



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ANDRESSA MEGUMI NIWA

**ATIVIDADE SELETIVA DA SALINOMICINA NA  
PROLIFERAÇÃO CELULAR, CITOTOXICIDADE,  
GENOTOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS  
HUMANAS**

---

Londrina  
2015



Universidade Estadual de Londrina

Instituto Agrônomo do Paraná

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

---

ANDRESSA MEGUMI NIWA

**ATIVIDADE SELETIVA DA SALINOMICINA NA  
PROLIFERAÇÃO CELULAR, CITOTOXICIDADE,  
GENOTOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS  
HUMANAS**

---

Londrina  
2015

ANDRESSA MEGUMI NIWA

**ATIVIDADE SELETIVA DA SALINOMICINA NA  
PROLIFERAÇÃO CELULAR, CITOTOXICIDADE,  
GENOTOXICIDADE E EXPRESSÃO GÊNICA DE CÉLULAS  
HUMANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani.

Londrina  
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

N735a Niwa, Andressa Megumi.  
Atividade seletiva da salinomicina na proliferação celular, citotoxicidade,  
genotoxicidade e expressão gênica de células humanas / Andressa Megumi Niwa.  
– Londrina, 2015.  
81 f.: il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e  
Biologia Molecular, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Células cancerosas – Teses. 2. Ciclo celular – Teses. 3. Apoptose – Teses.  
4. Genética – Expressão – Teses. 5. Antibióticos – Teses. I. Mantovani, Mário Sérgio.  
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Instituto Agrônomo do  
Paraná. IV. EMBRAPA. V. Título.

CDU 576.385.5

ANDRESSA MEGUMI NIWA

**ATIVIDADE SELETIVA DA SALINOMICINA NA PROLIFERAÇÃO  
CELULAR, CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E EXPRESSÃO  
GÊNICA DE CÉLULAS HUMANAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Biologia Molecular, da Universidade  
Estadual de Londrina, como requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Vanessa Moraes de Andrade  
Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC

---

Prof. Dr. Edson Luis Maistro  
Universidade Estadual Paulista - UNESP

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Lúcia Dias  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Fernanda Simões de Andrade  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 30 de março de 2015.

*Dedico a Deus Parens e Oyassama, que me protegem e me orientam diariamente.  
Dedico aos meus pais, pelo amor incondicional que me faz seguir em frente.  
Dedico ao meu marido, Douglas, pelo amor e companheirismo.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por todas as graças recebidas e por tornar esse sonho realidade.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, por todos esses anos de orientação e dedicação.

À banca examinadora, por terem aceitado o convite e pelas importantes contribuições.

À Universidade Estadual de Londrina e ao Programa de Genética e Biologia Molecular, que foram a minha segunda casa durante os últimos anos.

Aos meus professores, que fizeram parte da minha formação profissional e nos quais tento me espelhar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

Aos meus pais, Diogo e Helena, que nunca mediram esforços na educação de seus filhos. Sem o incentivo de vocês, nada disso seria possível.

Ao meu marido, Douglas, meu grande companheiro, que viveu comigo o doutorado, sempre me incentivando e me apoiando.

À minha família: meus avós, meus irmãos Tatiana e Tiago, meus tios e primos que sempre torceram por mim e me incentivaram.

Aos meus amigos do laboratório: Simone, Gláucia, Lilian, Ingrid, Daniela, Bruna, Adrivânio, Thalita, Amanda, Daniele e Eliane. Muito obrigada por todos esses anos de trabalho, companheirismo e amizade. O período do doutorado foi uma das melhores etapas da minha vida graças à companhia de vocês.

NIWA, Andressa Megumi. **Atividade seletiva da salinomicina na proliferação celular, citotoxicidade, genotoxicidade e expressão gênica de células humanas**. 2015. 81 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2015.

## RESUMO

A busca por drogas anticâncer mais eficazes é de grande interesse dos pesquisadores e da sociedade. Com esse propósito, surgiram estudos com a salinomicina, um antibiótico ionóforo utilizado como aditivo alimentar e para o tratamento da coccidiose em caprinos, ovinos e aves. Estudos mostram que a salinomicina apresenta potencial antitumoral em células tronco de câncer e é capaz de induzir morte celular por apoptose de forma seletiva em células tumorais. Dessa forma, devido à promissora utilidade da salinomicina na terapia do câncer, o presente trabalho avaliou a sua atividade em duas linhagens celulares humanas tumorais, carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A), adenocarcinoma de mama (MCF-7), e em uma linhagem não tumoral de mama (HB4a), a fim de verificar sua ação seletiva. A avaliação da proliferação celular em tempo real mostrou que as células não tumorais HB4a apresentam maior resistência à salinomicina em relação às células tumorais e esses dados foram confirmados pelo ensaio de citotoxicidade. Valores de  $IC_{50}$  (concentração que inibe 50% da população celular) mostram a maior sensibilidade das células MCF-7 à salinomicina. Na detecção de indução de danos no DNA pelo ensaio do cometa, apenas as células MCF-7 foram positivas. A análise por citometria de fluxo mostrou que somente as linhagens tumorais foram induzidas à morte celular por apoptose/necrose. Aumento da expressão dos genes *GADD45A* e *CDKN1A* foi observado em todas as linhagens celulares, indicando indução de danos no DNA e parada do ciclo celular. Nas células tumorais, houve redução da expressão dos genes *CCNA2* e *CCNB1*, resultando em parada do ciclo celular em G2/M. Como consequência da parada do ciclo celular, as células tumorais foram encaminhadas ao processo de morte por apoptose através da regulação do gene *BAK* na linhagem HepG2/C3A e via inibição dos genes antiapoptóticos *BCL-XL* e *BIRC5* na linhagem MCF-7. As linhagens tumorais apresentaram forte inibição do gene antiapoptótico *BCL-2*, e a linhagem HB4a apresentou inibição de *CASP9*. Esses dados contribuem para a elucidação do mecanismo de ação da salinomicina como uma promissora droga antitumoral pela sua atividade seletiva. Portanto, verificou-se que as células tumorais foram encaminhadas à apoptose envolvendo diferentes marcadores moleculares e, pela primeira vez, foi observada a maior resistência à salinomicina das células não tumorais de mama HB4a.

**Palavras-chave:** Câncer. Drogas anticâncer. Apoptose. Ciclo celular.

NIWA, Andressa Megumi. **Selective activity of salinomycin in cell proliferation, cytotoxicity, genotoxicity and gene expression of human cells.** 2015. 81 p. Thesis (PhD in Genetics and Molecular Biology) - Londrina State University, Londrina. 2015.

## ABSTRACT

The search for more effective anticancer drugs is of great interest of researchers and society. For this purpose, have emerged studies with salinomycin, an ionophore antibiotic used as a food additive and for the treatment of coccidiosis in goats, sheep and poultry. Studies show that salinomycin has anti-tumor potential against cancer stem cells and selectively destroys tumor cells by inducing apoptotic cell death. The promise of that approach prompted us to study salinomycin by assessing two human tumor cell lines, namely, hepatocellular carcinoma cells (HepG2/C3A) and breast adenocarcinoma (MCF-7), compared to a non-tumor breast cell line (HB4a) in order to verify its selective activity. Real-time assessment of cell proliferation showed that HB4a non-tumor breast cells are more resistant to salinomycin than are tumor cell lines and these data were confirmed in a cytotoxicity assay. The  $IC_{50}$  values (half maximal inhibitory concentration) show the increased sensitivity of MCF-7 cells to salinomycin. In the comet assay, only MCF-7 cells showed the induction of DNA damage. Flow cytometric analysis showed that cell death by apoptosis/necrosis was only induced in tumor cell lines. The increased expression of *GADD45A* and *CDKN1A* genes was observed in all cell lines, indicating DNA damage induction and cell cycle arrest. Decreased expression of *CCNA2* and *CCNB1* genes occurred only in tumor cells, resulting in G2/M cell cycle arrest. As a result of the cell cycle arrest, tumor cell apoptosis was activated through *BAK* gene regulation in HepG2/C3A cells and through inhibition of the antiapoptotic genes *BCL-XL* and *BIRC5* in MCF-7 cells. The tumor cell lines showed strong inhibition of the antiapoptotic gene *BCL-2*, and the HB4a cell line showed inhibition of *CASP9*. These data contribute to clarifying the mechanism of action of salinomycin as a promising antitumor drug, given its selective activity. Thus, we observed that the induction of apoptosis in tumor cells occurred through different molecular markers, and for the first time, we observed the higher resistance of HB4a non-tumor breast cells to salinomycin.

**Key words:** Cancer. Anticancer drugs. Apoptosis. Cell cycle.

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão bibliográfica

<b>Figura 1</b> –	Estrutura da salinomicina .....	17
<b>Figura 2</b> -	Ensaio do cometa.....	25
<b>Figura 3</b> -	Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	26
<b>Figura 4</b> –	Representação esquemática da exposição de fosfatidilserina durante a apoptose .....	27
<b>Figura 5</b> –	Detecção de morte celular por citometria de fluxo.....	28

### Artigo

<b>Figura 1</b> –	Curvas de proliferação celular obtidas por análise celular em tempo real (RTCA).....	44
<b>Figura 2</b> -	Média e desvio padrão das absorbâncias obtidas pelo ensaio de citotoxicidade MTT .....	46
<b>Figura 3</b> –	Valores de IC <sub>50</sub> (µM) da salinomicina .....	47
<b>Figura 4</b> –	Média e desvio padrão do escore obtido pelo ensaio do cometa.....	48
<b>Figura 5</b> –	Análise de ciclo celular por citometria de fluxo em células HepG2/C3A .....	49
<b>Figura 6</b> –	Análise de ciclo celular por citometria de fluxo em células MCF-7 .....	50
<b>Figura 7</b> -	Análise de ciclo celular por citometria de fluxo em células HB4a .....	50
<b>Figura 8</b> -	Análise de morte celular por apoptose de células HepG2/C3A por citometria de fluxo.....	52
<b>Figura 9</b> -	Análise de morte celular por apoptose de células MCF-7 por citometria de fluxo .....	53
<b>Figura 10</b> -	Análise de morte celular por apoptose de células HB4a por citometria de fluxo.....	54
<b>Figura 11</b> -	Expressão relativa dos genes relacionados a danos no DNA e ao ciclo celular obtida por RT-PCR em tempo real .....	56
<b>Figura 12</b> -	Expressão relativa dos genes relacionados ao processo de morte por apoptose obtida por RT-PCR em tempo real .....	57

## LISTA DE TABELAS

### Artigo

**Tabela 1 –** Sequência de primers utilizados na técnica RT-PCR em tempo real ..... 42

### Apêndice

**Tabela 1 –** Média e desvio padrão dos índices celulares obtidos pela análise celular em tempo real (RTCA) em células HepG2/C3A tratadas com salinomicina..... 77

**Tabela 2 -** Média e desvio padrão dos índices celulares obtidos pela análise celular em tempo real (RTCA) em células MCF-7 tratadas com salinomicina..... 77

**Tabela 3 –** Média e desvio padrão dos índices celulares obtidos pela análise celular em tempo real (RTCA) em células HB4a tratadas com salinomicina..... 77

**Tabela 4 –** Média e desvio padrão das absorbâncias obtidas pelo ensaio de citotoxicidade MTT em células HepG2/C3A tratadas com salinomicina..... 78

**Tabela 5 –** Média e desvio padrão das absorbâncias obtidas pelo ensaio de citotoxicidade MTT em células MCF-7 tratadas com salinomicina..... 78

**Tabela 6 –** Média e desvio padrão das absorbâncias obtidas pelo ensaio de citotoxicidade MTT em células HB4a tratadas com salinomicina ..... 78

**Tabela 7 -** Média e desvio padrão dos escores obtidos pelo ensaio do cometa em células HepG2/C3A tratadas com salinomicina ..... 79

**Tabela 8 -** Média e desvio padrão dos escores obtidos pelo ensaio do cometa em células MCF-7 tratadas com salinomicina..... 79

**Tabela 9 -** Média e desvio padrão dos escores obtidos pelo ensaio do cometa em células HB4a tratadas com salinomicina ..... 79

**Tabela 10 -** Análise de ciclo de células HepG2/C3A por citometria de fluxo..... 79

**Tabela 11 -** Análise de ciclo de células MCF-7 por citometria de fluxo ..... 80

**Tabela 12 -** Análise de ciclo células HB4a por citometria de fluxo ..... 80

**Tabela 13 -** Análise de morte de células HepG2/C3A por citometria de fluxo ..... 80

**Tabela 14 -** Análise de morte de células MCF-7 por citometria de fluxo ..... 80

**Tabela 15 -** Análise de morte de células HB4a por citometria de fluxo..... 81

<b>Tabela 16 -</b>	Expressão relativa dos genes relacionados a danos no DNA e ao ciclo celular obtida por RT-PCR em tempo real .....	81
<b>Tabela 17 -</b>	Expressão relativa dos genes relacionados ao processo de morte por apoptose obtida por RT-PCR em tempo real .....	81

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1	CÂNCER.....	14
2.2	SALINOMICINA .....	17
2.2.1	Salinomicina e Câncer .....	18
2.3	FERRAMENTAS PARA INVESTIGAÇÃO DE NOVAS DROGAS QUIMIOTERÁPICAS.....	22
2.3.1	Cultura de Células .....	22
2.3.2	Avaliação de Proliferação Celular e Citotoxicidade.....	23
2.3.3	Avaliação de Genotoxicidade.....	24
2.3.4	Avaliação de Ciclo Celular e Apoptose por Citometria de Fluxo .....	25
2.3.5	Expressão Gênica – RT-PCR em Tempo Real .....	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	29
3.1	OBJETIVO GERAL .....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	29
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> .....	30
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	67
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	68
	<b>APÊNDICES</b> .....	76
	APENDICE A - TABELAS .....	77

## 1 INTRODUÇÃO

O grande aumento do número de casos de câncer faz com que essa seja uma das doenças que mais preocupam os médicos, pacientes e pesquisadores em todo o mundo. O câncer é uma doença genética causada por acúmulo de mutações nas células. Essas mutações podem ocorrer em protooncogenes ou em genes supressores tumorais, o que resulta em proliferação celular descontrolada e resistência à morte celular por apoptose. Essas características são importantes para a progressão e sobrevivência do tumor dentro do organismo (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Atualmente, as drogas citotóxicas envolvidas no tratamento do câncer destroem as células que apresentam alto nível de proliferação e regeneração celular (FEITELSON et al., 2015). Porém, essa citotoxicidade nem sempre é seletiva contra células tumorais e as células saudáveis também são afetadas, levando aos diversos efeitos colaterais da quimioterapia. Assim, o grande desafio da ciência é buscar novas drogas que apresentem atividade seletiva contra células tumorais, a fim de reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia e aumentar a eficiência do tratamento.

Em 2009, a salinomicina foi descoberta como um potente destruidor de células tronco de câncer de mama (GUPTA et al., 2009). Esse efeito foi 100 vezes mais eficiente que a droga paclitaxel, um quimioterápico comumente utilizado para o tratamento do câncer de mama. A destruição desse grupo específico de células é importante, já que elas são as responsáveis pela resistência à quimioterapia e reincidência da doença. Há relatos de que a salinomicina apresenta seletividade contra células tumorais, característica de grande interesse para o tratamento do câncer (FUCHS et al., 2009; GUPTA et al., 2009; KETOLA et al., 2012). Porém, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado.

Assim, devido à promissora atividade da salinomicina contra células tumorais, o presente trabalho avaliou os seus efeitos em duas linhagens celulares tumorais humanas e em uma linhagem celular não tumoral a fim de verificar a sua atividade seletiva. Dentre as linhagens tumorais, foram selecionadas uma linhagem de carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A), por ser uma linhagem proficiente em metabolização, e uma linhagem de adenocarcinoma de mama (MCF-7), devido à importância desse tipo de câncer em todo o mundo, sendo a principal causa de morte por câncer em mulheres. Foi selecionada, para este estudo, uma linhagem não tumoral de epitélio mamário (HB4a), a fim de comparar os efeitos da salinomicina em relação às linhagens tumorais. Com a finalidade de desvendar a seletividade e o mecanismo de ação da salinomicina, foram avaliados os seus efeitos quanto à

proliferação celular, citotoxicidade, genotoxicidade, ciclo celular, indução de morte celular e análise de expressão de genes relacionados a esses processos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 CÂNCER

O crescente número de casos de câncer pelo mundo cria uma necessidade pela busca por novas drogas antineoplásicas mais eficazes para o seu tratamento. Estimativas mundiais do projeto Globocan, da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) (FERLAY et al., 2013), mostram que surgiram 14,1 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de pessoas morreram de câncer em todo o mundo no ano de 2012 (TORRE et al., 2015). Os tipos mais frequentes são os cânceres de pulmão, mama, cólon e reto, próstata e estômago. No Brasil, dados do INCA (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva) mostram que 15,1% das mortes ocorridas em 2011 foram decorrentes de câncer. Estimativas para o ano de 2014 mostraram a ocorrência de 576 mil novos casos de câncer no país, incluindo os casos de câncer de pele não melanoma, o mais incidente na população brasileira (182 mil), 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).

O câncer de mama é o tipo mais frequentemente diagnosticado no mundo e é a principal causa de morte por câncer em mulheres, correspondendo a 1,67 milhões (25,1%) dos novos casos de câncer e a 522 mil (14,7%) de morte por câncer de mama em todo o mundo (FERLAY et al., 2013). No Brasil, a estimativa para o ano de 2014, válida também para o ano de 2015, é que surgissem 57.120 novos casos de câncer de mama no país (INCA, 2014). Em homens, o câncer de fígado é o quinto mais frequentemente diagnosticado no mundo, com 554 mil novos casos (7,5%), mas é a segunda causa de morte por câncer, matando 521 mil pessoas (11,2%) em todo o mundo (FERLAY et al., 2013). Em mulheres, é o sétimo mais frequentemente diagnosticado, com 228 mil novos casos (3,4%), e a sexta causa de morte, com 224 mil casos (6,3%) (FERLAY et al., 2013). No Brasil, o câncer de fígado foi a causa de morte de 8.100 pessoas, sendo 4.556 homens e 3.544 mulheres no ano de 2011 (INCA, 2014).

O câncer é uma doença caracterizada pela proliferação celular descontrolada. Em tecidos saudáveis, a integridade e função das células dependem de um equilíbrio estabelecido entre proliferação e morte celular. Quando este equilíbrio é perdido, as células passam a proliferar de forma descontrolada, formando uma massa de células que constitui um tumor primário. Esse aumento do número de células pode ser resultado do

aumento da proliferação celular ou da inibição da morte celular por apoptose. Para isso, as células cancerosas devem escapar de uma série de mecanismos celulares para continuar proliferando (FEITELSON et al., 2015).

O câncer é uma doença genética, já que ocorrem mutações em genes específicos, conferindo-lhe alguma vantagem seletiva em relação às demais células. Existem dois grandes grupos de genes relacionados ao câncer. O primeiro grupo é chamado de proto-oncogenes que, em condições normais, estimulam a proliferação celular. Esses genes, quando mutados, passam a ser chamados oncogenes, e têm sua atividade aumentada, resultando em proliferação celular descontrolada e desrespeitando todas as sinalizações celulares. O segundo grupo é chamado de genes supressores tumorais que, em condições normais, têm como função inibir a progressão do ciclo celular a fim de manter o equilíbrio do organismo. Esses genes, quando mutados, perdem a sua função, o que resulta no aumento da proliferação celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Como o câncer é uma doença resultante do acúmulo de mutações no material genético, a maioria dos agentes carcinogênicos são indutores de danos no DNA. Esses agentes podem ser físicos, químicos ou biológicos (CHOY, 1996). A mutagênese é a ciência que estuda esses agentes indutores de danos no DNA e, por isso, está fortemente relacionada com a carcinogênese. Como a maioria dos agentes carcinogênicos são também mutagênicos, a identificação desses agentes no meio ambiente ou alimentos é de grande importância para a prevenção de diversos cânceres.

Por outro lado, a indução de danos no DNA também é utilizada como uma das estratégias para eliminar as células de um tumor. Muitas das drogas antineoplásicas utilizadas atualmente são citotóxicas e atuam no material genético das células tumorais causando mutações e, conseqüentemente, levando à morte celular. Esse é o caso da doxorrubicina, um quimioterápico citotóxico que vem sendo utilizado há mais de 30 anos. Ela pertence ao grupo das antraciclina e age intercalando-se no DNA e inibindo as topoisomerasas I e II, levando a uma série de danos no DNA e, conseqüentemente, à morte por apoptose (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013). Apesar de sua eficiência no tratamento de diversos tipos de câncer, a doxorrubicina não possui atividade seletiva contra células tumorais e sua toxicidade é conhecida em tecidos saudáveis (CARVALHO et al., 2009), enfatizando a toxicidade cardíaca (JONES; SWANTON; EWER, 2006). Devido aos seus efeitos colaterais, o uso das antraciclina vem diminuindo nos últimos anos (GIORDANO et al., 2012). Esses efeitos colaterais ocorrem porque a quimioterapia, assim como a radiação, tem como objetivo destruir todas as células que se dividem rapidamente

(RAMASWAMI; HARDING; NEWSOM-DAVIS, 2013). Infelizmente, isto também afeta células saudáveis do indivíduo, como a pele, células do trato digestivo e folículos pilosos, causando uma série de efeitos colaterais, resultados do elevado nível de toxicidade associado a esses tratamentos (FEITELSON et al., 2015).

A quimioterapia pode ser administrada via intravenosa ou oralmente em dois momentos, antes ou após a cirurgia. Quando a quimioterapia é administrada antes da cirurgia, o tratamento é chamado de neoadjuvante, e auxilia na redução da massa tumoral. Já o uso da quimioterapia após o procedimento cirúrgico, é chamado de tratamento adjuvante, que auxilia na destruição de células remanescentes (SCHMIDT, 2014). A cirurgia é o tratamento mais antigo e eficaz, já que é um método direto que evita a invasividade para outros tecidos, removendo o tumor.

A fim de diminuir os efeitos colaterais nas células saudáveis, outros tratamentos direcionados para as propriedades biológicas das células cancerosas foram surgindo (RAMASWAMI et al., 2013). O tratamento de câncer de mama HER2 positivo (*Human Epidermal growth factor Receptor 2*) com o medicamento trastuzumab (Herceptin®) é um exemplo. Nesse tipo de tumor, que corresponde a 20% dos casos de câncer de mama, há um aumento de receptores HER2 na superfície celular, que estimulam a proliferação celular. O trastuzumab é uma droga baseada em anticorpos monoclonais, que se liga aos receptores, bloqueando o sinal para a divisão celular. A combinação de trastuzumab com lapatinib é ainda mais eficaz, já que o lapatinib é um inibidor de tirosina quinase específico do HER2 e gera acúmulo deste na superfície das células tumorais, potencializando o efeito do trastuzumab (RAMASWAMI et al., 2013). Para pacientes em estágio avançado da doença, indica-se o tratamento com sorafenib (Nexavar®), um inibidor de tirosina quinase (KEATING; SANTORO, 2009).

Uma vez identificada a grande influência hormonal em alguns tipos de câncer de mama, outras estratégias foram criadas e surgiram estudos com o tamoxifeno, que atua como um competidor do estrógeno pelo sítio de ligação dos receptores (SMITH, 2014). Outro grupo de drogas consideradas fundamentais no tratamento do câncer de mama é o dos taxanos, como paclitaxel e docetaxel. Elas se ligam à tubulina, promovem estabilização dos microtúbulos e causam parada do ciclo celular na fase G2/M (SALOUSTROS; MAVROUDIS; GEORGOULIAS, 2008). O desenvolvimento de conjugados anticorpo-droga visa juntar a especificidade dos anticorpos com a eficiente citotoxicidade dos agentes quimioterápicos, gerando resultados mais eficazes para o tratamento do câncer (CHARI,

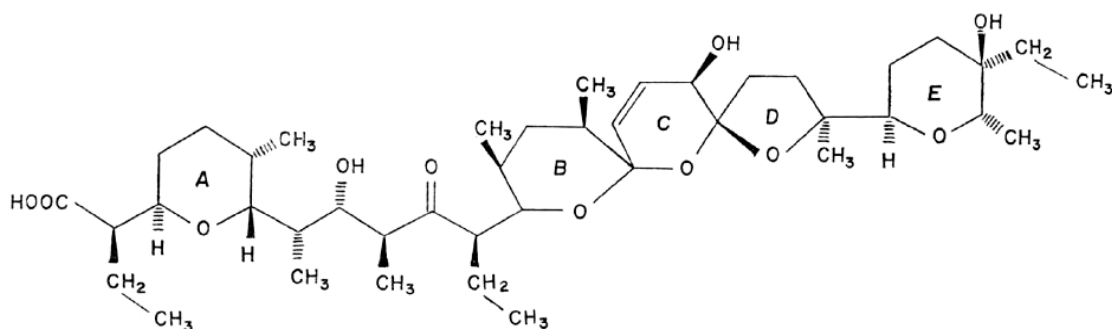
2008). Esses dados mostram a importância de um tratamento com maior seletividade contra o câncer, melhorando a eficiência e diminuindo os efeitos colaterais do tratamento.

