



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

GIULIANA CASTELLO COATTI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS,
GENOTÓXICOS E MECANISMO DE AÇÃO DO ALCALÓIDE
ASPIDOSPERMINA EM SISTEMA DE CULTURA DE
CÉLULAS METABOLIZADORAS HepG2**

Londrina
2013

GIULIANA CASTELLO COATTI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS,
GENOTÓXICOS E MECANISMO DE AÇÃO DO ALCALÓIDE
ASPIDOSPERMINA EM SISTEMA DE CULTURA DE
CÉLULAS METABOLIZADORAS HepG2**

Dissertação de mestrado 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 Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Mário Sergio Mantovani

Londrina
2013

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

C652a Coatti, Giuliana Castello.

Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mecanismo de ação do alcalóide aspidoespermina em sistema de cultura de células metabolizadoras HepG2 / Giuliana Castello Coatti. – Londrina, 2013.
63 f. : il.

Orientador: Mário Sérgio Mantovani.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Células hepáticas – Teses. 2. Células – Cultura e meios de cultura – Teses. 3. Genética – Expressão – Teses. 4. Alcalóides – Teses. 5. Toxicologia genética – 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

GIULIANA CASTELLO COATTI

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS E
MECANISMO DE AÇÃO DO ALCALÓIDE ASPIDOSPERMINA EM
SISTEMA DE CULTURA DE CÉLULAS METABOLIZADORAS HepG2**

Dissertação de mestrado 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 Mestre.

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Verônica Elisa Pimenta Vicentini
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof. Dr. Fernando Gomes Barcellos
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 20 de dezembro de 2012.

Dedico este trabalho os meus amores Giane,
Graziella, Daniel, Emilio, Giovanna e Nicolas. Pelo
simples fato de existirem.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à **Deus** pela vida. Como bióloga, apesar de seguir e acreditar na Teoria da Evolução das Espécies e não saber o que realmente Deus significa, sei que uma força maior possibilitou tudo isso. E eu estou adorando!

Ao meu **orientador Mario Sérgio Mantovani** por ter permitido que eu fizesse parte de sua equipe. Eu, uma garota sem experiência nenhuma na área, mas com muita vontade de aprender e fazer um trabalho que ajudasse a melhorar o mundo. Contrariando as coisas lógicas, ele me aceitou. Deve ser coisa de Deus!

Mário, obrigada por ter me dado a oportunidade de seguir com meu sonho!

Lógico, não podia faltar o agradecimento à **CAPES**, pelo apoio financeiro!

À **Dra. Juliana Cristina Marcarini**, a minha mentora. Nossa, como posso explicar... Sem ela NADA disso seria possível. Ela me ajudou no delineamento experimental, na execução dos experimentos, enfim, me ensinou TUDO. Desde o que era o Soro Bovino Fetal e como cultivar uma célula, até a interpretação dos resultados do Real Time. Tirando essa parte técnica, obrigada por ter sido e continuar sendo minha amiga e sempre ter me apoiado nas fases de turbulência!

Aos **meus amigos do laboratório Dani Sartori, Simone, Gláucia, Andressa, Douglas, Talita, Zane, LÍlian, Eliane e Tati**. Por todas as risadas, faxinas no lab e por terem me incentivado em umas das fases mais conturbadas que já vivi!

Aos meus **amigos Diego, Diogo, Daniele, Érika, Nats e Cleisson**, pelo simples fato de serem meus amigos e assim tornarem minha vida feliz! Em especial, agradeço à minha **eterna miguxa Laura**, que teve tanta paciência em ficar escutando minhas histórias, me apoiou em tudo e sempre me empurrou pra que eu seguisse meu sonho... E haja paciência!

À coordenadora do curso de Pós Graduação em Genética e minha eterna professora, **Dra. Ana Lúcia Dias**. Professora, obrigada pelo apoio e por ter sido uma amiga que me ajudou a tomar decisões importantes. E a culpa é sua de que eu tenha me apaixonado pela Genética. E agora?

À **Sueli** da secretaria, por sempre tão gentil, ajudar a manter a harmonia no CCB!

À **dra. Diva de Souza Andrade**, minha orientadora de iniciação científica, por ter me empurrado para fora da minha zona de conforto!

À **Dra. Gyslaine Vilas Boas** e **Dr. Marcelo Tempesta** pela enorme contribuição na qualificação!

Aos meus amores: **minha nonna Graziella, meu namorado Daniel e meus irmãos Emi, Vana e Nico**, por proporcionarem a minha existência. Sem vocês

não haveria trabalho de mestrado pois não haveria Giuliana. Sou o que sou e
estou onde estou graças ao apoio de vocês. Amores eternos!
Agradeço **à mim mesma**. Nossa, realmente não foi fácil, parabéns!
Reforço novamente aqui os agradecimentos feitos. Obrigada pessoal! Mas o
maior agradecimento de todos vai para a **minha mãe, Giane**.
Agradeço **à você mãe**, que além de $\frac{1}{2}$ de seus cromossomos, me deu a vida e
também força para jamais desistir. Obrigada também por me ensinar através de
seu próprio exemplo o que julgo mais importante: sempre buscar o algo mais.

Te amo mãe.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original”

Albert Einstein

COATTI, Giuliana, Castello. **Avaliação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos do alcalóide indólico aspidoespermina em células de hepatoma humano HepG2.** 2012. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A aspidoespermina é um alcalóide com propriedades biológicas no combate aos parasitos incluídos nos gêneros *Plasmodium*, *Leishmania* e *Trypanosoma*. Testes toxicológicos em células humanas devem ser realizados para a avaliação de riscos aos seres humanos, visando o uso futuro do composto como medicamento contra tais parasitos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade (ensaio da resazurina) a genotoxicidade (ensaio do cometa) e o mecanismo de ação (expressão gênica por qRT-PCR) deste alcalóide em sistema de cultura de células metabolizadoras HepG2. Os resultados demonstram que o tratamento com aspidoespermina foi citotóxico a partir da concentração de 75µM e apresentou efeito genotóxico a partir da concentração de 50µM. Para esta mesma concentração de 50µM (não citotóxica e genotóxica), houve aumento significativo da expressão de *CYP1A1* e *APC*, em relação ao controle não tratado. Para a concentração de 100µM, houve aumento significativo da expressão de *CYP1A1*, *GADD153* e *SOD*, e repressão da expressão de *GR*. Os resultados indicam que o tratamento com aspidoespermina a 100µM, dose que comprovadamente provoca redução de 89% do crescimento de *L. amazonenses*, pode desencadear o aumento do estresse oxidativo, aumento da resposta UPR e direcionamento à apoptose em células HepG2. Em virtude dos efeitos relatados, para que a aspidoespermina seja utilizada com segurança, recomenda-se alteração química da molécula inicial visando uma menor citotoxicidade/genotoxicidade em células hospedeiras.

Palavras-chave: Aspidoespermina. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Expressão gênica. HepG2

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Estrutura química da aspidospermin	13
Figura 2 – O desbalanço entre a produção de pró-oxidantes e anti-oxidantes pode elevar a produção de espécies reativas de oxigênio podendo causar uma série de danos à célula	21
Figura 3 – Redução de T[S]2 e de GSSG dependente de NADPH por TryR e GR	23
Figura 4 – Via de resposta à UPR.....	26
Figura 5 – Via extrínseca e intrínseca de apoptose	28

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	O GÊNERO ASPIDOSPERMA	11
2.2	ASPIDOSPERMINA	11
2.3	ESTUDO DE PRODUTOS NATURAIS	13
2.4	CULTURA DE CÉLULAS	14
2.4.1	Citotoxicidade.....	15
2.4.1.1	Ensaio de citotoxicidade da resazurina.....	15
2.5	GENOTOXICIDADE	16
2.5.1.1	Ensaio cometa ou single cell gel electrophoresis (scge) e teste de viabilidade celular por exclusão de azul de trypan.....	16
2.6	MECANISMO DE AÇÃO.....	17
2.6.1	qRT-PCR	18
2.6.1.1	Expressão de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos.....	18
2.6.1.2	Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo	20
2.6.1.3	Expressão de genes relacionados ao controle de ciclo celular	23
2.6.1.4	Expressão de genes relacionados ao estresse de retículo endoplasmático	25
2.6.1.5	Expressão de genes relacionados à apoptose.....	27
2.6.1.6	Expressão de genes relacionados ao reparo de DNA	30
3	OBJETIVO GERAL	33
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
	REFERÊNCIAS	34
	ARTIGO	44
	APÊNDICES	57

1 INTRODUÇÃO GERAL

O estudo de produtos naturais é uma etapa essencial no desenvolvimento de novos fármacos e como medida de segurança para o uso de tais produtos pela população. Após testes toxicológicos, diversas plantas utilizadas pela população com fins terapêuticos foram identificadas como causadoras de efeitos nocivos ao nosso organismo. Como exemplo é possível citar *Combretum mkhzenze*, uma planta utilizada na medicina tradicional sul-africana e que, após ser triada em testes toxicológicos, foi identificada como indutora de mutações ao DNA.

O alcaloide aspidoespermina, encontrado em várias espécies do gênero *Aspidosperma*, tem ação comprovada no combate à protozoários patogênicos dos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Plasmodium*, causadores de diversas doenças que acometem humanos como doença de chagas, leishmanioses e malária.

Apesar do seu efeito comprovado contra os parasitos, não há estudos que investiguem detalhadamente o seu efeito em células humanas. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos citotóxicos, genotóxicos bem como o mecanismo de ação da aspidoespermina em sistema de cultura de células de hepatoma humano HepG2, célula modelo de estudos toxicológicos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *ASPIDOSPERMA*

O uso frequente de espécies do gênero *Aspidosperma* pela população está associado principalmente aos seus efeitos medicinais. A baixa toxicidade e a ausência de contra-indicações de infusões têm contribuído para difusão do uso das cascas de *Aspidosperma* (KUBITZI *et al.*, 1978; WENIGER *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2004).

A última classificação proposta para o gênero foi realizada por Bolzani *et al.* (1987). Esta dividiu as espécies do gênero em 8 séries (rígida, nítida, quebrachines, polyneura, pyricolla, nobile, macrocarpa e tormentosa) com base em sua quimiotaxonomia.

Diversos exemplos de seus efeitos medicinais podem ser destacados: *A. ramiflorum* é empregada no tratamento de leishmaniose (FERREIRA *et al.*, 2004); *A. nitidum* é utilizada como anticonceptiva (RIBEIRO *et al.*, 1999), no tratamento de inflamações de útero e ovário, em diabetes, em problemas estomacais, contra câncer, febre, reumatismo (WENIGER *et al.*, 2001), e seu látex é utilizado até mesmo no combate à hanseníase pelos índios Makuna e Taiwano (RIBEIRO *et al.*, 1999). Cascas de *A. quebrachoblanco* são usadas na região andina como afrodisíaco e contra febre (LYON *et al.*, 1973; LYON *et al.*, 1973; DEUTSCH *et al.*, 1994) e, no Brasil, são utilizadas em casos de enfisema, bronquite e pneumonia, no tratamento de impotência, contra sintomas da hiperplasia prostática benigna e em dispnéia asmática e cardíaca (LYON *et al.*, 1973; LYON *et al.*, 1973; AIMI *et al.*, 1991;). Outros relatos dos efeitos medicinais dessas espécies se relacionam à atividade antimalárica de *A. nitidum*, *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum* e *A. polineuron*, utilizadas por nativos da Amazônia (BRANDÃO *et al.*, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2003; BOURDY *et al.*, 2004).

A família Apocynaceae na qual o gênero *Aspidosperma* se encontra, caracteriza-se pela ocorrência freqüente de alcalóides. Segundo Allen *et al.* (1980), nesta família há predominância de alcalóides indólicos com ampla diversidade estrutural.

2.2 ASPIDOSPERMINA

Atualmente mais de 100 alcalóides indólicos já foram isolados de plantas de *Aspidosperma*. Como exemplo, podemos citar β -anilinoacrilato de metila, fendlispermina, espegazinina, aspidospermidina, pirifolidina e aspidospermina (PEREIRA *et al.*, 2007).

Os alcalóides indólicos isolados do gênero de *Aspidosperma* possuem uma gama de efeitos biológicos como: atividade bloqueadora α -adrenérgica e ação inibitória de contrações de músculo liso (DEUTSCH *et al.*, 1994); ação analgésica (FOYE *et al.*, 1995) e efeito hipotensivo na pressão arterial (CRAVEIRO *et al.*, 1983). Os alcalóides indólicos de *Aspidosperma* apresentam ainda efeitos mutagênicos em *Salmonella typhimurium* (NUNES *et al.*, 1992); atividade contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (RIVAS *et al.*, 1999); atividades antimicrobiana e citotóxica (VERPOORTE *et al.*, 1982) e atividade antimicrobiana contra a *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (VERPOORTE *et al.*, 1983).

Em particular, um alcalóide indólico denominado aspidoaspermina (figura 1), encontrado em espécies de *Aspidosperma* das séries Nítida e Polyneura (PEREIRA *et al.*, 2007), vem recentemente despertando a atenção de pesquisadores por possuir atividade no combate à protozoários flagelados dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*. Tais parasitos podem parasitar humanos causando uma série de doenças incluindo a doença de Chagas (*T. cruzi*), a doença do sono (*T. brucei gambiense* e *T. b. rhodiensei*) e várias formas de leishmanioses (*L. brasiliensis* e *L. amazonensis*) (GALARRETA *et al.*, 2008).

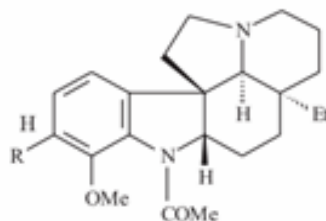
Uma característica comum destes parasitos é a sua dependência metabólica de tripanotiona redutase (TryR), uma flavoenzima NADPH-dependente que ajuda a combater o estresse oxidativo através da manutenção de níveis adequados de tripanotiona reduzida (FAIRLAMB *et al.*, 1992). Em humanos, atividade análoga é desempenhada pela enzima glutationa redutase.

Em estudo recente, Galarreta *et al.* (2008) avaliaram 23 compostos heterocíclicos cuja estrutura era compatível com moléculas inibidoras de TryR conhecidas. A aspidoaspermina foi escolhida para fazer parte deste estudo por ser um produto natural e por possuir estrutura semelhante ao farmacóforo de inibição de TryR. Foi detectado 89% de inibição de crescimento em *L. amazonensis* na fase de promastigotas quando tratados com aspidoaspermina. Neste mesmo trabalho, a aspidoaspermina não apresentou efeito direto na atividade da enzima homóloga de humanos, a glutationa redutase (GALARRETA *et al.*, 2008).

Mittaine-Offer *et al.* (2002) também verificaram que, de 12 alcalóides indólicos isolados de *Aspidosperma* estudados, 7 apresentaram alta atividade antiplasmodial e 4 apresentaram atividade moderada contra este parasito. Neste trabalho, também foi avaliada a citotoxicidade destes alcalóides em células humanas de fibroblastos NIH 3T3. A aspidoaspermina obteve o maior índice de seletividade (maior atividade contra o parasito e menor citotoxicidade) dentre os compostos avaliados (MITTAINE-OFFER *et al.*, 2002).

Apesar do seu efeito comprovado contra os parasitos, não há estudos que investiguem a fundo o seu efeito em células humanas.

Figura 1 – Estrutura química da aspidospermina.



Fonte: PEREIRA *et al.*, 2007

2.3 ESTUDO DE PRODUTOS NATURAIS

É necessária uma completa investigação da eficácia e segurança de um produto para que este possa ser utilizado como um fármaco pela população. Os benefícios que estes trazem devem superar os efeitos colaterais decorrentes de seu uso (KRISHNA *et al.*, 1998). Uma grande parte da população utiliza extratos de plantas ou seus princípios ativos nos cuidados primários em relação à saúde. Isso se dá a fácil disponibilidade e baixo custo destes produtos. Neste sentido, o estudo das plantas medicinais, tradicionalmente utilizadas, é válido primeiramente, como uma pesquisa de drogas com potencial quimioterapêutico, e em segundo, como medida de segurança para o uso popular (ELGORASHI *et al.*, 2003; ARORA *et al.*, 2005).

Diversos estudos com espécies vegetais comumente utilizadas pela medicina popular apresentaram resultados mutagênicos negativos, como é o caso de *Rhizoma Polygonati Odorati* (RPO), utilizada como erva medicinal chinesa há centenas de anos no tratamento de muitas doenças como a tuberculose e o diabetes (CHEN *et al.* 2001). Por outro lado, alguns produtos derivados de plantas tidas como medicinais foram identificados como causadores de efeitos nocivos como ocorre no bulbo de *Crinum macowanii*, folhas de *Diospyros whyteana*, *Catharanthus roseus*, *Ziziphus mucronata* e ramos de *Combretum mkhzenze*, plantas usadas na medicina tradicional sul-africana e que, após a realização de testes toxicológicos, foram identificadas como indutoras de mutações. (VAN WIK *et al.*, 1997).

Em especial, os alcalóides são apontados como principio ativo de diversos medicamentos devido a um potencial farmacológico muito proeminente, apresentando

atividade antimicrobiana, antiplasmodial e antitumoral (KINGSTON *et al.*, 1978; FREDERICH *et al.*, 1999). No entanto, muitos alcalóides também já foram reconhecidos por seus efeitos genotóxicos (WANG *et al.* 1996; MEI *et al.*, 2004; 2005; ANSAH *et al.*, 2005).

