrogenase, o que não parece ter ocorrido na linhagem MCF-7, provavelmente em função do seu metabolismo e elevada resistência, uma vez que o próprio MMS (50 μ M), comprovadamente citotóxico, reduziu a viabilidade para 70% em 24 h e 64% em 48 h.

O alcaloide CHE também foi ineficiente em induzir danos ao DNA das células MCF-7, ou de atrasar a progressão do ciclo celular. Corroboram com estes resultados os trabalhos de Kosina et al. (2004) e Stiborova et al. (2008), que não encontraram danos ao DNA em linfócitos e hepatócitos de ratos Wistar, alimentados com ração suplementada com CHE, também pelo teste do cometa. Todavia, Kaminsky et al. (2008), Zhang et al. (2012) e Kumar et al. (2013), identificaram o efeito genotóxico da CHE em células leucêmicas, tumorais de estômago e em linfoma humano. Além disso, Zhang et al. (2011) verificaram que a CHE induziu um acúmulo significativo de células de hepatoma humano na fase S e um aumento na população de sub-G1, em decorrência da apoptose. Foi demonstrado também que as atividades da CHE são específicas para cada tipo celular, e que a CHE pode induzir respostas diferentes *in vitro*, sugerindo que os mecanismos moleculares de indução de toxicidade dependem da linhagem celular avaliada (Maliková et al., 2006; Vrba et al., 2008).

Em função da elevada viabilidade celular no teste do MTT, acredita-se que a CHE não tenha produzido um acúmulo de espécies reativas de oxigênio ou promovido a liberação do citocromo *c*, iniciador da via intrínseca de apoptose, em células MCF-7. Apesar disso, esta via de morte celular é a principal responsável pela indução de apoptose em diversas outras linhagens celulares (Wan et al., 2007; Yang et al., 2008; Zhang et al., 2011; Kumar e Acharya, 2014).

Em conclusão, foi demonstrado que dentre os dois principais alcaloides quaternários benzo[c]fenantridinas, a sanguinarina reduz a atividade mitocondrial, promove a fragmentação do DNA e um acúmulo de células tumorais em sub-G1, enquanto que a cheleritina, um composto com elevada similaridade molecular, não apresenta os mesmos efeitos para as células de adenocarcinoma de mama (MCF-7), atingindo os objetivos propostos neste trabalho. O presente estudo fornece novos indícios sobre os efeitos da sanguinarina em células tumorais de mama, sendo mais um indicativo de que este composto é um candidato promissor para o desenvolvimento de novas terapias para o câncer de mama humano. Entretanto, são necessários

mais estudos para identificar os mecanismos moleculares de ação relacionados com as atividades biológicas deste alcaloide.