Já o câncer de fígado geralmente é resistente a maioria das drogas quimioterápicas. O tratamento padrão potencialmente curativo é por ressecção ou transplante (PANG; LAM, 2015). As drogas que apresentam melhores efeitos são a doxorrubicina, 5-fluorouracil e cisplatina (*American Cancer Society*). O 5-fluorouracil é um análogo de pirimidina que pode ser erroneamente incorporado ao DNA ou RNA no lugar de uracil ou timidina (ZHANG, N. et al., 2008). Já a cisplatina é um agente que causa danos no DNA, formando aductos, resultando em parada do ciclo celular e indução de morte por apoptose (JORDAN; CARMO-FONSECA, 2000). A dificuldade no tratamento e a ausência de drogas seletivas contra o câncer de fígado tornam a busca por novas drogas uma importante linha de pesquisa médica. Assim, a busca por drogas seletivas contra células tumorais e desvendar seus mecanismos de ação são objetivos de diversos pesquisadores em todo o mundo.

## 2.2 SALINOMICINA

A salinomicina é um antibiótico ionóforo produzido pela fermentação de *Streptomyces albus* como um poliéter monocarboxílico de 751 Da. Atua nas membranas plasmáticas e mitocondriais com seletividade para íons alcalinos e preferência para potássio (KIM, J. H. et al., 2012). Foi descrita em 1974 por Miyazaki et al. como uma molécula pentacíclica fracamente ácida e de fórmula molecular  $C_{42}H_{70}O_{11}$  (Figura 1).

**Figura 1** - Estrutura da salinomicina.



Fonte: (MIYAZAKI et al., 1974).

A salinomicina atua contra bactérias gram-positivas que incluem micobactérias e alguns fungos filamentosos, interferindo no fluxo iônico através das membranas bacterianas (IVANOVA et al., 2011; MIYAZAKI et al., 1974). É utilizada para o

tratamento de coccidiose em aves domésticas (galinhas, perus e codornas) e em ruminantes (IVANOVA et al., 2011; LI, Y. et al., 2010). A coccidiose é uma doença contagiosa causada por protozoários do gênero *Eimeria* e que ocasiona lesões intestinais resultando em diarreia e outros problemas relacionados (MATABUDUL; CROSBY; SUMAR, 1999). Além de tratar a coccidiose, a salinomicina também é utilizada para melhorar a eficiência de produção de gado através da alteração da composição microbiana ruminal (CALLAWAY et al., 2003).

A salinomicina é o princípio ativo do anticoccídeo Coxistac 120®. Sua ação afeta o desenvolvimento de esporozoítos, trofozoítos e esquizontes imaturos dentro das células da mucosa intestinal durante o 2º ao 4º dias após a infecção em aves. Em bovinos e suínos, altera as proporções de ácidos graxos voláteis que são produzidos, favorecendo a produção de ácido propiônico, uma fonte de energia mais eficiente. Salinomicina também é indicada como complemento alimentar para animais, pois aumenta a absorção de nutrientes no intestino grosso através da alteração do fluxo sanguíneo portal (Coxistac 120).

Segundo Bergen e Bates (1984), o modo de ação dos ionóforos está no fluxo de íons transmembrana e na dissipação de gradientes de cátion e proteína. Todos os seus efeitos parecem ser fenômenos secundários causados por essa disrupção da fisiologia normal da membrana.

### 2.2.1 Salinomicina e Câncer

Atualmente, o desafio da ciência é encontrar uma droga que seja capaz de destruir todas as células do tumor, incluindo as células tronco do câncer, acabando definitivamente com a doença e impedindo sua reincidência. Com essa finalidade, Gupta et al. (2009) estudaram cerca de 16.000 compostos e encontraram na salinomicina os melhores resultados. Nesse trabalho, a salinomicina foi eficiente em matar seletivamente as células tronco de câncer de mama de forma 100 vezes mais eficiente que a droga paclitaxel, um quimioterápico comumente utilizado no tratamento deste tipo de câncer. Células tronco de câncer de mama tratadas com salinomicina diminuíram sua capacidade de desenvolver tumores quando injetadas em camundongos, ocorrendo diminuição de metástase. Em camundongos previamente injetados com outras células de câncer de mama humano e tratados com salinomicina desenvolveram tumores menores e com menor número de células tronco de câncer, em comparação com camundongos tratados com a droga controle paclitaxel. Gupta et al. (2009) sugerem que, embora tenha se observado a alta seletividade da salinomicina por células tronco de câncer, um tratamento eficaz contra o câncer deve buscar

agentes que atuam sobre as células tronco e também sobre as demais células do tumor. Outra alternativa seria a combinação de terapias com agentes com toxicidade seletiva para células tronco de câncer, junto com outros agentes com toxicidade específica para as demais células do tumor (GUPTA et al., 2009).

Após a surpreendente descoberta de Gupta et al. (2009), vários outros estudos avaliaram os efeitos da salinomicina contra o câncer e alguns mecanismos foram descritos. Fuchs et al. (2009) demonstraram que a salinomicina é capaz de induzir apoptose sem atrasar o ciclo celular e de forma independente de p53, eliminando inclusive as células resistentes à apoptose, através do aumento de expressão de *BCL-2*. Os autores sugerem a salinomicina como uma droga antineoplásica promissora, já que, além de matar as células tronco de câncer, resultado mostrado por Gupta et al. (2009), também é capaz de induzir apoptose em células de câncer humano, superando os seus vários mecanismos de resistência à apoptose. O mesmo grupo de pesquisa relatou o efeito da salinomicina em células tronco de leucemia resistentes à apoptose (FUCHS et al., 2010).

Um dos mecanismos de resistência à droga mais importante em células tronco de câncer é a expressão de transportadores ATP (*ATP-binding cassette transporters*), que são proteínas transmembrana capazes de exportar uma grande variedade de moléculas e drogas quimioterápicas do citosol, conferindo multirresistência das células a drogas. A salinomicina induziu apoptose de forma dose-dependente em linhagem celular sensível a apoptose (células KG-1) e em linhagens resistentes à apoptose (células KG-1a e KG-1a (PB)) (FUCHS et al., 2010). Esses dados mostram que a salinomicina é capaz de superar a resistência à apoptose, efeito de grande importância já que eliminaria as células resistentes e reduziria a chance de reincidência da doença.

Kim et al. (2011) também relataram indução de morte por apoptose pela salinomicina. Eles demonstraram que a salinomicina diminuiu a viabilidade de células de câncer de próstata dependentes de andrógeno (LNCaP) e independentes de andrógeno (PC-3 e DU-145) de modo dose-dependente. Apoptose precoce e tardia e necrose foram observadas em células PC-3 tratadas com salinomicina, que ativou caspase-3, induziu clivagem de PARP-1, diminuiu a expressão da proteína Bcl-2 e aumentou a expressão de Bax (KIM, K. Y. et al., 2011). A indução de morte observada pode ter sido resultado do aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio que foi acompanhado pela diminuição do potencial de membrana da mitocôndria e aumento da atividade de caspase-3 de células PC-3 (KIM, K. Y. et al., 2011).

Estudos também relataram que a salinomicina é capaz de inibir a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina em células tronco de câncer gástrico (MAO et al., 2014), em células de leucemia linfocítica crônica (LU, D. et al., 2011), osteosarcoma (TANG et al., 2011) e em células de câncer de mama e de próstata (LU, W.; LI, 2014). A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina resulta na ativação de genes que controlam o ciclo celular, diferenciação e sobrevivência (POLAKIS, 2000). Apesar de ainda incerto, alguns mecanismos foram descritos para justificar a inibição dessa via de sinalização. Um dos motivos seria o acúmulo intracelular de íons  $\text{Ca}^{2+}$ . A salinomicina, por ser um ionóforo, altera o fluxo de íons através das membranas plasmáticas e mitocondriais, gerando acúmulo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, o que pode inibir a via Wnt/ $\beta$ -catenina (LU, D.; CARSON, 2009). Ainda foi relatado que a salinomicina bloqueia a fosforilação do correceptor de Wnt, a proteína LRP6 (proteína relacionada à lipoproteína 6) e induz sua degradação em células HEK293 Wnt-transfectadas (LU, D. et al., 2011). Ainda foi relatado que a salinomicina é capaz de reduzir a expressão de genes alvo da via Wnt/ $\beta$ -catenina, como LEF1, Ciclina D1 e fibronectina, e demonstrou atividade seletiva contra células tumorais, já que não foi citotóxica em amostras de sangue periférico de pacientes saudáveis. Supressão da expressão de LRP6 também foi relatada por Lu e Li (2014), que mostraram que a salinomicina reduz a expressão de ciclina D1 e survivina, genes alvo da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina.

Indução de danos no DNA compreende outro importante mecanismo de indução de morte celular. Kim et al. (2011) relataram que a salinomicina é capaz de sensibilizar células expostas à radiação, potencializando seu efeito. Essa sensibilização ocorreu pelo aumento de danos no DNA e redução dos níveis de p21, mecanismo similar à sensibilização ocorrida por doxorrubicina ou etoposide (KIM, W. K. et al., 2012). A salinomicina ainda inibiu a atividade da glicoproteína-P, responsável pela redução de danos celulares através do efluxo de drogas antineoplásicas (KIM, W. K. et al., 2012). A salinomicina sensibilizou também células resistentes ao verapamil, um conhecido inibidor de glicoproteína-P, indicando sua maior eficiência na sensibilização em relação ao verapamil (KIM, W. K. et al., 2012).

Os valores de  $\text{IC}_{50}$ , concentração que inibe 50% da população celular, são úteis na comparação de sensibilidade de diferentes linhagens expostas a uma droga de interesse. Cybulski et al. (2015) definiram o  $\text{IC}_{50}$  da salinomicina em células de hepatoma humano HepG2 após 24 horas de tratamento. Na densidade de 25.000 células, o  $\text{IC}_{50}$  encontrado foi de 13,9  $\mu\text{M}$ . Já na linhagem de adenocarcinoma de mama MCF-7, o  $\text{IC}_{50}$  da salinomicina foi definido por Al Dhaheri et al. (2013) após 24 e 48 horas de tratamento. Na

densidade de 5.000 células, os valores de IC<sub>50</sub> foram de 40 µM (24 horas) e 15 µM (48 horas). O IC<sub>50</sub> da salinomicina também foi definida em algumas linhagens de células de próstata (KETOLA et al., 2012). Células de carcinoma de próstata (VCaP) foram muito sensíveis à salinomicina, apresentando IC<sub>50</sub> de 380 nM. Outras linhagens de carcinoma de próstata (LNCaP, PC-3 e DU 145) apresentaram IC<sub>50</sub> acima de 1 µM. Em contrapartida, células epiteliais não malignas de próstata (RWPE-1, EP156T e PrEC) foram mais resistentes à salinomicina, com valores de IC<sub>50</sub> acima de 10 µM, indicando a seletividade da salinomicina contra células tumorais de próstata (KETOLA et al., 2012). A maior eficiência da salinomicina contra células que apresentam resistência à morte foi verificada por Zhou et al. (2013), onde o valor de IC<sub>50</sub> da salinomicina em células de câncer colorretal humano (SW620) de 1,54 µM foi comparado com o IC<sub>50</sub> de células SW620 resistentes à cisplatina de 0,32 µM.

Há vários relatos dos efeitos da salinomicina em células tumorais de mama MCF-7 (AL DHAHERI et al., 2013; GONG et al., 2010; OAK et al., 2012; VERDOODT et al., 2012; ZHANG, Y. et al., 2012). Gong et al (2010) avaliaram a associação entre a proporção de células iniciadoras do tumor mamário (*Breast Tumor Inicial Cells* - BT-ICs) com a quimioresistência dos tumores. Eles verificaram que a salinomicina reduz a proporção de BT-ICs em cerca de 50 vezes e aumenta a sensibilidade das células tumorais mamárias à quimioterapia em cerca de 30 vezes. Oak et al. (2012) demonstraram que a salinomicina reduz a expressão do gene *SOX2*, o que indica que a salinomicina possui ação seletiva contra células tronco de câncer. Ainda verificaram que o tratamento com salinomicina associado com trastuzumab foi mais eficiente, sugerindo uma nova estratégia de tratamento contra o câncer de mama. Zhang et al. (2012) também verificaram a ação da salinomicina contra células tronco de câncer e novas estratégias de tratamentos combinados foram sugeridas para combater todas as células tumorais de mama, inclusive as células tronco do câncer. Outros mecanismos, como indução de autofagia concomitante com indução de espécies reativas de oxigênio em células MCF-7 foram demonstradas por Verdoodt et al. (2012).

Apesar dos vários trabalhos sugerindo a salinomicina como promissora terapia de diversos cânceres, vários autores relataram toxicidade em humanos (STORY; DOUBE, 2004), gatos (VAN DER LINDE-SIPMAN et al., 1999), bezerros (OMIDI et al., 2010), cavalos (ROLLINSON; TAYLOR; CHESNEY, 1987), porcos (KAVANAGH; SPARROW, 1990) e perus (GRIFFITHS; HILLIER; SUTHERLAND, 1989).

Analisando os dados da literatura, é possível concluir que a salinomicina apresenta diferentes efeitos dependendo da linhagem celular e da concentração utilizada.

Assim, seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. Devido aos promissores efeitos da salinomicina contra células tumorais mais estudos são necessários para desvendar seu mecanismo de ação. Porém, como há relatos descrevendo efeitos tóxicos da salinomicina em animais, é de grande importância avaliar seus possíveis efeitos colaterais antes de indicá-la como droga quimioterápica.

## 2.3 FERRAMENTAS PARA INVESTIGAÇÃO DE NOVAS DROGAS QUIMIOTERÁPICAS

### 2.3.1 Cultura de Células

A cultura de células é uma importante ferramenta na pesquisa de novas drogas antineoplásicas. A grande vantagem é a possibilidade de controlar as condições de cultura, como quantidade de nutrientes, temperatura e disponibilidade de CO<sub>2</sub>, além de substituir animais de experimentação, eliminando uma série de questões relacionadas à ética experimental.

A cultura de células permanente permite o cultivo por prazo indeterminado, facilitando a continuidade dos experimentos. Grande parte das linhagens celulares permanentes são derivadas de tumores humanos e de outros animais. A cultura de células tumorais é de grande importância na pesquisa para o tratamento do câncer, já que novas drogas candidatas podem ser avaliadas quanto à capacidade de destruir células tumorais *in vitro*.

Uma linhagem celular muito utilizada por vários pesquisadores em todo o mundo é a linhagem de carcinoma hepatocelular, chamada HepG2/C3A. Essa linhagem é um clone derivado da linhagem HepG2 que foi selecionado pela inibição de crescimento por contato, alta produção de albumina e alfa fetoproteína (AFP) e habilidade de crescer em meio deficiente em glicose (Banco de Células do Rio de Janeiro). Ela foi extraída de um tumor de um adolescente caucasiano de 15 anos de idade. A grande vantagem dessa linhagem é a sua capacidade de metabolização, expressando genes da família citocromo P450 (CYPs), que desempenham importante papel no metabolismo de drogas (CHEN et al., 2014).

Devido ao grande número de casos de câncer de mama em todo o mundo, linhagens celulares de tumor de mama tornaram-se ferramentas fundamentais na pesquisa contra o câncer. A linhagem MCF-7, desenvolvida no instituto *Michigan Cancer Foundation*, é uma linhagem tumoral de mama isolada de uma paciente caucasiana de 69 anos de idade com carcinoma mamário metastático (LEVENSON; JORDAN, 1997). A linhagem foi

estabelecida por Soule et al (1973) através do isolamento de células em suspensão de uma efusão pleural. As células MCF-7 são hormônio-responsivas (LEVENSON; JORDAN, 1997) e apresentam o gene TP53 selvagem (SMARDOVA et al., 2005), características de grande utilidade na pesquisa contra o câncer.

Quando a proposta é avaliar a atividade seletiva de uma droga contra células tumorais, é fundamental a utilização de uma linhagem não tumoral a fim de comparar os efeitos. A linhagem de epitélio mamário humano imortalizado, HB4a, é uma delas. Ela foi isolada por Stamps et al. (1994) de tecido mamário de uma doadora de 18 anos de idade. A capacidade proliferativa dessa linhagem foi obtida por meio de infecção das células por retrovírus. A estabilidade dessa linhagem foi verificada através do crescimento por pelo menos 150 passagens, onde nenhuma alteração nos padrões de bandas de hibridização proviral genômico foi encontrada (STAMPS et al., 1994).

### 2.3.2 Avaliação de Proliferação Celular e Citotoxicidade

Em estudos que buscam novas drogas antineoplásicas também é importante avaliar a cinética da proliferação das células quando expostas ao composto de interesse. A análise celular em tempo real (*Real Time Cell Analyzer - RTCA*) *xCELLigence* (Roche Diagnostics) permite avaliar o crescimento das células expostas ou não ao composto de interesse em tempo real. Isso é possível devido aos microeletrodos de ouro acoplados na base de uma placa de cultura de 96 poços, chamada *E-Plate*. Esses eletrodos são conectados a um computador que mede as diferenças de impedância dentro de um circuito elétrico (MARTINEZ-SERRA et al., 2014). A impedância reflete alterações na aderência ou desprendimentos das células do poço, além de alterações na morfologia das células (ROSHAN MONIRI et al., 2015). Esses dados são convertidos em um valor de índice celular, de modo que quanto maior a área da superfície do poço ocupada pelas células, maior será o valor de índice celular.

O ensaio RTCA permite analisar as células de forma ininterrupta durante todo o curso do experimento (ROSHAN MONIRI et al., 2015). Essa é a grande vantagem em relação aos testes convencionais, que detectam os efeitos de uma droga nas células apenas no ponto final, onde efeitos importantes podem ser perdidos entre os pontos de leitura.

Uma vez verificada diminuição do índice celular pelo ensaio RTCA, é necessário investigar se a causa dessa diminuição foi por parada do crescimento celular (efeito citostático) ou por morte celular (efeito citotóxico). O ensaio de citotoxicidade MTT (3-(4,5-

dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um método amplamente utilizado para a análise de citotoxicidade, viabilidade celular e proliferação de células vivas (MOSMANN, 1983). Nas células vivas, o sal de tetrazolium MTT é reduzido a formazan (1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difenilformazan) que pode ser analisado colorimetricamente em espectrofotômetro. A redução do MTT é geralmente atribuída à atividade mitocondrial, portanto, a reação ocorre apenas em células vivas. Dessa forma, quanto maior o valor da absorbância maior será o número de células viáveis. Desses ensaios surgem os primeiros resultados na investigação de uma nova droga antineoplásica, permitindo selecionar as concentrações que apresentaram os efeitos mais satisfatórios.

### 2.3.3 Avaliação de Genotoxicidade

Uma vez detectada alteração na curva de crescimento das células pelo ensaio RTCA e diminuição de viabilidade pelo ensaio MTT, é preciso investigar o motivo dessa alteração. A queda da curva de crescimento pode ser resultado de parada de ciclo celular ou indução de morte celular. Um dos fatores que pode levar à parada de ciclo celular é a ocorrência de danos no DNA induzidos pela droga de interesse. O ensaio do cometa (*Single cell gel electrophoresis* – SCGE) é utilizado para detectar substâncias genotóxicas (SINGH et al., 1988). Este ensaio não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões genotóxicas detectadas pelo ensaio do cometa são passíveis de reparo.

Neste método, as células são ressuspensas em agarose de baixo ponto de fusão, lisadas, submetidas a eletroforese sob condições alcalinas, neutralizadas e fixadas em etanol absoluto. A análise é feita em microscopia de fluorescência após coloração com brometo de etídeo. Quanto maior o comprimento da cauda do nucleóide, maior é a fragmentação do DNA e, portanto, maior é o dano genotóxico. Os nucleóides são classificados em classes 0 a 3 de acordo com a intensidade de danos no DNA, como mostra a Figura 2.

**Figura 2 -** Ensaio do cometa. Imagem dos nucleóides em microscopia de fluorescência. Classificação dos nucleóides em classes 0, 1, 2 e 3, de acordo com a intensidade dos danos genotóxicos. Aumento de 400x.

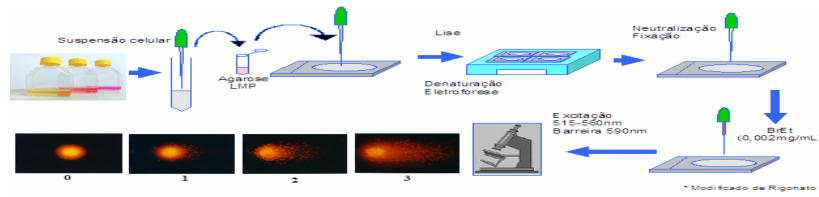


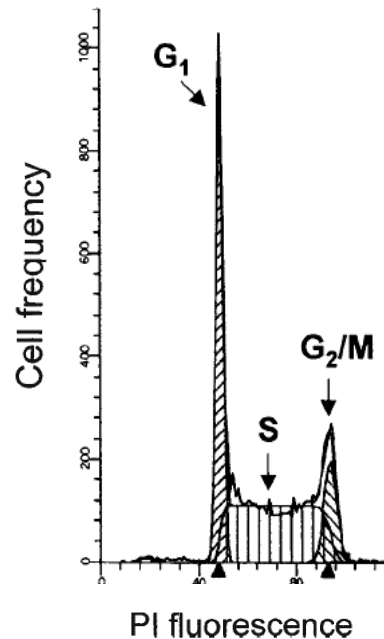
Fig. 3. Etapas do Ensaio do Cometa e a análise em microscopia óptica, mostrando as 4 classes de danos no DNA: 0, 1, 2 e 3.

#### 2.3.4 Avaliação de Ciclo Celular e Apoptose por Citometria de Fluxo

Danos no DNA podem resultar em parada do ciclo celular para que os danos sejam reparados ou para que a célula seja encaminhada para o processo de morte celular. Nesse contexto, a citometria de fluxo é uma metodologia capaz de investigar esses dois processos (POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ, 2004; WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2012). Essa técnica tem como princípio avaliar a morfologia e a composição celular. A citometria utiliza fluorocromos e lasers que detectam as características celulares individuais.

Para análise do ciclo celular, o conteúdo de DNA é detectado por marcação com iodeto de propídeo (*Propidium Iodide* – PI), onde a intensidade da fluorescência é proporcional à quantidade de DNA. Assim, é possível quantificar a porcentagem de células que estão nas fases G1, S e G2/M, como mostra a Figura 3.

**Figura 3** - Análise do ciclo celular por citometria de fluxo. Histograma mostrando o conteúdo de DNA por fluorescência de iodeto de propídeo (PI).



Fonte: POZAROWSKI; DARZYNKIEWICZ (2004), com modificações.

Apoptose ou morte celular programada é um processo fisiológico essencial que desempenha um papel crítico no controle do número de células no desenvolvimento e por toda a vida de um organismo através da remoção de células em momentos apropriados. Entretanto, apoptose também está envolvida em diversas condições patológicas, incluindo lesões neurológicas agudas, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares, doenças imunológicas, síndrome de imunodeficiência adquirida e câncer. Portanto, o conhecimento sobre os mecanismos envolvidos na apoptose pode ser importante no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001).

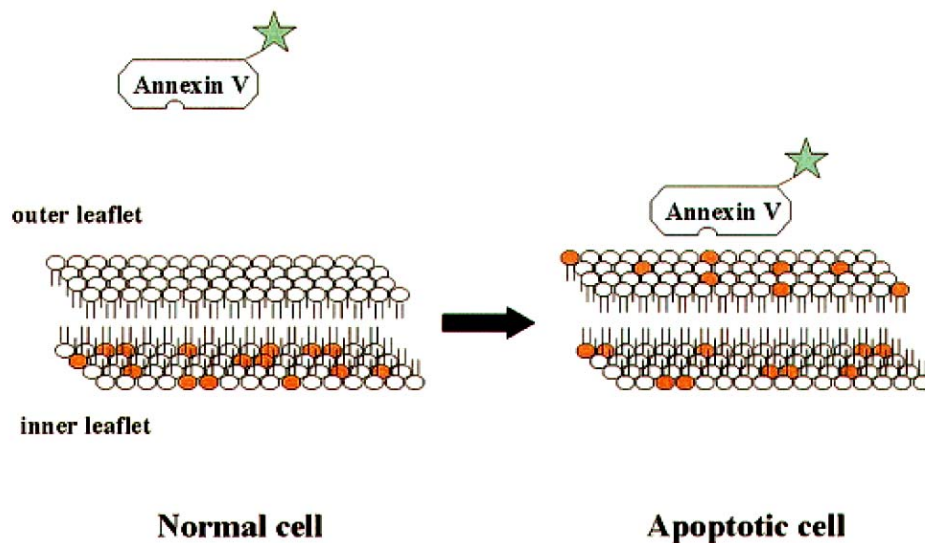
Apoptose foi descrita primeiramente por Kerr et al. em 1972, e é definida por uma aparência morfológica das células em morte, que inclui o aparecimento de *blebs* (bolhas), condensação da cromatina, fragmentação nuclear, perda de aderência e arredondamento (em células aderentes) e retração das células. Não ocorre processo inflamatório durante a morte por apoptose e, dessa forma, é um dos modos mais adequados para eliminar as células tumorais do organismo.