2.4 CULTURA DE CÉLULAS

Sistemas de experimentação *in vivo* são utilizados para testes de novas drogas, pois representam com grande semelhança as condições humanas. No entanto, tais resultados nem sempre são satisfatórios. Estima-se que de dez (10) novas drogas testadas em animais quanto à carcinogênese ou toxicidade ou em análises laboratoriais, nove (9) não podem ser efetivamente utilizadas uma vez que não é possível prever precisamente como será a resposta em humanos (SHANKS *et al.*, 2009).

Em contra partida, os testes de toxicidade *in vitro* apresentam uma série de vantagens como: facilidade de padronização das variáveis experimentais (densidade populacional, pH, temperatura, composição do meio de cultivo, etc); a possibilidade de aplicação do estudo em qualquer fase do ciclo celular; organização dos cromossomos e do seu DNA igual à das células *in vivo*; utilização de pequenas quantidades da substância teste; além de serem ensaios econômicos, de boa reprodutibilidade e com poucas questões éticas relacionadas ao seu uso (RABELLO-GAY *et al.*, 1991; HARTUNG *et al.*, 2009).

Para que os sistemas *in vitro* utilizados em avaliações relacionadas à genotoxicidade e mutagênese sejam efetivos, é necessário que ocorra a biotransformação do fármaco. Para que tal objetivo seja atingido, é possível adicionar enzimas metabolizadoras ao sistema ou utilizar células com competência metabólica própria, como aquelas provenientes do fígado (o principal órgão metabolizador de xenobióticos), tais como HepG2 (COECKE *et al.*, 2006).

Linhagens celulares de hepatoma humano têm sido propostas em alternativa aos hepatócitos humanos, como modelos *in vitro* de fígado normal para o estudo do metabolismo de xenobióticos, toxicidade e carcinogênese. As vantagens potenciais de células de hepatoma são que, sendo uma linha celular imortal, estão prontamente disponíveis em grandes quantidades, são facilmente mantidas, podem ser facilmente criopreservadas, e as atividades de enzimas metabolizadoras de fármacos não diminuem em cultura como acontece com culturas primárias de hepatócitos humanos (DUTHIE *et al.*, 1994).

2.4.1 Citotoxicidade

Citotoxicidade é a qualidade de ser tóxico às células. O tratamento com um composto citotóxico pode resultar em uma variedade de efeitos como por exemplo, injúria em organelas, parada no ciclo celular e também direcionamento à morte celular (ex. necrose e apoptose).

Ensaio de citotoxicidade são amplamente utilizados na indústria farmacêutica. Pesquisadores podem buscar compostos citotóxicos quando o objetivo é desenvolver um fármaco que afeta células cancerosas que se dividem rapidamente. Por outro lado, há busca por compostos não citotóxicos que possam ser utilizados com segurança no tratamento de diversas doenças.

2.4.1.1 Ensaio de citotoxicidade da resazurina

O ensaio da resazurina (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) tem sido amplamente utilizado como indicador de viabilidade celular em vários tipos de ensaios de proliferação e citotoxicidade (MCMILLIAN *et al.*, 2002; BURANRAT *et al.*, 2008; BORRA *et al.*, 2009).

O ensaio é baseado na habilidade que células viáveis e metabolicamente ativas possuem em reduzir a resazurina (azul, não fluorescente) a resorufina (rosa, fluorescente). A extensão da redução da resazurina está correlacionada com o número de células vivas, uma vez que enzimas mitocondriais, que possuem atividade de diaforase, como a NADPH desidrogenase, são responsáveis pela transferência de elétrons de NADPH⁺ para resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000).

O ensaio da resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona 10-óxido) tem sido amplamente utilizado como um indicador confiável de viabilidade celular em ensaios de proliferação e citotoxicidade. Análogo a resazurina, o teste do [3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium bromide] (MTT) também tem sido empregado para quantificar a viabilidade e citotoxicidade celular, no entanto, o ensaio resazurina aparenta ser mais sensível do que o ensaio MTT (O'BRIEN *et al.*, 2000, HAMID *et al.*, 2004).

2.5 GENOTOXICIDADE

Uma célula está em constante interação com o meio externo, o que requer o transporte de diversas substâncias para a célula. Eventualmente algumas dessas substâncias podem provocar alterações em biomoléculas como proteínas, lipídios e DNA. Quando um erro é gerado no DNA, é necessário que o sistema de reparo atue para que essa lesão física na molécula não seja passada para células filhas e dessa forma se fixe no genoma na forma de mutação (MARNETT *et al.*, 2001; WOGAN, *et al.*, 2004)

Uma lesão ao DNA é denominada lesão genotóxica e esta interfere nas atividades desempenhadas pelo polímero tais como a transcrição e a replicação. Uma lesão genotóxica pode apresentar-se de diversas formas como quebras simples, quebras duplas, ligações cruzadas entre as fitas de DNA com proteínas ou com lipídios, distorções na hélice, formação de dímeros, pontes intercadeias, alquilações de bases, perda de bases, desaminações, depurinações, oxidação de bases, entre outras (MARNETT *et al.*, 2001; PAGES *et al.*, 2002; LUCH, 2005; HOUTGRAAF *et al.*, 2006; ROOS *et al.*, 2006)

Após o estresse genotóxico, a velocidade do ciclo celular é reduzida por vias de sinalização para que seja possível reparar o material genético (HOUTGRAAF *et al.*, 2006). Quando, o sistema de reparo não consegue restaurar a estrutura original da molécula uma mutação pode ser gerada ao ser transmitida para células filhas. As células filhas afetadas pela mutação podem ser germinativas, resultando em defeitos hereditários, ou células somáticas, resultando frequentemente na formação de tumores benignos ou malignos e na patogenicidade de algumas doenças crônicas degenerativas tais como as cardiovasculares e neurodegenerativas (DE FLORA *et al.*, 1996; ANDREASSI *et al.*, 2000; ARUOMA 2003, ROSS *et al.*, 2005). No entanto, quando a lesão é muito complexa e/ou muito numerosa, as vias de indução de morte celular programada eliminam a célula danificada da população (HOUTGRAAF *et al.*, 2006). Tal processo é decorrente de uma via complexa de sinalização e pode resultar em diferentes tipos de morte celular tais como necrose, apoptose, catástrofe mitótica, entre outras (ROOS *et al.*, 2006).

2.5.1.1 Ensaio cometa ou single cell gel electrophoresis (scge) e teste de viabilidade celular por exclusão de azul de trypan

O teste do cometa ou Single Cell Gel Eletrophoresis (SCGE) é utilizado na detecção de um conjunto de lesões genômicas que, após serem processadas, podem levar à

mutações (GONTIJO *et al.*, 2003). Basicamente este teste consiste na imobilização do DNA em gel de agarose. Uma célula que possua lesão em seu genoma apresentará um padrão semelhante ao de um cometa, em que a formação de caudas é resultante da migração dos fragmentos do material genético em direção ao polo positivo durante a eletroforese (LIAO *et al.*, 2009).

Os pioneiros na quantificação de dano do material genético com o auxílio de um micro gel foram Ostiling *et al.* em 1984. Esta técnica foi modificada por Singh e colaboradores em 1988, com a criação de uma versão alcalina deste ensaio, o que permitiu a separação do duplex de DNA e consequentemente avaliação de quebras, tanto na fita dupla como na fita simples.

O ensaio do cometa é bastante sensível e assim, variações nas técnicas de isolamento celular e condições gerais do experimento podem contribuir com a flutuação de resultados que muitas vezes é observada. Apesar disso, o teste do cometa apresenta uma série de vantagens que possibilitam a sua aplicação. Este representa uma técnica simples, de baixo custo, rápida e versátil (COLLINS *et al.*, 2008). Com o uso desta técnica é possível quantificar o dano sofrido pelo material genético, uma vez que os cometas podem ser analisados visualmente e classificados em 4 classes variando da classe 0, sem cauda e portanto sem dano ao material genético, à classe 3, com cauda duas vezes maior do que o diâmetro do nucleóide e portanto com dano máximo (KOBAYASHI *et al.*, 1995).

O ensaio de viabilidade celular pelo método de Exclusão do azul de Trypan é uma das técnicas mais simples utilizadas para avaliar a citotoxicidade de compostos químicos (SHMALZ, 1994). Sendo hidrofílico, este corante não penetra no interior celular cuja membrana plasmática está íntegra e, portanto as células permanecem com coloração transparente, arredondadas, com a membrana refringente e os limites celulares nítidos. Caso haja a dano ou ruptura do envoltório celular, um sinal característico que antecede a morte celular, as células apresentarão coloração azulada.

2.6 MECANISMO DE AÇÃO

A investigação do mecanismo de ação de um composto no metabolismo celular pode ser dada pela investigação do seu efeito na expressão gênica. Para tal, utiliza-se a metodologia de qRT-PCR para avaliar o nível de expressão relativa de genes chaves de diversas vias metabólicas.

2.6.1 qRT-PCR

O Real Time PCR é uma técnica derivada da PCR convencional, que apresenta a capacidade de gerar resultados quantitativos.

Conforme a reação em cadeia da enzima DNA polimerase ocorre, há emissão de fluorescência e esta prossegue aumentando em proporção direta com o aumento dos produtos da PCR a cada ciclo. Assim, os valores da fluorescência representam a quantidade de produto amplificado. Dentre os fluoróforos mais utilizados e mais sensíveis está o SYBR[®] Green. Este se liga no meio da dupla fita durante a reação de polimerização e emite uma luz verde que será detectada pelo sistema óptico do termociclador (VITZHUM *et al.*, 1999).

Uma das aplicações bastante relevantes do Real Time PCR é a possibilidade de mensurar a expressão gênica. Utilizando esta metodologia, diversas vias metabólicas podem ser estudadas como por exemplo as vias de controle de ciclo celular, de apoptose, de reparo de DNA, de metabolismo de xenobióticos, de estresse oxidativo e de estresse de retículo endoplasmático. O estudo de tais vias dará um levantamento geral de quais processos poderão estar ativados ou inativados na célula devido ao tratamento com o composto em questão.

2.6.1.1 Expressão de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos

Diariamente o nosso organismo entra em contato com uma variedade de compostos estranhos (xenobióticos) veiculados através da água e alimentos, na forma de medicamentos com fins terapêuticos, entre outros. A resposta biológica do indivíduo exposto geralmente depende da conversão da substância absorvida em um metabólito ativo ou não, com a finalidade principal de ser eliminada (OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2003).

Tal processo de alteração química sofrida pelo xenobiótico no organismo recebe o nome de Biotransformação, e ocorre através da ação de enzimas específicas e/ou inespecíficas que modificam o xenobiótico em metabólitos com propriedades diferentes das drogas originais e com características mais hidrofílicas, facilitando assim a excreção pelo organismo (MEYER, 1996). No entanto, através da Biotransformação, alguns metabólitos podem adquirir propriedades tóxicas, mutagênicas, teratogênicas, carcinogênicas ou podem ter a sua atividade aumentada (OSHIMA-FRANCO *et al.*, 2003).

A Biotransformação de drogas envolve reações bioquímicas específicas, sendo que cada etapa tem a participação de sequências enzimáticas altamente ordenadas. Tais

enzimas ocorrem em todos os tecidos do organismo, sendo o fígado o órgão que mais as concentra (WATKINS,1992).

O metabolismo de xenobióticos e hormônios esteroides é realizado por três grupos de enzimas: enzimas de fase I (sistema citocromo p450), que metabolizam a droga e modificam o substrato por meio de oxidação, hidroxilação e dealquilação, enzimas de fase II, como por exemplo a glutathione transferase, que promovem a conjugação das drogas ao sulfato, glutathione, ou hidratos de carbono para facilitar a sua excreção e enzimas de fase III que auxiliam no transporte ativo dos metabólitos para fora da célula através da membrana plasmática. (GERHOLD *et al.*, 2001).

Gene *CYP1A1* - cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1

O gene *CYP1A1* (cromossomo 15 de humanos, braço q, posição 24.1) codifica um membro da superfamília de enzimas do citocromo P-450. Tais proteínas catalisam muitas reações envolvidas no metabolismo de fármacos e síntese de colesterol, esteróides e outros lipídios (NCBI, 2011).

Um viés do metabolismo de xenobióticos é a possibilidade de ativação de carcinógenos. É amplamente aceito que vários carcinógenos são ativados principalmente por um número restrito de espécies de P-450, incluindo P-4501A1, P-4501A2, P-4502E1 e P-4503^a (GUENGERICH *et al.*, 1991; KAWAJIRI *et al.*, 1991).

Em animais modelo, P-4501A1 é expresso no fígado e em tecidos extra hepáticos como o pulmão. Tal citocromo é induzido principalmente por benzo[a]pireno, 2,3,7,8-tetracloro-dibenzo-p-dioxina (TCDD) e 3-metilcolantreno (KAWAJIRI *et al.*, 1984; KIMURA *et al.*, 1986).

Gene *GSTP1* - glutathione S-transferase pi 1

As glutathione S-transferases (GSTs), compreendem uma família de enzimas cuja principal função é realizar o ataque nucleofílico da forma reduzida da glutathione (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílico (HAYES *et al.*, 2005).

O sítio ativo de cada GST consiste basicamente de duas regiões de ligação, uma específica para a glutathione (GSH) e outra para os eletrófilos (DANIELSON *et al.*, 1985). Os substratos (eletrófilos) mais comuns são haletos de alquila, epóxidos, compostos α,β -insaturados (ex. quinonas, iminoquinonas, aldeídos, cetonas, lactonas e ésteres), haletos de arila e nitro aromáticos (KEEN *et al.*, 1978; ARMSTRONG, 1997; SHEEHAN *et al.*, 2001).

Em mamíferos, as GSTs podem ser solúveis e estar localizadas no citosol ou mitocôndria. Podem também ser insolúveis e estar associadas à membrana (SHEEHAN *et al.*, 2001; ARMSTRONG, 2000)

Durante a fase II de biotransformação, a formação de conjugados com a glutatona é a principal reação observada para muitos xenobióticos (SHEEHAN *et al.*, 2001). Em condições normais, os níveis celulares de glutatona reduzida (GSH) são muito elevados (~10mM), indicando que o mecanismo de detoxificação via glutatona pode representar uma adaptação biológica fundamental (VAN BLADEREN, 2000; DRINGEN, 2000; LANDI, 2000).

O gene *GSTP1* localiza-se no cromossomo 11 de humanos (braço q, posição 13) e codifica uma GST citosólica (NCBI, 2011).

2.6.1.2 Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo

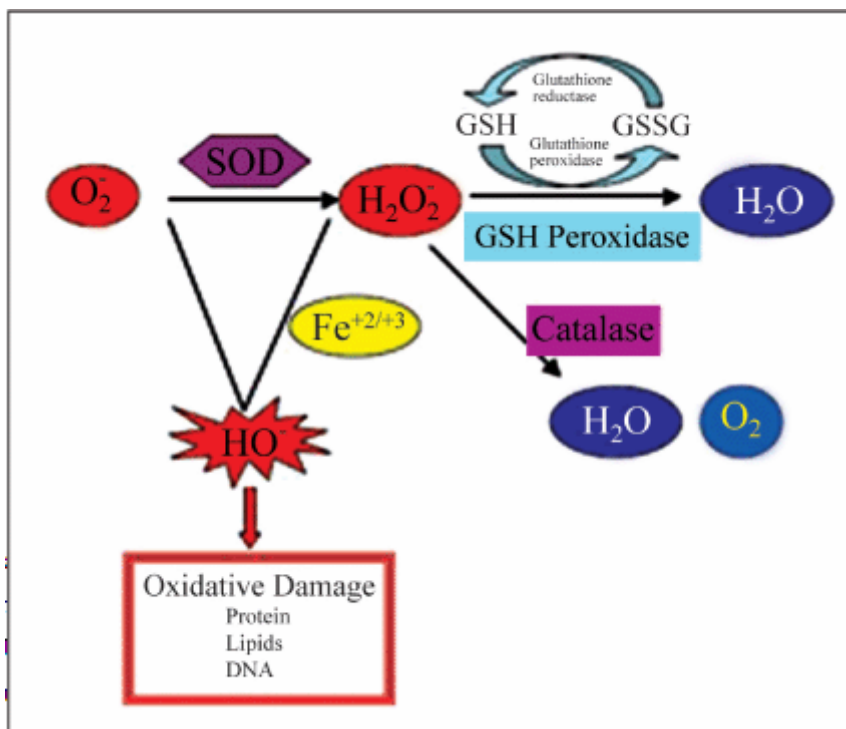
Os radicais livres, também denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou espécies reativas de nitrogênio (ERN), são espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, respectivamente. Estes são produzidos naturalmente no organismo por reações de oxidação, como resultado da atividade metabólica aeróbica, ou por alguma disfunção biológica (FINKELE *et al.*, 2000; HALLIWELL, 2000; PIETTA, 2000; VISIOLI *et al.*, 2000).

Apesar de auxiliarem em funções celulares como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes, quando em excesso, os radicais livres podem acarretar na peroxidação dos lipídios de membrana e na agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA (HUSAIN *et al.*, 1987). Por este motivo, o excesso de radicais livres em um organismo frequentemente está associado à várias patologias, tais como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (HALLIWELL *et al.*, 1992).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido por antioxidantes absorvidos da dieta, como o α -tocoferol (vitamina-E), β -caroteno (pro-vitamina-A), ácido ascórbico (vitamina-C), e compostos fenólicos como os flavonóides e poliflavonóides, ou por antioxidantes produzidos pelo corpo (Figura 2) como as enzimas *GPX* (Glutaciona Peroxidase), *CAT* (catalase) e *SOD1* (superóxido dismutase), e proteínas *GR* (Glutaciona

Redutase), peptídeos de histidina, proteínas ligadas ao ferro (transferrina e ferritina), ácido diidrolipóico e CoQH2 (HALLIWELL *et al.*, 1995; PIETTA, 2000).