5. Referências

- Ahmad N, Gupta S, Husain MM, Heiskanen KM, Mukhtar H (2000) Differential antiproliferative and apoptotic response of sanguinarine for cancer cells versus normal cells. *Clin Cancer Res* **6**: 1524-1528
- Ansari KM, Dhawan A, Khann SK, Das M (2005) *In vivo* DNA damaging potential of sanguinarine alkaloid, isolated from argemone oil, using alkaline Comet assay in mice. *Food Chem Toxicol* **43**: 147–153
- Ansari KM, Dhawan A, Khanna SK, Das M (2006) Protective effect of bioantioxidants on argemone oil/sanguinarine alkaloid induced genotoxicity in mice. *Cancer Let* **244**: 109–118
- Barreto MC, Pinto RE, Arrabaça JD, Pavão ML (2003) Inhibition of mouse liver respiration by Chelidonium majus isoquinoline alkaloids. *Toxicol Let* **146** 37–47
- Burgeiro A, Bento AC, Gajate C, Oliveira PJ, Mollinedo F (2013) Rapid human melanoma cell death induced by sanguinarine through oxidative stress. *Eur J Pharm* **705**: 109–118
- Cecen E, Altun Z, Ercetin P, Aktas S, Olgun N (2014) Promoting effects of sanguinarine on apoptotic gene expression in human neuroblastoma cells. *Asian Pacific J Cancer Prev* **15** 9445-9451
- Chang MC, Chan CP, Wang YJ, Lee PH, Chen LI, Tsai YL, Lin BR, Wang YL, Jeng JH (2007) Induction of necrosis and apoptosis to KB cancer cells by sanguinarine is associated with reactive oxygen species production and mitochondrial membrane depolarization. *Toxicol Ap Pharm* **128**: 143–151
- Choi WY, Jin CY, Han MH, Kim GY, Kim ND, Lee WH, Kim SK, Choi YH (2009) Sanguinarine sensitizes human gastric adenocarcinoma AGS cells to TRAIL-mediated apoptosis via down-regulation of AKT and activation of caspase-3. *Anticancer Res* **29**: 4457-4466
- Collins A, Koppen G, Valdiglesias V, Dusinska M, Kruszewski M, Møller P, Rojas E, Dhawan A, Benzie I, Coskun E, Moretti M, Speit G, Bonassi S (2014) The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. *Rev Mut Res* **759**: 27-39
- De Stefano I, Raspaglio G, Zannoni GF, Travaglia D, Prisco MG, Mosca M, Ferlini C, Scambia G, Gallo D (2009) Antiproliferative and antiangiogenic effects of the benzophenanthridine alkaloid sanguinarine in melanoma. *Biochem Pharm* **78**: 1374–1381
- Dvorak Z, Sovadinová I, Bláha L, Giesy JP, Ulrichova J (2006) Quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine do not affect transcriptional activity of aryl hydrocarbon receptor: Analyses in rat hepatoma cell line H4IIE.luc. *Food Chem Toxicol* **44**: 1466–1473
- Funakoshi T, Aki T, Nakayama H, Watanuki Y, Imori S, Uemura K (2011) Reactive oxygen species-independent rapid initiation of mitochondrial apoptotic pathway by chelerythrine. *Toxicol in Vitro* **25**: 1581–1587
- Gatti L, Cossa G, Tinelli S, Carenini N, Arrighetti N, Pennati M, Cominetti D, Cesare M, Zunino F, Zaffaroni N, Perego P (2014) Improved Apoptotic Cell Death in Drug-Resistant Non-Small-Cell Lung Cancer Cells by Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand-Based Treatments. *J Pharm Exp Ther* **348**: 360–371
- Hammerová J, Uldrijan S, Táborská E, Slaninová I (2011) Benzo[c]phenanthridine alkaloids exhibit strong anti-proliferative activity in malignant melanoma cells regardless of their p53 status. *J Dermatol Sci* **62**: 22-35

- Han MH, Kim GY, Yoo YH, Choi YH (2013) Sanguinarine induces apoptosis in human colorectal cancer HCT-116 cells through ROS-mediated Egr-1 activation and mitochondrial dysfunction. *Toxicol Let* **220**: 157-66
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674
INCA – Instituto Nacional de Câncer. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>> Acesso em: 21/08/2015.
- Kaminsky VO, Lin KW, Filyak Y, Stoika R (2008) Differential effect of sanguinarine, chelerythrine and chelidonine on DNA damage and cell viability in primary mouse spleen cells and mouse leukemic cells. *Cell Bio Inter* **32**: 271-277
- Kim S, Lee TJ, Leem J, Choi KS, Park JW, Kwon TK (2008) Sanguinarine-induced apoptosis: generation of ROS, down-regulation of Bcl-2, c-FLIP, and synergy with TRAIL. *J Cel Biochem* **104**: 895–907
- Kosina P, Walterová D, Ulrichová J, Lichnovsky V, Stiborová M, Rydlov H, Vicar J, Krecman V, Brabec MJ, Simánek V (2004) Sanguinarine and chelerythrine: assessment of safety on pigs in ninety days feeding experiment. *Food Chem Toxicol* **42**: 85–91
- Kumar S, Acharya A (2014) Chelerythrine induces reactive oxygen species-dependent mitochondrial apoptotic pathway in a murine T cell lymphoma. *Tumor Bio* **35**: 129–140
- Kumar S, Deepak P, Kumar S, Gautam PK, Acharya A (2013) A benzophenanthridine alkaloid, chelerythrine induces apoptosis *in vitro* in a Dalton's lymphoma. *J Cancer Res Ther* **9** 693-700
- Kumar S, Tomar MS, Acharya A (2015) Activation of p53-dependent/-independent pathways of apoptotic cell death by chelerythrine in a murine T cell lymphoma. *Leuk Lymph* **56**: 1846-1855
- Li JF, Li BH, Wu YB, shuang S, dong C, choi MM (2012) Luminescence and binding properties of two isoquinoline alkaloids chelerythrine and sanguinarine with ctDNA. *Spectrochimic Acta Part A: Mol Biomol Spectroscopy* **95**: 80–85
- Lorenzo Y, Costa S, Collins AR, Azqueta A (2013) The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead. *Mutagenesis* **28**: 427-432
- Malíková J, Zdarilová A, Hlobilková A, Ulrichová J (2006) The effect of chelerythrine on cell growth, apoptosis, and cell cycle in human normal and cancer cells in comparison with sanguinarine. *Cell Bio Toxicol* **22**: 439–453
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* **65**: 55-63
- Park SY, Jin ML, Kim YH, Lee SJ, Park G (2014) Sanguinarine inhibits invasiveness and the MMP-9 and COX-2 expression in TPA-induced breast cancer cells by inducing HO-1 expression. *Oncology Rep* **31**: 497-504
- Sarasin A (2003) An overview of the mechanisms of mutagens and carcinogens. *Mut Res* **544**: 99-106
- Slaninová I, Penciková K, Urbanová J, Slanina J, Táborska E (2014) Antitumour activities of sanguinarine and related alkaloids. *Phytochem Rev* **13**: 51–68
- Stiborová M, Simánek V, Frei E, Hobza P, Ulrichová J (2002) DNA adduct formation from quaternary benzo[c]phenanthridine alkaloids sanguinarine and chelerythrine as revealed by the ³²P-postlabeling technique. *Chem Bio Inter* **140**: 231–242
- Stiborova M, Vostalova J, Zdarilova A, Ulrichova J, Hudecek J, Tschirner K, Simanek V (2008) *Macleaya cordata* extract and sangrovit® genotoxicity: assessment in vivo. *Biomed P Med Fac, Universitatis Palacky Olomouc Czech Republic* **152**: 35–39
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki F (2000) Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Env Mol Mut* **35**: 206-221