A maioria dos medicamentos atualmente utilizados na terapia anticâncer mata as células-alvo por indução de apoptose, tanto por via mediada por receptor, quanto por via mitocondrial (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2005). Dessa forma, a identificação de novos compostos que sejam capazes de induzir apoptose de forma seletiva

em células cancerosas é uma importante ferramenta na busca por novas terapias contra o câncer.

A análise de morte por apoptose pode ser realizada por marcação com Anexina V (AV) e iodeto de propídeo (PI) por citometria de fluxo. Durante o processo de apoptose, ocorre o deslocamento do fosfolípido fosfatidilserina (*Phosphatidylserine* - PS) para a face externa da membrana plasmática, antes da perda de integridade da membrana plasmática (LECOEUR; PREVOST; GOUGEON, 2001), como mostra a Figura 4. A anexina V liga-se aos resíduos de PS e, através da conjugação com o fluorocromo FITC (*Fluorescein Isothiocyanate* - Isotiocianato de Fluoresceína), emite fluorescência detectada por filtro FL1 (520 nm) (ELMORE, 2007).

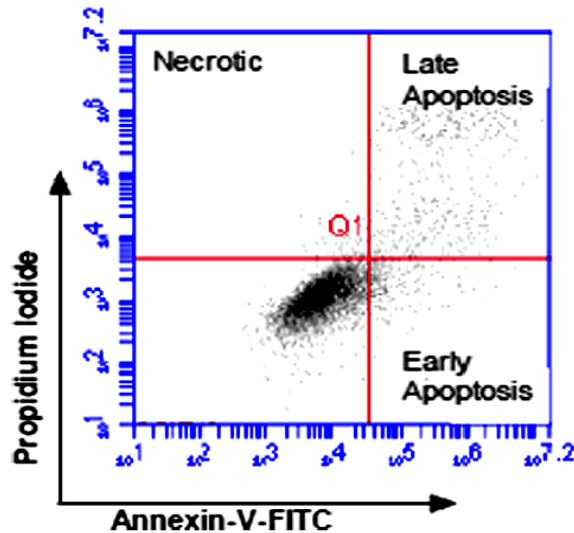
**Figura 4 -** Representação esquemática da exposição de fosfatidilserina (PS) durante a apoptose. Células viáveis mantêm a composição assimétrica da bicamada lipídica, com os resíduos de PS (círculos alaranjados) na camada interna da membrana plasmática. Durante a apoptose, moléculas de fosfatidilserina ficam expostas no folheto externo da membrana. Anexina V liga-se com alta afinidade à PS exposta. A estrela verde representa o fluorocromo FITC conjugado à Anexina V



Fonte: VAN ENGELAND et al. (1998).

O iodeto de propídeo somente é capaz de penetrar em células inviáveis, que perderam a integridade da membrana plasmática. Assim, o PI penetra nas células inviáveis e liga-se ao DNA, emitindo fluorescência detectada por filtro FL3 (610 nm) (KRYSKO et al., 2008). A combinação de anexina V-FITC (AV) e PI permite diferenciar células viáveis (AV-/PI-), células em apoptose inicial (AV+/PI-) e células em apoptose tardia/necrose (AV+/PI+ e AV-/PI+), como mostra a Figura 5.

**Figura 5 -** Detecção de morte celular por citometria de fluxo. No quadrante inferior à esquerda, estão representadas as células viáveis (AV-/PI-). Células em apoptose inicial são marcadas apenas com AV (quadrante inferior à direita), células em apoptose final/necrose são marcadas com PI (quadrantes superiores).



Fonte: FAHRMANN; HARDMAN (2013).

### 2.3.5 Expressão Gênica – RT-PCR em Tempo Real

Baseada na reação em cadeia da polimerase, a técnica de RT-PCR em tempo real permite o monitoramento dos produtos de PCR em “tempo real”, ou seja, assim que são gerados (VALASEK; REPA, 2005). Nesse método, o RNA total é extraído das células e é convertido em cDNA (DNA complementar) através da enzima transcriptase reversa. O cDNA é encaminhado para a PCR em tempo real juntamente com os *primers* referentes aos genes de interesse. Ensaios baseados em RT-PCR em tempo real atualmente são os métodos mais comuns para caracterização e confirmação de padrões de expressão gênica e para comparar níveis gênicos em diferentes populações (MOCELLIN et al., 2003). Assim, é possível avaliar a diferença nos níveis de expressão gênica de células tratadas com um composto de interesse em relação a células não tratadas. Informações sobre o mecanismo de ação de novas drogas podem ser investigadas através dessa metodologia.

Uma das abordagens na Genética Toxicológica é a investigação da expressão de genes associados com a resposta a danos no DNA em células tratadas com o composto teste. Danos no DNA podem acarretar em parada do ciclo celular, apoptose e reparo do material genético. Utilizando a metodologia da RT-PCR em tempo real é possível analisar a expressão e o papel dos genes relacionados a esses processos celulares.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Devido à promissora utilidade da salinomicina na terapia do câncer, compreende-se a necessidade de avaliar a proliferação celular, citotoxicidade, genotoxicidade e indução de morte em linhagens celulares tumorais e não tumorais, assim como estudar a expressão de genes da via de sinalização de danos no DNA, ciclo celular e apoptose. Os dados visam verificar se há seletividade para células tumorais e poderão auxiliar no entendimento dos mecanismos de ação da salinomicina em experimentos *in vitro*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar o efeito antiproliferativo da salinomicina, através da análise de proliferação celular em tempo real (ensaio RTCA), em células HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a durante 96 horas de tratamento;
- ✓ Avaliar o efeito citotóxico da salinomicina, pelo ensaio de citotoxicidade MTT, em células HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a tratadas por 24, 48 e 72 horas;
- ✓ Avaliar o potencial genotóxico da salinomicina, pelo ensaio do cometa, em células HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a após 3 horas de tratamento;
- ✓ Avaliar a distribuição das células HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a nas fases do ciclo celular (G1, S, G2/M) após exposição à salinomicina, por citometria de fluxo;
- ✓ Avaliar o potencial de indução de morte celular em células HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a após exposição à salinomicina, por citometria de fluxo;
- ✓ Analisar a expressão de genes da via de sinalização de danos no DNA, ciclo celular e apoptose em células HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a expostas à salinomicina, pela técnica RT-PCR em tempo real.

**4 ARTIGO**

**Seletividade da salinomicina na indução de morte de células tumorais humanas por aumento dos níveis transcricionais de *GADD45A* e *CDKN1A*, parada de ciclo celular em G2/M e repressão de *BCL-2***

**Artigo submetido ao periódico *Mutagenesis***

**Seletividade da salinomicina na indução de morte de células tumorais humanas por aumento dos níveis transcricionais de *GADD45A* e *CDKN1A*, parada de ciclo celular em G2/M e repressão de *BCL-2***

Niwa, AM<sup>1</sup>; D'Epiro GFR<sup>1</sup>; Marques, LA<sup>1</sup>; Semprebon, SC<sup>1</sup>; Sartori D<sup>1</sup>; Mantovani, MS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina.

\* Me. Andressa Megumi Niwa  
Laboratório de Genética Toxicológica  
Departamento de Biologia Geral – CCB  
Universidade Estadual de Londrina – Campus Universitário  
P.O. Box 10.011, Londrina, Paraná, Brasil.  
CEP: 86.057-970  
e-mail: andressamn@yahoo.com.br  
Phone: 55 43 3371-4977

## RESUMO

A busca por drogas anticâncer mais eficazes tem embasado os pesquisadores a estudarem a salinomicina, um antibiótico ionóforo, que destrói células tronco de câncer de forma seletiva. Esse promissor enfoque nos levou a estudar a salinomicina avaliando duas linhagens celulares humanas tumorais, adenocarcinoma de mama (MCF-7) e carcinoma hepatocelular (HepG2/C3A), comparando com uma linhagem não tumoral de mama (HB4a). A avaliação da proliferação celular em tempo real mostrou que as células não tumorais HB4a apresentaram maior resistência à salinomicina em relação às linhagens tumorais, dados também obtidos no ensaio de citotoxicidade. Os valores de  $IC_{50}$  mostram a maior sensibilidade das células MCF-7 à salinomicina. Na detecção de indução de danos no DNA pelo ensaio do cometa, apenas as células MCF-7 foram positivas. A análise por citometria de fluxo mostrou que somente as linhagens tumorais foram induzidas à morte celular por apoptose/necrose. Aumento da expressão dos genes *GADD45A* (HepG2/C3A>HB4a>MCF-7) e *CDKN1A* (HB4a>HepG2/C3A>MCF-7) foi observado em todas as linhagens celulares. Nas células tumorais, houve diminuição da expressão dos genes *CCNA2* e *CCNB1*, resultando em parada do ciclo celular em G2/M. Como consequência da parada do ciclo celular, as células tumorais foram encaminhadas para morte através de acentuada repressão de *BCL-2*, com regulação do gene *BAK* nas células HepG2/C3A e via inibição dos genes *BCL-XL* e *BIRC5* nas células MCF-7. Esses dados contribuem para a elucidação do mecanismo de ação da salinomicina como uma promissora droga antitumoral pela sua atividade seletiva. Portanto, verificou-se que as células tumorais foram encaminhadas à apoptose envolvendo diferentes marcadores moleculares e, pela primeira vez, observou-se a maior resistência à salinomicina das células não tumorais de mama HB4a.

Palavras-chave: salinomicina, câncer, citotoxicidade, genotoxicidade, apoptose.

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das doenças que mais preocupam os pesquisadores devido a sua crescente incidência em todo o mundo. Um dos fatores que dificultam o tratamento do câncer é a resistência à quimioterapia e a reincidência da doença. Além disso, a maioria das drogas anticâncer atuais não atuam seletivamente contra as células tumorais, levando também a morte de células saudáveis e produzindo uma série de efeitos colaterais (CHARI, 2008).

Nesse contexto, encontra-se a salinomicina, um antibiótico ionóforo produzido pela fermentação de *Streptomyces albus*, descrita pela primeira vez por Miyazaki e colaboradores em 1974 (MIYAZAKI et al., 1974). A salinomicina é utilizada para o tratamento de coccidiose em aves domésticas (galinhas, perus e codornas) e em ruminantes (IVANOVA et al., 2011; LI, Y. et al., 2010). Além disso, é utilizada como aditivo alimentar em gado através da alteração da composição microbiana ruminal (CALLAWAY et al., 2003). O primeiro trabalho que demonstrou a atividade antitumoral da salinomicina foi o de Gupta et al em 2009 (GUPTA et al., 2009), que investigaram cerca de 16.000 compostos e encontraram na salinomicina os melhores resultados contra células tumorais. Os autores verificaram que a salinomicina apresentou atividade seletiva contra células tronco do câncer de mama de forma 100 vezes mais eficiente que o paclitaxel, um quimioterápico comumente utilizado para o tratamento deste tipo de câncer. As células tronco de câncer representam uma pequena porção do tumor com resistência às terapias atuais (quimioterapia e radioterapia) e com capacidade de regeneração, levando a metástases e reincidência da doença (EYLER; RICH, 2008).

A partir do trabalho de Gupta et al (2009) (GUPTA et al., 2009), novos trabalhos com a salinomicina surgiram (ARAFAT et al., 2013; FUCHS et al., 2009; HE et al., 2013; KIM, J. H. et al., 2013; KIM, J. H. et al., 2012; ZHI et al., 2011). Fuchs et al (2009) (FUCHS et al., 2009) verificaram que este antibiótico induz morte por apoptose em células de câncer humano de diferentes origens, inclusive em linhagens que geralmente são resistentes à apoptose, enquanto nenhum efeito foi observado em linhagens celulares normais, como os linfócitos humanos. Outros trabalhos realizados com células tronco de osteosarcoma (TANG et al., 2011), células de câncer de próstata (KETOLA et al., 2012; KIM, K. Y. et al., 2011), linhagens de câncer de pulmão de células não pequenas (ARAFAT et al., 2013; LI, T. et al., 2013), linhagem de câncer pancreático (HE et al., 2013), câncer gástrico (ZHI et al., 2011), carcinoma hepatocelular (WANG, F. et al., 2012) e câncer de ovário (KOO et al., 2013) mostraram eficiência da salinomicina no combate às células tumorais.

Apesar dos vários trabalhos sugerindo a salinomicina como uma droga promissora contra diversos tipos de câncer, vários autores relataram sua toxicidade em cavalos (ROLLINSON et al., 1987), perus (GRIFFITHS et al., 1989), porcos (KAVANAGH; SPARROW, 1990), gatos (VAN DER LINDE-SIPMAN et al., 1999), humanos (STORY; DOUBE, 2004), bezerros (OMIDI et al., 2010) e neurotoxicidade em células isoladas de embrião de rato (BOEHMERLE; ENDRES, 2011). Dessa forma, apesar da promissora utilização da salinomicina no combate ao câncer, fica evidente a necessidade de mais estudos sobre a toxicidade e os efeitos colaterais que a salinomicina pode causar antes de indicá-la como droga quimioterápica, identificando os mecanismos de ação que possam estar envolvidos.

Estudos de citometria de fluxo das fases de ciclo celular e indução de apoptose, entre outros, aliados a avaliação de marcadores genéticos de expressão gênica por RT-PCR em tempo real podem contribuir na identificação dos efeitos de novas drogas no combate ao câncer. Essa doença é caracterizada pela proliferação celular desordenada, característica apresentada nas várias linhagens celulares tumorais que apresentam diferentes desordens genéticas envolvidas no processo de carcinogênese. Dessa forma, a cultura de células é importante na fundamentação com base em evidências *in vitro* das formas principais de intervenção dessa patologia. Assim, devido à promissora utilidade da salinomicina no tratamento do câncer e como o seu mecanismo ainda é desconhecido, o presente trabalho teve como objetivo contribuir na avaliação da atividade seletiva da salinomicina contra células tumorais humanas e elucidar seu mecanismo de ação. Para isso, a salinomicina foi avaliada em duas linhagens celulares tumorais humanas e em uma linhagem não tumoral quanto a proliferação celular, citotoxicidade, genotoxicidade, indução de apoptose, ciclo celular e análise de expressão de genes envolvidos nestes processos.

## **2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### *2.1 Cultura celular*

Neste estudo, foram utilizadas as linhagens celulares de carcinoma hepatocelular humano (C3A [HepG2/C3A, derivada da HepG2]), de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e a linhagem não tumoral de epitélio mamário humano (HB4a). As células foram cultivadas em frascos de cultura de 25 cm<sup>2</sup> contendo meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco, Life Technologies), suplementado com 10% de soro bovino

fetal (SBF) (Gibco, Life Technologies) e mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C (Ultrasafe HF 212 UV). As linhagens mamárias, HB4a e MCF-7, foram suplementadas com insulina (Gibco, Life Technologies) e hidrocortisona (5 µg/mL). Em todos os experimentos, as células receberam os tratamentos após 24 horas de estabilização celular.

As linhagens celulares MCF-7 e HepG2/C3A foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro e a linhagem celular HB4a foi gentilmente fornecida pelo Hospital AC Camargo (SP).

## 2.2 Agentes químicos

A salinomicina (C<sub>42</sub>H<sub>70</sub>O<sub>11</sub>), extraída de *Streptomyces albus*, utilizada neste estudo, foi adquirida da Sigma (S4526) e diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) (Acros Organics). A concentração de DMSO não ultrapassou 0,25% em cultura.

Na análise celular em tempo real (RTCA) e citotoxicidade (ensaio MTT) foi utilizado como controle de indução de danos no DNA o quimioterápico doxorrubicina (Adriblastina®) (Pharmacia) 5 µM, diluído em meio DMEM. Na avaliação de genotoxicidade foi utilizada a doxorrubicina 1 µM.

Na análise de indução de apoptose, foi utilizado o corante Hoechst 33342 (Sigma) 10 µg/mL para a análise morfológica das células.

## 2.3 Análise Celular em Tempo Real (Real-Time Cell Analyzer - RTCA)

A análise celular em tempo real (RTCA - *Real Time Cell Analyzer*) xCELLigence (Roche Diagnostic) permite avaliar em tempo real o crescimento das células expostas ou não a diferentes concentrações do composto de interesse. Isso é possível devido aos microeletrodos de ouro acoplados na base de uma placa de cultura de 96 poços, chamada *E-Plate*. Esses eletrodos são conectados a um computador que mede as diferenças de impedância dentro de um circuito elétrico (MARTINEZ-SERRA et al., 2014). A impedância reflete alterações na aderência ou desprendimentos das células do poço, além de alterações na morfologia das células (ROSHAN MONIRI et al., 2015). Esses dados são convertidos em um valor de índice celular, de modo que quanto maior a área da superfície do poço ocupada pelas células, maior será o valor de índice celular.

Antes de iniciar as análises, foi realizada uma titulação para avaliar a quantidade de células que permite crescimento constante durante o período de tratamento, sem que as células entrem em platô. Definir a quantidade ideal de células é importante para garantir que elas receberão o tratamento em um momento ótimo, quando as células estão em crescimento exponencial. As quantidades de células definidas foram: 3.125 células HB4a; 6.250 células MCF-7 e 25.000 células HepG2/C3A por poço, contendo 100  $\mu$ L de meio, em placa de 96 poços. A proporção de células e quantidade de meio de cultura foi respeitada nos demais ensaios.

As células foram semeadas em E-plates de 96 poços. Para avaliar a proliferação celular das três linhagens, foram selecionadas as concentrações de 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 40  $\mu$ M e 80  $\mu$ M de salinomicina. Estas concentrações foram escolhidas de acordo com dados da literatura. Como controle de veículo foi adicionado ao meio de cultura DMSO 0,25% e tampão PBS 0,5% (KCl 0,02%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,02%, NaCl 0,8%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,115%). O crescimento das células foi monitorado por 96 horas após a adição dos tratamentos, sendo as leituras realizadas a cada 30 minutos. O índice celular normalizado foi calculado pelo software RTCA (Roche Diagnostic). Os experimentos foram realizados em triplicata.

## 2.4 Avaliação da citotoxicidade

### 2.4.1 Ensaio de citotoxicidade MTT

O ensaio de citotoxicidade MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) foi baseado no protocolo descrito pela primeira vez por Mosmann (1983) (MOSMANN, 1983). Este método é amplamente utilizado para a análise de citotoxicidade, viabilidade celular e proliferação de células vivas. Nas células vivas, o sal de tetrazolium MTT (Invitrogen Life Technologies) de coloração amarela é reduzido a formazan (1-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-3,5-difenilformazan) de coloração roxa. Após a metabolização pelas células vivas, o sal de formazan é dissolvido em DMSO e a solução pode ser analisada colorimetricamente em espectrofotômetro. Assim, quanto maior o número de células viáveis, maior será a intensidade da cor roxa e maior será o valor da absorbância.

Foram utilizadas placas de cultura de 96 poços, com 100  $\mu$ L de meio de cultura contendo as mesmas quantidades de células determinadas pela titulação. Não receberam células os poços correspondentes ao branco. O sistema foi incubado em estufa a

5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas para estabilização celular. Após este período, foram adicionados ao meio de cultura os respectivos tratamentos: controle de veículo (meio de cultura com 0,25% DMSO e 0,5% PBS); controle de indução de danos no DNA (doxorubicina 5 µM); e salinomicina 5 µM, 10 µM, 20 µM, 40 µM e 80 µM. As células foram expostas aos tratamentos por 24, 48 e 72 horas.

Após os períodos de tratamento, todo o conteúdo dos poços foi retirado e foram adicionados em cada um dos poços 100 µL de MTT 0,5 mg/mL, diluído em meio de cultura sem soro. As células foram novamente incubadas a 37°C por 4 horas. Após este período, a solução de MTT foi retirada dos poços e foram adicionados 100 µL de DMSO para diluir os cristais de formazan. A leitura foi realizada em espectrofotômetro (Thermoplate) a 540 nm. As avaliações foram realizados em 3 repetições biológicas com 5 replicatas cada.

#### 2.4.2 Cálculo do IC<sub>50</sub>

O cálculo do IC<sub>50</sub>, concentração que inibe 50% da população celular, foi realizado pelo programa GraphPad Prism versão 5.00, GraphPad Software, San Diego California EUA. Para o cálculo, foram utilizados os valores de viabilidade celular obtidos pelo ensaio MTT, após 24, 48 e 72 horas de exposição à salinomicina. O cálculo da porcentagem de viabilidade celular foi realizado a partir dos valores das absorbâncias obtidas pelo ensaio MTT, considerando o controle como 100% (HUANG; SHANG; ZHEN, 2005).

#### 2.5 Avaliação da Genotoxicidade – Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi baseado de acordo com o protocolo de Tice et al (2000) (TICE et al., 2000). Foram utilizadas placas de cultura de 6 poços, contendo 5.000 células em 2 mL de meio de cultura. A salinomicina foi avaliada quanto à genotoxicidade nas concentrações 10 µM, 20 µM e 40 µM. Como controle de indução de danos no DNA, foi utilizada a doxorubicina 1 µM e o controle de veículo contém meio de cultura com 0,06% DMSO e 0,05% PBS.

Após 3 horas de tratamento, as células foram colhidas, centrifugadas, ressuspensas em agarose de baixo ponto de fusão (LMP- *Low Melting Point*) 0,5% e distribuídas em lâminas pré-gelatinizadas com agarose 1,5%. As células foram imersas em solução de lise (Triton X-100 1%, DMSO 10%, NaCl 14,61%, EDTA-titriplex 3,72%, Tris

0,12%) por 60 minutos a 4°C e submetidas a condições alcalinas em tampão de eletroforese (EDTA-titriplex 200mM 0,5%, NaOH 10N 3%) por 20 minutos. A eletroforese foi realizada em pH 13, 25V, 300 mA por 20 minutos. Posteriormente, as lâminas foram neutralizadas com a solução de neutralização (Tris 0,4M 4,85%, pH 7,5) e fixadas com etanol absoluto por 10 minutos.

Para a análise, as lâminas foram coradas com 100 µL de brometo de etídio (0,002 mg/mL) e analisadas em microscópio de fluorescência (Nikon) com aumento final de 400x. Os cometas foram classificados visualmente em classes de 0 a 3, conforme o comprimento e intensidade da cauda: (0) ausência de cauda; (1) cauda com comprimento de até um diâmetro do nucleóide do cometa; (2) cauda com comprimento de até 2 vezes o diâmetro do nucleóide e (3) cauda com comprimento superior a 2 vezes o diâmetro do nucleóide. Assim, quanto maior o comprimento da cauda, maior o dano genotóxico. A viabilidade celular foi confirmada através do método de exclusão com azul de tripan. Foi considerada como satisfatória viabilidade acima de 80%. O escore foi calculado através da fórmula: (classe 0 x 0 + classe 1 x 1 + classe 2 x 2 + classe 3 x 3). Foram realizadas três repetições biológicas, cada uma com duas replicatas de lâmina. Em cada tratamento foram analisados 200 nucleóides, sendo 100 em cada lâmina.

## 2.6 *Análise de ciclo celular – Citometria de fluxo*

As células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços contendo as seguintes quantidades de células:  $5 \times 10^5$  células/poço para a linhagem HepG2/C3A e  $1,25 \times 10^5$  células/poço para as linhagens MCF-7 e HB4a. Após 24 horas de estabilização celular, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado novo meio contendo os seguintes tratamentos: controle de veículo (0,06% DMSO; 0,05% PBS) e salinomicina 10 µM, 20 µM e 40 µM. As células foram expostas aos tratamentos por 24 horas.

Após esse período, as células foram desprendidas do frasco com o reagente Accutase (Gibco, Life Technologies), centrifugadas (2.000 rpm por 5 min) e ressuspensas em PBS. As amostras foram tratadas com RNase (0,1 mg/mL) (QIAGEN) por 30 min a 37°C e, em seguida, receberam 100 µL da solução hipotônica do fluorocromo (iodeto de propídeo 50 µg/mL, citrato de sódio 0,1%, Triton X-100 1 µL/mL) e foram colocadas no gelo, protegidas da luz, por 30 minutos (SAVIO et al., 2014). Após este período, a fluorescência do iodeto de propídeo foi estimada por citometria de fluxo (Accuri C6, BD Pharmingen™). O

conteúdo de DNA, baseado na intensidade de fluorescência do iodeto de propídeo, foi analisado e foram estimadas as porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo celular (G1, S e G2/M). Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos e foram realizados três experimentos independentes.

## 2.7 *Análise de morte celular*

### 2.7.1 Citometria de fluxo (Anexina V/Iodeto de Propídeo)

A análise de apoptose foi realizada utilizando o Kit de detecção de apoptose Anexina V-FITC (BD Pharmingen), seguindo o protocolo do fabricante. As células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços e, após 24 horas de estabilização celular, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado novo meio contendo os seguintes tratamentos: controle de veículo (0,06% DMSO; 0,05% PBS) e salinomicina 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ . As células foram incubadas por 24 horas.