Figura 2 – O desbalanço entre a produção de pró-oxidantes e anti-oxidantes pode elevar a produção de espécies reativas de oxigênio podendo causar uma série de danos à célula.



Fonte: (WAKAMATSU *et al.*, 2008)

Gene SOD1- superoxide dismutase 1, soluble

O ânion superóxido é um ROS altamente reativo que é um produto da transferência de um único elétron ao oxigênio molecular (O_2). Esta espécie é detoxificada por duas enzimas superóxido dismutases, Sod1 e Sod2. Ambas utilizam cofatores metais para transformar o ânion superóxido em oxigênio molecular e em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), uma espécie menos reativa (KLÖPPEL *et al.*, 2010).

A superóxido dismutase cobre-zinco (Sod1) é uma enzima citosólica bastante abundante. Adicionalmente, Sod 1 já foi encontrada no núcleo (CHANG *et al.*, 1988), em lisossomos (LIOU *et al.*, 1993), no retículo endoplasmático (URUSHITANI *et al.*, 2006.) e no espaço inter membrana mitocondrial (KADO-MATSUMOTO *et al.*, 2001; STURTZ *et al.*, 2001). O gene SOD1 está localizado no cromossomo 21, na posição q22.1 (NCBI, 2011).

Gene GPXI- glutathione peroxidase 1

A enzima glutathione peroxidase (Gpx) cataliza a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) ou hidroperóxidos orgânicos a água ou moléculas de álcool pela glutathione reduzida (GSH). Gpx1 é uma enzima citosólica que permanece sob a forma de um homotetrâmero com resíduos de selenocisteína no sítio ativo (LEISINGER *et al.*, 1999). O gene *GPXI* está localizado no cromossomo 3, na posição p21.3 (NCBI, 2011).

Gene CAT- catalase

Além da Gpx1, a enzima catalase também atua no combate ao peróxido de hidrogênio, pela sua conversão a água e oxigênio. Assim, ambas enzimas são vitais na manutenção do balance redox celular (HALLIWELL *et al.*, 1990).

O gene *CAT* está localizado no cromossomo 11 de humanos, mais especificamente na posição p13 (NCBI, 2011).

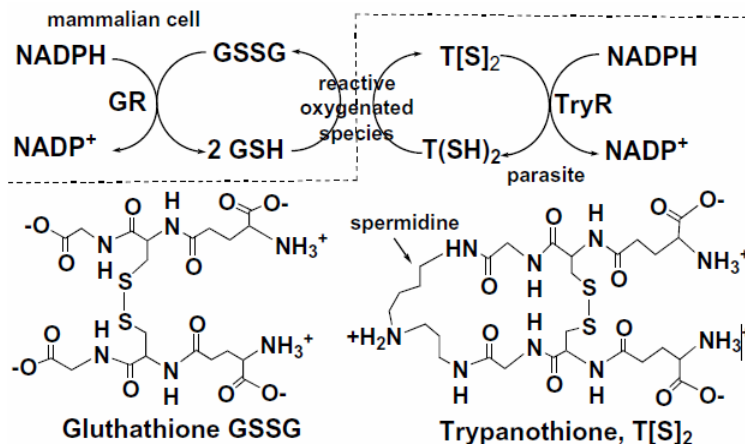
Gene GR- glutathione reductase

A glutathione é um tripeptídeo encontrado numa grande variedade de organismos (MEISTER *et al.*, 1983; SMITH *et al.*, 1990). Tal molécula desempenha múltiplas funções incluindo o transporte de enxofre e regulação gênica em resposta a ataques de patógenos e estresse ambiental. No entanto, um dos principais papéis da glutathione é servir como um antioxidante celular (YOONA *et al.*, 2005).

A enzima glutathione reductase (Gr) é uma flavoproteína óxido reductase que catalisa a conversão da glutathione oxidada (GSSG) a glutathione reduzida (GSH) com uso de NAD(P)H, como um doador de elétrons (SCRUTON *et al.*, 1990). Assim a Gr desempenha um papel chave na manutenção da capacidade antioxidante das células através da manutenção de uma taxa elevada de GSH/GSSG na célula (SCHIRMER *et al.*, 1989; CREISSEN *et al.*, 1994).

Uma macromolécula análoga e intimamente relacionada à glutathione reductase é a tripanotiona reductase (TryR), que está presente em protozoários flagelados dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* (Figura 3). De modo análogo ao sistema humano, a tripanotiona oxidada, (TS₂), é reciclada à tripanotiona reduzida, T(SH)₂, pela enzima Tripanotiona Redutase (TryR), tendo como cofator NADPH (GALARRETA *et al.*, 2008).

Figura 3 – Redução de T[S]2 e de GSSG dependente de NADPH por TryR e GR



Fonte: NADPH (GALARRETA *et al.*, 2008).

Devido a suas funções catalíticas semelhantes, estas enzimas possuem uma identidade de 41% em relação a sequência de aminoácidos (WALSH *et al.*, 1991). No entanto, ao comparar a superfície de potencial eletrostático de ambas, é possível observar que a GR apresenta resíduos que caracterizam um sítio ativo mais positivo e hidrofílico do que o da TryR que, por sua vez, é mais espaçoso e hidrofóbico. Tais características fazem com que a GR tenha atração eletrostática por seu substrato natural (GSSH) que é menos volumoso, mais hidrofóbico e que tenha repulsão eletrostática pela tripanotiona (TS2) que é mais volumosa e mais hidrofílica, substrato natural da TryR (BOND *et al.*, 1999). Assim, embora ambas pertençam à família das dissulfeto óxido-redutases (HUNTER *et al.*, 1992), GR e TryR, apresentam alta exclusividade por seus respectivos substratos (FAIRLAMB *et al.*, 1992).

2.6.1.3 Expressão de genes relacionados ao controle de ciclo celular

Dois grupos de genes estão envolvidos na regulação da proliferação celular: os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais.

Os proto-oncogenes codificam reguladores fisiológicos que atuam estimulando o crescimento e a diferenciação celular. Eventualmente, mutações que surgem pela exposição destes genes a agentes carcinogênicos físicos, químicos e biológicos faz com que estes se tornem oncogenes. Neste grupo, estão inclusos os genes *RAS*, *MYC*, *BCL-2*, *MET*, *RET*, entre outros (GUEMBAROVSKI *et al.*, 2008; SILVA, 2009).

Em contrapartida, os genes supressores tumorais freiam a proliferação celular, atuando no controle negativo do ciclo. Mutações em tais genes podem resultar no aumento de

da taxa de proliferação e conseqüentemente, no surgimento de tumores. (VERMA *et al.*, 1998). Dentre os genes supressores tumorais é possível citar *TP53*, *RBI* e *APC* (WEINBERG, 1995).

Gene *TP53*- tumor protein p53

O gene *TP53*, localizado em 17p13.1, codifica uma proteína denominada *tumor protein 53*. O p53 é um fator de transcrição que aumenta a taxa de transcrição de aproximadamente 7 genes conhecidos: p21, WAF1, MDM2, GADD45, Ciclina G, BAX, IGF-BP3 (LEVINE, 1997).

Em condições normais da célula, p53 é mantido em baixas concentrações devido à sua curta meia vida (cerca de 20 minutos). Adicionalmente, em algumas células, p53 provavelmente também reside em uma forma latente, inativa. Em tais condições, a proteína p53 deve receber um sinal ou alteração para se tornar ativa como um fator de transcrição. Os eventos que ativam p53 ou aumentam a sua concentração na célula são devidos à diversas situações de estresse como vários tipos de dano ao DNA. Além de funcionar como fator de transcrição, p53 pode atuar como sinalizador direto, ativando determinadas proteínas e enzimas, resultando em parada do ciclo celular, apoptose, senescência, reparo de DNA ou mudanças no metabolismo (NCBI, 2011; LEVINE, 1997).

Gene *APC*- adenomatosis polyposis coli

Este gene codifica um supressor tumoral que atua como um antagonista da via de sinalização Wnt, via que influencia diversas funções celulares como o comprometimento celular, a auto-renovação de células tronco e progenitoras, a diferenciação, a transformação, migração e a adesão celular (ANGERS *et al.*, 2009).

Nesta via de sinalização, na ausência do sinal de Wnt, a β -catenina citoplasmática é degradada no proteossoma a partir de sua fosforilação em resíduos específicos de Ser-Thr, por um complexo de destruição que é formado por axina, proteína da Polipose Adenomatosa do Colo (APC), Glicogênio Sintase Quinase-3 β (GSK-3 β) e caseína quinase 1 α (CK1 α). Fatores de crescimento Wnt se ligam a receptores Frizzled e a receptores de lipoproteína de baixa densidade tipo 5 ou 6 (LRP-6/-5), para inativar o complexo de destruição (CLEVERS, 2006).

A β -catenina não fosforilada se acumula e é translocada ao núcleo onde se complexa com membros da família do fator promotor de célula T/linfócito (TCF/LEF) e estimulam a transcrição de genes específicos como a ciclina D1 (TETSU *et al.*, 1999), c-Myc

(HE *et al.*, 1998), Fator do crescimento do endotélio vascular VEGF, entre outros (FREESE *et al.*, 2010). Além de antagonista da via de sinalização Wnt, Apc também atua em outros processos celulares como migração e adesão celular e apoptose. APC está localizado em 5q21 (NCBI, 2011).

Gene *CCNA1*- *ciclin A1*

A proteína codificada por este gene pertence à família altamente conservada de ciclinas, cujos membros são caracterizados por uma periodicidade na sua abundância nas diferentes fases do ciclo celular.

Ciclinas funcionam como reguladores de quinases CDKs. Diferentes ciclinas exibem padrão de expressão e degradação distintos o que contribui para a coordenação temporal de cada evento mitótico. A ciclina codificada pelo gene *CCNA1* liga-se tanto a CDK2 (CDK que aparece na fase S) como a CDC2 (aparece em G2), o que proporciona duas atividades distintas no ciclo celular (NCBI, 2011).

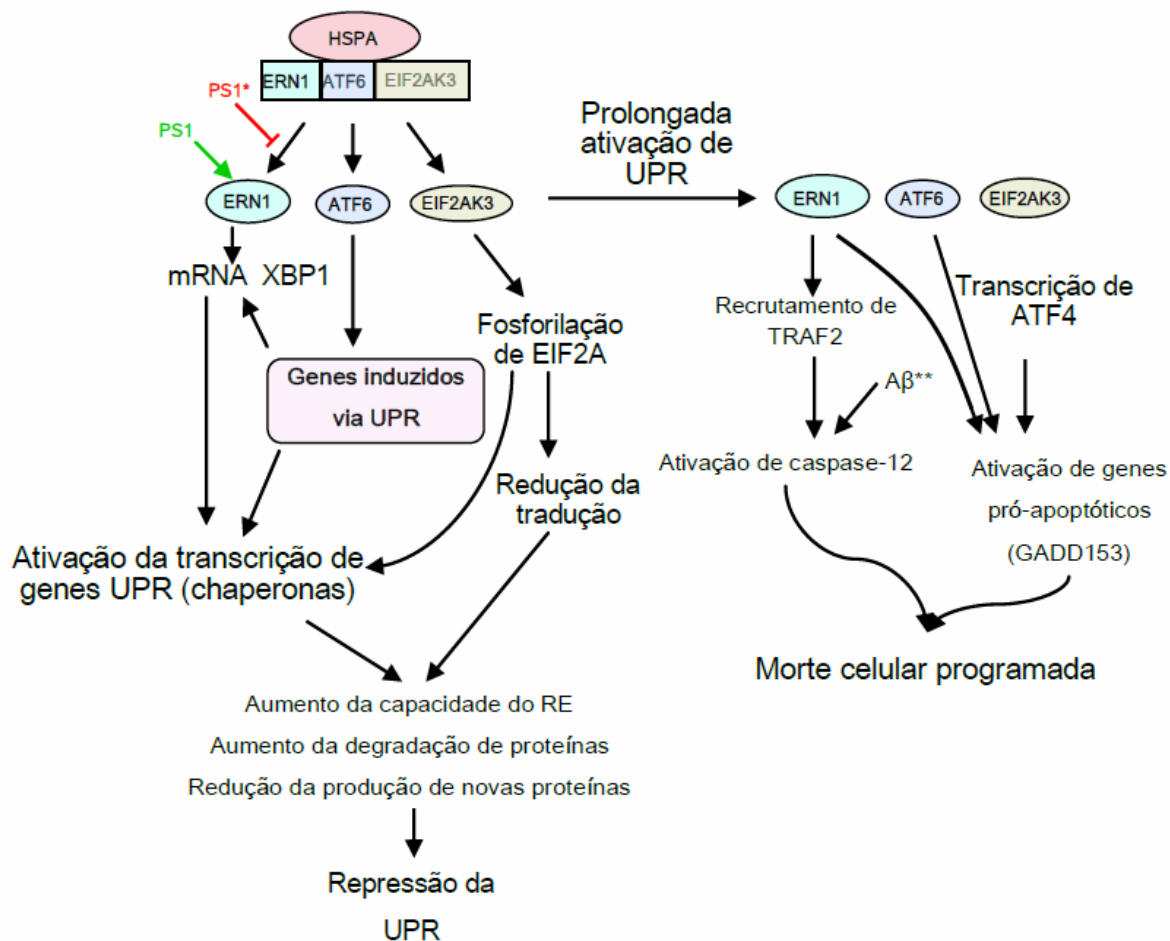
Esta ciclina também liga-se a reguladores celulares importantes, tais como proteínas da família Rb, e da família de p21 e fator de transcrição E2F-1 (NCBI, 2011).

2.6.1.4 Expressão de genes relacionados ao estresse de retículo endoplasmático

É no retículo endoplasmático rugoso (RER) que ocorre a maioria dos processos celulares responsáveis pelo enovelamento de proteínas, um processo bastante importante e que promove a conversão de cadeias lineares proteicas em estruturas tridimensionais funcionais. Este processo de enovelamento é composto por uma série de mecanismos como: dobramento, montagem, formação de pontes dissulfetos e glicosilação de proteínas.

Perturbações no metabolismo celular podem prejudicar o dobramento ideal, formando proteínas imaturas não dobradas (*unfolded*) e/ou mal dobradas (*misfolded*) (RON *et al.*, 2007). O aumento de tais espécies proteicas acionam uma resposta adaptativa elaborada conhecida como resposta à proteína não dobrada (*unfolded protein response*, UPR) (RON *et al.*, 2007) (Figura 4). A UPR é caracterizada por uma cascata de sinalização (Figura 3) com finalidade de resgatar a qualidade da síntese proteica, atenuando a síntese global de proteínas, aumentando a expressão de chaperonas e quinases dobradoras de proteínas e ativando o sistema de degradação proteica associado ao RE (*endoplasmic reticulum-associated degradation*, ERAD). Desequilíbrios na sinalização da UPR podem resultar no estresse de retículo (BODEN *et al.*, 2008).

Figura 4 – Via de resposta à UPR



Fonte: BERANDINELLI, 2011.

Gene *HSPA5*- heat shock 70kDa protein 5

O gene *HSPA5* codifica uma chaperona com papel central na resposta à UPR. Esta regula negativamente três proteínas sensoras: Ern1 (Ire1), Atf6 e Eif2ak3 (Perk). Na presença de uma proteína mal dobrada, ou alterada no RE, a chaperona Hspa5 se dissocia do complexo com as proteínas sensoras e se liga à proteína defeituosa com a finalidade de dobrá-la. Neste ato, os sensores são liberados e ativam múltiplas vias de sinalização, que culminam na indução dos genes induzidos por UPR e repressão na tradução levando ao aumento da capacidade de dobramento do RE, redução da translocação de novas proteínas à organela e aumento da degradação de proteínas mal processadas (BERANDINELLI, 2011).

Gene *ERN1*- endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1

O gene *ERN1* (*IRE1*) codifica uma proteína que atua como sensor de proteínas mal dobradas. Além de possuir atividade de quinase, Ern1 possui também atividade de endonuclease, responsável por clivar o mRNA de XBP1 e assim torna-lo em um potente

ativador transcricional cuja ação culmina na sinalização para bloqueio do crescimento e direcionamento para a via de apoptose (BI *et al.*, 2005)

Gene *EIF2AK3* - eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3

EIF2AK3 (*PERK*) codifica uma proteína sensora que também faz parte do complexo com Hspa5 e que atua em conjunto com os efetores de UPR Ern1 e Atf6. Quando liberada do complexo, esta proteína tem por função principal fosforilar a subunidade alfa do fator de iniciação da tradução 2 (EIF2), o que leva à sua inativação e consequentemente à rápida repressão da síntese global de proteína (BERANDINELLI, 2011; NCBI, 2011).

Gene *TRAF2* - TNF receptor-associated factor 2

Em condições de ativação prolongada de UPR, as proteínas sensoras Eif2ak3, Atf6 e Ire1 tem por função o direcionamento da célula à apoptose. Ire1 recruta Traf2 para a membrana do RE. Traf2 ativa Ask1 que por sua vez ativa a cascata de sinalização nuclear JNK e certas caspases da via intrínseca de apoptose (FORMAN *et al.*, 2003). A proteína codificada por este gene é um membro da família de fatores associados a receptores TNF (*TNF receptor associated factor*, TRAF). (NCBI, 2011)

Gene *GADD153* – (*DDIT3*) DNA-damage-inducible transcript 3

GADD153 codifica um dos componentes da via de apoptose mediada pelo estresse de RE. Também conhecida por Chop, é uma proteína pró apoptótica (BERANDINELLI, 2011).