- Tsukamoto H, Kondo S, Mukudai Y, Nagumo T, Yasuda A, Kurihara Y, Kamatani T, Shintani S. Evaluation of anticancer activities of benzo[c]phenanthridine alkaloid sanguinarine in oral squamous cell carcinoma cell line. *Anticancer Res* **31**: 2841-2846
- Vrba J, Dolezel P, Vicar J, Modriansky M, Ulrichova J (2008) Chelerythrine and dihydrochelerythrine induce G1 phase arrest and bimodal cell death in human leukemia HL-60 cells. *Toxicol in Vitro* **22**: 1008–1017
- Wan KF, Chan SL, Sukumaran SK, Lee MC, Yu VC (2008) Chelerythrine induces apoptosis through a Bax/Bak-independent mitochondrial mechanism. *J Bio Chem* **283**: 8423–8433
- Yang R, Piperdi S, Gorlick R (2008) Activation of the RAF/mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway mediates apoptosis induced by chelerythrine in osteosarcoma. *Clin Cancer Res* **14**: 6396-6404
- Zhang ZF, Guo Y, Zhang JB, Wei XH (2011) Induction of apoptosis by chelerythrine chloride through mitochondrial pathway and Bcl-2 family proteins in human hepatoma SMMC-7721 cell. *Arch Pharm Res* **34**: 791-800
- Zhang Z, Guo Y, Zhang L, Zhang J, Wei X (2012) Chelerythrine chloride from *Macleaya cordata* induces growth inhibition and apoptosis in human gastric cancer BGC-823 cells. *Acta Pharm Sin B* **2**: 464–471

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que:

- Alcaloides de plantas possuem atividades biológicas que podem contribuir para o desenvolvimento de novas drogas para uso no combate ao câncer;
- O alcaloide sanguinarina é citotóxico para células tumorais de hepatoma humano (HepG2/C3A) e fibroblastos não tumorais de pulmão humano (MRC-5), apresenta maior genotoxicidade para a linhagem tumoral e induz apoptose na linhagem não tumoral;
- O alcaloide cheliritrina é citotóxico para células HepG2/C3A e MRC-5, apresenta maior genotoxicidade para a linhagem não tumoral e induz apoptose em ambas as células;
- A sanguinarina reduziu efetivamente a viabilidade celular, foi genotóxica e induziu uma maior população de células em sub-G1 (apoptóticas ou necróticas), para células tumorais de adenocarcinoma de mama (MCF-7), diferentemente do observado para a cheliritrina.

ANEXO 1

Normas da revista *Toxicology Letters*, na qual o artigo 1 será submetido.

Official Journal of EUROTOX

An international journal for the rapid publication of short reports on all aspects of toxicology, especially mechanisms of toxicity. *Toxicology Letters* also publishes mini-reviews, editorials, commentaries and contemporary issues in toxicology.