Após esse período, as células foram desprendidas do frasco com o reagente Accutase (Gibco, Life Technologies), centrifugadas (2.000 rpm por 5 min) e lavadas duas vezes com PBS gelado. Após as centrifugações, as células foram ressuspensas em tampão de ligação a Anexina V (1x) e marcadas com os fluorocromos Anexina V- isotiocianato de fluoresceína (AV-FITC) e iodeto de propídeo (*PI - Propidium Iodide*) por 15 minutos no escuro. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (Accuri C6, BD Pharmingen™) utilizando o software BD Accuri C6. De acordo com as marcações com os fluorocromos, três populações celulares foram definidas: Células viáveis (AV-/PI-); Apoptose Inicial (AV+/PI-); Apoptose tardia/Necrose (AV-/PI+; AV+/PI+). Para cada amostra foram adquiridos 10.000 eventos e foram realizados três experimentos independentes.

A partir dos resultados da citometria de fluxo, foi escolhida a concentração de salinomicina a ser testada no ensaio RT-PCR em tempo real.

### 2.7.2 Coloração com Hoechst 33342

A fim de visualizar a morfologia das células expostas à salinomicina, elas foram coradas com Hoechst 33342, que cora o DNA e permite a visualização do núcleo das células em microscopia de fluorescência (CHAZOTTE, 2011). As células foram semeadas em placas de cultura de 6 poços e, após 24 horas de estabilização celular, o meio de cultura foi

retirado e foi adicionado novo meio contendo os seguintes tratamentos: controle de veículo (0,06% DMSO; 0,05% PBS) e salinomicina 10  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$  e 40  $\mu\text{M}$ . As células foram incubadas por 24 horas e, após esse período, as amostras foram expostas ao fluorocromo Hoechst 33342 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 20 min no escuro. As células foram analisadas em microscópio invertido de fluorescência em aumento de 460x (filtro azul, 390/40 nm excitação e 446/33 nm de emissão - FLoid® Cell Imaging Station, Life Technologies), onde foram captadas imagens dos diferentes tratamentos, distinguindo as células não apoptóticas das células apoptóticas. Foram consideradas apoptóticas as células com cromatina condensada e formação de corpos apoptóticos.

## 2.8 RT-PCR em Tempo Real

Foram utilizadas placas de cultura de 6 poços e, após 24 horas de estabilização celular, foram adicionados ao meio de cultura os respectivos tratamentos: controle de veículo (0,06% DMSO; 0,05% PBS) e salinomicina 40  $\mu\text{M}$ . As células foram incubadas por 24 horas.

Após esse período, o RNA total foi extraído utilizando o RNeasy® Mini Kit (Qiagen, Cat. No. 74106), seguindo o protocolo do fabricante. A pureza das amostras foi verificada pelo aparelho NanoDrop (ThermoScientific) e a integridade foi verificada em gel de agarose 1%.

Em seguida, o cDNA foi sintetizado a partir de 1  $\mu\text{g}$  de RNA total, utilizando dNTPs (Invitrogen, Life Technologies), Oligo-dT (Invitrogen, Life Technologies) e enzima transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Life Technologies). No ensaio RT-PCR em tempo real, 5  $\mu\text{L}$  de cDNA foram adicionados ao mix contendo 1  $\mu\text{L}$  dos *primers forward* e *reverse* (10 pmol), que amplifica regiões parciais dos transcritos de interesse, e 5  $\mu\text{L}$  do corante Sybr Green (Bio-Rad), que emite fluorescência ao se ligar à dupla fita de DNA, em uma reação de 12  $\mu\text{L}$  de volume final. As reações foram realizadas em termociclador Bio-Rad C1000 Touch™ ThermalCycler (CFX96™ Real-Time System). Foram avaliados transcritos de genes relacionados à indução de danos no DNA (*GADD45A* - *Growth Arrest And DNA-Damage-Inducible, Alpha*), ao ciclo celular (*TP53* - *Tumor Protein P53*, *BIRC5* - *Baculoviral IAP Repeat Containing 5*, *CCNA2* - *Cyclin A2*, *CCNB1* - *Cyclin B1*, *CDKN1A* - *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A (P21, Cip1)*) e à apoptose (*BAX* - *BCL2-associated X protein*, *BAK* - *BCL2-antagonist/killer 1*, *CASP7* - *Caspase 7*, *CASP8* - *Caspase 8*, *CASP9* - *Caspase 9*, *CTNNB1* - *Catenin (Cadherin-Associated Protein), Beta 1*, *BCL-XL* - *Bcl-2-like protein 1*,

*BCL-2 - B-cell lymphoma 2*). A expressão da *CASP3 – Caspase 3* foi avaliada somente nas células HB4a e HepG2/C3A, já que as células MCF-7 não expressam a caspase-3 (JANICKE, 2009). As sequências dos *primers* estão listadas na Tabela 1. A amplificação dos fragmentos foi detectada pela fluorescência emitida pelo fluoróforo SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). As condições da PCR foram as seguintes: um passo de desnaturação inicial de 50°C por 2 minutos; 95°C por 2 minutos; 45 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos e 72°C por 30 segundos. As reações foram realizadas em três repetições biológicas e duas replicatas mecânicas. Os dados foram normalizados pelos genes gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*),  $\beta$ -actina (*ACTB*) e proteína ribossomal 13a (*RPL13A*).

## 2.9 Análise Estatística

Os dados obtidos nos ensaios RTCA, citotoxicidade MTT, cometa e citometria de fluxo (ciclo celular e apoptose) foram analisados por análise de variância seguida de Dunnett, através do software GraphPad Prism1 versão 5.00 (GraphPad Software, San Diego, California, USA), considerando  $p < 0,05$ , comparando os tratamentos com diferentes concentrações de salinomicina com o grupo controle.

Os níveis de expressão dos genes em estudo foram determinados pelo método de Pfaffl et al. (PFAFFL, 2001), com análise estatística realizada através do *Software Relative Expression Software Tool (REST)* 2009 v.2.0.13 (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002). Foram consideradas diferenças significativas de expressão gênica quando a expressão relativa foi maior que 2 ou menor que -2.

**Tabela 1 -** Sequência de *primers* utilizados na técnica RT-PCR em tempo real.

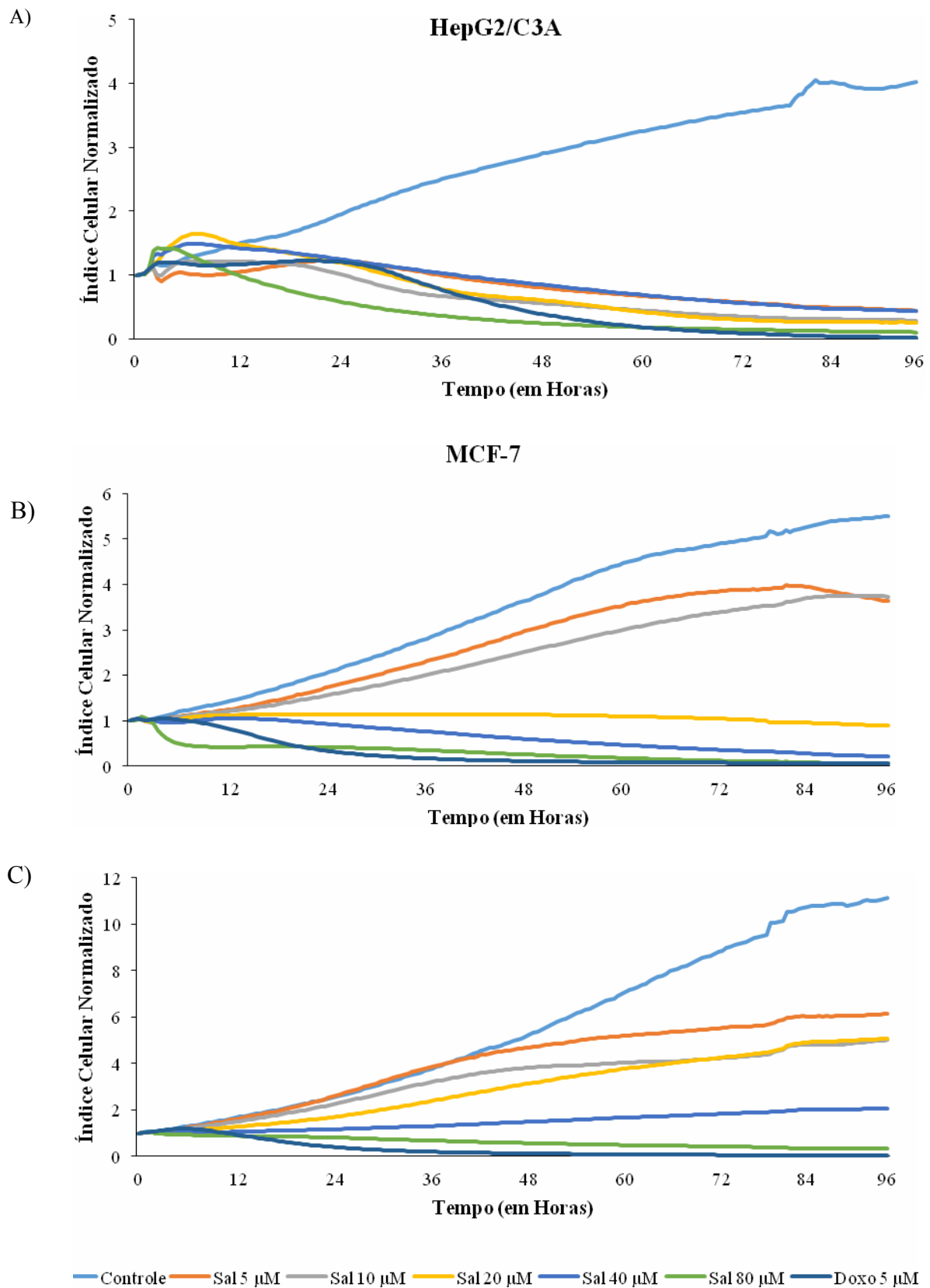
<b>Gene</b>	<b>Primers</b>	<b>Referência</b>
<i>ACTB</i>	F:5' CTG GCA CCC AGC ACA ATG 3' R:5' GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT 3'	(WESTERINK; SCHOONEN, 2007)
<i>BAX</i>	F:5' TTT CTG ACG GCA ACT TCA ACT GGG 3' R:5' TGT CCA GCC CAT GAT GGT TCT GAT 3'	(TSUBOY et al., 2014)
<i>BAK</i>	F:5' CAA GAT TGC CAC CAG CCT GTT TGA 3' R:5' ATG CAG TGA TGC AGC ATG AAG TCG 3'	Presente estudo <sup>a</sup>
<i>BCL-2</i>	F:5' GAT TGT GGC CTT CTT TGA G 3' R:5' GTT CCA CAA AGG CAT CC 3'	SIGMA
<i>BCL-XL</i>	F:5' TGG GCT CAC TCT TCA GTC GGA AAT 3' R:5' ATG TAG TGG TTC TCC TGG TGG CAA 3'	(DE PAULA et al., 2013)
<i>BIRC5</i>	F:5' AGC CCT TTC TCA AGG ACC AC 3' R:5' TGG CTC GTT CTC AGT GGG GCA GT 3'	(ZHANG, T. et al., 2001) com modificações
<i>CASP3</i>	F:5' GTG CTA CAA TGC CCC TGG AT 3' R:5' GCC CAT TCA TTT ATT GCT TTC C 3'	(AQUINO et al., 2013)
<i>CASP7</i>	F:5' TCA CCA TGC GAT CCA TCA AGA CCA 3' R:5' TTT GTC TGT TCC GTT TCG AAC GCC 3'	(TSUBOY et al., 2014)
<i>CASP8</i>	F:5' GCA AAA GCA CGG GAG AAA GT 3' R:5' TGC ATC CAA GTG TGT TCC ATT C 3'	(CASTANEDA; ROSIN-STEINER, 2006)
<i>CASP9</i>	F:5' CTC TAC TTT CCC AGG TTT 3' R:5' TTT CAC CGA AAC AGC ATT 3'	SIGMA
<i>CCNA2</i>	F:5' GAC CCT GCA TTT GGC TGT G 3' R:5' ACA AAC TCT GCT ACT TCT GG 3'	(HSIEH et al., 2006)
<i>CCNB1</i>	F:5' AGA GCA TCT AAG ATT GGA GAG 3' R:5' CCA TGT CAT AGT CCA ACA TAG 3'	SIGMA
<i>CDKN1A</i>	F:5' CAG CAT GAC AGA TTT CTA CC 3' R:5' CAG GGT ATG TAC ATG AGG AG 3'	SIGMA
<i>CTNNB1</i>	F:5' CCT ATG CAG GGG TGG TCA AC 3' R:5' CGA CCT GGA AAA CGC CAT CA 3'	(DIOGO CAMPOS VESENICK, 2012)
<i>GADD45A</i>	F:5' TCA GCG CAC GAT CAC TGT C 3' R:5' CCA GCA GGC ACA ACA CCA C 3'	Presente estudo <sup>a</sup>
<i>GAPDH</i>	F:5' GAA GGT GAA GGT CGG AGT C 3' R:5' GGA AGA TGG TGA TGG GAT TT 3'	(SUGAYA et al., 2005) com modificações
<i>RPL13A</i>	F:5' CCT GGA GGA GAA GAG GAA AGA GA T 3' R:5' TTG AGG ACC TCT GTG TAT TTG TCA A 3'	(BRANDIMARTO, 2009)
<i>TP53</i>	F:5' TAC CAC CAT CCA CTA CAA CT 3' R:5' GAC AGG CAC AAA CAC GCA C 3'	(JAVELAUD; BESANCON, 2002) com modificações

<sup>a</sup> Sequências dos primers *forward* e *reverse* foram desenhados de acordo com o software IDT (Integrated DNA Technologies) (IDT (Integrated DNA Technologies) PrimerQuest © Copyright 2012).

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 *Análise Celular em Tempo Real (RTCA)*

A salinomicina foi mais eficiente em reduzir o crescimento das células tumorais HepG2/C3A e MCF-7 quando comparada ao crescimento das células não tumorais HB4a (Figura 1). Nessas duas linhagens celulares, há um decréscimo significativo no crescimento celular a partir de 12 horas de exposição à salinomicina em todas as concentrações testadas em comparação com o grupo controle. Já na linhagem não tumoral HB4a, a salinomicina nas concentrações 5 e 10  $\mu\text{M}$  não altera o crescimento celular nas primeiras 24 horas e na concentração 5  $\mu\text{M}$ , o crescimento celular permanece semelhante ao controle mesmo após 48 horas de tratamento. Após 72 horas de cultivo celular, todas as concentrações de salinomicina também diminuem o crescimento das células HB4a. Os valores de índice celular e a análise estatística do ensaio RTCA nas linhagens HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a estão descritas respectivamente nas tabelas 1, 2 e 3 do Apêndice.



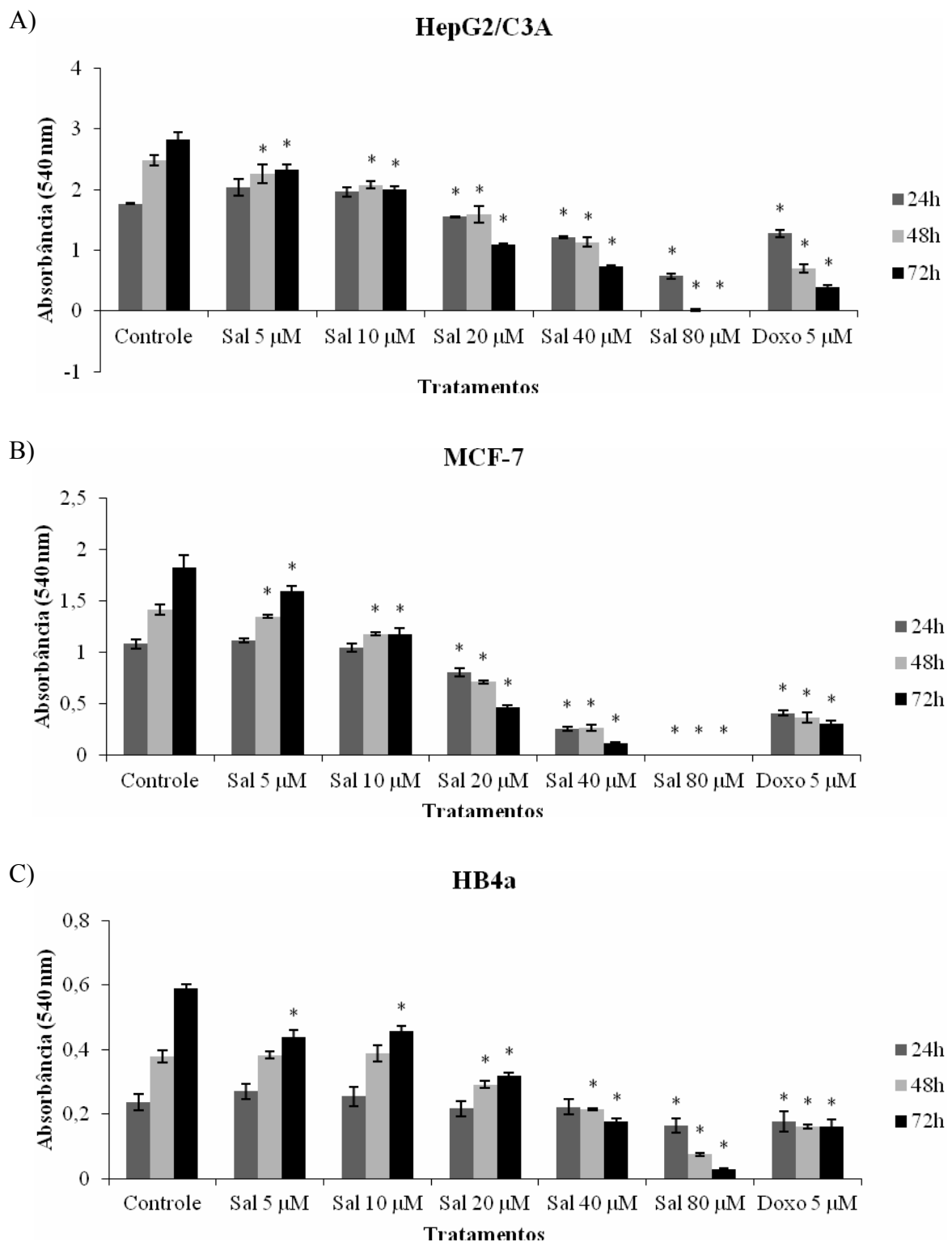
**Figura 1** - Curvas de proliferação celular obtidas por análise celular em tempo real (RTCA) de células HepG2/C3A (A), MCF-7 (B) e HB4a (C) expostas aos tratamentos: Controle (DMSO 0,25%; PBS 0,5%), Sal: Salinomicina 5, 10, 20, 40 e 80  $\mu\text{M}$  e Doxo: Doxorubicina 5  $\mu\text{M}$ .

### 3.2 *Avaliação da citotoxicidade*

#### 3.2.1 Ensaio de citotoxicidade MTT

O ensaio de citotoxicidade MTT comprovou os dados obtidos pelo ensaio RTCA, já que também mostrou que as células tumorais HepG2/C3A e MCF-7 foram mais sensíveis à salinomicina em comparação com as células HB4a (Figura 2). A salinomicina foi citotóxica de modo concentração e tempo dependente em todas as linhagens celulares. Após 24 horas de tratamento, a salinomicina foi citotóxica para as linhagens tumorais HepG2/C3A e MCF-7 a partir da concentração de 20  $\mu\text{M}$ , enquanto para as células não tumorais HB4a a salinomicina foi citotóxica a partir da concentração de 80  $\mu\text{M}$ . Após 48 e 72 horas de tratamento, todas as concentrações de salinomicina testadas foram citotóxicas para as células HepG2/C3A e MCF-7. Já para as células HB4a, após 48 horas de tratamento, a salinomicina foi citotóxica a partir da concentração de 20  $\mu\text{M}$  e somente após 72 horas todas as concentrações foram citotóxicas. Os valores de absorbância e a análise estatística referentes às linhagens HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a estão descritos, respectivamente, nas tabelas 4, 5 e 6 do Apêndice.

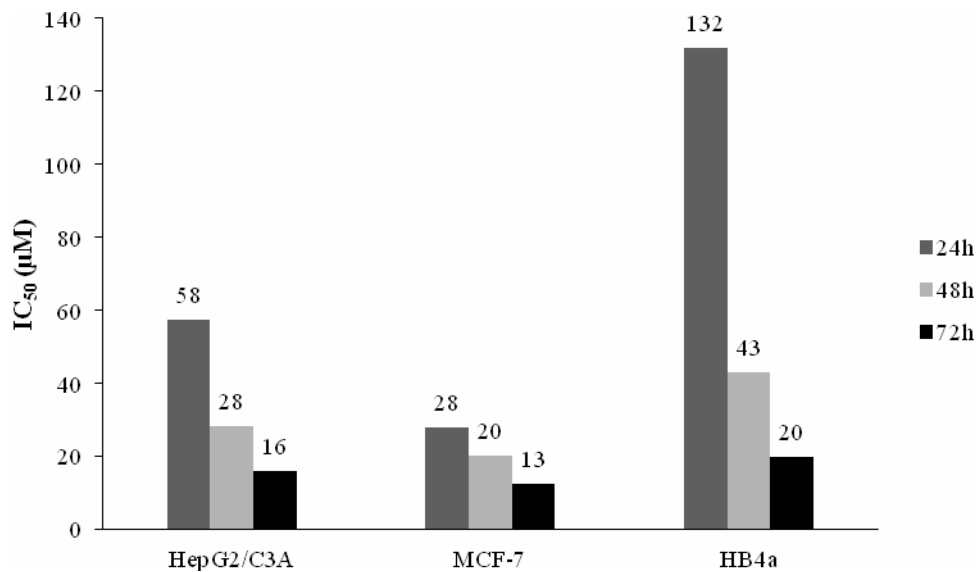
A partir dos resultados dos ensaios RTCA e MTT, as concentrações 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  foram selecionadas para os demais experimentos.



**Figura 2** – Média e desvio padrão das absorvâncias obtidas pelo ensaio de citotoxicidade MTT de células HepG2/C3A (A), MCF-7 (B) e HB4a (C) após 24, 48 e 72 horas de exposição aos tratamentos: Controle (DMSO 0,25%; PBS 0,5%), Sal: Salinomicina 5, 10, 20, 40 e 80 µM e Doxo: Doxorubicina 5 µM. \* Diferença significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Cálculo do IC<sub>50</sub>

O IC<sub>50</sub> da salinomicina foi calculado para as linhagens celulares HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a após 24, 48 e 72 horas de tratamento (Figura 3). Novamente, os valores de IC<sub>50</sub> mostram a maior resistência da linhagem HB4a à salinomicina em relação às linhagens tumorais. As células MCF-7 foram as mais sensíveis à salinomicina, apresentando os menores valores de IC<sub>50</sub>. No tempo de 24 horas, as células HB4a foram muito mais resistentes à salinomicina em relação às linhagens tumorais, com valores de IC<sub>50</sub> cerca de 2,3 vezes maior que o da HepG2/C3A e 4,7 vezes maior que o da MCF-7. Após 48 horas de tratamento, o IC<sub>50</sub> nas células HB4a caiu bruscamente, porém ainda foi significativamente maior que o das demais linhagens e, após 72 horas, o valor de IC<sub>50</sub> fica próximo aos valores das demais células.

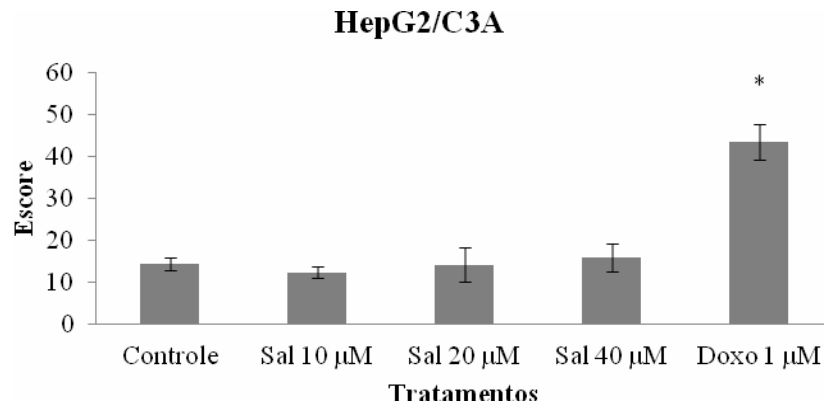


**Figura 3** – Valores de IC<sub>50</sub> (µM) da salinomicina nas células HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a nos tempos 24, 48 e 72 horas de tratamento.

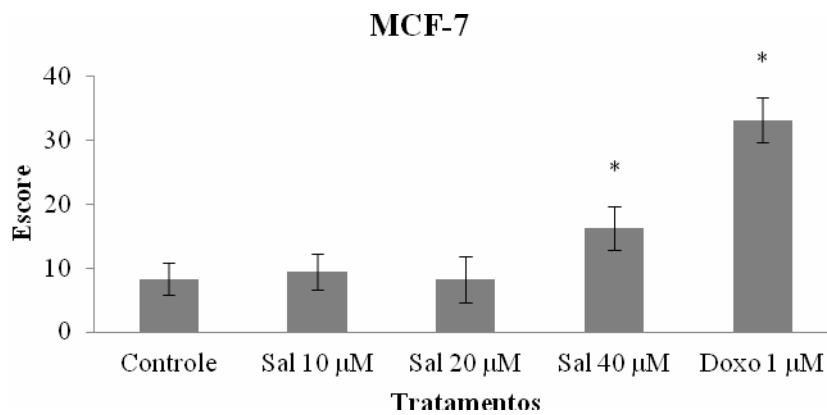
### 3.3 Avaliação da Genotoxicidade

O ensaio do cometa mostrou que a salinomicina 40 µM foi genotóxica apenas para as células MCF-7 após 3 horas de tratamento (Figura 4). Nas células HepG2/C3A e HB4a não foi observada genotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas. Os valores de escore, que podem variar de 0 a 300, e a análise estatística referentes às linhagens HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a estão descritos, respectivamente, nas tabelas 7, 8 e 9 do Apêndice.