2.6.1.5 Expressão de genes relacionados à apoptose

O processo de morte celular por apoptose é um fenômeno celular que ocorre em diversas situações como por exemplo, durante a organogênese e hematopoiese, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (YANAGIHARA *et al.*, 1992).

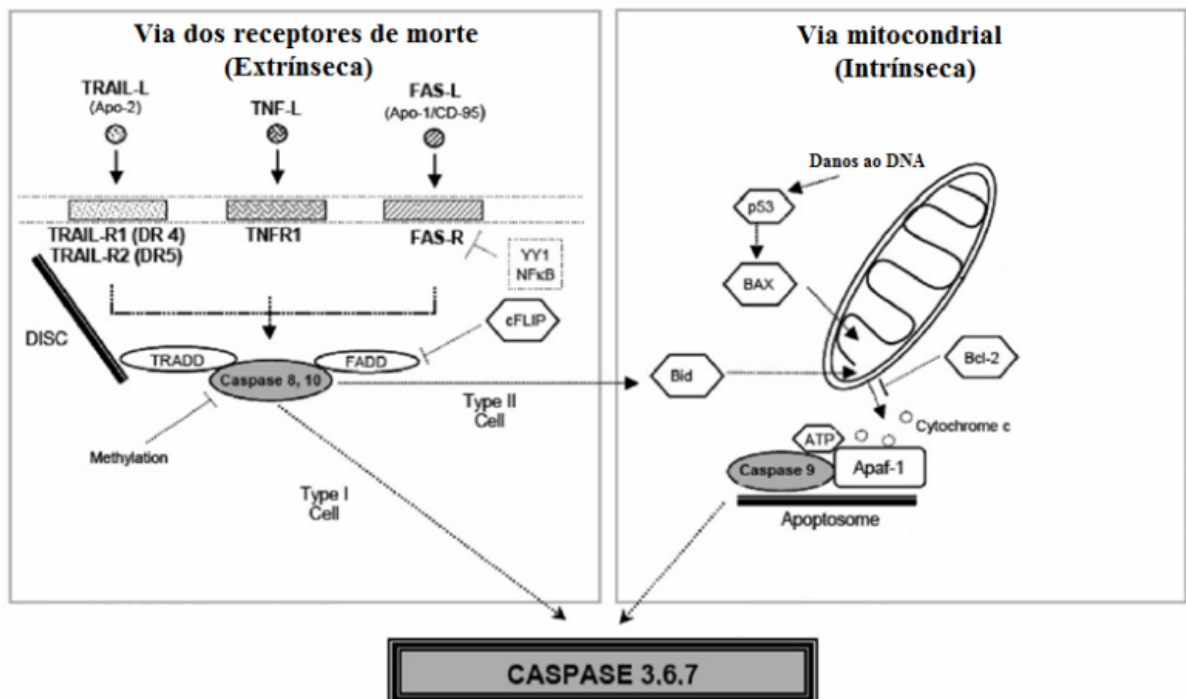
Um célula em processo de apoptose apresenta-se retraída e perde sua aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. Suas organelas mantêm a morfologia original, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina é condensada e se concentra junto à membrana nuclear. Em uma etapa posterior ocorre a fragmentação internucleossômica do DNA, o núcleo se desintegra em

fragmentos envoltos pela membrana nuclear e a membrana plasmática passa a sofrer bolhamento, formando corpos apoptóticos (MARTIKAINEN *et al.*, 1990; ARRENDTS *et al.*, 1991). Tais corpos apoptóticos são fagocitados por macrófagos e removidos sem causar processo inflamatório (ARRENDTS *et al.*, 1991).

As alterações morfológicas observadas na apoptose são conseqüência de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos específicos, geneticamente regulados (MARTIKAINEN *et al.*, 1990). Basicamente, a apoptose pode ser regulada por duas vias (Figura 5): pela a via extrínseca, na qual estímulos externos interagem com receptores específicos da superfície celular, chamados receptores da morte; ou pela via intrínseca que é desencadeada por estresse intracelular (THORBUM, 2004). Tais vias culminam na ativação de proteases conhecidas como caspases efetoras (PAROLIN *et al.*, 2001).

O processo de apoptose é regulado por fatores inibidores (anti apoptóticos) e ativadores (pró apoptóticos). Entre os inibidores estão algumas proteínas da família Bcl-2, como bcl-2, bcl-xL, e da família das proteínas inibidoras de apoptose (*inhibitor of apoptosis protein*, IAP). Entre os ativadores estão o Fas, o DR4, o DR5, interferon-gama e proteínas membros da família Bcl-2, como Bad, Bak, Bax (HALE *et al.*, 1996).

Figura 5 – Via extrínseca e intrínseca de apoptose



Fonte: Modificado de HUERTA *et al.*, 2007.

Gene CASP8 – caspase 8

O gene *CASP8* codifica um membro da família das cisteíno proteases (caspases). A ativação sequencial das caspases desempenha um papel central na via de apoptose celular.

Na célula, as caspases existem como pro-enzimas inativas (zimógenos) com massa molecular entre 30 a 60kDa. Para se tornarem ativas devem sofrer um processamento proteolítico que irá clivar a proteína inicial em duas regiões específicas para gerar uma subunidade grande (cadeia α) e uma pequena (cadeia β). A forma ativa da caspase é um tetrâmero $\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2$. As caspases 2, 8, 9 e 10 (efetoras) atuam na iniciação da cascata de ativação das caspases 3, 6, e 7 (executoras) (GARAY, *et al.*, 2003).

A caspase 8 está envolvida na morte celular programada induzida por Fas e vários estímulos apoptóticos. Esta irá ativar a caspase3 (GARAY, *et al.*, 2003).

Gene CASP9 – caspase 9

O gene *CASP9* codifica a caspase 9, uma caspase iniciadora que atua na via intrínseca da apoptose. Nesta via, células expostas à vários tipos de estresse podem sofrer ruptura da mitocôndria levando ao extravasamento de citocromo c para o citosol. A formação do apoptosomo contendo o citocromo c, Apaf-1 e caspase 9 levam à ativação desta última. A caspase 9 por sua vez dispara uma cascata de sinalização levando à apoptose (CHEN *et al.*, 2007).

Gene CASP3 – caspase 3

O gene *CASP3*, localizado em 4q34, codifica a proteína caspase 3 que é ativada pelas caspases 8, 9 e 10 e é responsável por clivar e ativar as caspases 6 e 7 (NCBI, 2012).

Gene CASP7 – caspase 7

A Caspase 7 era considerada uma proteína redundante à caspase 3 uma vez que estas proteases compartilham uma sequência ótima de reconhecimento peptídico e possuem uma série de substratos proteicos em comum. Adicionalmente, ambas as caspases são ativadas pelas caspases iniciadoras 8 e 9 durante a via extrínseca e intrínseca, respectivamente (LAMKANFI, *et al.*, 2010).

Atualmente, vários dados apontam para diferenças funcionais entre estas duas proteínas como por exemplo, muitos substratos são especificamente clivados pela caspase 7, mas não pela caspase 3. Além disso, a ativação da caspase 7 requer a presença da caspase 1

sob condições inflamatórias enquanto que a ativação da caspase 3 procede independente da caspase 1 (LAMKANFI *et al.*, 2010).

Família BCL-2: genes BCL-2 (B-cell CLL/lymphoma 2), BCL-XL (B-cell lymphoma-extra large), BAX (BCL2-associated X protein) e BAK (BCL2-antagonist/killer 1)

Os membros da família Bcl-2 compartilham homologia em domínios (BH)3 e podem ser divididas em 3 subfamílias: a subfamília de anti apoptóticos como Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1; a subfamília das proteínas pró apoptóticas Bax e Bax-like (ex. Bak); e a subfamília de proteínas pró apoptóticas BH3-only (ADAMS *et al.*, 1998; WEI *et al.*, 2001; STRASSER, 2005).

As proteínas anti apoptóticas sequestram as proteínas pró apoptóticas Bax e Bak e assim inibem a apoptose (CHAO *et al.*, 1998). Proteínas BH3-only inibem moléculas anti apoptóticas e também ativam as proteínas pro apoptóticas Bax e Bak (ADAMS *et al.*, 1998; WEI *et al.*, 2001).

Gene PCBP4 - poly(C) binding protein 4

As proteínas de ligação à poli(C) possuem afinidade por sequências ricas em citosinas. Em células de mamíferos, estas PCBP's se dividem em dois grupos: hnRNP K/J, ou proteínas do complexo alfa (e.x., PCBP1-4). Membros desta família possuem múltiplas funções devido à sua capacidade de ligação à regiões ricas em C, incluindo estabilização e silenciamento de mRNA e aumento de sua taxa de tradução. Também são capazes de se ligar à regiões gênicas promotoras e atuar como um reguladores de transcrição (CHOI *et al.*, 2009).

O gene *PCBP4*, localizado em 3p21, pode ser induzido pelo supressor tumoral p53, podendo levar a célula à apoptose. PCBP4 é encontrada no citoplasma uma vez que não possui o sinal de localização nuclear, encontrado em outros membros da subfamília (NCBI, 2011; CHOI *et al.*, 2009).

2.6.1.6 Expressão de genes relacionados ao reparo de DNA

Uma ampla gama de compostos é capaz de promover dano ao material genético. Estima-se que para cada célula humana surjam cerca de 1 milhão de lesões moleculares individuais por dia (LODISH *et al.*, 2006).

Para evitar o acúmulo de mutações, a célula dispõe basicamente de 6 principais vias de reparo conhecidas: (i) reparo por excisão de bases (*base excision repair*, BER), (ii)

reparo por excisão de nucleotídeos (*nucleotide excision repair*, NER), (iii) reparo de bases mal emparelhadas (*mismatch repair*, MMR), (iv) reparo por síntese translesão (*translesion synthesis*, TLS), (v) reparo por recombinação homóloga (*homologue recombination*, HR) e (vi) reparo por recombinação não homóloga ou ilegítima (*non homologous end joining*, NHEJ). A via a ser utilizada dependerá da extensão da lesão que foi gerada. (HSIEH, 2001; BERNSTEIN *et al.*, 2002; DUDÁS *et al.*, 2004; DUDÁSOVA *et al.*, 2004).

Gene *ERCC4* - *excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4*

Ercc4 foi a última proteína caracterizada na via de excisão de nucleotídeos (NER). Esta proteína, também conhecida como Xpf forma um complexo estável com a proteína *Ercc1*, responsável pela primeira incisão em 5' durante o reparo por excisão de nucleotídeo (NER). Assim, o complexo *Ercc1-Ercc4* corta especificamente a fita na região danificada e em seguida ocorre o preenchimento desta lacuna. (SHAO *et al.*, 2008)

Gene *OGG1* - *8-oxoguanine DNA glycosylase*

Um dos tipos comuns de dano causado no DNA pelo excesso de radicais livres na célula é devido à oxidação de guaninas, formando 8-oxo-7,8 diidroguanina (8-oxo-dG). Se não reparado, 8-oxo-dG é capaz de parear erroneamente com adenina durante a replicação do DNA resultando em transversão de um par G:C para T:A (MIRBAHAI *et al.*, 2009).

A célula dispõe de complexos mecanismos para combater 8-oxo-dG incluindo hidrólise de 8-oxo-dG, reparo de pares de base 8-oxo-dG:C, transcrição e replicação acoplada à sistemas de detecção e reparo de 8-oxo-dG e remoção pós replicação de adeninas pareadas com 8-oxo-dG. A iniciação do reparo de 8-oxo-dG em células de mamíferos é mediada pela enzima 8-oxoguanina glicosilase 1 (*Ogg1*), que possui atividade de liase para quebra de cadeia. O gene *OGG1* localiza-se em 3p26,3 (NCBI, 2011; MIRBAHAI *et al.*, 2009).

Gene *RAD21* - *RAD21 homolog (Schizosaccharomyce pombe)*

Localizado em 8q24, codifica uma proteína bastante similar à do produto gênico *RAD21* de *Schizosaccharomyces pombe*. A proteína *Rad21* faz parte do complexo de coesinas, atuando no alinhamento de cromátides irmãs durante a fase M. *Rad21* também atua no reparo de quebra de dupla fita de DNA (DSB). Esta proteína se torna hiperfosforilada na fase M do ciclo celular (NCBI, 2011; ATIENZA *et al.*, 2005).

Gene *MLH1* - *mutL* homolog 1

Os modelos explicativos de reparo de bases mal emparelhadas (MMR) tem proposto que proteínas Msh identificam na forquilha de replicação os erros causados pela DNA polimerase. Mlh1, a proteína codificada pelo gene *MLH1*, faz uma busca pelo genoma por lesões ligadas à proteínas Msh. O complexo resultante Msh-Mlh1 formado em uma lesão de DNA inicia os passos downstream da via de reparo de bases mal emparelhadas (PLYS *et al.*, 2012).

3 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo a avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mecanismo de ação (pela avaliação da expressão gênica) causados pelo tratamento com aspidospermina em cultura de células metabolizadores HepG2.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

O presente trabalho tem como objetivos específicos:

- Avaliar a citotoxicidade do tratamento com aspidospermina por 24 horas, através do ensaio de citotoxicidade da resazurina;
- Avaliar o efeito do tratamento com aspidospermina por 3 horas na indução de dano ao material genético, através do ensaio do cometa;
- Avaliar o efeito do tratamento com aspidospermina por 6 horas na expressão de genes relacionados ao metabolismo de xenobióticos (*CYP1A1*, *GSTP1*), estresse oxidativo (*SOD*, *GPX1*, *CAT*, *GR*), controle de ciclo celular (*TP53*, *APC*, *CCNA1*), estresse de retículo endoplasmático (*HSPA5*, *ERN1*, *EIF2AK3*, *TRAF2*, *GADD153*), apoptose (*CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *CASP7*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *BAK*, *BAX*, *PCBP4*) e de reparo de DNA (*ERCC4*, *OGG1*, *RAD21*, *MLH1*).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M. E CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, v.281, p.1322–1326, 1998.
- AIMI, N.; UCHIDA, N.; OHYA, N.; HOSOKAWA, H.; TAKAYAMA, H. e SAKAI, S. Novel indole alkaloids from cell suspension cultures of *Aspidosperma quebracho blanco* schlecht. **Tetrahedron Letters**. v.32, p.4949- 4952, 1991.
- ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R.; The simple β -carboline alkaloids **Phytochemistry**. v.19, p.1573, 1980.
- ANDREASSI, M. G.; BOTTO, N.; COLOMBO, M.G.; BIAGINI, A.; CLERICO, A. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases? **Environmental and Molecular Mutagenesis**. v.35, p.265-269, 2000.
- ANGERS, S.; MOON, R. T. Proximal Events in Wnt Signal Transduction. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v.7, p. 468-77, 2009
- ANSAH, C.; KHAN, A.; GOODERHAM, N. J. *In vitro* genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine. **Toxicology**. v.208, p.141-147, 2005.
- ARMSTRONG, R. N. Structure, catalytic mechanism, and evolution of the glutathione transferases. **Chem. Res. Toxicol**. v.10, p.2-18, 1997.
- ARMSTRONG, R. N. Mechanistic diversity in a metalloenzyme superfamily. **Biochemistry**. v.39, 13625-32, 2000.
- ARORA, S.; BRITS, E.; KAUR, K.; SOHI, R.S.; KUMAR, S.; VERSCHAEVE, L. Evaluation or genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests. **Journal of environmental pathology, toxicology and oncology**. v. 24, p. 193-200, 2005.
- ARRENDTS, M.J. E WYLLIE, A.H. Apotposis: Mechanisms and roles in pathology. **Int Rev Exp Pathol**. v.32, p.233-250, 1991.
- ARUOMA, O. I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidante actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**. v.523, p.9-20, 2003.
- ATIENZA, J. M.; ROTH, R. M.; ROSETTE, C.; SMYLIE, K. J.; KAMMERER, S.; REHBOCK, J.; EKBLUM, J.; DENISSENKO, M. F. Suppression of RAD21 gene expression decreases cell growth and enhances cytotoxicity of etoposide and bleomycin in human breast cancer cells. **Mol Cancer Ther**. v. 4(3), 2005.
- BERNSTEIN, C.; BERNSTEIN, H.; PAYNE, C. M.; GAREWAL, H. DNA repair/pro-apoptotic dual role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. **Mutation Research**. v.511, p.145-178, 2002.

BI, M.; NACZKI, C.; KORITZINSKY, M.; FELS, D.; BLAIS, J.; HU, N.; HARDING, H.; NOVOA, I.; VARIA, M.; RALEIGH, J.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R.J.; BELL, J.; RON, D.; WOUTERS, B.G. E KOUMENIS, C. ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth. **EMBO J.** v. 24(19), p.3470-81, 2005.

BOLZANI, V. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; GOTTLIEB, O. R. Indole alkaloid evolution in *Aspidosperma*. **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 15, p.187-200, 1987.

BOND, C. S.; ZHANG, Y.; BERRIMAN, M.; CUNNINGHAM, M. L.; FAIRLAMB, A. H.; HUNTER, W. N. Crystal structure of Trypanosoma cruzi trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. **Structure**, v.7, p.81,1999.