Types of paper

Toxicology Letters publishes short reports on all aspects of toxicology, especially mechanisms of toxicity. *Toxicology Letters* also publishes mini-reviews, editorials, commentaries and contemporary issues in toxicology.

Mini-review papers: These papers should be approximately 12-15, 1.5-spaced typewritten pages; should be in English and submitted via the Internet on the Elsevier website (<http://ees.elsevier.com/toxlet>). The reference list need not be exhaustive, but should include the most significant articles. The names of two potential reviewers are also requested.

General guidelines

The journal focuses on the rapid publication of novel results and prefers short manuscripts on all aspects of toxicology although longer manuscripts will be considered. Preference is given to studies that are relevant to mechanistic toxicology and hypothesis-driven. The rationale should be sound, and the experimental design should be well-conceived. Completeness usually requires that dose-response relationships are examined. Manuscripts that primarily describe new methods, either experimental or theoretical, should provide examples of their use. When studies involve the use of experimental animals, manuscripts should briefly describe the procedures employed for animal care and handling. Experiments that require the use of animals or humans must be conducted in accordance with International Guidelines.

Non-hypothesis-driven studies (e.g. safety evaluation of new chemicals or drugs) may be published if the work is considered complete and the conclusions are unequivocal. Studies that fail to elicit a toxic response (negative studies) might be acceptable if competently performed.

A manuscript may be declined for reasons of ethical considerations, incompleteness, insufficient quality, prior publication of portions of the work, inadequate experimental design or methods, inadequate description of experiments, of insufficient support for conclusions, or subject matter not consistent with the mission of the journal.

Manuscripts are accepted for review with the understanding that the same work has not been published, that it is not under consideration for publication elsewhere, and that its submission for publication has been approved by all of the authors and by the institution where the work was carried out. Further, it is understood that any person cited as a source of personal communications has approved such citation.

Authors submitting a manuscript do so on the understanding that if it is accepted for publication, copyright in the article, including the right to reproduce the article in all forms and media, shall be assigned exclusively to Elsevier, unless legally prohibited (e.g. U.S. Federal government employees).

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure the text of your paper is double-spaced and has consecutive line numbering—this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:<http://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Manuscripts should be typewritten, 1.5-spaced. In general, manuscripts should not be longer than 10 printed pages (approx. 15, 1.5-spaced pages).

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself. **The Abstract should contain approx. 150 - 200 Words.**

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

See <http://www.elsevier.com/graphicalabstracts> for examples.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a minimum of 3, maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the

figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

Tables should be numbered with Arabic numbers and bear a short descriptive title. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
 2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
 3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
- Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, *Data in Brief* (<http://www.journals.elsevier.com/data-in-brief>). The open access fee for *Data in Brief* is \$500. For authors who submit in 2015 a reduced fee of \$250 will apply. Please use the following template to write your Data in Brief: <http://www.elsevier.com/dib-template>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <http://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site

at <http://support.elsevier.com>.

ANEXO 2

Normas da revista *British Journal of Cancer*, na qual os artigos 2 e 3 serão submetidos.

Submitting to BJC

BJC is proud of its editorial independence and strives to uphold the highest standards in every aspect of its decision-making and publishing process; we expect our authors to do the same. The guidance that follows is not and never could be exhaustive, but is intended to guide authors towards best practice.

What we publish

BJC welcomes the submission of high quality original and innovative research findings from all countries, if they add to understanding of the risk factors for and pathogenesis of cancer; further prevention and early detection; and contribute to improving the diagnosis, treatment and survival of patients.

- Full-length papers should be no more than 5,000 words, reduced appropriately to allow for up to six figures or tables, and should be supported by key references.
- Short communications of 1,500 words and up to three figures or tables are also published across the entire spectrum of cancer research.
- Single case reports are very rarely accepted and only if they illustrate an important point of broad general interest.
- Minireviews on current topics, some longer reviews and book reviews, are usually invited by the editor, but potential authors are encouraged to approach the journal with suggestions for these and other relevant articles.
- Editorials and letters to the editor that relate to material that has been published in the journal are published at the Editor's discretion.
- There are additional facilities for publishing supplementary material and online colour versions of figures that will be printed in black and white.
- BJC authors may opt for open access publication, with a choice of licence types. This will be offered after papers are accepted BJC OPEN.

How to submit

Manuscripts should be submitted via our  Online Submission site

Submissions are the responsibility of the BJC Main Editorial Office, bjc@bjcancer.net. You are welcome to ask for their advice and support.