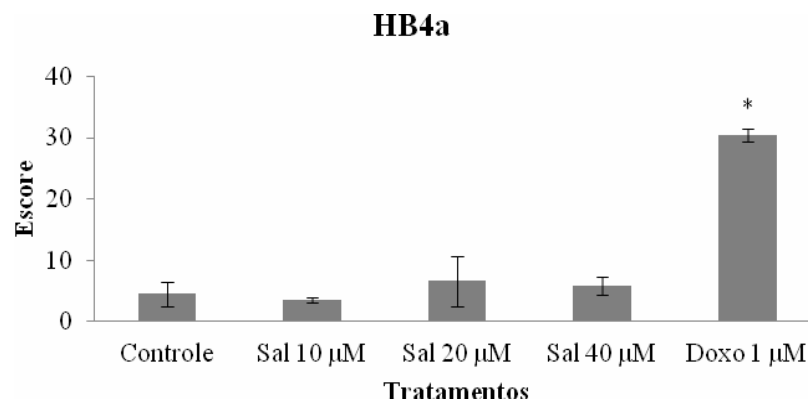
A)



B)



C)



**Figura 4** - Média e desvio padrão do escore obtido em 600 cometas analisados pelo ensaio do cometa em células HepG2/C3A (A), MCF-7 (B) e HB4a (C) expostas aos tratamentos: Controle (0,06% DMSO; 0,05% PBS), Sal: Salinomicina 10, 20 e 40 µM e Doxo: Doxorrubicina 1 µM por 3 horas. \* Diferença significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.4 Análise de ciclo celular

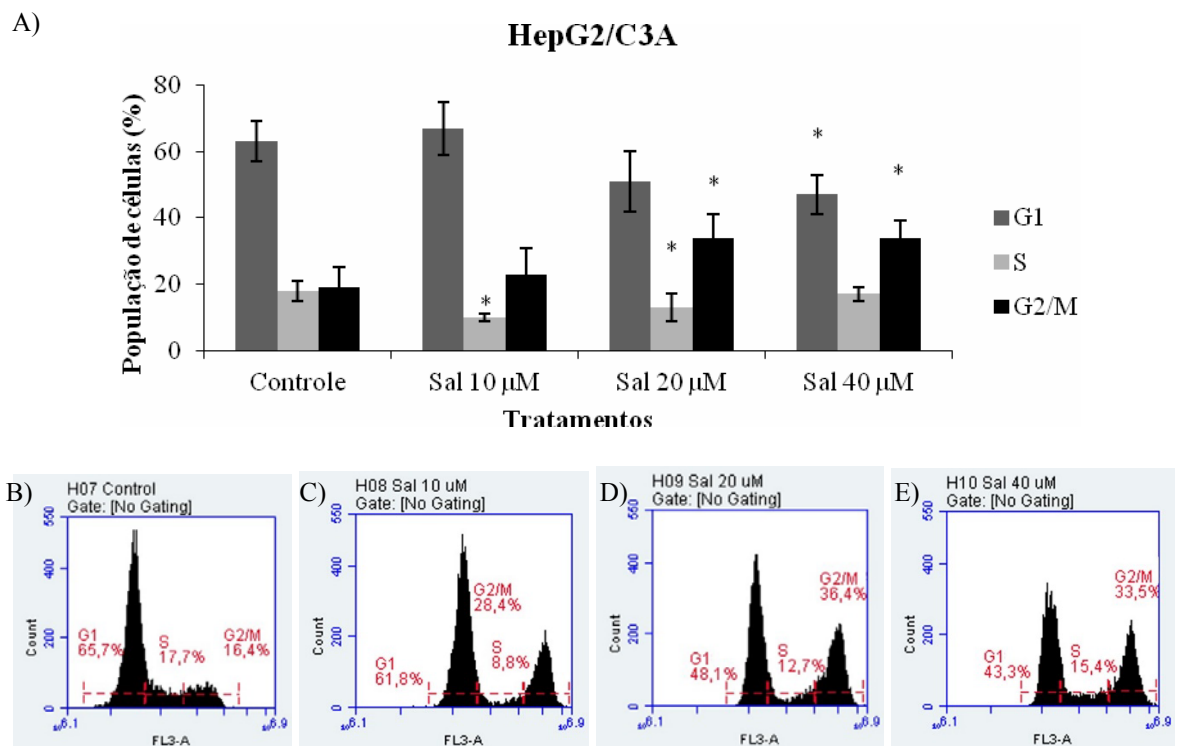
A análise de ciclo celular por citometria de fluxo mostrou que a salinomicina foi capaz de alterar a distribuição das células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular nas linhagens tumorais HepG2/C3A e MCF-7, porém não houve diferença

significativa em relação ao controle na linhagem não tumoral HB4a. As figuras 5, 6 e 7 mostram os resultados da análise de ciclo celular por citometria de fluxo nas células HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a, respectivamente.

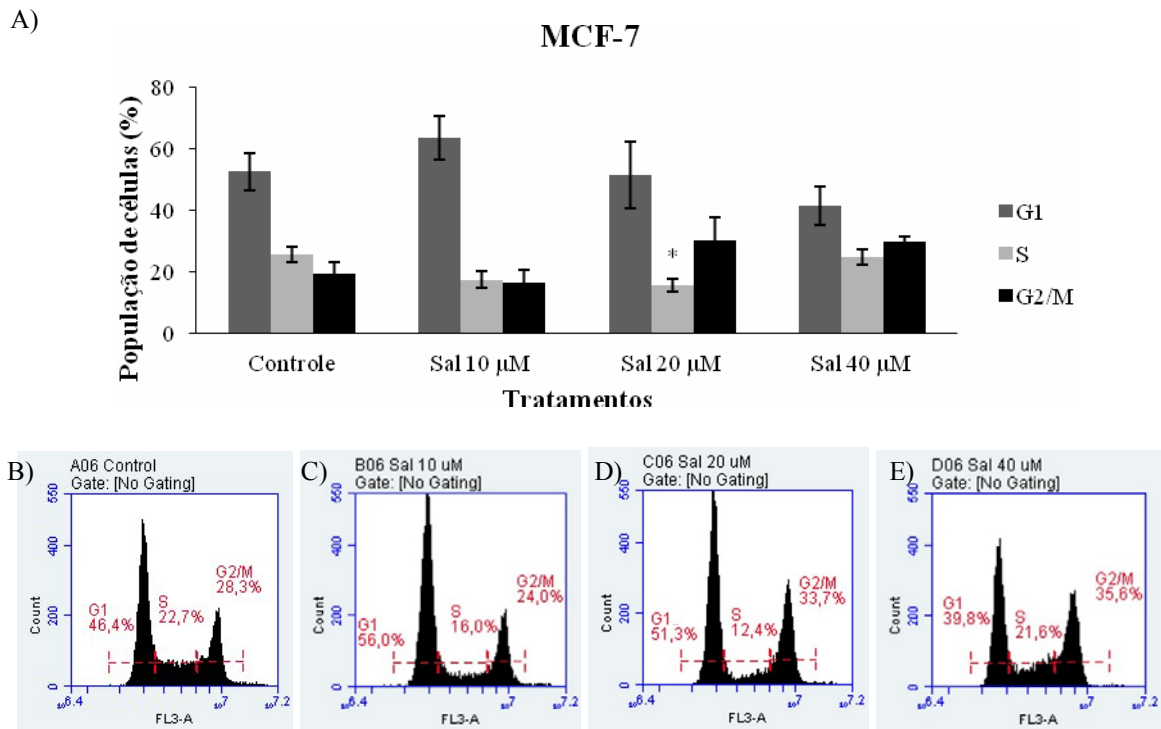
Nas células hepáticas HepG2/C3A, quando comparada ao controle, a exposição à salinomicina 10  $\mu\text{M}$  resultou em redução de células na fase S do ciclo celular. Já na concentração 20  $\mu\text{M}$ , houve um aumento de células na fase G2/M, com consequente redução de células na fase S. Na concentração 40  $\mu\text{M}$  também houve aumento de células na fase G2/M, com diminuição de células na fase G1 em relação ao controle (Figura 5).

Nas células tumorais de mama MCF-7, a exposição à salinomicina 20  $\mu\text{M}$  levou a uma diminuição significativa de células na fase S em comparação com o grupo controle. Houve aumento de células na fase G2/M após tratamento com salinomicina 20 e 40  $\mu\text{M}$ , porém esse aumento não foi significativo em relação ao controle (Figura 6).

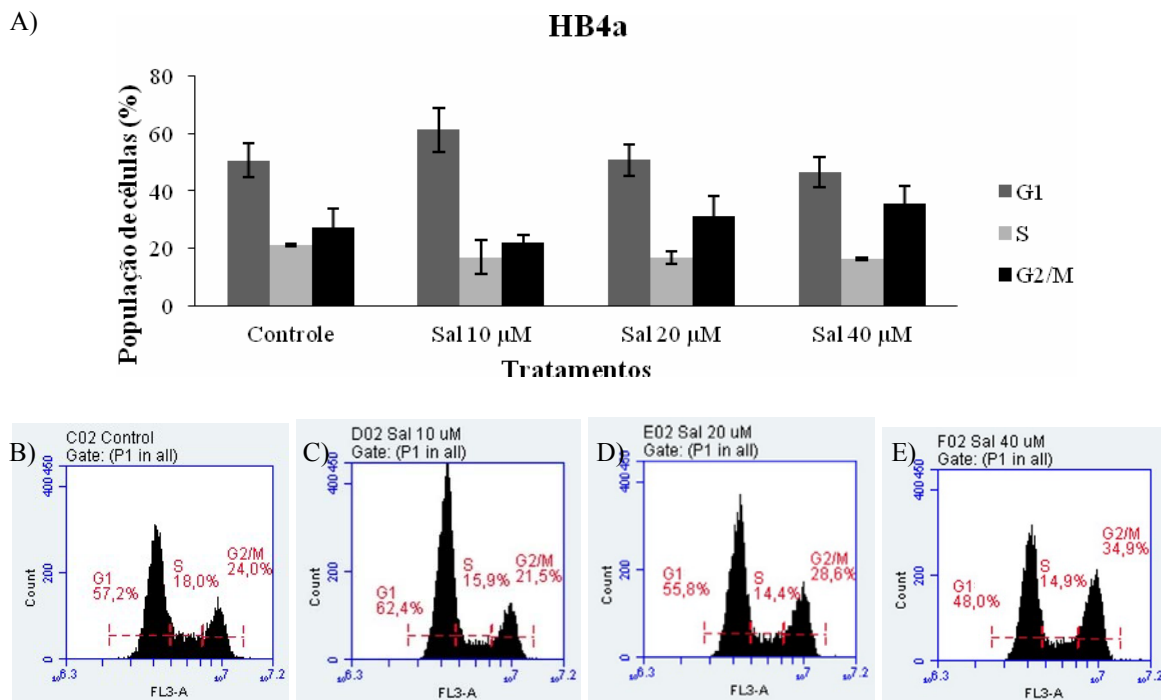
As porcentagens de células nas diferentes fases do ciclo celular e a análise estatística referentes às linhagens HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a estão descritas, respectivamente, nas tabelas 10, 11 e 12 do Apêndice.



**Figura5** - Análise de ciclo celular por citometria de fluxo em células HepG2/C3A. A) Efeitos da exposição ao Controle (0,06% DMSO; 0,05% PBS) e à salinomicina 10, 20 e 40  $\mu\text{M}$  sobre o ciclo celular. Média e desvio padrão da porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular em três experimentos independentes; B) Controle; C) Salinomicina 10  $\mu\text{M}$ ; D) Salinomicina 20  $\mu\text{M}$ ; E) Salinomicina 40  $\mu\text{M}$ . \* Diferença significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 6** - Análise de ciclo celular por citometria de fluxo em células MCF-7. A) Efeitos da exposição ao Controle (0,06% DMSO; 0,05% PBS) e à salinomicina 10, 20 e 40 µM sobre o ciclo celular. Média e desvio padrão da porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular em três experimentos independentes; B) Controle; C) Salinomicina 10 µM; D) Salinomicina 20 µM; E) Salinomicina 40 µM. \* Diferença significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7** - Análise de ciclo celular por citometria de fluxo em células HB4a. A) Efeitos da exposição ao Controle (0,06% DMSO; 0,05% PBS) e à salinomicina 10, 20 e 40 µM sobre o ciclo celular. Média e desvio padrão da porcentagem de células nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular em três experimentos independentes; B) Controle; C) Salinomicina 10 µM; D) Salinomicina 20 µM; E) Salinomicina 40 µM. \* Diferença significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.5 *Análise de morte celular*

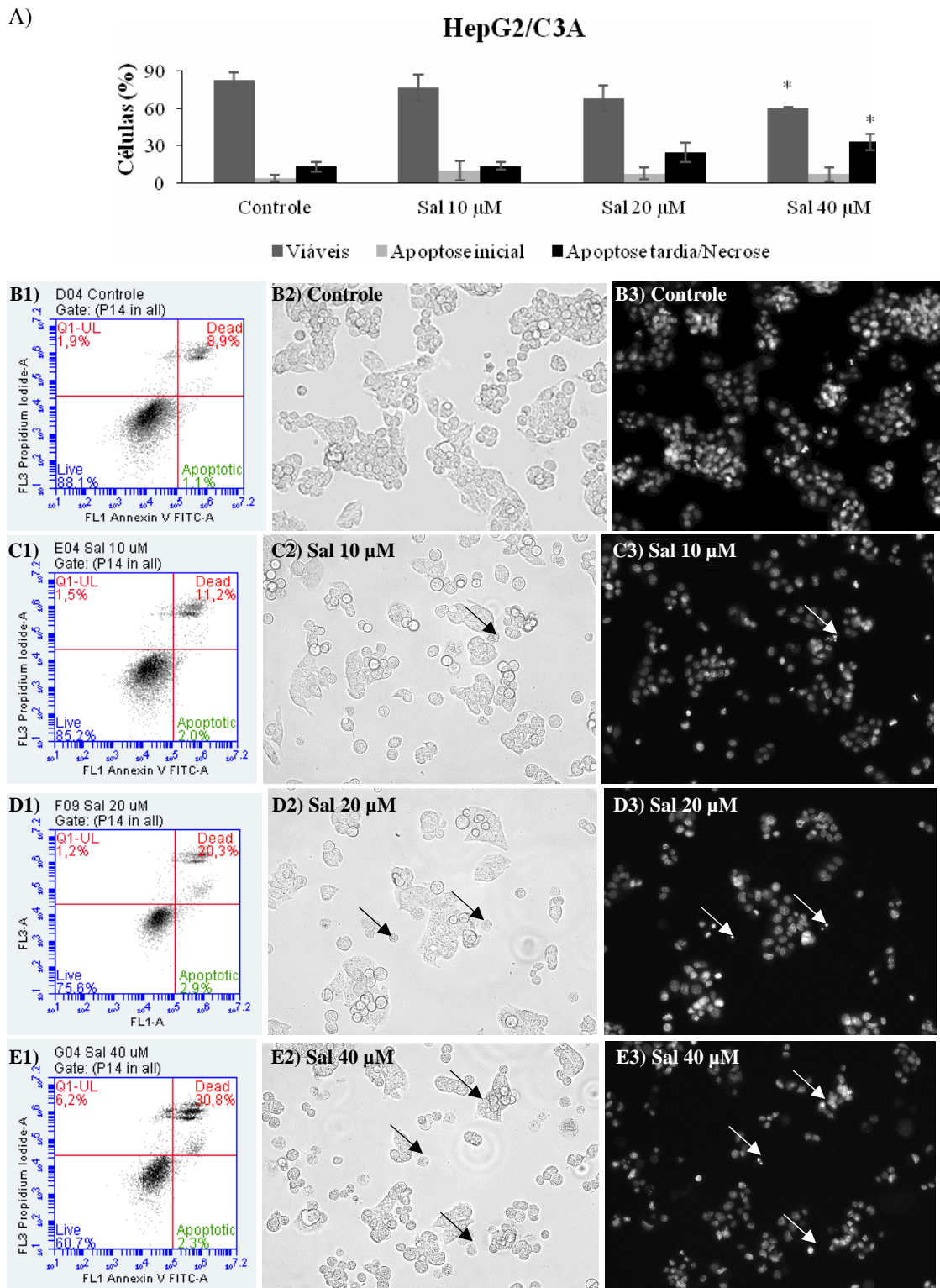
#### 3.5.1 Citometria de fluxo (Anexina V/Iodeto de Propídeo)

A análise de indução de apoptose por citometria de fluxo mostrou que não houve diferença significativa no número de células em apoptose inicial (AV+/PI-) nos tratamentos com salinomicina em relação ao grupo controle em todas as linhagens estudadas. Houve redução da viabilidade celular e indução de morte por apoptose tardia/necrose (AV+/PI+ e AV-/PI+) apenas nas linhagens tumorais HepG2/C3A e MCF-7 após 24 horas de exposição à salinomicina 40  $\mu$ M (Figuras 8 e 9, respectivamente). Já na linhagem não tumoral HB4a, nenhum efeito foi observado, permanecendo a viabilidade celular muito semelhante a do grupo controle em todas as concentrações de salinomicina avaliadas (Figura 10). A partir desses resultados, a salinomicina na concentração 40  $\mu$ M foi selecionada para avaliação de expressão gênica por RT-PCR em tempo real.

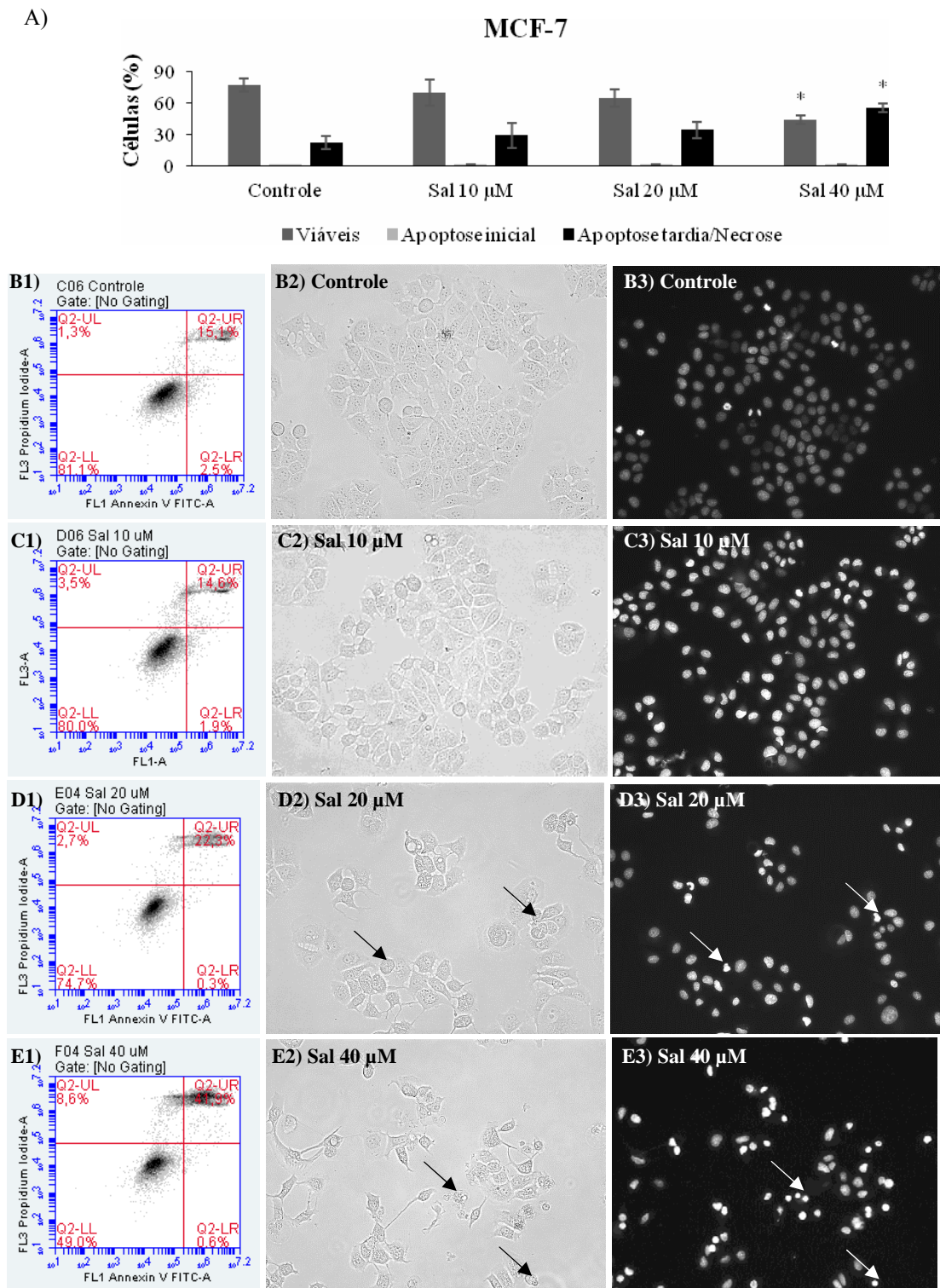
As porcentagens de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose e a análise estatística referentes às linhagens HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a estão descritos, respectivamente, nas tabelas 13, 14 e 15 do Apêndice.

#### 3.5.2 Coloração com Hoechst 33342

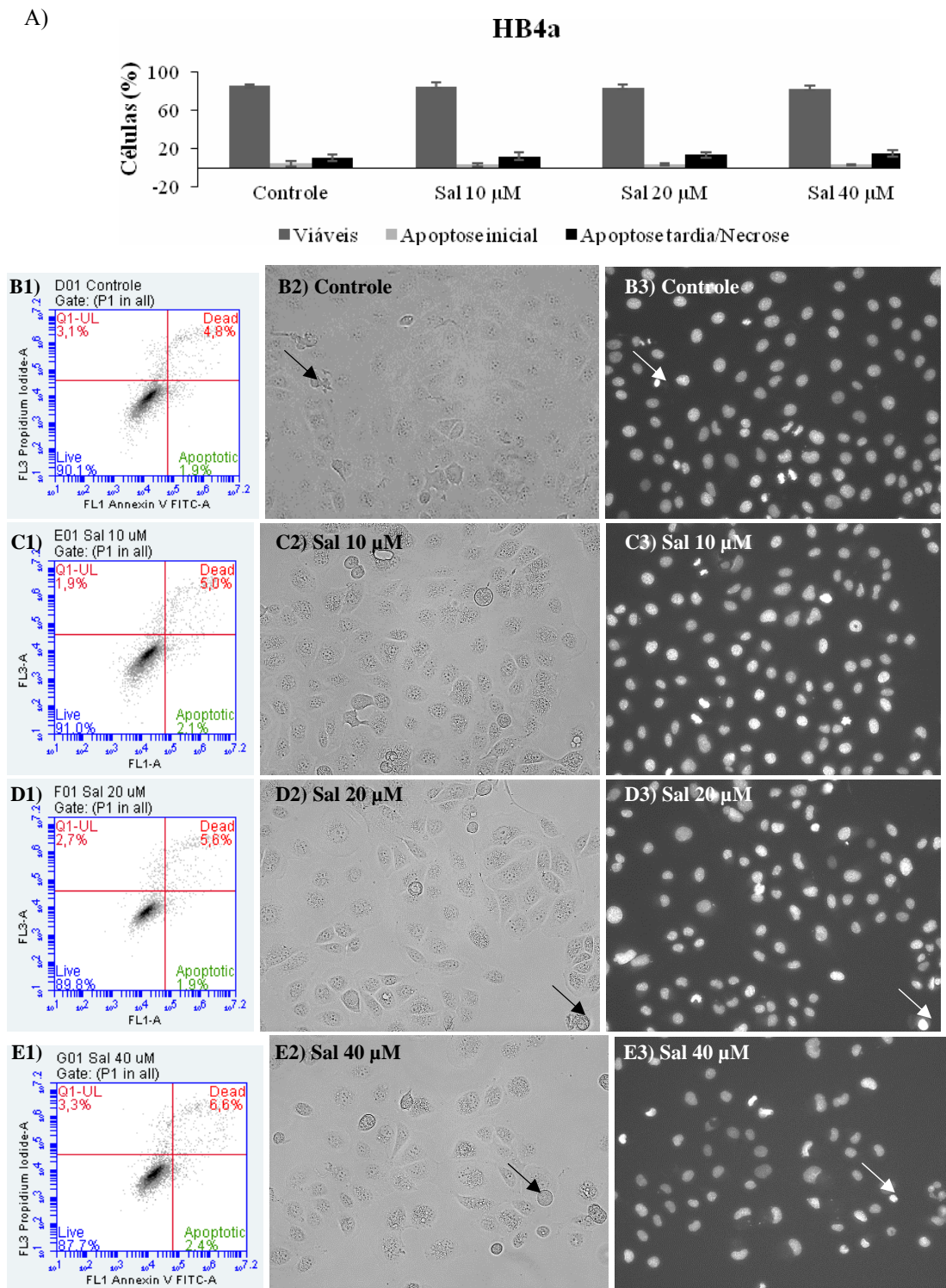
Imagens de microscopia de luz mostram que, nas linhagens tumorais expostas à salinomicina 40  $\mu$ M, há um aumento de células pequenas e arredondadas (setas pretas), características de células em apoptose, apenas nas linhagens tumorais (Figuras 8, 9 e 10). A observação das células marcadas com Hoechst 33342 em microscopia de fluorescência mostrou que a salinomicina induziu morte por apoptose nas células tumorais HepG2/C3A e MCF-7 na concentração de 40  $\mu$ M (setas brancas), enquanto poucas células apoptóticas foram observadas na linhagem não tumoral HB4a em todas as concentrações avaliadas (Figuras 8, 9 e 10, respectivamente). Esses dados confirmam a morte por apoptose detectada pela citometria de fluxo.