BORRA, R.C.; LOTUFO, M.A.; GAGIOTI, S.M.; BARROS, F.M. E ANDRADE, P.M. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Braz Oral Res.** v.23(3), p.255-62, 2009.

BOURDY, G.; OPORTO, P.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E.; A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceno-Guarani Indians. **Journal of Ethnopharmacology.**v.93, p.269-277. 2004.

BRANDÃO, M. G. L.; GRANDI, T. S. M.; ROCHA, E. M. M.; SAWYER, D. R.; KRETTLI, A. U. J. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. **Journal of Ethnopharmacology.** v.36, p.175-182, 1992.

BURANRAT, B.; PRAWAN, A. E KUKONGVIRIYAPAN, V. Optimization of Resazurin-based Assay for Cytotoxicity Test in Cholangiocarcinoma Cells. **KKU Res J (GS).** v.8(1), 2008.

CHANG, L.Y.; SLOT, J.W.; GEUZE, H.J. E CRAPO, J.D. Molecular immunocytochemistry of the CuZn superoxide dismutase in rat hepatocytes. *J. Cell Biol.* v. 107, p.2169–2179, 1988.

CHAO, D. T. E KORSMEYER, S. J. BCL-2 family: regulators of cell death. **Annu. Rev. Immunol.** v.16, p.395–419, 1998.

CHEN, H.; FENG, R.; GUO, Y.; SUN, L.; ZHOU, Y.; JIANG, J. Toxicity studies of *Rhizoma Polygonati* Odorati. **Journal of Ethnopharmacology.** v.74, p. 221- 224, 2001.

CHEN, M.; GUERRERO, A.D.; HUANG, L.; SHABIER, Z.; PAN, M.; TAN, T.H.; WANG, J. Caspase-9-induced Mitochondrial Disruption through Cleavage of Anti-apoptotic BCL-2 Family Members. **Journal of Biological Chemistry.** v.282 (46), p.33888–33895, 2007.

CHOI, H. S.; HWANG, C. K.; SONG, K. Y.; LAW, P. Y.; WEI, L. N.; LOH, H. H. Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 380, p. 431–436, 2009.

CLEVERS, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. **Cell**, v. 127, p. 469–480, 2006

COECKE, S.; AHR, H.; BLAAUBOER, B.J.; BREMER, S.; CASATI, S.; CASTELL, J.; COMBES, R.; CORVI, R.; CRESPI, C.L.; CUNNINGHAM, M.L.; ELAUT, G.; ELETTI, B.; FREIDIG, A.; GENNARI, A.; GHERSI-EGEA, J.F.; GUILLOUZO, A.; HARTUNG, T.; HOET, P.; INGELMAN-SUNDBERG, M.; MUNN, S.; JANSSENS, W.; LADSTETTER, B.; LEAHY, D.; LONG, A.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; MORATH, S.; NAGELKERKE, F.; PELKONEN, O.; PONTI, J.; PRIETO, P.; RICHERT, L.; SABBIONI, E.; SCHAACK, B.; STEILING, W.; TESTAI, E.; VERICAT J.A.; WORTH, A. Metabolism: a bottleneck in in vitro toxicological test development. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 34, p.48-84, 2006.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANNELI; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, F. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143-152, 2008.

CRAVEIRO, A. A.; MATOS, F. J. A.; SERUR, L. M. Alkaloids of *Aspidosperma pyrifolium*. **Phytochemistry**, v.22, p.1526-1528, 1983.

CREISSEN, G.; EDWARDS, E.A.; MULLINEAUX, P.. Glutathione reductase and ascorbate peroxidase, in: C.H. Foyer, P.M. Mullineaux (Eds.), **Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants**, CRC Press, Boca Raton, p.343–364, 1994.

DANIELSON, U. H.; MANNERVIK, B.; Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. *J. Biochem.*, v.231, p.263-7, 1985.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; RANDEATH, K.; RANDEATH, E.; BARTSCH, H.; NAIR, J.; BALANSKY, R.; VAN SCHOOTEN, F.; DEGAN, P.; FRONZA, G.; WALSH, D.; LEWTASDNA, J. DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenic relevance and implications in preventive medicine. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**. v.366, p.197–238, 1996.

DEUTSCH, H. F.; EVENSON, M. A.; DRESCHER, P.; SPARWASSER, C.; MADSEN, P.O. Isolation and biological activity of aspidospermine and quebrachamine from an *Aspidosperma* tree source. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.12, p. 1283-1987, 1994.

DRINGEN, R. Metabolism and functions of glutathione in brain. **Progr. Neurobiol.** v.129, p. 649-71, 2000.

DUDÁS, A. E CHOVANEC, M. Double strand break repair by homologous recombination. **Mutation Research**. v.566, p.131-167, 2004.

DUDÁSOVA, Z.; DUDÁS, A.; CHOVANEC, M. Non-homologous end-joining factors of *saccharomyces cerevisiae*. *FEMS. Microbiology Reviews*. v.28, p. 581-601, 2004.

DUTHIE, S. J.; MELVIN, W.T. E BURKE, M.D. Bromobenzene detoxification in the human liver-derived HepG2 cell line. **Xenobiotica**. v. 24(3), p.265-279, 1994.

ELGORASHI, E. E.; TAYLOR, J.L.S.; MAES, A.; VAN STADEN, J.; DE KIMPE, N.; VERSCHAEVE, L. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicology Letters**. v.143, p. 195-207, 2003.

FAIRLAMB, A. H.; CERAMI, A. Metabolism and functions of the trypanothione in the kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology*. v.46, p. 695-729, 1992.

FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; GOBBI-FILHO, L.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. B. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 325-327, 2004.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, p.239-247, 2000.

FORMAN, M.S.; LEE, V.M.Y. E TROJANOWSKI, J.Q. 'Unfolding' pathways in neurodegenerative disease. **Trends in neurosciences**. v.26 (8), p.407-10, 2003.

FOYE, W. O.; LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Foye's principals of Medicinal Chemistry**, Williams & Wilkins: Media, 1995.

FREDERICH, M.; HAYETTE, M.P.; TITS, M.; DE MOL, P.; ANGENOT, L. *In vitro* activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.43, p. 2328-233, 1999.

FRESE, J. L.; PINO, D.; PLEASURE, S. J.; Wnt signaling in development and disease. **Neurobiol Dis**. v.38(2), p. 148-53, 2010.

GALARRETA, B. C.; SIFUENTES, R.; CARRILLO, A. K.; SANCHEZ, L. The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. v.16, p. 6689-6695, 2008.

GARAY, H. M.; ALVES, J.; OCHIUCI, J.M.; BELIZÁRIO, J.E. Degradação seletiva de proteínas e suas implicações no câncer. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.30, p.60-70, 2003.

GERHOLD, D.; LU, M.; XU, J. AUSTIN, C.; CASKEY, C. T.; RUSHMORE, T. Monitoring expression of genes involved in drug metabolism and toxicology using DNA microarrays. **Physiological Genomics**. v.5, p. 161-170, 2001.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano do DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F; MARQUES E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, p. 247-279. 2003

GUEMBAROVSKI, R. L.; CÓLUS, I. M. S. Câncer, uma doença genética. **Genética na escola (SBG)**. p.4-7, 2008.

GUENGERICH, F.P. E SHIMADA, T. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome. P-450 enzymes. **Chem Res Toxicol**. v.4, p.391-407, 1991.

HALE, A.J.; SMITH, C.A.; SUTHERLAND, L.C.; STONEMAN, V.E.; LONGTHORNE, V.L.; CULHANE, A.C. E WILLIAMS, G.T. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem*. v.236, p.1-26, 1996.

HALLIWELL, B. E GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease an overview. **Methods Enzymol**. v.186, p. 1-85, 1990.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C.; CROSS, C. E. *J. Free-radicals, antioxidants, and human disease—where are we now?* **The Journal of Laboratory and clinical medicine.** v.119, p.598–620, 1992.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; AROUMA, O. I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology.** v.33, p.601-617, 1995.

HALLIWELL, B. The antioxidant paradox. **The Lancet.** v.355, p.1179, 2000.

HAMID, R.; ROTSHTEYN, Y.; RABADI, L.; PARIKH, R.; BULLOCK, P. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. **Toxicol In Vitro.** v. 18(5), p. 703-10, 2004.

HARTUNG, T.; DASTON, G. Are *in vitro* suitable for regulatory use? **Toxicological sciences,** v. 111, p. 233-237, 2009.

HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R.; ANNU. Glutathione transferases. **Rev. Pharmacol. Toxicol.** v.45, p. 51-88, 2005.

HE, T. C.; SPARKS, A. B., RAGO, C.; HERMEKING, H.; ZAWEL, L.; COSTA, L. T.; MORIN, P. J.; VOLGESTEIN, B. KINZLER, K. W. Identification of cMYC as a target of the APC pathway. **Science.** v.281, p. 1509-1512, 1998.

HOUTGRAAF, J.H.; VERMISSEN, J.; VAN DER GIESSEN, W. J. A concise review of DNA damages checkpoints and repair in mammalian cells. **Cardiovascular Revascularization Medicine.** v.7, p. 165-172, 2006.

HSIEH, P. Molecular mechanisms of DNA mismatch repair. **Mutation Research.** v.486, p. 71-87, 2001.

HUSAIN, S. R.; CILLARD, J.; CILLARD, P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry.** v.26, p. 2489-2491, 1987.

HUERTA, S.; GOULET, E.J.; HUERTA-YEPEZ, S. E LIVINGSTON, E.H. Screening and detection of apoptosis. **Journal of Surgical Research,** v.139, p. 143-156, 2007.

HUNTER, W. N.; BAILEY, S.; HABASH, J.; HARROP, S. J.; HELLIWELL, J. R.; ABOAGYE-KWARTENG, T.; SMITH, K., FAIRLAMB, A. H. Active site of trypanothione reductase: a target for rational drug design. **J. Mol. Biol.** v.227, p.322-333, 1992.

KADO-MATSUMOTO, A. E FRIDOVICH, I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu, Zn-SOD in mitochondria. *J. Biol. Chem.* v.276, p.38388–38393, 2001.

KAWAJIRI, K.; GOTOH, O.; TAGASHIRA, Y.; SOGAWA, K.; FUJII-KURIYAMA, Y. Titration of mRNAs for cytochrome P-450c and P-450d under drug-inductive conditions in rat livers by their specific probes of cloned DNAs. **J Biol Chem.** v.259, p.10145-10149, 1984.

KAWAJIRI, K. E FUJII-KURIYAMA, Y. P-450 and human cancer. **Jpn J Cancer Res,** v.82, p.1325-1335, 1991.

KEEN, J. H.; JAKOBY, W. B.; J. Glutathione transferases. Catalysis of nucleophilic reactions of glutathione. **Biol. Chem.** v.253, p.5654-7, 1978.

KIMURA, S.; GONZALEZ, F.J.; NEBERT, D.W. Tissue-specific expression of the mouse dioxin-inducible Pl-450 and Ps-450 genes:differential transcriptional activation and mRNA stability in liver and extrahepatic tissues. **Mol Cell Biol.** v.6, p.1471-1477, 1986.

KINGSTON, D. G.; GERHART, B. B.; IONESCU, F.; MANGINO, M. M.; SAMI, S. M. Plant anticancer agents V: new bisindole alkaloids from *Tabernaemontana johnstonii* stem bark. **Journal of Pharmaceutical Sciences.** v. 62, p.249-51, 1978.

KLÖPPEL, C.; MICHELS, C.; ZIMMER, J.; HERRMANN, J. M.; RIEMER, J. In yeast redistribution of Sod1 to the mitochondrial intermembrane space provides protection against respiration derived oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 403, p.114–119, 2010.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHY, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computadorized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Communications**, v.3, p. 103-115, 1995.

KRISHNA, G.; URDA, G.; THEISS, J. Principles and pratices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxiclogy studies: a pharmaceutical industry perspective. **Environmental and Molecular Mutagenesis.** v.32, p.115-120, 1998.

KUBITZKI, K.; MESQUITA, A. A. L.; GOTTLIEB, O. R. Chemosystematic implications of Xanthones in *Bonnetia* and *Archytaea*. **Biochemical Systematics and Ecology.** v. 6, p.185-187, 1978.

LAMKANFI, M. E KANNEGANTI, T.D. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol.* v.42(1), p.21-4, 2010.

LANDI, S. Mammalian class theta GST and differential susceptibility to carcinogens: a review. **Mutat. Res.** v.463, p.247-83, 2000.

LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W. G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods.** v.48, p. 46-53, 2009.

LIU, W.; CHANG, L.Y.; GEUZE, H.J.; STROUS, G.J.; CRAPO, J.D.; SLOT, J.W. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. **Free Radic. Biol. Med.** v.14, p.201–207, 1993.

LODISH, H.; BERK, A.; MATSUDAIRA, P.; KAISER, C.A.; KRIEGER, M.; SCOTT, M.P.; ZIPURSKY, S.L.; DARNELL, J. **Molecular Biology of the Cell.** WH Freeman: New York, NY. 5th ed., p.963, 2004

LUCH, A. Nature e nurture – lessons from chemical carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer.** v5, p.113-125, 2005.

LYON, R. L.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; SVOBODA, G. H. Biological and phytochemical evaluation of plants XI: Isolation of aspidospermine, quebrachidine, rhazinilam, (—)-pyrifolidine, and akuammidine from *Aspidosperma quebracho-blanco* (apocynaceae). **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.62, p. 218-221, 1973.

LYON, R. L.; FONG, H. H. S.; FARNSWORTH, N. R.; SVOBODA, G. H. Biological and phytochemical evaluation of plants XII: Isolation of acetylakuammidine from *Aspidosperma quebracho - blanco* leaves. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 62, p. 833, 1973.

MARNETT, L. J.; PLASTARAS, J. P. Endogenous DNA e damage mutation. **Trends in Genetics**. v.17, p. 214-221, 2001.

MARTIKAINEN, P.; KYPRIANOU, N. E ISAACS, J.T. Effect of transforming growth factor β 1 on proliferation and death of rat prostatic cells. **Endocrinology**. v.127, p.2963-2968, 1990.

MCMILLIAN, M.K.; LI, L.; PARKER, J.B.; PATEL, L.; ZHONG, Z.; GUNNETT, J.W.; POWERS, W.J.; JOHNSON, M.D. An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells. **Cell Biol Toxicol**. v.18(3), p.157-73, 2002.

MEISTER, A. E ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annu. Rev. Biochem**. v. 52, p. 711–760, 1983.

MEI, N.; HEFLICH, R.H.; CHOU, M.W.; CHEN, T. Mutations induced by the carcinogenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in the liver *cII* gene of transgenic big blue rats. **Chemical Research in Toxicology**. v.17, p. 814-818, 2004.

MEI, N.; GUO, L.; FU, P. P.; HEFLICH, R. H.; CHEN, T. Mutagenicity of comfrey (*Symphytum officinale*) in rat liver. **British Journal of Cancer**. v.92, p.873-875, 2005.

MEYER, U. Overview of enzymes of drug metabolism. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics* .v.24, p. 449-459, 1996. MEDEIROS, I.A.; HAUN, M. Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis Eichl*: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells. **Toxicology Letters**. v.142, 143-151, 2003.

MIRBAHAI, L.; KERSHAW. R. M.; GREEN, R. M.; HAYDEN, R. E.; MELDRUM, R.A.; HODGES, N.J. Use of a molecular beacon to track the activity of base excision repair protein OGG1 in live cells. **DNA Repair**. v.9, p. 144-152, 2009.

MITAINE-OFFER, A. C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIÉ M.; ZÈCHES-HANROT, M. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytochemistry**. v. 9, p.142–145, 2002.

NCBI-GenBank. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>>. Acesso em Maio, 2011.

NUNES, D. S.; KOIKE, L.; TAVEIRA, J. J.; REIS, F. A. M.; Indole alkaloids from *Aspidosperma pruinosum*. **Phytochemistry**. v.31, p.2507-2511, 1992.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T. and POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **Eur J Biochem**. V. 267(17), p. 5421-6, 2000

- OLIVEIRA, F. Q.; JUNQUEIRA, R. G.; STEHMANN, J. R.; BRANDÃO, M. G. L. Potencial das plantas medicinais como fonte de novos antimaláricos: espécies indicadas na bibliografia etnomédica brasileira. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v. 5, p. 23-31, 2003.
- OSHIMA-FRANCO, Y. E FRANCO, L. M. Biotransformação: importância e toxicidade. *Saúde em Revista*. v. 5, p. 69-76, 2003.
- OSTILING, O.; JOHANSEN, K. J. Microeletrophoretic study os radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. ***Biochemical and Biophysical Research Communications***, v. 123, p.291-298, 1984.
- PAGES, V.; FUCHS, R. P. How DNA lesions are turned into mutations within cells? *Oncogene*. v. 21, p. 8957-8966, 2002.
- PAROLIN, M.B. E REOSAN, I.J.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. ***Arq Gastroenterol***. v.38 (2), p.138-144, 2001.
- PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L.; ALCÂNTARA, A. F. C.; ALVES, R. B.; RASLAN, D. S. Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae). ***Química Nova***. v.30, p.970-983, 2007.
- PIETTA, P. Flavonoids as Antioxidants. ***Journal of Natural Products***. v. 63, p.1035-1042, 2000.
- PLYS, A.F.; ROGACHEVA, M.V.; GREENE, E.C. E ALANI, E. The Unstructured Linker Arms of Mlh1-Pms1 Are Important for Interactions with DNA during Mismatch Repair. ***Journal of Molecular Biology***. Available online 30 May 2012
- RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. R.; MONTELEONE-NETO, R (Eds). Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação. Ribeirão Preto: Ed. Sociedade Brasileira de Genética/Revista Brasileira de Genética, p.67, 1991.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke: ***Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central***, INPA: Manaus, 1999.
- RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y. Effects of some β -carboline alkaloids on intact *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. ***Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology***. v.122, p. 27-31, 1999.
- ROSS, C.A.; MARGOLIS, R. L. Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. ***Clinical Neuroscience Research***. v.5, p. 3-14, 2005.
- ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. ***Trends in Molecular Medicine***. v.12, p.440-450, 2006.
- SCHIRMER, R.H.; KRAUTH-SIEGEL, R.L.; SCHULZ, G.E. Glutathione reductase, in: D. Dolphin, O. Avaramovic, R. Poulson (Eds.), ***Coenzymes and Cofactors: Glutathione***, vol. 3, Wiley, New York, p. 553–596, 1989.