You can also contact them at

BJC Main Editorial Office

First floor Angel Building
407 St John Street

London EC1V 4AD
UK

Tel: +44 (0)20 3469 6179
Fax: +44 (0)20 3070 0638

Covering letter

All submissions should be accompanied by a covering letter setting the new paper in context. You will find a template for such a letter [here](#)

Manuscript format

Manuscripts, which must be written in English, should be typed using double spacing with a wide margin all round the text. Manuscripts must be concise, overly long manuscripts may be rejected on that basis. Authors are encouraged to make use of online only Supplementary Material when additional data is needed to support their conclusions. All Supplementary Material must be shown to the referees and should be submitted with the paper.

- **Full papers** must not exceed 5000 words, which should include all figure legends and associated text. They should contain no more than six display items: figures and/or tables. Figures should be as concise as possible and should be prepared with regard for the current design of the BJC page and our [Guide to Preparing Artwork](#). Figures must not have more than eight constituent parts and they must not exceed one page including their figure legend. If tables are likely to occupy more than one page when typeset in BJC's current style, following the examples given in our [Table Style Guide](#), the total number of display items submitted should be reduced accordingly. Full papers should be divided into sections: a structured abstract of about 200 words; introduction; materials and methods; results; discussion; acknowledgements; and should be supported by key references.
- **Short communications** should comprise approximately 1500 words and up to three figures or tables, prepared as described above. They should be supported by a shortened list of references and should have the section headings; introduction; materials and methods; results; discussion; acknowledgements and a shorter structured abstract of approximately 100-150 words.
- **Minireviews** should have 3000-3500 words, with appropriate reductions for one or two figures or tables, and should include a brief abstract, an introduction, a conclusion, and no more than 30 references. Minireview figures are usually restyled, please discuss this with the Main Editorial Office when manuscripts are accepted. All minireview articles will have their figures published with a facility for all readers to download free PowerPoint slides via the BJC website.

Title page

Your title page, numbered as 1, should give the title in bold letters (not normally exceeding 100 characters), a running title (not to exceed 50 characters) and all the authors' names in the preferred format (exactly as they are to appear in the published version), with affiliations and complete addresses, including postal (zip) codes.

Please indicate clearly who the corresponding author is. Both an e-mail address and a full postal address are required for the corresponding author.

When preparing the final manuscript, corresponding authors are asked to recheck and update

- the order in which names are to appear
- the exact format and spelling of all names
- the addresses of all authors, ensuring that addresses are complete and properly identify the institutions where authors are working.

It will not be possible to correct avoidable omissions and mistakes once they are published.

Structured abstracts and keywords

You should prepare an abstract of your manuscript, of a maximum of 200 words summarising its content (reduced to a maximum of 150 words for a short communication).

BJC requires **structured abstracts for research papers and short communications**. Please use these headings for your abstract: Background, Methods, Results, and Conclusion or Interpretation, following the structure of your paper as closely as is possible.

BJC uses **unstructured abstracts for minireviews, reviews and similar papers**. Letters and editorials do not need abstracts.

Please type your abstract on a separate sheet following the title page.

At least three and no more than twelve keywords, should be listed after the abstract.

During the submission process, you will be required to choose the most relevant and specific subject terms that apply to your manuscript from our **Subject Ontology**, this will ensure that your article will be more discoverable and that it will appear on appropriate subject specific pages on nature.com, in addition to the journal's own pages. Your article should be indexed with at least two and no more than five unique subject terms that describe the key subjects and concepts in your manuscript.

Click [here](#) for help with allocating Ontology terms.

Units & abbreviations

Please avoid abbreviations in the title and abstract. All unusual abbreviations should be fully explained at their first occurrence in the text.

All measurements should be expressed in SI units. For more detailed recommendations, authors may consult Baron DN & H McKenzie-Clark (eds) (2008) *Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Authors and Editors in Medicine and Related Sciences* (Sixth Edition).

Drug names

Generic drug names should be used.

Reference Style

BJC papers are referenced using a modified Harvard referencing style. Please see below for examples:

Only papers closely related to the author's work should be quoted, and these should wherever possible be original papers rather than reviews. Exhaustive lists should be avoided. Citation of conference proceedings or meeting abstracts should also be avoided unless there is no other reference.

References in the text should be made by giving, in brackets, the author's surname, with the year of publication.