**Figura 8** - Análise de morte celular por apoptose de células HepG2/C3A por citometria de fluxo (Anexina V/PI). A) Porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose após 24 horas de exposição ao Controle (0,06% DMSO; 0,05% PBS) e à salinomicina 10, 20 e 40 µM; B1 a E1) Quantificação de células viáveis, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose após 24 horas de exposição ao Controle e à salinomicina 10, 20 e 40 µM; B2 a E2) Imagens de microscopia de luz de células expostas ao Controle e à salinomicina 10, 20 e 40 µM por 24 horas; B3 a E3) Imagens de microscopia de fluorescência de células coradas com Hoechst 33342 expostas ao Controle e à salinomicina 10, 20 e 40 µM por 24 horas. As setas indicam células apoptóticas. Aumento de 460x. \* Diferença significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 9** - Análise de morte celular por apoptose de células MCF-7 por citometria de fluxo (Anexina V/PI). A) Porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose após 24 horas de exposição ao Controle (0,06% DMSO; 0,05% PBS) e à salinomicina 10, 20 e 40 µM; B1 a E1) Quantificação de células viáveis, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose após 24 horas de exposição ao Controle e à salinomicina 10, 20 e 40 µM; B2 a E2) Imagens de microscopia de luz de células expostas ao Controle e à salinomicina 10, 20 e 40 µM por 24 horas; B3 a E3) Imagens de microscopia de fluorescência de células coradas com Hoechst 33342 expostas ao Controle e à salinomicina 10, 20 e 40 µM por 24 horas. As setas indicam células apoptóticas. Aumento de 460x. \* Diferença significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ).



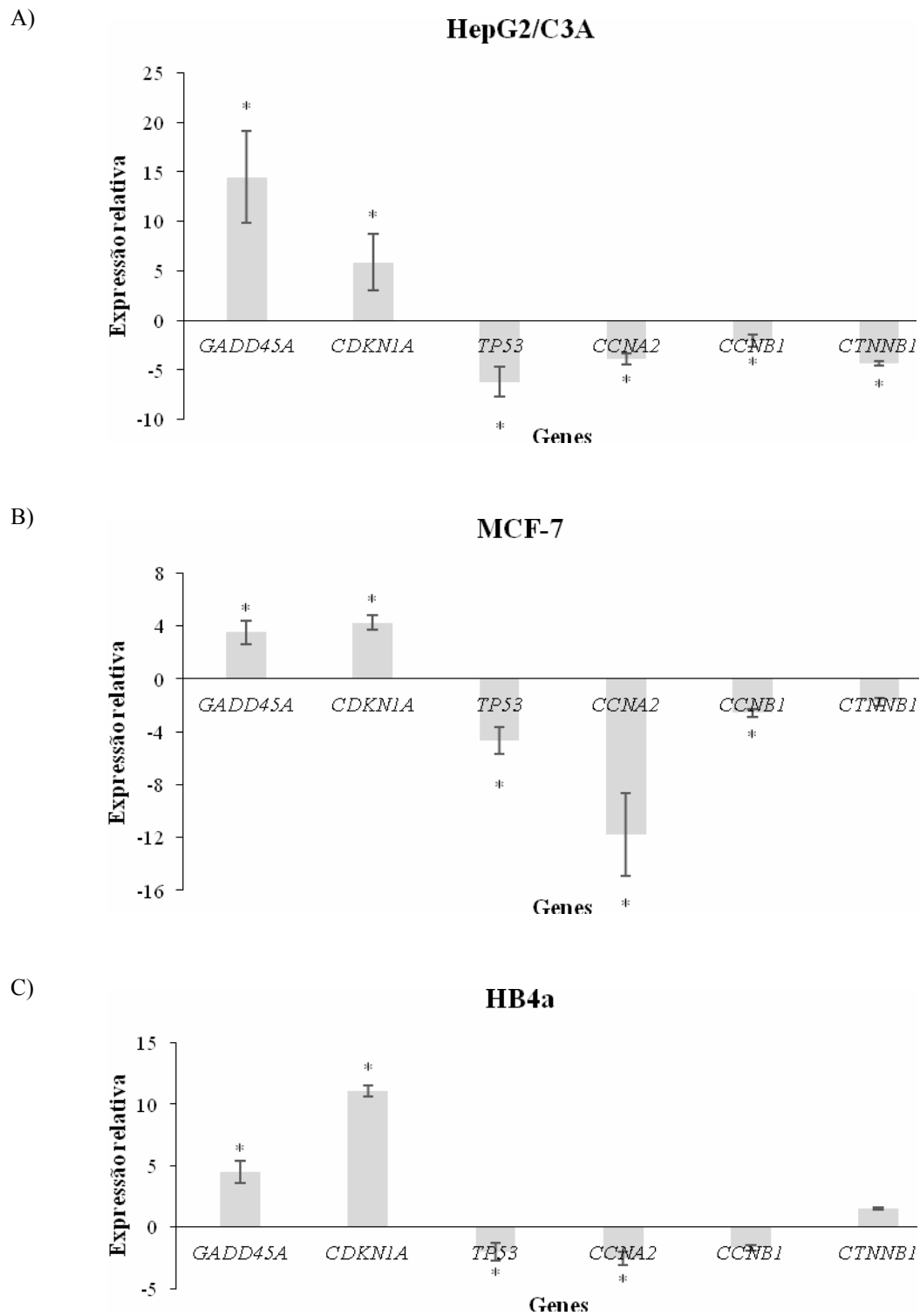
**Figura 10** - Análise de morte celular por apoptose de células HB4a por citometria de fluxo (Anexina V/PI). A) Porcentagem de células viáveis, em apoptose inicial e apoptose tardia/necrose após 24 horas de exposição ao Controle (0,06% DMSO; 0,05% PBS) e à salinomicina 10, 20 e 40 µM; B1 a E1) Quantificação de células viáveis, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose após 24 horas de exposição ao Controle e à salinomicina 10, 20 e 40 µM; B2 a E2) Imagens de microscopia de luz de células expostas ao Controle e à salinomicina 10, 20 e 40 µM por 24 horas; B3 a E3) Imagens de microscopia de fluorescência de células coradas com Hoechst 33342 expostas ao Controle e à salinomicina 10, 20 e 40 µM por 24 horas. As setas indicam células apoptóticas. Aumento de 460x. \* Diferença significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ).

### 3.6 RT-PCR em Tempo Real

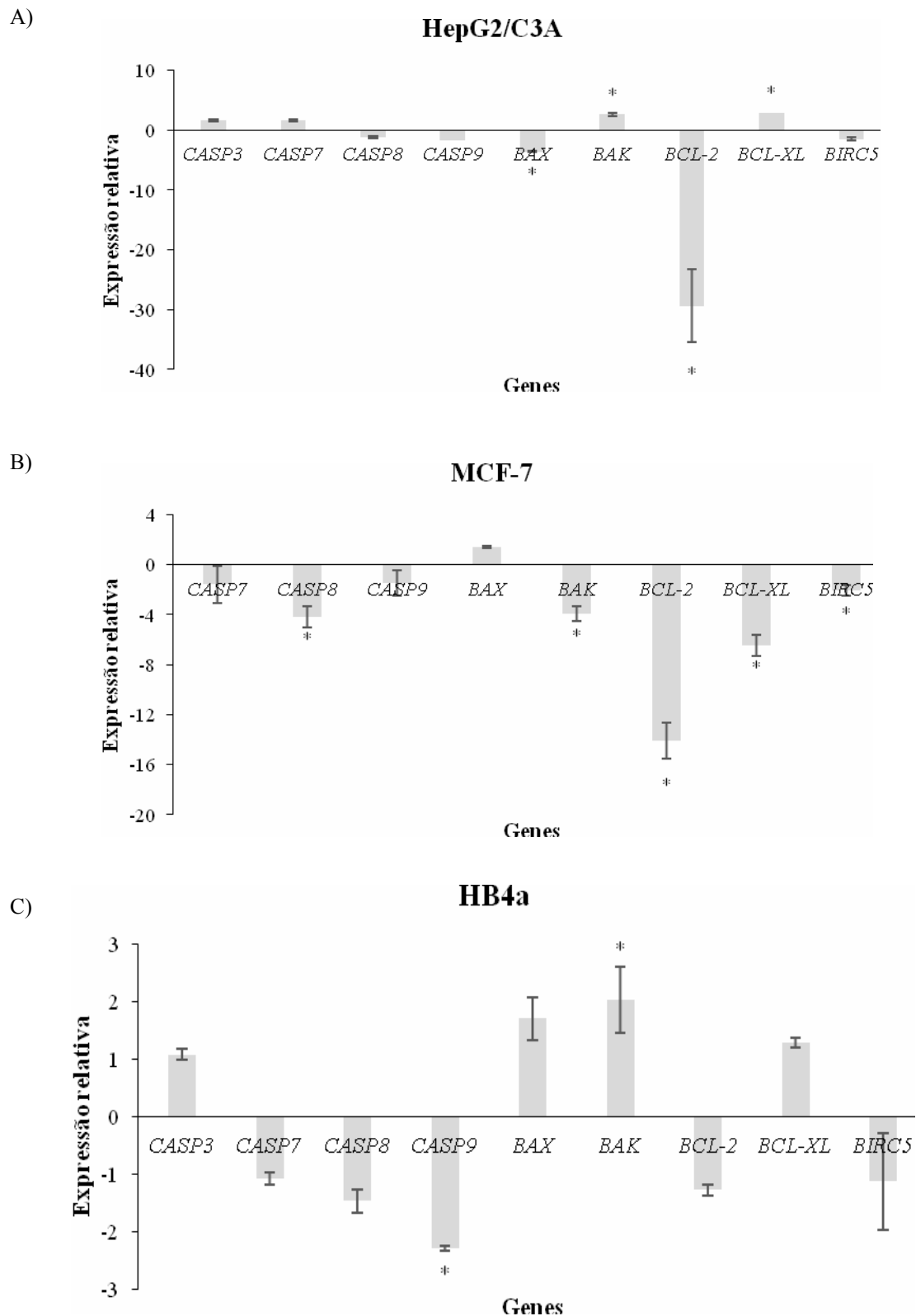
Na análise de expressão de genes relacionados ao ciclo celular, verificamos que em todas as linhagens celulares estudadas houve indução significativa nos níveis de expressão dos genes *GADD45A* (14,5 HepG2/C3A; 3,5 MCF-7; 4,5 HB4a) e *CDKN1A* (5,8 HepG2/C3A; 4,2 MCF-7; 11,1 HB4a) e repressão da expressão de *TP53* (6,2 HepG2/C3A; 4,7 MCF-7; 2 HB4a) e *CCNA2* (3,9 HepG2/C3A; 11,8 MCF-7; 2,5 HB4a), como mostra a Figura 11. Nas linhagens tumorais HepG2/C3A e MCF-7, o gene *CCNB1* também teve a expressão reduzida (2,1 HepG2/C3A; 2,6 MCF-7), como mostram as Figuras 11A e B, respectivamente. Ainda, nas células HepG2/C3A, houve redução da expressão do gene *CTNNB1* (4,3) (Figura 11A).

Em relação aos genes envolvidos no processo de morte celular, nas linhagens tumorais, houve acentuada repressão da expressão do gene anti-apoptótico *BCL-2* (29,4 HepG2/C3A; 14,1 MCF-7), como mostram as Figuras 12A e B, respectivamente. Nas células HepG2/C3A houve ainda indução de expressão dos genes *BAK* (2,8) e *BCL-XL* (2,8) e repressão de *BAX* (3,6), como mostra a Figura 12A. Já nas células MCF-7, houve redução na expressão dos genes *BAK* (3,9), *BCL-XL* (6,5), *CASP8* (4,1) e *BIRC5* (2,1), como mostra a Figura 12B. Na linhagem não tumoral HB4a, houve um aumento nos níveis de expressão dos genes *BAK* (2,0) e repressão de *CASP9* (2,3), como mostra a Figura 12C.

A análise estatística e a expressão relativa de genes relacionados a danos no DNA e ao ciclo celular estão descritas na tabela 16 e a expressão relativa de genes envolvidos à morte por apoptose está descrita na tabela 17 do Apêndice.



**Figura 11** - Expressão relativa dos genes relacionados a danos no DNA (*GADD45A*) e ao ciclo celular *CDKN1A*, *TP53*, *CCNA2*, *CCNB1* e *CTNNB1* obtidas por RT-PCR em tempo real após 24 horas de exposição à salinomicina 40  $\mu$ M em células HepG2/C3A (A), MCF-7 (B) e HB4a (C). Os dados foram normalizados com os genes *GAPDH*, *ACTB* e *RPL13A*. \* Diferença estatística significativa, realizada conforme parâmetros do software REST-384 (Pfaffl, 2002) e com expressão relativa acima de 2 ou abaixo de -2.



**Figura 12** - Expressão relativa dos genes relacionados ao processo de morte celular *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9*, *BAX*, *BAK*, *BCL-2*, *BCL-XL* e *BIRC5* obtidas por RT-PCR em tempo real após 24 horas de exposição à salinomicina 40  $\mu$ M em células HepG2/C3A (A), MCF-7 (B) e HB4a (C). Os dados foram normalizados com os genes *GAPDH*, *ACTB* e *RPL13A*. \* Diferença estatística significativa, realizada conforme parâmetros do software REST-384 (Pfaffl, 2002) e com expressão relativa acima de 2 ou abaixo de -2.

## 4 DISCUSSÃO

A busca por novas drogas anticâncer é um dos grandes desafios da ciência. O grande aumento dos casos de câncer no mundo justifica a importância dessa área de pesquisa, que busca por drogas mais eficientes e que melhorem a qualidade de vida dos pacientes. A salinomicina apresenta promissora atividade antitumoral e alguns mecanismos foram investigados, como a indução de apoptose (FUCHS et al., 2010; FUCHS et al., 2009; WANG, F. et al., 2012; ZHOU et al., 2013), indução de danos no DNA (KIM, K. Y. et al., 2011), aumento no nível de espécies reativas de oxigênio (ZHOU et al., 2013), inibição da atividade da glicoproteína-P (KIM, K. Y. et al., 2011), indução de autofagia (JANGAMREDDY et al., 2013; LI, T. et al., 2013), indução de estresse oxidativo (KETOLA et al., 2012) e atividade tripanocida (STEVERDING; SEXTON, 2013). Porém, o mecanismo de ação antitumoral da salinomicina permanece desconhecido.

No presente estudo, a salinomicina diminuiu a proliferação das células tumorais HepG2/C3A e MCF-7 de forma mais eficiente em comparação com as células não tumorais HB4a. Esses resultados confirmam a atividade seletiva da salinomicina, já demonstrada em células epiteliais mamárias não tumorais imortalizadas (HMLE) [5], células T CD4<sup>+</sup> isoladas de sangue periférico de indivíduo saudável (FUCHS et al., 2009) e em células epiteliais não malignas de próstata (KETOLA et al., 2012). Além de destruir as células tumorais de forma seletiva, estudos mostram que a salinomicina é capaz de destruir células resistentes à morte por apoptose (FUCHS et al., 2009). O ensaio de citotoxicidade também confirmou os dados obtidos pela análise de proliferação celular, evidenciando a maior citotoxicidade da salinomicina nas células HepG2/C3A e MCF-7 em relação à linhagem HB4a. Redução de viabilidade celular também foi demonstrada em outros trabalhos em células MCF-7 expostas à salinomicina 2,5 a 50  $\mu$ M de modo concentração e tempo dependente após 24 e 48 horas de tratamento (AL DHAHERI et al., 2013). A maior resistência das células HB4a à salinomicina foi novamente confirmada, já que os valores de IC<sub>50</sub> foram maiores quando comparados com os das células tumorais, principalmente nos tempos de 24 e 48 horas. A linhagem MCF-7 foi a mais sensível à salinomicina, apresentando os menores valores de IC<sub>50</sub>. A maior resistência à salinomicina das células HepG2/C3A, quando comparada com a linhagem tumoral MCF-7, pode estar na capacidade de metabolização da linhagem de carcinoma hepático.

Cybulski et al. (CYBULSKI et al., 2015) definiram a concentração de salinomicina necessária para inibir 50% da viabilidade de células HepG2, após 24 horas de

tratamento. Na densidade de 25.000 células, a concentração encontrada foi de 13,9  $\mu\text{M}$ . Esses dados diferem dos nossos resultados, já que observamos  $\text{IC}_{50}$  no valor de 58  $\mu\text{M}$ . A diferença dos resultados está na divergência de densidade celular utilizada, já que nós utilizamos quantidade celular 10 vezes maior, que foi definida pela titulação do ensaio RTCA, que determina a quantidade de células ideal para cada linhagem celular. Já nas células MCF-7, o  $\text{IC}_{50}$  da salinomicina foi definido após 24 e 48 horas de tratamento (AL DHAHERI et al., 2013), onde, na densidade de 5.000 células, os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram de 40  $\mu\text{M}$  (24 horas) e 15  $\mu\text{M}$  (48 horas). Esses valores divergem dos definidos no presente trabalho, que foram de 28  $\mu\text{M}$  (24 horas) e 20  $\mu\text{M}$  (48 horas), onde a diferença pode ser atribuída à pequena variação na densidade celular utilizada.

Selecionadas as concentrações que levam à diminuição da proliferação celular, o mecanismo de ação da salinomicina foi avaliado quanto à capacidade de induzir danos no DNA. Somente a maior concentração de salinomicina (40  $\mu\text{M}$ ) foi genotóxica e apenas para as células MCF-7. A indução de danos observada nessas células está de acordo com a redução do crescimento observada na análise de proliferação celular e de citotoxicidade. Há relatos de que a salinomicina induz quebra de fita dupla em células de câncer de mama MDA-MB-231, o que resulta em morte por apoptose quando expostas a altas concentrações de salinomicina (25 e 50  $\mu\text{M}$ ). Já em baixas concentrações (até 10  $\mu\text{M}$ ), a salinomicina leva as células a um quadro de senescência (AL DHAHERI et al., 2013). As demais linhagens não apresentaram danos genotóxicos significativos. O curto tempo de tratamento (3 horas) pode não ter sido suficiente para causar danos genotóxicos nessas duas linhagens celulares.

Apesar de danos no DNA não terem sido observados nas células HepG2/C3A e HB4a, houve indução significativa da expressão do gene *GADD45A* em todas as linhagens celulares avaliadas, após 24 horas de exposição à salinomicina 40  $\mu\text{M}$ . Esse gene tem o nível de seus transcritos aumentado quando há estresse celular por danos no DNA, podendo resultar em parada do ciclo celular, reparo do DNA, senescência ou apoptose (LIEBERMANN; HOFFMAN, 2008).

Com a parada do ciclo celular, os danos no DNA podem ser reparados ou as células podem ser encaminhadas à morte por apoptose. A fim de avaliar se existe parada do ciclo celular, as linhagens celulares HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a foram avaliadas por citometria de fluxo. Foi observada parada em fase G2/M somente na linhagem HepG2/C3A. O produto do gene *GADD45A* regula o checkpoint G2/M (WANG, X. W. et al., 1999), inibindo o complexo Cdk1/Ciclina B1 (ZHAN et al., 1999), necessário para a progressão para

mitose. Diminuição dos níveis de expressão do gene *CCNB1*, que codifica a ciclina B1, também foram observados nas linhagens tumorais HepG2/C3A e MCF-7, sugerindo parada do ciclo celular na fase G2/M. Nesse contexto, houve indução de expressão do gene *CDKN1A*, que codifica a proteína p21, contribuindo com a inibição do complexo ciclina/cdk e replicação do DNA (MEDEMA et al., 1998). Além da ciclina B1, nas três linhagens celulares analisadas, houve também redução da expressão de *CCNA2*, que codifica a ciclina A2. Apesar da parada em G2/M das células tumorais, foi verificada diminuição da expressão do gene *TP53*. No entanto, há relatos de que a regulação do checkpoint G2/M possa ocorrer de modo independente de p53 (ZHAN et al., 1999), incluindo o aumento dos níveis de p21 pela salinomicina (AL DHAHERI et al., 2013). Ainda, nas células HepG2/C3A, houve redução da expressão do gene *CTNNB1*, que codifica a proteína  $\beta$ -catenina, o que pode ter ocorrido por inibição da via Wnt/ $\beta$ -catenina já demonstrada em outros trabalhos com células de osteosarcoma (TANG et al., 2011), células de leucemia linfocítica crônica (LU, D. et al., 2011), células de câncer de mama e de próstata (LU, W.; LI, 2014), carcinoma hepatocelular (WANG, F. et al., 2012) e carcinoma nasofaríngeo (WU et al., 2014). O efeito antitumoral da salinomicina associada a baixa expressão de  $\beta$ -catenina foi relatado em outro trabalho (WU et al., 2014). Wang et al (WANG, F. et al., 2012) verificaram que a salinomicina reduz a proliferação das células HepG2 e induz morte por apoptose *in vitro* e *in vivo* e que o possível mecanismo seria a inibição da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina devido ao aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular (WANG, F. et al., 2012). Essa característica da salinomicina em alterar o fluxo de íons entre membranas é resultado da sua atividade como ionóforo. Alteração do fluxo de íons também foi demonstrada em outros trabalhos (BOEHMERLE; ENDRES, 2011; MITANI et al., 1976; STEVERDING; SEXTON, 2013) e esse pode ser um importante mecanismo de citotoxicidade da salinomicina.

A redução da proliferação celular pela salinomicina por parada em G2/M também foi relatada em outros estudos. Al Dhaheri et al. relataram parada em G2/M em células de tumor de mama humano MDA-MB-231 após exposição à salinomicina 10 e 25  $\mu$ M de modo tempo e dose-dependente (AL DHAHERI et al., 2013). Diminuição de expressão de ciclina B1 também foi relatada, confirmando a parada do ciclo na fase G2 (AL DHAHERI et al., 2013).

Além da parada de ciclo celular, a redução da proliferação celular pode ocorrer por indução de morte por apoptose. No presente trabalho, a salinomicina 40  $\mu$ M reduziu a quantidade de células viáveis e aumentou a população de células em apoptose tardia/necrose somente nas células tumorais HepG2/C3A e MCF-7 após 24 horas de

tratamento. As imagens realizadas após coloração das células com Hoechst 33342 confirmam os dados obtidos pela citometria de fluxo, onde um maior número de células em apoptose tardia foram observadas. A indução de morte celular pode ter sido uma consequência da parada do ciclo celular. Nenhuma alteração foi observada nas células não tumorais HB4a, mostrando, mais uma vez, a sua maior resistência à salinomicina. Outros trabalhos também relataram indução de apoptose pela salinomicina em linhagens tumorais (AL DHAHERI et al., 2013; FUCHS et al., 2009; KIM, J. H. et al., 2012; KIM, K. Y. et al., 2011; LEE et al., 2014; WANG, F. et al., 2012; WU et al., 2014; ZHOU et al., 2013).

Nas linhagens tumorais, a indução de morte celular pela salinomicina pode estar relacionada com a acentuada repressão da expressão do gene anti-apoptótico *BCL-2*, que teve sua expressão reduzida 29,4 vezes nas células HepG2/C3A e 14,1 vezes nas células MCF-7 em relação ao controle. Além da repressão de *BCL-2*, houve indução de expressão do gene pró-apoptótico *BAK* nas células HepG2/C3A e redução da expressão dos genes antiapoptóticos *BIRC5*, que codifica a proteína survivina, e *BCL-XL* nas células MCF-7. A ativação do processo de apoptose pela salinomicina de modo independente de p53 e sem ativação de caspases já foi relatada em outros trabalhos (FUCHS et al., 2009; KETOLA et al., 2012). Nossos dados estão em concordância com os resultados de Al Dhaheri et al., onde foi relatada diminuição dos níveis da proteína survivina após exposição à salinomicina 25 e 50  $\mu\text{M}$  por 24 e 48 horas, sensibilizando células de câncer de mama MD-MB-231 à morte (AL DHAHERI et al., 2013). Regulação negativa de *BCL-XL* pela salinomicina também foi observada em células de câncer colorretal (ZHOU et al., 2013) e em células de cultura primária de leiomioma uterino humano (LEE et al., 2014). Nossos resultados também estão em concordância com outros estudos, que também relataram indução de apoptose e redução da expressão de *BCL-2* após exposição à salinomicina (KUSUNOKI et al., 2013; LEE et al., 2014). Já na linhagem não tumoral HB4a, houve um aumento na expressão de *BAK*, porém com redução de *CASP9*, o que pode ter impedido o desencadeamento da cascata apoptótica nessas células. Outros trabalhos já relataram a redução de expressão de *CASP9* como uma estratégia para prevenir a morte celular por apoptose (MAHESHWARI et al., 2011; XU et al., 2010). Este foi o primeiro trabalho a demonstrar o efeito da salinomicina em células não tumorais de mama HB4a.