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

SCRUTON, N.S.; BERRY, A.; PERHAM, R.N. Redesign of the coenzyme specificity of a dehydrogenase by protein engineering. **Nature**. v.343, p.38–43, 1990.

SHANKS, N.; GREEK, R.; GREEK, J. Are animal models predictive for humans? Philosophy, **Ethics and Humanities Medicine**. v.4, p.2, 2009.

SHAO, M.; MA, H.; WANG, Y.; XU, L.; YUAN, J.; WANG, Y.; HU, Z.; YANG, L.; WANG, F.; LIU, H.; QIAN, J.; XUN, P.; CHEN, W.; YUAN, W.; JING, G.; CHEN, F.; JIN, L.; WEI, Q.; WU, T.; SHEN, H.; HUANG, W.; LU, D. Polymorphisms in excision repair cross-complementing group 4 (ERCC4) and susceptibility to primary lung cancer in a Chinese Han population. **Lung Cancer**. v.60(3), p.332-9, 2008

SHEEHAN, D.; MEADE, G.; FOLEY, V. W.; DOWD, C. A. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of nonmammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem. J**. v.360, p. 1-16, 2001.

SILVA, A. F. Efeitos da beta-glucana extraída de *Agaricus blazei* na expressão dos genes ERCC5, CASP9, TP53 E CYP1A1 em células de hepatoma humano. Londrina, 2009. 55p. **Dissertação (mestrado)**. Universidade Estadual de Londrina.

SMITH, I.K.; POLLE, A.; RENNENBERG, H. Glutathione, in: R.G. Alscher, J.R. Cumming (Eds.), **Stress Responses in Plant Adaptation and Acclimation Mechanisms**, Wiley-Liss, New York, p.201–215, 1990.

STRASSER, A. Apoptosis - Part II: The Bcl-2 family proteins. **Nat. Rev. Immunol**. v.5, p.189–200, 2005.

STURTZ, L.A.; DIEKERT, K.; JENSEN, L.T.; LILL, R. E CULOTTA, V.C. A fraction of yeast Cu, Zn- superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage, **J. Biol. Chem**. v.276, p.38084–38089, 2001.

TESTU, O.; McCORNICK, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. **Nature**. v.398, p.422-426, 1999

THORBUM, A. Death receptor-induced cell killing. **Cellular Signaling**. v.16, p.139-44, 2004.

URUSHITANI, M.; SIK, A.; SAKURAI, T.; NUKINA, N.; TAKAHASHI, R. E JULIEN, J.P. Chromogranin-mediated secretion of mutant superoxide dismutase proteins linked to amyotrophic lateral sclerosis. **Nat. Neurosci**. v. 9, p.108–118, 2006.

VAN BLADEREN, P. J. Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. **Chem. Biol. Interact**. v.129, p. 61-76, 2000.

VAN WYK BE; VAN OUDTSHOORN, B.; GERICKE, N. **Medicinal plants of South Africa**. Briza Publications, South Africa, 304p, 1997.

VERMA, R. S.; TRIANFILLOU, N. G. Oncogenetic map of human genome. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v.100, p. 88-90, 1998.

VERPOORTE, R.; RUIGROK, C. L. M.; SVENDSEN, A. B.; Medicinal Plants of Surinam II: Antimicrobial Active Alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. **Planta Med.** v. 46, p. 149-152, 1982.

VERPOORTE, R.; KOS-KUYCK, E.; TSOI, A. T. A.; RUIGROK, C. L. M.; JONG, G.; SVENDSEN, A. B. Medicinal Plants of Surinam III: Antimicrobially Active Alkaloids from *Aspidosperma excelsum*. **Planta Med.** v. 48, p. 283-289, 1983.

VISIOLI, F.; KEANEY JR., J. F.; HALLIWELL, B. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**. v.47, p. 409, 2000.

WAKAMATSU, T.H.; DOGRU, M. E TSUBOTA, K. Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases. *Arq. Bras. Oftalmol.* v.71 (6), 2008.

WALSH, C.; BRADLEY, M.; NADEAU, K. Molecular studies on trypanothione reductase, a target for antiparasitic drugs. **Trends Biochem. Sci.** v.16, p.305-09, 1991.

WANG, C.; PENG, C. The mutagenicities of alkaloids and N-nitrosoguvacoline from betel quid. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**. v.360, p.165-171, 1996.

WATKINS, P.B. Drug metabolism by cytochromes P450 in the liver and small bowel. **Gastroenterology Clinics of North America**. v.21, p.511-526, 1992.

WEI, M.C.; ZONG, W.X.; CHENG, E.H.; LINDSTEN, T.; PANOUTSAKOPOULOU, V.; ROSS, A. J.; ROTH, K. A.; MACGREGOR, G. R.; THOMPSON, C. B. E KORS-MEYER, S. J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. **Science**, v.292, p.727-730, 2001.

WEINBERG, R. A. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. **Cell**. v.81, p.323-330, 1995.

WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGON, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R.; *J. Antiprotozoal activities of Colombian plants.* **Ethnopharmacology**. v. 78, p. 193-200, 2001.

WOGAN, G. N.; HECHT, S. S.; FELTON, J. S.; CONNEY, A.H.; LOEB, L. A. Environmental and chemical carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**. v.14, p. 473-486, 2004.

YANAGIHARA, K. E TSUMURAYA, M. Transforming growth factor β induces apoptotic cell death in cultured human gastric cells. *Cancer Res.* v. 52, p.4042-4045, 1992.

YOONA, H. S.; LEE, I. A.; LEE, H.; LEE, B.H.; JOD, J. Overexpression of a eukaryotic glutathione reductase gene from *Brassica campestris* improved resistance to oxidative stress in *Escherichia coli*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.326, p.618-623, 2005.

ARTIGO

A ser submetido à revista Mutation Research

Cytotoxicity, genotoxicity and mechanism of action (via gene expression analysis) of the indole alkaloid aspidofermine (antiparasitic) extracted from *Aspidoferma polyneuron* in HepG2 cells

¹ COATTI, G.C.; ¹ MARCARINI, J.C.; ¹ SARTORI, D.; ² FIDELIS, Q. C.; ² TREVISAN, D.;¹ MANTOVANI, M.S.

SUMMARY

Aspidofermine is an indole alkaloid with biological properties associated with combating parasites included in the genera *Plasmodium*, *Leishmania* and *Trypanosoma*. The present study evaluated the cytotoxicity (resazurin test), genotoxicity (comet assay) and mechanism of action (gene expression analysis via qRT-PCR) of this alkaloid in HepG2 cells to determine its risks to humans if it is used in the future as a medicine to treat parasites. The results demonstrated that treatment with aspidofermine was both cytotoxic (75 μ M) and genotoxic (50 μ M). There was no significant modulation of the expression of the following genes: *GSTP1* and *GPX1* (xenobiotic metabolism); *CAT* (oxidative stress); *TP53* and *CCNA2* (cell cycle); *HSPA5*, *ERN1*, *EIF2AK3* and *TRAF2* (endoplasmic reticulum stress); *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *CASP7*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX* and *BAX* (apoptosis); and *PCBP4*, *ERCC4*, *OGG1*, *RAD21* and *MLH1* (DNA repair). At a concentration of 50 μ M (non-cytotoxic, but genotoxic), there was a significant increase in the expression of *CYP1A1* (xenobiotic metabolism) and *APC* (cell cycle), and at a concentration of 100 μ M, a significant increase in the expression of *CYP1A1* (xenobiotic metabolism), *GADD153* (endoplasmic reticulum stress) and *SOD* (oxidative stress) was detected, with repression of the expression of *GR* (xenobiotic metabolism and oxidative stress). The results of treatment with aspidofermine at a 100 μ M concentration (the dose indicated in the literature to achieve 89% reduction of the growth of *L. amazonensis*) suggest that increased oxidative stress and an unfolded protein response (UPR) occurred in HepG2 cells. For the therapeutic use of aspidofermine (antiparasitic), chemical alteration of the molecule to achieve a lower cytotoxicity/genotoxicity in host cells is recommended.

Keywords: Aspidofermine. Cytotoxicity. Genotoxicity. Gene expression. HepG2

¹ Departamento de Biologia Geral, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina (PR), Brasil

² Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina (UEL). Londrina (PR), Brasil

1. INTRODUCTION

Species of the genus *Aspidosperma* are known for their medicinal effects. Low toxicity and absence of contraindications of infusions of *Aspidosperma* shells have contributed to their increasing use [1, 2]. Several examples of its medicinal effects can be distinguished: *A. ramiflorum* is used in the treatment of [2] and *A. nitidum* is used for treating uterus and ovary inflammation, diabetes, cancer, fever and rheumatism [1]. The family Apocynaceae, which includes the genus *Aspidosperma*, is characterized by the frequent presence of alkaloids with extensive structural diversity [3].

A new medical use for aspidospermine (Figure 1), an indole alkaloid isolated from plants belonging to the genus *Aspidosperma*, has come to the attention of researchers. Aspidospermine exhibits activity in combating flagellate protozoa of the genus *Trypanosoma* and *Leishmania*, which, when they parasitize humans, cause a variety of diseases, including Chagas disease (*T. cruzi*), sleeping sickness (*T. brucei gambiense* and *T. b. rhodesiense*) and various forms of *Leishmania* (*L. brasiliensis* and *L. amazonensis*) [4].

A common feature of these parasites is their metabolic dependence on tripanothione reductase (TryR), an NADPH-dependent flavoenzyme that helps fight oxidative stress by maintaining adequate levels of reduced tripanothione [5]. In humans, a similar activity is carried out by the enzyme glutathione reductase. Galarreta *et al.* (2008) [4] assessed 23 heterocyclic compounds whose structure was compatible with known inhibitory molecules of TryR and found that treatment with aspidospermine during the promastigote stage resulted in 89% inhibition of *L. amazonensis*.

Furthermore, Mitaine-Offer *et al.* (2002) [6] found that, of 12 indole alkaloids isolated from *Aspidosperma*, 7 showed high antiplasmodial activity, and 4 showed moderate activity against this parasite. The cytotoxicity of these alkaloids in the human fibroblast cell line NIH 3T3 was also evaluated. Aspidospermine showed the highest selectivity index (highest activity against the parasite and lower cytotoxicity against host cell) among the compounds evaluated.

Medicinal plants are studied to reveal potential chemotherapeutic drugs and to determine the safety of these potential drugs for common use [7, 8]. Alkaloids have been singled out as the principal active components in various medicines because of their prominent pharmacological potential, including antimicrobial, antitumor and antiplasmodial activities [9, 10]. However, many alkaloids have also been recognized for presenting genotoxic effects [11, 12, 13, 14]

Despite the proven effect of aspidospermine against parasites, no study has previously been conducted to deeply investigate its effect on human cells. Thus, the objective of the present study was to evaluate the cytotoxic and genotoxic effects and the mechanism of action (via gene expression analysis) of aspidospermine in a cell culture system using human hepatoma HepG2 cells. One type of analysis that is relevant to the study of a natural product is the evaluation of gene expression using real-time PCR. Applying this methodology, various cellular pathways were investigated in this study, including the metabolism of xenobiotics (*CYP1A1* and *GSTP1*), oxidative stress (*SOD1*, *GPX1*, *CAT* and *GR*), cell cycle control (*TP53*, *APC* and *CCNA2*), endoplasmic reticulum stress (*HSPA5*, *ERN1*, *EIF2AK3*, *TRAF2* and *GADD153*), apoptosis (*CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *CASP7*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX*, *BAK* and *PCBP4*) and DNA repair (*ERCC4*, *OGG1*, *RAD21* and *MLH1*). The study of such pathways aids in the determination of the processes that are activated or inactivated in the cell due to treatment with the referred compound.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 ASPIDOSPERMINE AND CHEMICAL AGENTS INDUCE CELLULAR DAMAGE

Root ethanolic extract of *A. polyneuron* was submitted to acid-base treatment for alkaloid extraction. The product was submitted to column chromatography on silica gel eluted by solvents in increasing gradient of polarity [hexane, acetone, methyl acetate and methanol] resulting in 469 fractions [250 mL]. The APR-108-110 [APA-8] was eluted in hexane:acetone 30%. This fraction was submitted to the purification with preparative thin layer chromatography plates of silica gel using dichloromethane:methanol [9:1] yielding needle crystals. Through spectroscopy methods [NMR, $^1\text{H}/^{13}\text{C}$, CG/MS, IV] the crystals were identified. These procedures were performed in the Laboratory of Chemistry of Natural Products at the State University of Londrina. Aspidospermine (mm = 354,49 g) was dissolved in DMSO and diluted in DMEM. The DMSO concentration did not exceed 1% of the total quantity of the medium in the culture.

After evaluation of the results of the cytotoxicity test, the concentrations of aspidospermine for use in the comet and qRT-PCR assays were determined. As a positive control for the resazurin and comet assays, methylmethanesulfonate (CAS No. 66-27-3, Sigma-Aldrich ®) was employed at a concentration of 300 μM in the culture medium.

2.2 CELL LINE

The human hepatoma HepG2 cell line (metabolizing cells) was acquired from the cell bank of the Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). These cells were cultured in 25 cm² flasks containing DMEM (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) in a 37°C incubator under 5% CO₂. Under these conditions, the cell cycle of this lineage takes approximately 24 hours.

2.3 CYTOTOXICITY ASSAY

The resazurin (7-hydroxy-10-oxide-phenoxazin-10-ium-3-one) cytotoxicity test was based on the method employed by McMillian et al. (2002) [15] and was performed using 24-well plates. The following treatments were included: media (without cells), negative control (1% DMSO, the same concentration used in other treatments), positive control (300 µM MMS) and aspidospermine at 5, 25, 50, 75 and 100 µM. The applied aspidospermine concentrations were chosen according to the assessment of cytotoxicity conducted by Mitaine-Offer et al. (2002) [6] based on [³H]-hypoxanthine incorporation in NIH 3T3 fibroblast cells. In this case, the IC₅₀ of aspidospermine was 53.2±0.8 µM after 24 hours of incubation. Each treatment was repeated three times in each plate, and each well was seeded with 2x10⁴ cells.

After 24 hours of treatment, the supernatant was discarded, and resazurin was added at a final concentration of 60 µM per well. The cells were incubated at 37°C for 3 hours. Then, the fluorescence was read at an excitation wavelength of 530-560 nm and emission wavelength of 580-600 nm (with a VICTOR 3 microplate reader). The obtained absorbance data were used to generate a regression curve for determination of the IC₅₀. This experiment was replicated 3 times.

2.4 SINGLE-CELL GEL ELECTROPHORESIS (SCGE), OR COMET ASSAY, AND CELLULAR VIABILITY TEST

The comet assay was conducted as described by Tice et al. (2000) [16]. Approximately 5 x 10⁵ cells from the experimental cultures were plated per flask, and after stabilization for 24 hours, the following experimental treatments were realized: positive control (MMS, 300 µM), negative control (1% DMSO, the same concentration used in the

other treatments), two non-cytotoxic concentrations of aspidospermine (5 μ M and 50 μ M) and a cytotoxic concentration of aspidospermine (100 μ M) chosen previously based on the results of the resazurin cytotoxicity test. Three repetitions were performed.

After three hours of treatment, the cells were washed with PBS, trypsinized, centrifuged for 5 minutes (64.4 g) and then resuspended in culture medium. A mixture of 20 μ L of the resuspended cells and 120 μ L of low-melting-point agarose (LMP, 0.5%) was applied to pre-gelatinized slides with normal melting point agarose (1.5%). Next, the slides were submerged in an alkaline lysis solution for one hour, followed by incubation for 40 minutes in electrophoresis buffer and then electrophoresis for 20 minutes. After this step, the slides were neutralized for 5 minutes 3 times and then submerged in absolute alcohol for 5 minutes for fixation. Staining of the slides was performed with ethidium bromide (200 μ g/mL).

Simultaneously to the comet assay, 20 μ L of the cell suspension was mixed with 20 μ L of trypan blue (0.2%) for cell viability analysis. Only the treatments resulting in an index greater than 80% were considered.

The nucleoids were finally displayed under a fluorescent microscope (excitation filter of 420-490 nm and 520 nm barrier filter, magnified 400 x). For each treatment, 300 nucleoids were analyzed with CometScore software, v. 1.5 (TriTek, Sumerduck, VA, USA). The parameter evaluated was the total size of the comet (comet total length).