When the reference is to a specific part of a book, the page number should also be cited. When reference is made to a work by three or more authors, the first name followed by *et al*, should be used for all citations in the text (Weiss *et al*, 2001). If several papers by the same first author and from the same year are cited, a, b, c, etc, should be added after the year of publication. Authors are asked to check the accuracy of all references before submitting a manuscript. References should be brought together at the end of the paper in alphabetical order, where titles of papers and all authors' names should be given in full.

Names of journals should be abbreviated as in Index Medicus, followed by the volume number and the initial and final page numbers, e.g.:

Nagai H, Pineau P, Tiollais P, Buendia MA, Dejean A (1997) Comprehensive allelotyping of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **14**: 2927 - 2933

Wherever possible, include the digital object identifier (DOI), from the article's title page. Please note the following example:

Nanduri and Zimniak P (1999) *Arch Biochem Biophys* **362**: 167 - 174, doi:10.1054/abbi.1998.1009

References to books and monographs should appear as in the following examples:

Means JH (1984) *The Thyroid and its Diseases*. Lippincott: Philadelphia

Stevenson AC (1966) Sex chromatin and sex ratio in man. In *Sex Chromatin*, Moore A. (ed) pp 405 - 425. W. B. Saunders: Philadelphia

Figures

Figures and images should be labelled sequentially, numbered and cited in the text. Figure legends should be printed, double spaced, on a separate sheet titled 'Titles and legends to figures'. Figures should be referred to specifically in the text of the paper but should not be embedded within the text. The use of three-dimensional and shadowed histograms is strongly discouraged when the addition of the third dimension gives no extra information. If a table or figure has been published before, the authors must obtain written permission to reproduce the material in both print and electronic formats from the copyright owner and submit it with the manuscript. This follows for quotes, illustrations and other materials taken from previously published works not in the public domain. The original source should be cited in the figure caption or table footnote. (see [Permissions](#))

Artwork Guidelines

A detailed guide to preparing artwork for submission can be downloaded at <http://www.nature.com/aj/artworkguidelines.pdf>. Please submit production quality artwork

with your initial online submission. Individual figures may be submitted in any one of the BJC's preferred formats, ideally TIFF or EPS files.

If your paper is accepted for publication and you have already submitted production quality artwork, following the [Guide to Preparing Artwork](#), it will not be necessary to resubmit the artwork following the peer-review process, except where changes are required by the reviewers or our Editor.

Colour in print

Full colour illustrations may be included in the printed text, at the discretion of the editor.

A charge will normally be made to the author to cover the extra costs incurred in originating and printing colour illustrations. BJC has a standardised scale of charges for the first three colour figures with no further charges being made for additional colour. It is helpful if authors who submit colour figures indicate in their covering letter that they are willing, in principle, to meet these costs. Prior to publication, authors will be advised of the costs and asked to make arrangements to pay them.

Authors who choose a BJC OPEN licence do not pay additional charges for colour figures.

Colour online

We are usually able to substitute colour versions of illustrations in the HTML version of the online journal at no additional cost. The online PDF of the paper exactly matches the printed journal and will therefore carry the black and white version of the figure, as printed. Authors wishing to take advantage of this facility are asked to submit a 300 dpi black and white and a colour file for the electronically published version. Please refer to the [Guide to Preparing Artwork](#).

Tables

Tables should only be used to present essential data. Each must be on a separate sheet with a title or caption and be clearly labelled, sequentially. Please make sure each table is cited within the text and in the correct order, e.g. (Table 3).

Tables should ideally be presented in Excel, one table per workbook. It is imperative that the tables are editable. Please save the files with extensions .xls / .xlsx / .ods / or .doc or .docx. Please ensure that you provide a 'flat' file, with single values in each cell with no macros or links to other workbooks or worksheets and no calculations or functions.

BJC has recently changed its style for tables. Please consult our [Guide to Preparing Tables](#), for examples, and follow it as closely as possible.

Supplementary online material

Authors wishing to provide additional material supporting their paper, may wish to have this published online as supplementary material linked to the paper on the BJC website.

All supplementary materials must be submitted with the original manuscript and will be shown to referees. This allows papers to have greater depth, online enhancements, such as video clips and additional data sets, making them more useful to fellow specialists in the field who require detail, without distracting more general readers.

Authors should ensure that supplementary information is supplied in its FINAL format because it is not subedited and will appear online exactly as submitted. It cannot be altered, nor can new supplementary information be added, after the paper has been accepted for publication. All supplementary material must be cited in the text of the manuscript, sequentially.

For further information regarding acceptable file formats, please refer to the [Guide to Preparing Artwork](#).