Em resumo, o presente trabalho confirmou a atividade seletiva da salinomicina contra células tumorais. Nas linhagens tumorais HepG2/C3A e MCF-7, a salinomicina aumentou os níveis de *GADD45A* e *CDKN1A*, levando à redução de expressão de ciclinas A2 e B1, resultando em parada do ciclo celular na fase G2/M. Como consequência

da parada do ciclo celular, as células tumorais foram encaminhadas para morte através de acentuada repressão de *BCL-2*, com repressão do gene *BAK* nas células HepG2/C3A e via inibição dos genes *BCL-XL* e *BIRC5* nas células MCF-7. Esses dados sugerem o grande potencial da salinomycina como droga anticâncer, já que atua na destruição apenas das linhagens tumorais e não foi eficaz na célula não tumoral testada.

## AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa teve o apoio financeiro do CNPq, CAPES e Fundação Araucária.

## REFERÊNCIAS

1. Chari, R.V. (2008) Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. *Accounts of chemical research*, **41**, 98-107.
2. Miyazaki, Y., Shibuya, M., Sugawara, H., Kawaguchi, O., and Hirsoe, C. (1974) Salinomycin, a new polyether antibiotic. *The Journal of antibiotics*, **27**, 814-821.
3. Li, Y., Fang, J., Wu, S., Ma, K., Li, H., Yan, X., and Dong, F. (2010) Identification and quantification of salinomycin in intoxicated human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Analytical and bioanalytical chemistry*, **398**, 955-961.
4. Ivanova, J., Pantcheva, I.N., Mitewa, M., Simova, S., Tanabe, M., and Osakada, K. (2011) Cd(II) and Pb(II) complexes of the polyether ionophorous antibiotic salinomycin. *Chemistry Central journal*, **5**, 52.
5. Callaway, T.R., Edrington, T.S., Rychlik, J.L., Genovese, K.J., Poole, T.L., Jung, Y.S., Bischoff, K.M., Anderson, R.C., and Nisbet, D.J. (2003) Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Current issues in intestinal microbiology*, **4**, 43-51.
6. Gupta, P.B., Onder, T.T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R.A., and Lander, E.S. (2009) Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, **138**, 645-659.
7. Eyler, C.E., and Rich, J.N. (2008) Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, **26**, 2839-2845.
8. Fuchs, D., Heinold, A., Opelz, G., Daniel, V., and Naujokat, C. (2009) Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **390**, 743-749.
9. Zhi, Q.M., Chen, X.H., Ji, J., Zhang, J.N., Li, J.F., Cai, Q., Liu, B.Y., Gu, Q.L., Zhu, Z.G., and Yu, Y.Y. (2011) Salinomycin can effectively kill ALDH(high) stem-like cells on gastric cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, **65**, 509-515.
10. Kim, J.H., Kim, T.Y., Kim, H.S., Hong, S., and Yoon, S. (2012) Lower salinomycin concentration increases apoptotic detachment in high-density cancer cells. *International journal of molecular sciences*, **13**, 13169-13182.

11. Arafat, K., Iratni, R., Takahashi, T., Parekh, K., Al Dhaheri, Y., Adrian, T.E., and Attoub, S. (2013) Inhibitory Effects of Salinomycin on Cell Survival, Colony Growth, Migration, and Invasion of Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 and LNM35: Involvement of NAG-1. *PloS one*, **8**, e66931.
12. He, L., Wang, F., Dai, W.Q., Wu, D., Lin, C.L., Wu, S.M., Cheng, P., Zhang, Y., Shen, M., Wang, C.F., Lu, J., Zhou, Y.Q., Xu, X.F., Xu, L., and Guo, C.Y. (2013) Mechanism of action of salinomycin on growth and migration in pancreatic cancer cell lines. *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology*, **13**, 72-78.
13. Kim, J.H., Choi, A.R., Kim, Y.K., Kim, H.S., and Yoon, S. (2013) Low amount of salinomycin greatly increases Akt activation, but reduces activated p70S6K levels. *International journal of molecular sciences*, **14**, 17304-17318.
14. Tang, Q.L., Zhao, Z.Q., Li, J.C., Liang, Y., Yin, J.Q., Zou, C.Y., Xie, X.B., Zeng, Y.X., Shen, J.N., Kang, T., and Wang, J. (2011) Salinomycin inhibits osteosarcoma by targeting its tumor stem cells. *Cancer letters*, **311**, 113-121.
15. Kim, K.Y., Yu, S.N., Lee, S.Y., Chun, S.S., Choi, Y.L., Park, Y.M., Song, C.S., Chatterjee, B., and Ahn, S.C. (2011) Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochemical and biophysical research communications*, **413**, 80-86.
16. Ketola, K., Hilvo, M., Hyotylainen, T., Vuoristo, A., Ruskeepaa, A.L., Oresic, M., Kallioniemi, O., and Iljin, K. (2012) Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress. *British journal of cancer*, **106**, 99-106.
17. Li, T., Su, L., Zhong, N., Hao, X., Zhong, D., Singhal, S., and Liu, X. (2013) Salinomycin induces cell death with autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress in human cancer cells. *Autophagy*, **9**, 1057-1068.
18. Wang, F., He, L., Dai, W.Q., Xu, Y.P., Wu, D., Lin, C.L., Wu, S.M., Cheng, P., Zhang, Y., Shen, M., Wang, C.F., Lu, J., Zhou, Y.Q., Xu, X.F., Xu, L., and Guo, C.Y. (2012) Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *PloS one*, **7**, e50638.
19. Koo, K.H., Kim, H., Bae, Y.K., Kim, K., Park, B.K., Lee, C.H., and Kim, Y.N. (2013) Salinomycin induces cell death via inactivation of Stat3 and downregulation of Skp2. *Cell death & disease*, **4**, e693.
20. Rollinson, J., Taylor, F.G., and Chesney, J. (1987) Salinomycin poisoning in horses. *The Veterinary record*, **121**, 126-128.
21. Griffiths, G.L., Hillier, P., and Sutherland, R.J. (1989) Salinomycin poisoning in point-of-lay turkeys. *Australian veterinary journal*, **66**, 326-329.
22. Kavanagh, N.T., and Sparrow, D.S. (1990) Salinomycin toxicity in pigs. *The Veterinary record*, **127**, 507.
23. van der Linde-Sipman, J.S., van den Ingh, T.S., van nes, J.J., Verhagen, H., Kersten, J.G., Beynen, A.C., and Plekkringa, R. (1999) Salinomycin-induced polyneuropathy in cats: morphologic and epidemiologic data. *Veterinary pathology*, **36**, 152-156.
24. Story, P., and Doube, A. (2004) A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic. *The New Zealand medical journal*, **117**, U799.
25. Omid, A., Aslani, M.R., Movassaghi, A.R., Mohri, M., and Dadfar, M. (2010) Accidental salinomycin intoxication in calves. *The Canadian veterinary journal. La revue veterinaire canadienne*, **51**, 1143-1145.
26. Boehmerle, W., and Endres, M. (2011) Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death. *Cell death & disease*, **2**, e168.

27. Martinez-Serra, J., Gutierrez, A., Munoz-Capo, S., Navarro-Palou, M., Ros, T., Amat, J.C., Lopez, B., Marcus, T.F., Fueyo, L., Suquia, A.G., Gines, J., Rubio, F., Ramos, R., and Besalduch, J. (2014) xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. *Oncotargets and therapy*, **7**, 985-994.
28. Roshan Moniri, M., Young, A., Reinheimer, K., Rayat, J., Dai, L.J., and Warnock, G.L. (2015) Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). *Cytotechnology*, **67**, 379-386.
29. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, **65**, 55-63.
30. Huang, Y.H., Shang, B.Y., and Zhen, Y.S. (2005) Antitumor efficacy of lidamycin on hepatoma and active moiety of its molecule. *World journal of gastroenterology : WJG*, **11**, 3980-3984.
31. Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., and Sasaki, Y.F. (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environmental and molecular mutagenesis*, **35**, 206-221.
32. Savio, A.L., da Silva, G.N., de Camargo, E.A., and Salvadori, D.M. (2014) Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). *Mutation research. Fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis*, **762**, 40-46.
33. Chazotte, B. (2011) Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. *Cold Spring Harbor protocols*, **2011**, pdb prot5557.
34. Janicke, R.U. (2009) MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. *Breast cancer research and treatment*, **117**, 219-221.
35. Westerink, W.M., and Schoonen, W.G. (2007) Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **21**, 1581-1591.
36. Tsuboy, M.S., Marcarini, J.C., de Souza, A.O., de Paula, N.A., Dorta, D.J., Mantovani, M.S., and Ribeiro, L.R. (2014) Genistein at maximal physiologic serum levels induces G0/G1 arrest in MCF-7 and HB4a cells, but not apoptosis. *Journal of medicinal food*, **17**, 218-225.
37. de Paula, N.A., Niwa, A.M., Vesenick, D.C., Panis, C., Cecchini, R., de Fatima, A., Ribeiro, L.R., and Mantovani, M.S. (2013) Evaluation of the effects of nicorandil and its molecular precursor (without radical NO) on proliferation and apoptosis of 786-cell. *Cytotechnology*, **65**, 839-850.
38. Zhang, T., Otevrel, T., Gao, Z., Gao, Z., Ehrlich, S.M., Fields, J.Z., and Boman, B.M. (2001) Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. *Cancer research*, **61**, 8664-8667.
39. Aquino, I., Tsuboy, M.S., Marcarini, J.C., Mantovani, M.S., Perazzo, F.F., and Maistro, E.L. (2013) Genotoxic evaluation of the antimalarial drugs artemisinin and artesunate in human HepG2 cells and effects on CASP3 and SOD1 gene expressions. *Genetics and molecular research : GMR*, **12**, 2517-2527.
40. Castaneda, F., and Rosin-Steiner, S. (2006) Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: role of various signal transduction pathways. *International journal of medical sciences*, **3**, 160-167.
41. Hsieh, W.T., Huang, K.Y., Lin, H.Y., and Chung, J.G. (2006) Physalis angulata induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. *Food and chemical*

- toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, **44**, 974-983.
42. Diogo Campos Vesenick, N.A.d.P., Andressa Megumi Niwa, Mário Sérgio Mantovani (2012) Evaluation of the Effects of Chlorophyllin on Apoptosis Induction, Inhibition of Cellular Proliferation and mRNA Expression of CASP8, CASP9, APC and  $\beta$ -catenin. *Current Research Journal of Biological Sciences*, **4(3)**, 7.
  43. Sugaya, S., Nakanishi, H., Tanzawa, H., Sugita, K., Kita, K., and Suzuki, N. (2005) Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. *Mutation research*, **578**, 327-332.
  44. Brandimarto, J.A. (2009) Molecular regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 by signaling molecules downstream of the IGF-I receptor in mammary epithelial cells. The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey.
  45. Javelaud, D., and Besancon, F. (2002) Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 37949-37954.
  46. IDT (Integrated DNA Technologies) PrimerQuest © Copyright 2012. Whitehead Institute for Biomedical Research, pp. IDT's PrimerQuest incorporates Primer3 software (version 2.2.3).
  47. Pfaffl, M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, **29**, e45.
  48. Pfaffl, M.W., Horgan, G.W., and Dempfle, L. (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic acids research*, **30**, e36.
  49. Zhou, J., Li, P., Xue, X., He, S., Kuang, Y., Zhao, H., Chen, S., Zhi, Q., and Guo, X. (2013) Salinomycin induces apoptosis in cisplatin-resistant colorectal cancer cells by accumulation of reactive oxygen species. *Toxicology letters*, **222**, 139-145.
  50. Fuchs, D., Daniel, V., Sadeghi, M., Opelz, G., and Naujokat, C. (2010) Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochemical and biophysical research communications*, **394**, 1098-1104.
  51. Jangamreddy, J.R., Ghavami, S., Grabarek, J., Kratz, G., Wiechec, E., Fredriksson, B.A., Rao Pariti, R.K., Cieslar-Pobuda, A., Panigrahi, S., and Los, M.J. (2013) Salinomycin induces activation of autophagy, mitophagy and affects mitochondrial polarity: differences between primary and cancer cells. *Biochimica et biophysica acta*, **1833**, 2057-2069.
  52. Steverding, D., and Sexton, D.W. (2013) Trypanocidal activity of salinomycin is due to sodium influx followed by cell swelling. *Parasites & vectors*, **6**, 78.
  53. Al Dhaheri, Y., Attoub, S., Arafat, K., Abuqamar, S., Eid, A., Al Faresi, N., and Iratni, R. (2013) Salinomycin induces apoptosis and senescence in breast cancer: upregulation of p21, downregulation of survivin and histone H3 and H4 hyperacetylation. *Biochimica et biophysica acta*, **1830**, 3121-3135.
  54. Cybulski, W., Radko, L., and Rzeski, W. (2015) Cytotoxicity of monensin, narasin and salinomycin and their interaction with silybin in HepG2, LMH and L6 cell cultures. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, **29**, 337-344.
  55. Liebermann, D.A., and Hoffman, B. (2008) Gadd45 in stress signaling. *Journal of molecular signaling*, **3**, 15.
  56. Wang, X.W., Zhan, Q., Coursen, J.D., Khan, M.A., Kontny, H.U., Yu, L., Hollander, M.C., O'Connor, P.M., Fornace, A.J., Jr., and Harris, C.C. (1999) GADD45 induction

- of a G2/M cell cycle checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 3706-3711.
57. Zhan, Q., Antinore, M.J., Wang, X.W., Carrier, F., Smith, M.L., Harris, C.C., and Fornace, A.J., Jr. (1999) Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*, **18**, 2892-2900.
  58. Medema, R.H., Klompaker, R., Smits, V.A., and Rijksen, G. (1998) p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene*, **16**, 431-441.
  59. Lu, D., Choi, M.Y., Yu, J., Castro, J.E., Kipps, T.J., and Carson, D.A. (2011) Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 13253-13257.
  60. Lu, W., and Li, Y. (2014) Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/beta-catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, **115**, 1799-1807.
  61. Wu, D., Zhang, Y., Huang, J., Fan, Z., Shi, F., and Wang, S. (2014) Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cell in vitro and suppresses tumor growth in vivo. *Biochemical and biophysical research communications*, **443**, 712-717.
  62. Mitani, M., Yamanishi, T., Miyazaki, Y., and Otake, N. (1976) Salinomycin effects on mitochondrial ion translocation and respiration. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **9**, 655-660.
  63. Lee, H.G., Lee, J.M., Shin, S.J., Kwon, S.H., Lee, G.S., Song, C.H., Choi, E.S., Cha, S.D., and Cho, C.H. (2014) Salinomycin inhibited cell proliferation and induced apoptosis in human uterine leiomyoma cells. *Obstetrics & gynecology science*, **57**, 501-506.
  64. Kusunoki, S., Kato, K., Tabu, K., Inagaki, T., Okabe, H., Kaneda, H., Suga, S., Terao, Y., Taga, T., and Takeda, S. (2013) The inhibitory effect of salinomycin on the proliferation, migration and invasion of human endometrial cancer stem-like cells. *Gynecologic oncology*, **129**, 598-605.
  65. Maheshwari, A., Misro, M.M., Aggarwal, A., Sharma, R.K., and Nandan, D. (2011) N-acetyl-L-cysteine counteracts oxidative stress and prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced germ cell apoptosis through down-regulation of caspase-9 and JNK/c-Jun. *Molecular reproduction and development*, **78**, 69-79.
  66. Xu, Z.R., Hu, L., Cheng, L.F., Qian, Y., and Yang, Y.M. (2010) Dihydrotestosterone protects human vascular endothelial cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis through inhibition of caspase-3, caspase-9 and p38 MAPK. *European journal of pharmacology*, **643**, 254-259.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo confirmou o potencial terapêutico da salinomicina no combate ao câncer, já que sua atividade seletiva contra células tumorais foi confirmada por ensaios de proliferação celular, citotoxicidade e indução de morte celular. Os aumentos dos níveis transcricionais dos genes *GADD45A* e *CDKN1A* após tratamento com salinomicina sugerem parada do ciclo celular na fase G2/M. A redução de expressão dos genes *CCNA2* e *CCNB1* reforçam a parada do ciclo nessa fase nas linhagens tumorais estudadas. Como consequência, as células tumorais foram encaminhadas para o processo de morte através da acentuada repressão do gene antiapoptótico *BCL-2*, com repressão do gene *BAK* nas células HepG2/C3A e via inibição dos genes *BCL-XL* e *BIRC5* nas células MCF-7. Esses dados sugerem o grande potencial da salinomicina como droga anticâncer, já que atua na destruição apenas das linhagens tumorais e não é eficaz contra a linhagem não tumoral avaliada.

## REFERÊNCIAS

- AL DHAHERI, Y. et al. Salinomycin induces apoptosis and senescence in breast cancer: upregulation of p21, downregulation of survivin and histone H3 and H4 hyperacetylation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, n. 4, p. 3121-35, 2013.
- American Cancer Society. Disponível em: < <http://www.cancer.org/> >. Acesso em: fev. 2015.
- AQUINO, I. et al. Genotoxic evaluation of the antimalarial drugs artemisinin and artesunate in human HepG2 cells and effects on CASP3 and SOD1 gene expressions. **Genet Mol Res**, v. 12, n. 3, p. 2517-27, 2013.
- ARAFAT, K. et al. Inhibitory Effects of Salinomycin on Cell Survival, Colony Growth, Migration, and Invasion of Human Non-Small Cell Lung Cancer A549 and LNM35: Involvement of NAG-1. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e66931, 2013.
- Banco de Células do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://bcrj.org.br/> >. Acesso em: nov. 2014.
- BERGEN, W. G.; BATES, D. B. Ionophores: their effect on production efficiency and mode of action. **J Anim Sci**, v. 58, n. 6, p. 1465-83, 1984.
- BOEHMERLE, W.; ENDRES, M. Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death. **Cell Death Dis**, v. 2, p. e168, 2011.
- BRANDIMARTO, J. A. **Molecular regulation of insulin-like growth factor binding protein-5 by signaling molecules downstream of the IGF-I receptor in mammary epithelial cells**. 2009. The State University of New Jersey, New Brunswick, New Jersey.
- CALLAWAY, T. R. et al. Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. **Curr Issues Intest Microbiol**, v. 4, n. 2, p. 43-51, 2003.
- CARVALHO, C. et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect. **Curr Med Chem**, v. 16, n. 25, p. 3267-85, 2009.
- CASTANEDA, F.; ROSIN-STEINER, S. Low concentration of ethanol induce apoptosis in HepG2 cells: role of various signal transduction pathways. **Int J Med Sci**, v. 3, n. 4, p. 160-7, 2006.
- CHARI, R. V. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. **Acc Chem Res**, v. 41, n. 1, p. 98-107, 2008.
- CHAZOTTE, B. Labeling nuclear DNA with hoechst 33342. **Cold Spring Harb Protoc**, v. 2011, n. 1, p. pdb prot5557, 2011.
- CHEN, F. et al. Up-regulating CYP3A4 expression in C3A cells by transfection with a novel chimeric regulator of hPXR-p53-AD. **PLoS One**, v. 9, n. 5, p. e95752, 2014.

CHOY, W. N. Principles of genetic toxicology. **Drug Chem Toxicol**, v. 19, n. 3, p. 149-60, 1996.

Coxistac 120. Disponível em: < <http://vitecnutrition.co.nz/images/Coxistac.pdf> >. Acesso em: nov. 2014.

CYBULSKI, W.; RADKO, L.; RZESKI, W. Cytotoxicity of monensin, narasin and salinomycin and their interaction with silybin in HepG2, LMH and L6 cell cultures. **Toxicol In Vitro**, v. 29, n. 2, p. 337-44, 2015.

DE PAULA, N. A. et al. Evaluation of the effects of nicorandil and its molecular precursor (without radical NO) on proliferation and apoptosis of 786-cell. **Cytotechnology**, v. 65, n. 5, p. 839-50, 2013.

DIOGO CAMPOS VESENICK, N. A. D. P., ANDRESSA MEGUMI NIWA, MÁRIO SÉRGIO MANTOVANI. Evaluation of the Effects of Chlorophyllin on Apoptosis Induction, Inhibition of Cellular Proliferation and mRNA Expression of CASP8, CASP9, APC and  $\beta$ -catenin. **Current Research Journal of Biological Sciences**, v. 4(3), p. 7, 2012.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

EYLER, C. E.; RICH, J. N. Survival of the fittest: cancer stem cells in therapeutic resistance and angiogenesis. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 17, p. 2839-45, 2008.

FAHRMANN, J. F.; HARDMAN, W. E. Omega 3 fatty acids increase the chemo-sensitivity of B-CLL-derived cell lines EHEB and MEC-2 and of B-PLL-derived cell line JVM-2 to anti-cancer drugs doxorubicin, vincristine and fludarabine. **Lipids Health Dis**, v. 12, p. 36, 2013.

FEITELSON, M. A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **Semin Cancer Biol**, 2015.

FERLAY J, S. I., ERVIK M, DIKSHIT R, ESER S, MATHERS C, REBELO M, PARKIN DM, FORMAN D, BRAY, F. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France, p. International Agency for Research on Cancer, 2013. Disponível em: < <http://globocan.iarc.fr> >.

FUCHS, D. et al. Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 394, n. 4, p. 1098-104, 2010.

FUCHS, D. et al. Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 390, n. 3, p. 743-9, 2009.

GIORDANO, S. H. et al. Decline in the use of anthracyclines for breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 18, p. 2232-9, 2012.

GONG, C. et al. Markers of tumor-initiating cells predict chemoresistance in breast cancer. **PLoS One**, v. 5, n. 12, p. e15630, 2010.

GRIFFITHS, G. L.; HILLIER, P.; SUTHERLAND, R. J. Salinomycin poisoning in point-of-lay turkeys. **Aust Vet J**, v. 66, n. 10, p. 326-9, 1989.

GUPTA, P. B. et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 645-59, 2009.

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

HE, L. et al. Mechanism of action of salinomycin on growth and migration in pancreatic cancer cell lines. **Pancreatology**, v. 13, n. 1, p. 72-8, 2013.

HSIEH, W. T. et al. Physalis angulata induced G2/M phase arrest in human breast cancer cells. **Food Chem Toxicol**, v. 44, n. 7, p. 974-83, 2006.

HUANG, Y. H.; SHANG, B. Y.; ZHEN, Y. S. Antitumor efficacy of lidamycin on hepatoma and active moiety of its molecule. **World J Gastroenterol**, v. 11, n. 26, p. 3980-4, 2005.

IDT (Integrated DNA Technologies) PrimerQuest © Copyright 2012. p. IDT's PrimerQuest incorporates Primer3 software (version 2.2.3), Disponível em: <  
<http://www.idtdna.com/primerquest/home/index> >.

INCA. **Estimativa 2014. Incidência de Câncer no Brasil**

Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância: 124 p. 2014.

IVANOVA, J. et al. Cd(II) and Pb(II) complexes of the polyether ionophorous antibiotic salinomycin. **Chem Cent J**, v. 5, n. 1, p. 52, 2011.

JANGAMREDDY, J. R. et al. Salinomycin induces activation of autophagy, mitophagy and affects mitochondrial polarity: differences between primary and cancer cells. **Biochim Biophys Acta**, v. 1833, n. 9, p. 2057-69, 2013.

JANICKE, R. U. MCF-7 breast carcinoma cells do not express caspase-3. **Breast Cancer Res Treat**, v. 117, n. 1, p. 219-21, 2009.

JAVELAUD, D.; BESANCON, F. Inactivation of p21WAF1 sensitizes cells to apoptosis via an increase of both p14ARF and p53 levels and an alteration of the Bax/Bcl-2 ratio. **J Biol Chem**, v. 277, n. 40, p. 37949-54, 2002.

JONES, R. L.; SWANTON, C.; EWER, M. S. Anthracycline cardiotoxicity. **Expert Opin Drug Saf**, v. 5, n. 6, p. 791-809, 2006.

JORDAN, P.; CARMO-FONSECA, M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. **Cell Mol Life Sci**, v. 57, n. 8-9, p. 1229-35, 2000.

KAVANAGH, N. T.; SPARROW, D. S. Salinomycin toxicity in pigs. **Vet Rec**, v. 127, n. 20, p. 507, 1990.

KEATING, G. M.; SANTORO, A. Sorafenib: a review of its use in advanced hepatocellular carcinoma. **Drugs**, v. 69, n. 2, p. 223-40, 2009.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, 1972.