2.5 ANALYSIS OF GENE EXPRESSION VIA QRT-PCR

To assess the mechanism of action of aspidospermine in HepG2 cells, the effect of the alkaloid on the expression of key genes involved in xenobiotic metabolism, oxidative stress, cell cycle regulation, endoplasmic reticulum stress, apoptosis and DNA repair (Table 01) was tested using the qRT-PCR technique. To obtain RNA, 10^6 cells were seeded in 25 cm^2 culture flasks. After stabilization for 24 hours, the following treatments were performed for 6 hours: negative control, 50 μ M aspidospermine (non-cytotoxic concentration) and 100 μ M aspidospermine (cytotoxic concentration). The experiment was replicated 3 times.

RNA was extracted using the LS-TRIzol reagent (Invitrogen) in accordance with the protocol of the manufacturer. RNA integrity was confirmed through 1% agarose gel electrophoresis, and the concentration and purity of the RNA were verified based on the A260/A280 absorbance ratios obtained using a spectrophotometer.

cDNA synthesis was performed using 200 units of M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen), 1 µg of total RNA and oligonucleotides with an oligo(dT) primer according to the protocol provided by the manufacturer of the enzyme.

Real-time PCR assays were carried out in a PTC 200 DNA Engine Cycler (a thermal cycler) using the Chromo 4 detection system (MJ Research BIO-RAD). The amplified products were detected with a fluorescence measurement system using SYBR Green dye (Invitrogen). The thermal cycling conditions for PCR included an initial step at 95 °C for 5 min; 40 cycles at 95 °C for 20 sec, 60 °C for 30 sec and 72 °C for 20 sec; 1 cycle at 95 °C for 10 sec; and, finally, 1 cycle at 40 °C for 1 min. A melting curve analysis was performed at the end of each reaction at temperatures between 50 °C to 90 °C.

The obtained data were normalized to the endogenous glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, which was amplified in each set of PCR experiments. The primers used (n = 28) are listed in Table 01.

2.6 STATISTICAL ANALYSIS

The data from the resazurin cytotoxicity assay and comet assay were subjected to variance analysis (ANOVA), followed by a Dunnett Test ($p < 0.05$).

For the qRT-PCR gene expression assays, analysis of the relative values of gene expression and standardization using the reference gene GAPDH were conducted via the PffafI method [17].

To decrease the likelihood of false positive or false negative results, the analyses were restricted to the statistically significant gene expression data that showed at least a 2-fold increase or decrease from the control.

3. RESULTS

3.1 TREATMENT WITH 75 µM OR 100 µM ASPIDOSPERMINE INDUCES CYTOTOXICITY

When the values obtained from the resazurin cytotoxicity test were examined, it was possible to observe a dose-dependent reduction of cell survival (Figure 2, Table 2). After 24 hours of treatment, the reduction of cell survival detected in HepG2 cells was significant for aspidospermine concentrations of 75 µM (67.88%) and 100 µM (38.55%) when compared to the control.

The straight polynomial equation ($r^2 = 0.98$) obtained through regression analysis showed that the IC50 for a 24-hour treatment with aspidospermine in HepG2 cells was 92.46 μM .

3.2 TREATMENT WITH 50 mM OR 100 mM ASPIDOSPERMINE INDUCES GENOTOXICITY

The results obtained for the comet length parameter in the comet assay showed that the genotoxicity associated with aspidospermine treatment for three hours was dose dependent (Figure 3, Table 3). There were significant differences between the negative control (8.3 μm) and the treatment with aspidospermine at the concentrations of 50 μM (10.7 μm) and 100 μM (14.3 μm). The concentration of 5 μM (8.7 μm) was not genotoxic to HepG2 cells. Cell viability remained above 80% in all treatments.

3.3 TREATMENT WITH 50 mM ASPIDOSPERMINE CAUSES INCREASED EXPRESSION OF CYP1A1 AND APC

To assess the mechanism of aspidospermine action in human cells, the effect of aspidospermine on the expression of key genes involved in various types of process of the cellular metabolism, was analyzed via qRT-PCR after 6 hours of treatment (Figure 4).

For the non-cytotoxic, but genotoxic concentration of 50 μM aspidospermine, increased *CYP1A1*, but not *GSTP1* expression was observed. In relation to the oxidative stress genes, 50 μM aspidospermine showed a tendency to inhibit the expression of *GR* and to increase the expression of *SOD*, but these results were not significant. With regard to the examined cell cycle control genes, there was a significant increase of *APC* expression detected.

There was no significant modulation of *GSTP1*, *SOD*, *GPX1*, *CAT*, *GR*, *TP53*, *CCNA1*, *HSPA5*, *ERN1*, *EIF2AK3*, *TRAF2*, *GADD153*, *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *CASP7*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX*, *BAK*, *PCBP4*, *ERCC4*, *OGG1*, *RAD21* or *MLH1* under the 50 μM aspidospermine treatment.

3.4 TREATMENT WITH 100 μ M ASPIDOSPERMINE CAUSES AN INCREASE IN THE EXPRESSION OF CYP1A1, GADD153 AND SOD AND INHIBITION OF THE EXPRESSION OF GR.

For the cytotoxic and genotoxic concentration of 100 μ M aspidospermine, among the group of biotransformation genes, an increase in the expression of the *CYP1A1*, but not *GSTP1* was observed, which was the same pattern observed under the 50 μ M concentration (Figure 4).

Regarding the examined oxidative stress genes, the pattern observed at the 50 μ M concentration were confirmed under the 100 μ M concentration. Aspidospermine treatment significantly inhibited *GR* expression and caused an increase in *SOD1* expression.

The expression of the *APC* gene, which was upregulated by treatment with 50 μ M aspidospermine, showed no significant change when the concentration of aspidospermine was increased to 100 μ M. Among the genes in the endoplasmic reticulum (ER) stress group, an increase in the expression of the pro-apoptotic gene *GADD153* was noted. There was no change in the expression of DNA repair and cell cycle control genes detected in HepG2 cells.

For the 100 μ M concentration of aspidospermine, there was no change in the gene expression of *GSTP1*, *GPXI*, *CAT*, *TP53*, *APC*, *CCNA1*, *HSPA5*, *ERN1*, *EIF2AK3*, *TRAF2*, *CASP8*, *CASP9*, *CASP3*, *CASP7*, *BCL-2*, *BCL-XL*, *BAX*, *BAK*, *PCBP4*, *ERCC4*, *OGG1*, *RAD21* and *MLH1*.

4. DISCUSSION

Studies have suggested that the alkaloid aspidospermine is effective in the treatment of parasites of the *Leishmania*, *Trypanosoma* and *Plasmodium* genera, which cause numerous diseases. However, the reports discussing the effect of aspidospermine on host cells are scarce. Only one study addressed the topic by assessing the cytotoxicity of aspidospermine in human cells, using NIH3T3 fibroblasts [6]. Employing the [³H]-hypoxanthine incorporation method, the IC₅₀ values observed were 53.2 μ M and 46.2 μ M for 24 and 72 hour periods of incubation with aspidospermine, respectively. In the present study, the IC₅₀ found for a 24 hour incubation period with aspidospermine was 92.46 μ M, indicating that a higher concentration of aspidospermine was necessary to induce cytotoxicity in 50% of HepG2 cells than in fibroblasts.

HepG2 cells are widely used in toxicological studies because they exhibit the ability to metabolize xenobiotics and generated experimental conditions that are closer to

those that occur *in vivo*. When testing the cytotoxicity of the alkaloids warifteine and milonine, Melo et al. (2003) [18] found similar IC₅₀ values in hepatocytes and fibroblasts and demonstrated that the toxic effects of both compounds are independent of the cytochrome P450 metabolism system.

In the present study, analysis of the expression of important genes involved in xenobiotic metabolism revealed a dose-dependent increase in *CYP1A1* gene expression under treatment with 50 and 100 µM concentrations of aspidospermine, indicating that the aspidospermine can be metabolized by HepG2 cells. In contrast, the levels of the *GSTP1* gene transcript were not modulated significantly. It is possible that the intermediary generated by phase I metabolism of aspidospermine is a substrate of a phase II enzyme other than *GSTP1*. Thus, the difference between the HepG2 and NIH3T3 IC₅₀s could be attributed to the formation of less toxic metabolites of aspidospermine by the biotransformation process of HepG2 cells. This phenomenon has also been observed for other compounds [19].

The results of the gene expression analysis for genes involved in apoptosis were consistent with the pattern observed in the cytotoxicity assay. Non-cytotoxic treatment, with 50 µM aspidospermine, resulted in no significant increase in the expression of any of the evaluated genes, whereas cytotoxic treatment, with 100 µM aspidospermine, resulted in increased expression of *GADD153*. This suggests that the changes in cellular metabolism that occur when the concentration of aspidospermine is increased to 100 µM can be harmful to normal protein folding, resulting in the formation of immature, unfolded proteins and/or poorly folded proteins. In this study, the cells were apparently unable to restore the correct protein folding pattern because there was no increase in the expression of the genes responsible for repression of the UPR located upstream in the ER stress pathway (*EIF2AK3*, *ERN1* and *HSPA5*), which can cause the targeting of apoptosis via *GADD153*.

In regard to the group of genes involved in the oxidative stress response, a trend of increased expression of *SOD1* in response to treatment with aspidospermine was observed at the 50 µM concentration, and an additional significant increase was observed at the 100 µM concentration. This may be an indication that treatment with aspidospermine triggers an increase in superoxide anions that are then converted to H₂O₂ by the enzyme superoxide dismutase 1, which is overexpressed. On the other hand, there was no change in gene expression detected for *CAT* or *GPX1*, which are the enzymes responsible for the neutralization of H₂O₂ to H₂O.

The parasites of the *Leishmania* and *Trypanosoma* genera exhibit metabolic dependence on trypanothione reductase (TryR), which helps to combat oxidative stress [5]. In

humans, an analogue activity is carried out by the enzyme glutathione reductase (GR). In a recent study, Galarreta, et al. (2008) [4] observed significant inhibition (89%) of the growth in *L. amazonensis* during the promastigote stage when treated with 100 μM aspidospermine. In the current study, the 100 μM aspidospermine treatment did not have a direct effect on the enzyme activity of glutathione reductase (analogue to TryR in humans) in HepG2 cells.

The results of this study demonstrated a trend of inhibition of *GR* gene expression in response to the 50 μM aspidospermine treatment that became significant when the concentration was increased to 100 μM . Thus, aspidospermine may not have a direct effect on the catalytic activity of glutathione reductase but does cause inhibition of the gene expression in HepG2 cells. As a result, the GSH/GSSG ratio may decrease, and the antioxidant capacity of the cells related to glutathione could be reduced. An excess of H_2O_2 in the cell can cause serious damage to proteins, lipids and DNA [20]. Using comet assays, it was possible to observe that the genotoxicity caused by a 3-hour treatment with aspidospermine was dose dependent and was significant starting at the 50 μM concentration, which may be a result of a buildup of H_2O_2 in the cells.

Despite detection of the induction of DNA damage at a concentration of 50 μM , only the highest concentration tested in this study (100 μM) was cytotoxic, suggesting that at the 50 μM concentration, DNA repair mechanisms remained active, and the number of viable cells was consequently unaltered. However, none of the repair genes assessed via qRT-PCR showed significant modulation under the 50 or 100 μM aspidospermine concentration. It is possible that the examined repair genes are involved in a more immediate response, and consequently, no changes in their expression were observed after the 6-hour treatment with aspidospermine. For example, Cortes et al. (2011) [21] observed modulation of the expression of repair genes after two hours of treatment with glucose oxidase, an enzyme that induces oxidative stress in breast cell lines.

Still, treatment with 50 μM aspidospermine triggered an increase in the expression of *APC*, a tumor suppressor, reinforcing the idea that the cell cycle is paused to allow repair of genotoxic damage under these conditions.

Drugs that are genotoxic can be modified to achieve greater therapeutic activity and lower toxicity. For example, several active components of vegetable origin, some of which exhibit toxic properties, have been used as precursors of important substances incorporated into therapy, including catarantine and vindoline, isolated from *Catharanthus roseus*; camptothecin, isolated from *Camptotheca acuminata*; podophyllotoxin, isolated from

rhizomes of *Podophyllum peltatum* and *P. hexandru*; scopolamine isolated from *Datura ssp.*; stigmasterol, isolated from *Glycine max*; and diosgenin, isolated from *Dioscores ssp.* [22].

By virtue of its cytotoxic nature, aspodospermine can also be investigated as a potential drug for anticancer treatment, similar to other alkaloids with the same properties. An example of such a compound is the cytotoxic alkaloid camptothecin (CPT), which has inhibitory effect on the enzyme topoisomerase I [23]. While CPT showed excellent antitumor activity in preliminary clinical trials, it also presented a low solubility and led to numerous adverse reactions. Due to these disadvantages, a wide variety of compounds have been synthesized based on the structure of CPT, two of which (topotecan and irinotecan) have been approved and are currently being used in chemotherapy for cancer treatment [24, 25, 26].

5. CONCLUSION

The cytotoxic and genotoxic effects triggered in HepG2 cells treated with aspodospermine, which is useful for combating parasites included in the genera *Trypanossoma*, *Leishmania* and *Plasmodium*, were observed to be dose dependent. The results obtained in this study suggest that aspodospermine is biotransformed by cells into a metabolite with properties that are less toxic than the initial molecule and that treatment with this compound causes modulation of oxidative stress-related enzymes, which may be the cause of the observed genotoxic damage. These findings suggest that treatment with 50 μM aspodospermine results in cell cycle arrest to allow repair of the damage and that treatment with 100 μM aspodospermine induces apoptosis via a persistent response to the UPR. Based on the effects reported here, it is recommended that the original chemical structure of aspodospermine be altered to decrease its cytotoxicity and genotoxicity in host cells, making it more viable for clinical use. Additionally, because of its potential cytotoxicity, aspodospermine can be evaluated for use as a potential anticancer treatment.

REFERENCES

- [1] B. Weniger, S. Robledo, G.J. Arango, E. Deharo, R. Aragon, V. Muñoz, J. Callapa, A. Lobstein, R. Anton, Antiprotozoal activities of Colombian plants, *Ethnopharmacology*. 78 (2001) 193-200.
- [2] I.C.P. Ferreira, M.V.C. Lonardonni, G.M.C. Machado, L.L. Leon, L. Gobbi-Filho, L.H.B. Pinto, A.J.B. Oliveira, Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99 (2004) 325-327.

- [3] J.R.F. Allen, B.R. Holmstedt, The simple β -carboline alkaloids, *Phytochemistry*. 19(1980) 1573, 1980.
- [4] B.C. Galarreta, R. Sifuentes, A.K. Carrillo, L. Sanchez, The use of natural product scaffolds as leads in the search for trypanothione reductase inhibitors, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16 (2008) 6689-6695.
- [5] A.H. Fairlamb, A. Cerami, Metabolism and functions of the trypanothione in the kinetoplastida, *Annual Review of Microbiology*. 46 (1992) 695-729
- [6] A.C. Mitaine-Offer, M. Sauvain, A. Valentin, J. Callapa, M. Mallié M. Zèches-Hanrot, Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids, *Phytomedicine*. 9 (2002) 142-145.
- [7] E.E. Elgorashi, J.L.S. Taylor, A. Maes, J. Van Staden, N. De Kimpe, L. Verschaeve, Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects, *Toxicology Letters*. 143 (2003) 195-207.
- [8] S. Arora, E. Brits, K. Kaur, R.S. Sohi, S. Kumar, L. Verschaeve, Evaluation or genotoxicity of medicinal plant extracts by the comet and Vitotox (R) tests, *Journal of environmental pathology, toxicology and oncology*. 24 (2005) 193-200.
- [9] D.G. Kingston, B.B. Gerhart, F. Ionescu, M.M. Mangino, S.M. Sami, Plant anticancer agents V: new bisindole alkaloids from *Tabernaemontana johnstonii* stem bark, *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 62 (1978) 249-51.
- [10] M. Frederich, M.P. Hayette, M. Tits, P. De Mol, L. Angenot, *In vitro* activities of *Strychnos* alkaloids and extracts against *Plasmodium falciparum*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 43 (1999) 2328-233.
- [11] C. Wang, C. Peng, The mutagenicities of alkaloids and N-nitrosoguvacoline from betel quid, *Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects*. 360 (1996) 165-171.
- [12] N. Mei, R.H. Heflich, M.W. Chou, T. Chen, Mutations induced by the carcinogenic pyrrolizidine alkaloid riddelliine in the liver *cII* gene of transgenic big blue rats, *Chemical Research in Toxicology*. 17 (2004) 814-818.
- [13] N. Mei, L. Guo, P.P. Fu, R.H. Heflich, T. Chen, Mutagenicity of comfrey (*Symphytum officinale*) in rat liver, *British Journal of Cancer*. 92 (2005) 873-875.
- [14] C. Ansah, A. Khan, N.J. Gooderham, *In vitro* genotoxicity of the West African anti-malarial herbal *Cryptolepis sanguinolenta* and its major alkaloid cryptolepine, *Toxicology*. 208 (2005) 141-147.
- [15] M.K. Mcmillian, L. Li, J.B. Parker, L. Patel, Z. Zhong, J.W. Gunnett, W.J. Powers, M.D. Johnson, An improved resazurin-based cytotoxicity assay for hepatic cells, *Cell Biology and Toxicology*. 18 (2002) 157-173.
- [16] R.R. Tice, E. Agurell, D. Anderson, B. Burlinson, A. Hartmann, H. Kobayashi, Y. Miyamae, E. Rojas, J.C. Ryu, Y.F. Sasaki, Single cell gel/comet assay: guidelines for in

vitro and in vivo genetic toxicology testing, *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35 (2000) 206-221.