KETOLA, K. et al. Salinomycin inhibits prostate cancer growth and migration via induction of oxidative stress. **Br J Cancer**, v. 106, n. 1, p. 99-106, 2012.

KIM, J. H. et al. Low amount of salinomycin greatly increases Akt activation, but reduces activated p70S6K levels. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 9, p. 17304-18, 2013.

KIM, J. H. et al. Lower salinomycin concentration increases apoptotic detachment in high-density cancer cells. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 10, p. 13169-82, 2012.

KIM, K. Y. et al. Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 413, n. 1, p. 80-6, 2011.

KIM, W. K. et al. Salinomycin, a p-glycoprotein inhibitor, sensitizes radiation-treated cancer cells by increasing DNA damage and inducing G2 arrest. **Invest New Drugs**, v. 30, n. 4, p. 1311-8, 2012.

KOO, K. H. et al. Salinomycin induces cell death via inactivation of Stat3 and downregulation of Skp2. **Cell Death Dis**, v. 4, p. e693, 2013.

KRYSKO, D. V. et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205-21, 2008.

KUSUNOKI, S. et al. The inhibitory effect of salinomycin on the proliferation, migration and invasion of human endometrial cancer stem-like cells. **Gynecol Oncol**, v. 129, n. 3, p. 598-605, 2013.

LECOEUR, H.; PREVOST, M. C.; GOUGEON, M. L. Oncosis is associated with exposure of phosphatidylserine residues on the outside layer of the plasma membrane: a reconsideration of the specificity of the annexin V/propidium iodide assay. **Cytometry**, v. 44, n. 1, p. 65-72, 2001.

LEE, H. G. et al. Salinomycin inhibited cell proliferation and induced apoptosis in human uterine leiomyoma cells. **Obstet Gynecol Sci**, v. 57, n. 6, p. 501-6, 2014.

LEVENSON, A. S.; JORDAN, V. C. MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. **Cancer Res**, v. 57, n. 15, p. 3071-8, 1997.

LI, T. et al. Salinomycin induces cell death with autophagy through activation of endoplasmic reticulum stress in human cancer cells. **Autophagy**, v. 9, n. 7, p. 1057-68, 2013.

LI, Y. et al. Identification and quantification of salinomycin in intoxicated human plasma by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **Anal Bioanal Chem**, v. 398, n. 2, p. 955-61, 2010.

- LIEBERMANN, D. A.; HOFFMAN, B. Gadd45 in stress signaling. **J Mol Signal**, v. 3, p. 15, 2008.
- LU, D.; CARSON, D. A. Spiperone enhances intracellular calcium level and inhibits the Wnt signaling pathway. **BMC Pharmacol**, v. 9, p. 13, 2009.
- LU, D. et al. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 32, p. 13253-7, 2011.
- LU, W.; LI, Y. Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/beta-catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells. **J Cell Biochem**, v. 115, n. 10, p. 1799-807, 2014.
- MAHESHWARI, A. et al. N-acetyl-L-cysteine counteracts oxidative stress and prevents H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced germ cell apoptosis through down-regulation of caspase-9 and JNK/c-Jun. **Mol Reprod Dev**, v. 78, n. 2, p. 69-79, 2011.
- MAO, J. et al. Roles of Wnt/beta-catenin signaling in the gastric cancer stem cells proliferation and salinomycin treatment. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1039, 2014.
- MARTINEZ-SERRA, J. et al. xCELLigence system for real-time label-free monitoring of growth and viability of cell lines from hematological malignancies. **Onco Targets Ther**, v. 7, p. 985-94, 2014.
- MATABUDUL, D. K.; CROSBY, N. T.; SUMAR, S. A new and rapid method for the determination of ncarbazine residues in poultry feed, eggs and muscle tissue using supercritical fluid extraction and high performance liquid chromatography. **Analyst**, v. 124, n. 4, p. 499-502, 1999.
- MEDEMA, R. H. et al. p21<sup>waf1</sup> can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. **Oncogene**, v. 16, n. 4, p. 431-41, 1998.
- MITANI, M. et al. Salinomycin effects on mitochondrial ion translocation and respiration. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 9, n. 4, p. 655-60, 1976.
- MIYAZAKI, Y. et al. Salinomycin, a new polyether antibiotic. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 27, n. 11, p. 814-21, 1974.
- MOCELLIN, S. et al. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. **Trends Mol Med**, v. 9, n. 5, p. 189-95, 2003.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- OAK, P. S. et al. Combinatorial treatment of mammospheres with trastuzumab and salinomycin efficiently targets HER2-positive cancer cells and cancer stem cells. **Int J Cancer**, v. 131, n. 12, p. 2808-19, 2012.

- OMIDI, A. et al. Accidental salinomycin intoxication in calves. **Can Vet J**, v. 51, n. 10, p. 1143-5, 2010.
- PANG, T. C.; LAM, V. W. Surgical management of hepatocellular carcinoma. **World J Hepatol**, v. 7, n. 2, p. 245-52, 2015.
- PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 29, n. 9, p. e45, 2001.
- PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Res**, v. 30, n. 9, p. e36, 2002.
- POLAKIS, P. Wnt signaling and cancer. **Genes Dev**, v. 14, n. 15, p. 1837-51, 2000.
- POZAROWSKI, P.; DARZYNKIEWICZ, Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry. **Methods Mol Biol**, v. 281, p. 301-11, 2004.
- RAMASWAMI, R.; HARDING, V.; NEWSOM-DAVIS, T. Novel cancer therapies: treatments driven by tumour biology. **Postgrad Med J**, v. 89, n. 1057, p. 652-8, 2013.
- ROLLINSON, J.; TAYLOR, F. G.; CHESNEY, J. Salinomycin poisoning in horses. **Vet Rec**, v. 121, n. 6, p. 126-8, 1987.
- ROSHAN MONIRI, M. et al. Dynamic assessment of cell viability, proliferation and migration using real time cell analyzer system (RTCA). **Cytotechnology**, v. 67, n. 2, p. 379-86, 2015.
- SALOUSTROS, E.; MAVROUDIS, D.; GEORGOULIAS, V. Paclitaxel and docetaxel in the treatment of breast cancer. **Expert Opin Pharmacother**, v. 9, n. 15, p. 2603-16, 2008.
- SAVIO, A. L. et al. Cell cycle kinetics, apoptosis rates, DNA damage and TP53 gene expression in bladder cancer cells treated with allyl isothiocyanate (mustard essential oil). **Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen**, v. 762, p. 40-6, 2014.
- SCHMIDT, M. Chemotherapy in early breast cancer: when, how and which one? **Breast Care (Basel)**, v. 9, n. 3, p. 154-60, 2014.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res**, v. 175, n. 1, p. 184-91, 1988.
- SMARDOVA, J. et al. Analysis of p53 status in human cell lines using a functional assay in yeast: detection of new non-sense p53 mutation in codon 124. **Oncol Rep**, v. 14, n. 4, p. 901-7, 2005.
- SMITH, G. L. The Long and Short of Tamoxifen Therapy: A Review of the ATLAS Trial. **J Adv Pract Oncol**, v. 5, n. 1, p. 57-60, 2014.
- SOULE, H. D. et al. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J Natl Cancer Inst**, v. 51, n. 5, p. 1409-16, 1973.

- STAMPS, A. C. et al. Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. **Int J Cancer**, v. 57, n. 6, p. 865-74, 1994.
- STEVERDING, D.; SEXTON, D. W. Trypanocidal activity of salinomycin is due to sodium influx followed by cell swelling. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 78, 2013.
- STORY, P.; DOUBE, A. A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic. **N Z Med J**, v. 117, n. 1190, p. U799, 2004.
- SUGAYA, S. et al. Down-regulation of SMT3A gene expression in association with DNA synthesis induction after X-ray irradiation in nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) cells. **Mutat Res**, v. 578, n. 1-2, p. 327-32, 2005.
- TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **J Pharm Pharmacol**, v. 65, n. 2, p. 157-70, 2013.
- TANG, Q. L. et al. Salinomycin inhibits osteosarcoma by targeting its tumor stem cells. **Cancer Lett**, v. 311, n. 1, p. 113-21, 2011.
- TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v. 35, n. 3, p. 206-21, 2000.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, 2015.
- TSUBOY, M. S. et al. Genistein at maximal physiologic serum levels induces G0/G1 arrest in MCF-7 and HB4a cells, but not apoptosis. **J Med Food**, v. 17, n. 2, p. 218-25, 2014.
- VALASEK, M. A.; REPA, J. J. The power of real-time PCR. **Adv Physiol Educ**, v. 29, n. 3, p. 151-9, 2005.
- VAN DER LINDE-SIPMAN, J. S. et al. Salinomycin-induced polyneuropathy in cats: morphologic and epidemiologic data. **Vet Pathol**, v. 36, n. 2, p. 152-6, 1999.
- VAN ENGELAND, M. et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 1998.
- VERDOODT, B. et al. Salinomycin induces autophagy in colon and breast cancer cells with concomitant generation of reactive oxygen species. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e44132, 2012.
- VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. **Ann Hematol**, v. 84, n. 10, p. 627-39, 2005.
- WANG, F. et al. Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50638, 2012.
- WANG, X. W. et al. GADD45 induction of a G2/M cell cycle checkpoint. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 7, p. 3706-11, 1999.

WESTERINK, W. M.; SCHOONEN, W. G. Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells. **Toxicol In Vitro**, v. 21, n. 8, p. 1581-91, 2007.

WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. **Exp Oncol**, v. 34, n. 3, p. 255-62, 2012.

WU, D. et al. Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cell in vitro and suppresses tumor growth in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 443, n. 2, p. 712-7, 2014.

XU, Z. R. et al. Dihydrotestosterone protects human vascular endothelial cells from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis through inhibition of caspase-3, caspase-9 and p38 MAPK. **Eur J Pharmacol**, v. 643, n. 2-3, p. 254-9, 2010.

ZHAN, Q. et al. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/Cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. **Oncogene**, v. 18, n. 18, p. 2892-900, 1999.

ZHANG, N. et al. 5-Fluorouracil: mechanisms of resistance and reversal strategies. **Molecules**, v. 13, n. 8, p. 1551-69, 2008.

ZHANG, T. et al. Evidence that APC regulates survivin expression: a possible mechanism contributing to the stem cell origin of colon cancer. **Cancer Res**, v. 61, n. 24, p. 8664-7, 2001.

ZHANG, Y. et al. The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles. **Biomaterials**, v. 33, n. 2, p. 679-91, 2012.

ZHI, Q. M. et al. Salinomycin can effectively kill ALDH(high) stem-like cells on gastric cancer. **Biomed Pharmacother**, v. 65, n. 7, p. 509-15, 2011.

ZHOU, J. et al. Salinomycin induces apoptosis in cisplatin-resistant colorectal cancer cells by accumulation of reactive oxygen species. **Toxicol Lett**, v. 222, n. 2, p. 139-45, 2013.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacol Ther**, v. 92, n. 1, p. 57-70, 2001.

## **APÊNDICES**

APENDICE A  
TABELAS

**Tabela 1 -** Média e desvio padrão dos índices celulares obtidos pela análise celular em tempo real (RTCA) em células HepG2/C3A tratadas com salinomicina.

Tratamentos	Tempos de tratamento					
	24 h		48 h		72 h	
<b>Controle</b>	2,708	± 0,266	3,968	± 0,250	4,831	± 0,234
<b>Salinomicina 5 µM</b>	1,761	± 0,200 *	1,145	± 0,135 *	0,813	± 0,087 *
<b>Salinomicina 10 µM</b>	1,523	± 0,080 *	0,850	± 0,100 *	0,529	± 0,070 *
<b>Salinomicina 20 µM</b>	1,832	± 0,217 *	0,937	± 0,125 *	0,458	± 0,054 *
<b>Salinomicina 40 µM</b>	1,734	± 0,213 *	1,183	± 0,199 *	0,789	± 0,232 *
<b>Salinomicina 80 µM</b>	0,823	± 0,150 *	0,349	± 0,092 *	0,208	± 0,070 *
<b>Doxorrubicina 5 µg/mL</b>	1,640	± 0,099 *	0,511	± 0,029 *	0,113	± 0,014 *

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 2 -** Média e desvio padrão dos índices celulares obtidos pela análise celular em tempo real (RTCA) em células MCF-7 tratadas com salinomicina.

Tratamentos	Tempos de tratamento					
	24 h		48 h		72 h	
<b>Controle</b>	3,881	± 0,460	6,725	± 0,591	8,998	± 0,677
<b>Salinomicina 5 µM</b>	3,015	± 0,247 *	5,095	± 0,161 *	6,548	± 0,165 *
<b>Salinomicina 10 µM</b>	2,915	± 0,302 *	4,643	± 0,452 *	6,236	± 0,499 *
<b>Salinomicina 20 µM</b>	2,104	± 0,250 *	2,083	± 0,201 *	1,916	± 0,190 *
<b>Salinomicina 40 µM</b>	1,770	± 0,195 *	1,143	± 0,109 *	0,683	± 0,073 *
<b>Salinomicina 80 µM</b>	0,762	± 0,022 *	0,464	± 0,003 *	0,213	± 0,011 *
<b>Doxorrubicina 5 µg/mL</b>	0,552	± 0,101 *	0,193	± 0,040 *	0,128	± 0,029 *

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 3 -** Média e desvio padrão dos índices celulares obtidos pela análise celular em tempo real (RTCA) em células HB4a tratadas com salinomicina.

Tratamentos	Tempos de tratamento					
	24 h		48 h		72 h	
<b>Controle</b>	2,838	± 0,213	5,705	± 0,604	9,605	± 1,386
<b>Salinomicina 5 µM</b>	3,098	± 0,300	5,409	± 0,643	6,355	± 0,941 *
<b>Salinomicina 10 µM</b>	2,946	± 0,057	4,884	± 0,277	5,415	± 0,500 *
<b>Salinomicina 20 µM</b>	2,093	± 0,047 *	3,818	± 0,236 *	5,154	± 0,383 *
<b>Salinomicina 40 µM</b>	1,471	± 0,245 *	1,882	± 0,500 *	2,334	± 0,832 *
<b>Salinomicina 80 µM</b>	0,913	± 0,121 *	0,644	± 0,181 *	0,487	± 0,188 *
<b>Doxorrubicina 5 µg/mL</b>	0,434	± 0,042 *	0,140	± 0,024 *	0,069	± 0,020 *

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 4 -** Média e desvio padrão das absorvâncias obtidas pelo ensaio de citotoxicidade MTT em células HepG2/C3A tratadas com salinomicina.

Tratamentos	Tempos de tratamento					
	24 h		48 h		72 h	
Controle	1,766	± 0,009	2,480	± 0,091	2,832	± 0,109
Salinomicina 5 µM	2,036	± 0,139	2,257	± 0,152 *	2,331	± 0,075 *
Salinomicina 10 µM	1,964	± 0,079	2,078	± 0,056 *	2,005	± 0,052 *
Salinomicina 20 µM	1,550	± 0,009 *	1,593	± 0,134 *	1,100	± 0,016 *
Salinomicina 40 µM	1,215	± 0,023 *	1,131	± 0,078 *	0,726	± 0,019 *
Salinomicina 80 µM	0,575	± 0,040 *	0,014	± 0,017 *	0,000	± 0,000 *
Doxorrubicina 5 µg/mL	1,273	± 0,055 *	0,696	± 0,074 *	0,391	± 0,037 *

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 5 -** Média e desvio padrão das absorvâncias obtidas pelo ensaio de citotoxicidade MTT em células MCF-7 tratadas com salinomicina.

Tratamentos	Tempos de tratamento					
	24 h		48 h		72 h	
Controle	1,080	± 0,042	1,413	± 0,046	1,824	± 0,125
Salinomicina 5 µM	1,113	± 0,021	1,348	± 0,014 *	1,593	± 0,052 *
Salinomicina 10 µM	1,047	± 0,039	1,179	± 0,014 *	1,180	± 0,051 *
Salinomicina 20 µM	0,806	± 0,041 *	0,711	± 0,012 *	0,466	± 0,022 *
Salinomicina 40 µM	0,256	± 0,022 *	0,266	± 0,027 *	0,115	± 0,014 *
Salinomicina 80 µM	0,000	± 0,000 *	0,000	± 0,000 *	0,000	± 0,000 *
Doxorrubicina 5 µg/mL	0,410	± 0,028 *	0,365	± 0,054 *	0,301	± 0,038 *

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 6 -** Média e desvio padrão das absorvâncias obtidas pelo ensaio de citotoxicidade MTT em células HB4a tratadas com salinomicina.

Tratamentos	Tempos de tratamento					
	24 h		48 h		72 h	
Controle	0,237	± 0,024	0,380	± 0,019	0,589	± 0,013
Salinomicina 5 µM	0,270	± 0,022	0,383	± 0,010	0,438	± 0,024 *
Salinomicina 10 µM	0,255	± 0,030	0,387	± 0,025	0,457	± 0,016 *
Salinomicina 20 µM	0,217	± 0,024	0,292	± 0,011 *	0,318	± 0,009 *
Salinomicina 40 µM	0,222	± 0,023	0,216	± 0,003 *	0,177	± 0,011 *
Salinomicina 80 µM	0,163	± 0,022 *	0,075	± 0,004 *	0,029	± 0,002 *
Doxorrubicina 5 µg/mL	0,176	± 0,031 *	0,162	± 0,006 *	0,161	± 0,022 *

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 7 -** Média e desvio padrão dos escores obtidos pelo ensaio do cometa em células HepG2/C3A tratadas com salinomicina.

Tratamentos	Média		Desvio padrão	
Controle	14,375	±	1,536	
Salinomicina 10 µM	12,417	±	1,283	
Salinomicina 20 µM	14,208	±	4,101	
Salinomicina 40 µM	16,000	±	3,279	
Doxorrubicina 1 µM	43,500	±	4,148	*

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 8 -** Média e desvio padrão dos escores obtidos pelo ensaio do cometa em células MCF-7 tratadas com salinomicina.

Tratamentos	Média		Desvio padrão	
Controle	8,292	±	2,526	
Salinomicina 10 µM	9,458	±	2,774	
Salinomicina 20 µM	8,208	±	3,545	
Salinomicina 40 µM	16,208	±	3,442	*
Doxorrubicina 1 µM	33,167	±	3,413	*

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 9 -** Média e desvio padrão dos escores obtidos pelo ensaio do cometa em células HB4a tratadas com salinomicina.

Tratamentos	Média		Desvio padrão	
Controle	4,500	±	1,984	
Salinomicina 10 µM	3,542	±	0,402	
Salinomicina 20 µM	6,625	±	4,076	
Salinomicina 40 µM	5,875	±	1,521	
Doxorrubicina 1 µM	30,417	±	1,120	*

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 10 -** Análise de ciclo celular por citometria de fluxo. Média e desvio padrão das porcentagens de células HepG2/C3A tratadas com salinomicina nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular.

Tratamentos	Fases do ciclo celular									
	G1			S			G2/M			
Controle	63	±	6	18	±	3		19	±	6
Salinomicina 10 µM	67	±	8	10	±	1	*	23	±	8
Salinomicina 20 µM	51	±	9	13	±	4	*	34	±	7
Salinomicina 40 µM	47	±	6	17	±	2		34	±	5

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 11** - Análise de ciclo celular por citometria de fluxo. Média e desvio padrão das porcentagens de células MCF-7 tratadas com salinomicina nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular.

Tratamentos	Fases do ciclo celular								
	G1			S			G2/M		
Controle	53	±	6	26	±	3	20	±	4
Salinomicina 10 µM	63	±	7	18	±	3	17	±	4
Salinomicina 20 µM	51	±	11	16	±	2	30	±	7
Salinomicina 40 µM	41	±	6	25	±	3	30	±	2

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 12** - Análise de ciclo celular por citometria de fluxo. Média e desvio padrão das porcentagens de células HB4a tratadas com salinomicina nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular.

Tratamentos	Fases do ciclo celular								
	G1			S			G2/M		
Controle	50	±	6	21	±	0	27	±	7
Salinomicina 10 µM	61	±	8	17	±	6	22	±	3
Salinomicina 20 µM	51	±	6	17	±	2	31	±	7
Salinomicina 40 µM	46	±	5	16	±	0	36	±	6

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 13** - Análise de morte celular por citometria de fluxo. Média e desvio padrão das porcentagens de células HepG2/C3A viáveis, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose após tratamento com salinomicina.

Tratamentos	Viáveis		Apoptose inicial		Apoptose tardia/necrose	
Controle	82,98	± 5,84	4,08	± 2,60	12,94	± 3,79
Salinomicina 10 µM	76,39	± 10,09	10,01	± 7,99	13,61	± 2,75
Salinomicina 20 µM	67,76	± 10,61	7,39	± 4,76	24,85	± 7,85
Salinomicina 40 µM	60,35	± 0,64 *	6,88	± 5,89	32,77	± 6,10

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 14** - Análise de morte celular por citometria de fluxo. Média e desvio padrão das porcentagens de células MCF-7 viáveis, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose após tratamento com salinomicina.

Tratamentos	Viáveis		Apoptose inicial		Apoptose tardia/necrose	
Controle	76,99	± 6,31	0,54	± 0,07	22,48	± 6,29
Salinomicina 10 µM	69,97	± 12,40	0,89	± 0,42	29,14	± 12,07
Salinomicina 20 µM	64,60	± 8,44	1,03	± 0,57	34,37	± 7,87
Salinomicina 40 µM	43,89	± 4,24 *	0,90	± 0,25	55,21	± 4,02

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 15 -** Análise de morte celular por citometria de fluxo. Média e desvio padrão das porcentagens de células HB4a viáveis, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose após tratamento com salinomicina.

Tratamentos	Viáveis		Apoptose inicial		Apoptose tardia/necrose	
Controle	85,42	± 1,26	4,20	± 2,36	10,38	± 3,18
Salinomicina 10 µM	84,79	± 3,92	3,27	± 1,48	11,94	± 4,07
Salinomicina 20 µM	83,22	± 4,03	3,42	± 1,46	13,36	± 2,69
Salinomicina 40 µM	81,72	± 3,58 *	3,20	± 0,67	15,09	± 3,14

\* Diferença estatisticamente significativa em relação ao Controle ( $p < 0,05$ ) pelo teste ANOVA seguido de Dunnett.

**Tabela 16 -** Expressão relativa dos genes relacionados a danos no DNA (*GADD45A*) e ao ciclo celular *CDKN1A*, *TP53*, *CCNA2*, *CCNB1* e *CTNNB1* obtida por RT-PCR em tempo real. Média e desvio padrão da expressão relativa obtida em células HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a após tratamento com salinomicina 40 µM.

Genes	Expressão relativa		
	HepG2/C3A	MCF-7	HB4a
<i>GADD45A</i>	14,45 ± 4,66	3,54 ± 0,88	4,45 ± 0,91
<i>CDKN1A</i>	5,84 ± 2,83	4,24 ± 0,54	11,09 ± 0,45
<i>TP53</i>	-6,21 ± 1,49	-4,67 ± 1,01	-2,01 ± 0,74
<i>CCNA2</i>	-3,88 ± 0,56	-11,76 ± 3,15	-2,54 ± 0,54
<i>CCNB1</i>	-2,08 ± 0,60	-2,56 ± 0,29	-1,67 ± 0,22
<i>CTNNB1</i>	-4,35 ± 0,18	-1,74 ± 0,27	1,51 ± 0,10

\* Diferença estatisticamente significativa, realizada conforme parâmetros do software REST (Pfaffl, 2002) e com expressão relativa acima de 2 ou abaixo de -2.

**Tabela 17 -** Expressão relativa dos genes relacionados ao processo de morte por apoptose *CASP3*, *CASP7*, *CASP8*, *CASP9*, *BAX*, *BAK*, *BCL-2*, *BCL-XL* e *BIRC5* obtidas por RT-PCR em tempo real. Média e desvio padrão da expressão relativa obtida em células HepG2/C3A, MCF-7 e HB4a após tratamento com salinomicina 40 µM.

Genes	Expressão relativa		
	HepG2/C3A	MCF-7	HB4a
<i>CASP3</i>	1,57 ± 0,20	--- ---	1,08 ± 0,09
<i>CASP7</i>	1,62 ± 0,10	-1,57 ± 1,47	-1,08 ± 0,11
<i>CASP8</i>	-1,23 ± 0,16	-4,15 ± 0,83	-1,47 ± 0,21
<i>CASP9</i>	-1,75 ± 0,04	-1,46 ± 1,02	-2,29 ± 0,05
<i>BAX</i>	-3,60 ± 0,17	1,42 ± 0,08	1,71 ± 0,38
<i>BAK</i>	2,58 ± 0,33	-3,91 ± 0,58	2,03 ± 0,57
<i>BCL-2</i>	-29,41 ± 6,10	-14,09 ± 1,42	-1,28 ± 0,09
<i>BCL-XL</i>	2,82 ± 0,01	-6,45 ± 0,82	1,29 ± 0,09
<i>BIRC5</i>	-1,52 ± 0,23	-2,08 ± 0,40	-1,12 ± 0,84

\* Diferença estatisticamente significativa, realizada conforme parâmetros do software REST (Pfaffl, 2002) e com expressão relativa acima de 2 ou abaixo de -2.