- [17] M.W. Pfaffl, G.W.E. Horgan, L. Dempfle, Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 1-10.
- [18] P.S. Melo, H.M.M. Cavalcante, J.M. Barbosa-Filho, M.F.F.M. Diniz, I.A. Medeiros, M.; Haun, Warifteine and milonine, alkaloids isolated from *Cissampelos sympodialis Eichl*: cytotoxicity on rat hepatocyte culture and in V79 cells, *Toxicology Letters*. 142 (2003) 143-151.
- [19] A.F. Li, G.L. Shen, S.Y. Jiao, H.E. Li, Q. Wang, Metabolic detoxification of bakuchiol is mediated by cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes, *Beijing Da Xue Xue Bao*. 44(2012) 431-6.
- [20] T.H. Wakamatsu, M.E. Dogru, K. Tsubota, Tearful relations: oxidative stress, inflammation and eye diseases, *Arq. Bras. Oftalmol.* 71 (2008).
- [21] D.F. Cortes, W. Sha, V. Hower, G. Blekherman, R. Laubenbacher, S. Akman, S.V.E. Torti, V. Shulaev, Differential gene expression in normal and transformed human mammary epithelial cells in response to oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine*. 50(2011) 1565–1574.
- [22] C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4.ed. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRS; 833p, 2002.
- [23] T. Efferth, Y.J. Fu, Y.G. Zu, G. Schwarz, V.S. Konkimalla, M. Wink, Molecular target-guided tumor therapy with natural products derived from traditional Chinese medicine, *Current medicinal chemistry*. 14 (2007) 2024–32.
- [24] H. Ulukan, P.W. Swaan, Camptothecins, a review of their chemotherapeutical potential, *Drugs*. 62 (2002) 2039–2057.
- [25] Samuelsson, G. *Drugs of Natural Origin: a Textbook of Pharmacognosy* (5 ed.). (2004).
- [26] C.H. Takimoto, E. Calvo, "Principles of Oncologic Pharmacotherapy" in Pazdur R, Wagman LD, Camphausen KA, Hoskins WJ (Eds) *Cancer Management: A Multidisciplinary Approach*. 11 ed. 2008.
- [27] M.M. Pereira, R.L. Jácome, A.F.C. Alcântara, R.B. Alves, D.S. Raslan, Alcalóides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae), *Química Nova*. 30 (2007) 970-983.

APÊNDICES

FIGURES

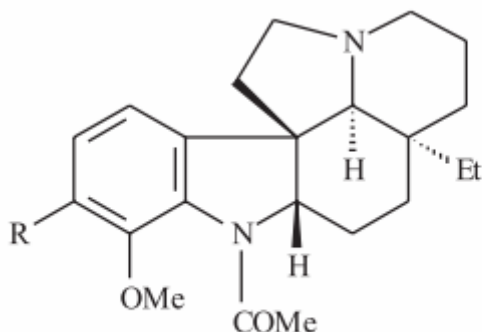
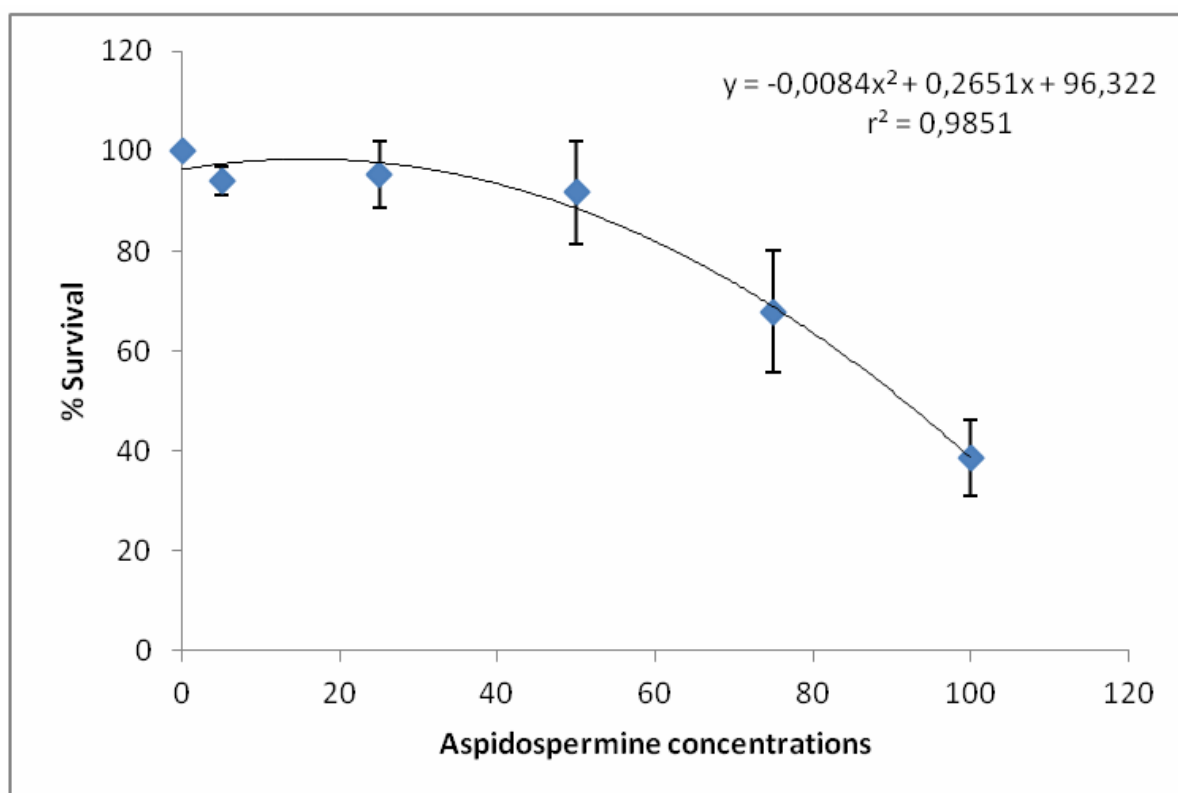
Figure 1 – Chemical structure of aspidospermine [27].**Figure 2** – Cell survival curve obtained from the resazurin cytotoxicity test in HepG2 cells treated with aspidospermine at different concentrations for 24 hours. The dots represent the average survival \pm standard deviation values obtained in three independent experiments.

Figure 3 – Genotoxicity values (comet length) obtained from comet assays after a 3-hour treatment of HepG2 cells with 5, 50 or 100 μ M aspidospermine. Statistical significance: * = $p < 0.001$ relative to the control.

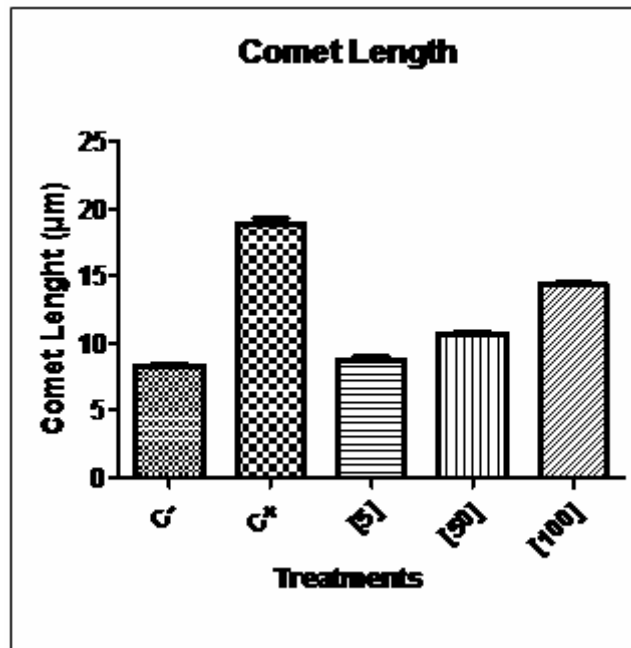
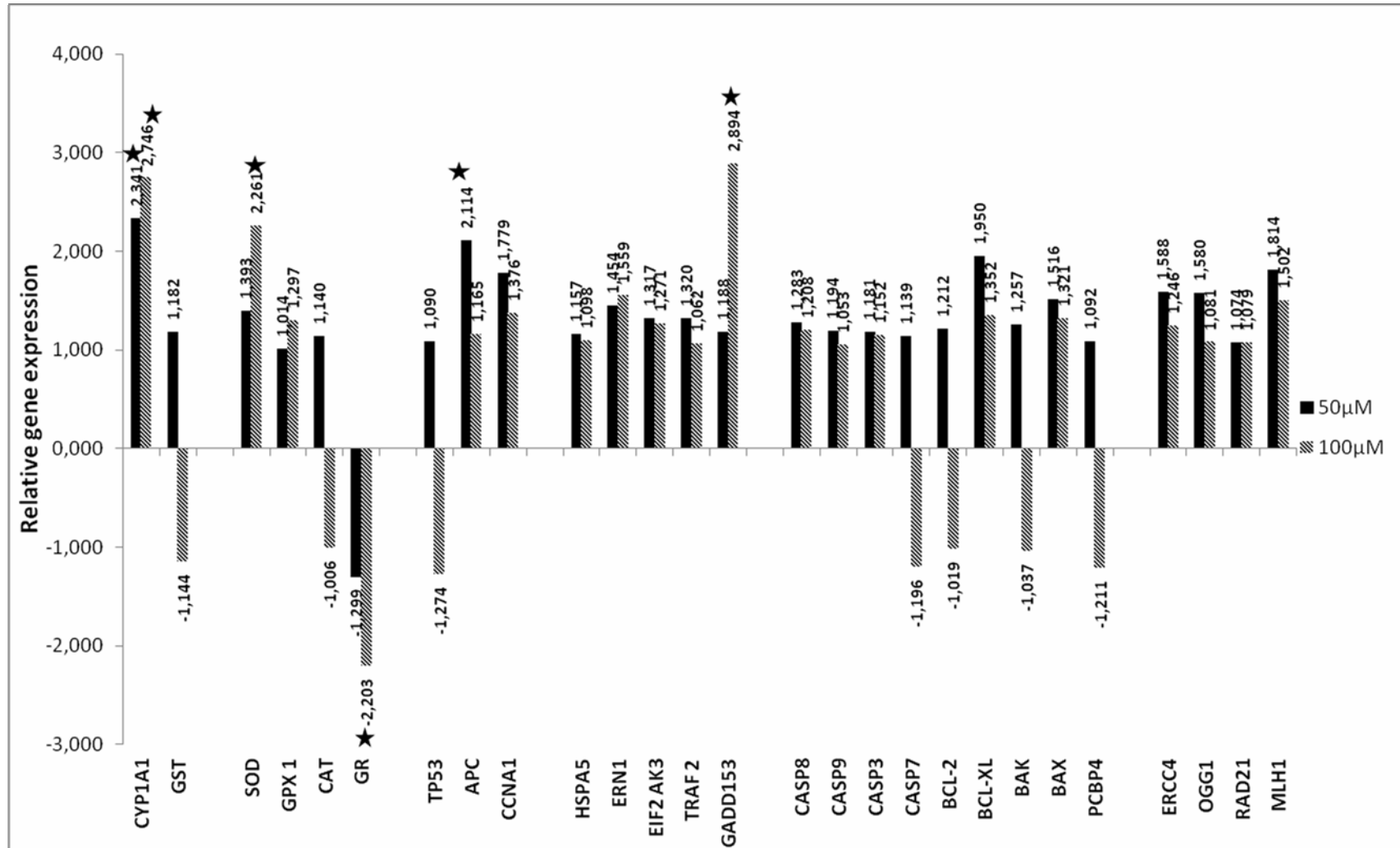


Figure 4 – Relative gene expression obtained via qRT-PCR for genes assessed after treatment of HepG2 cells for 6 hours with 50 or 100 μ M aspidospermine. * Significant expression.



TABLES

Table 01 – Primers used in the present study.

	Sequência
<i>CYP1A1</i>	F- TCA TCC CTA TTC TTC GCT ACC R- CAG GAG ATA GCA GTT GTG AC
<i>GSTP</i>	F- CAA TAC CAT CCT GCG TCA CC' R- GGA GAT GTA TTT GCA GCG GA
<i>SOD1</i>	F- CTAGCGAGTTATGGCGAC' R- GAATGTTTATTGGGCGATC'
<i>GPX 1</i>	F- CAACCAGTTTGGGCATCAG' R- CGATGTCAATGGTCTGGAAG'
<i>CAT</i>	F- CATCGCCACATGAATGGATA' R- CCAACTGGGATGAGAGGGTA'
<i>GR</i>	F-GAAAAAGTTTACCGCTCCAC' R- TAAACGCCTTTGACGTTGGTA'
<i>TP53</i>	F: 5' TCACACCATCCACTACAAC 3' R: 5' GACAGGCACAAACACGCAC 3'
<i>APC</i>	F: 5' AAAGCGCCATGATATTGCACGGTC 3' R: 5' TGTTTGCTGTGCTCACGTTTCCAG 3'
<i>CCNA1</i>	F: 5' GACCCTGCATTTGGCTGTG 3' R: 5' ACAAACTCTGCTACTTCTGG 3'
<i>HSPA5</i>	F: 5' ACGGACGTCAAGTTTGATCC 3' R: 5' TTGGTAGACGCAGACAGTGG 3'
<i>ERN1</i>	F: 5' ACGGACGTCAAGTTTGATCC 3' R: 5' TTGGTAGACGCAGACAGTGG 3'
<i>EIF2 AK3</i>	F: 5' CCTCACCATTTGCCTAAGGA 3' R: 5' GGGGGACTTTCCTTCTTCTG 3'
<i>TRAF 2</i>	F: 5' AGTTTTGTGGTGCTGGCTCT 3' R: 5' ACTCAGCCCCGTAAGATTT 3'
<i>GADD153</i>	F: 5' CCCTCACTCTCCAGATTCCA 3' R: 5' CTGGGGAATGACCACTCTGT 5'

<i>CASP8</i>	F: 5' GCAAAAGCACGGGAGAAAGT 3' R: 5' TGCATCCAAGTGTGTTCCATT3'
<i>CASP9</i>	F: 5' GCTCTCCTTTGTTTCATCTCC 3' R: 5' GTTTCTAGGGTTGGCTTCG 3'
<i>CASP3</i>	F: 5' GTGCTACAATGCCCTGGAT 3' R: 5' GCCCATTCAATTATTGCTTTC C 3'
<i>CASP7</i>	F: 5' TCACCATGCGATCCATCAAGACCA 3' R: 5' TTTGTCTGTTCCGTTTCGAACGCC 3'
<i>BCL-2</i>	F: 5'CCTCGTCCAAGAATGCAAAGCACA 3' R: 5'ATCTCCCGTTATCGTACCCTGTT 3'
<i>BCL-XL</i>	F: 5' TGGGCTCACTCTTCAGTCGGAAAT 3' R: 5' ATGTAGTGTTCTCCTGGTGGCAA3'
<i>BAX</i>	F: 5' TTTCTGACGGCAACTTCAACTGGG 3' R: 5' TGTCCAGCCCATGATGGTTCTGAT 3'
<i>BAK</i>	F: 5' CAAGAT TGCCACCAGCCTGTT TGA 3' R: 5' ATGCAGTGATGCAGCATGAAGTCG 3'
<i>PCBP4</i>	F 5' CTGATGCACGGGAAGGAAGT R 5' CCCGATTGCTTTACAGTCT
<i>ERCC4</i>	F5`AATTCCAAGGTGTGCGACTG R5`CGATGTTGTTGTTGGAGGAAC
<i>OGG1</i>	F5`AATTCCAAGGTGTGCGACTG R5`CGATGTTGTTGTTGGAGGAAC
<i>RAD21</i>	F 5'-CAATGCCAACCATGACTGAT R 5'-CGGTGTAAGACAGCGTGTAAC
<i>MLH1</i>	F 5` CTTGTACCCCCGGAGAAG R 5` TGCAACATCTCCCGGAGAAC
<i>GAPDH</i>	F: 5' GAAGGTGAAGGTCGGAGTC 3' R: 5' GGAAGATGGTGTGGGATTT 3'

Table 02 – Average percentage of cell survival rates \pm standard deviation. Calculated from the resazurin assay after 24 hours of treatment.

Statistical significance: * = $p < 0.001$ relative to the control.

Treatments	Mean \pm St Deviation
Negative Control	100 \pm 0,00
Positive Control	20,30 \pm 2,85
Aspidospermine 5 μ M	93,96 \pm 6,66
Aspidospermine 25 μ M	95,58 \pm 10,37
Aspidospermine 50 μ M	92,02 \pm 12,31
Aspidospermine 75 μ M	68,02 \pm 7,54 ***
Aspidospermine 100 μ M	39,04 \pm 22,34 ***

Table 03 – Mean \pm standard deviation of Comet Length and increase (%) of this parameter in the aspidospermine treatments compared to the negative control. Values obtained from the comet assay and evaluated by software CometScore v1, 5.

Statistical significance: * = $p < 0.001$ relative to the control.

	Comet Length (μ m) \pm StDev	Increase (%) related to negative control
Negative Control	8,320 \pm 1,492	
Positive Control	18,914 \pm 6,336 ***	127,3
Aspidospermine 5 μ M	8,711 \pm 5,108	4,7
Aspidospermine 50 μ M	10,710 \pm 2,637***	28,7
Aspidospermine 100 μ M	14,348 \pm 2,991 ***	72,5