

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO, GENOTÓXICO,
ESTROGÊNICO E MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO
NEMOROSONE, ISOLADO DA RESINA DE *Clusia rosea***

MARIANA SANTORO DE CAMARGO

Araraquara - SP
2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA APLICADAS À
FARMÁCIA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL MUTAGÊNICO, GENOTÓXICO,
ESTROGÊNICO E MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO
NEMOROSONE, ISOLADO DA RESINA DE *Clusia rosea***

MARIANA SANTORO DE CAMARGO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia, área de concentração: Mutagênese, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicadas à Farmácia.

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. ELIANA APARECIDA VARANDA

Araraquara - SP
2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

C172a Camargo, Mariana Santoro de
Avaliação do potencial mutagênico, genotóxico, estrogênico e modulação da expressão gênica pelo nemorosone, isolado da resina de *Clusia rosea* / Mariana Santoro de Camargo. – Araraquara, 2012
110 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Eliana Aparecida Varanda

1. Nemorosone. 2. Mutagenicidade. 3. Genotoxicidade. 4. Atividade estrogênica. 5. Expressão gênica. I. Varanda, Eliana Aparecida, orient.
II. Título.

CAPES: 40300005

**Esta tese foi realizada com o apoio financeiro da Fundação
de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) –**

Processo nº 2009/03057-8

DEDICATÓRIA

*Dedico esse trabalho aos meus pais, Antonio Carlos
e Eliane, pelo apoio, dedicação, amor e ensinamentos.*

Enfim, por tudo que representam para mim.

Se aqui estou, devo a vocês.

AGRADEÇO...

Muito especialmente a minha orientadora, Prof^a Eliana Varanda, pela confiança, incentivo, paciência, atenção, disponibilidade e profissionalismo. Agradeço pela oportunidade de realizar meu doutorado sob sua orientação, pela amizade e pelos aprendizados sobre a ciência e a vida.

A Prof^a Maria Stella Gonçalves Raddi, minha orientadora de mestrado, por ter me iniciado na pesquisa, pela confiança, ensinamentos e pela grande amizade de sempre.

Ao Prof. Antonio Carlos Pizzolitto por ter me ensinado a trabalhar com microbiologia...

As Prof^{as} Valéria Valente e Raquel Alves dos Santos pela participação na minha banca de qualificação e sugestões enriquecedoras.

Aos companheiros de laboratório: Flávia Resende, Ana Paula Oliveira, Aline Miranda, Livia Espanha, Paula Boldrin, Marcio Weiss, Cassia Cardoso e Rone De Grandis, pela ajuda, dicas, ensinamentos, momentos de descontração e amizade.

Ao Pós-doc da UEL Marcelo Tempesta e a funcionária do Laboratório de Biologia Molecular da FCFAr Mariana Biasioli pela grande ajuda com os experimentos de PCR Array.

Aos companheiros de Unesp: Marcelo Gonzaga, Mariana Rozatto, Michelle, Leonardo Gorla, Carol, Suelen, Lili, Panta, Haroldo, Julhiany e Fátima, pela amizade, conversas e sorrisos pelos corredores

Aos meus avós, irmãos, sobrinhos, tios, primos e amigos, por todos os momentos bons que sempre passamos juntos.

Ao Leandro, meu companheiro, conselheiro, amigo. Por tudo o que faz por mim, além de todo o amor que me dá.

À Margarete, Marisa, Sílvia e Néia pela disponibilidade em ajudar, sempre

Às funcionárias da Secretaria de Pós-Graduação pelo profissionalismo e atenção

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa concedida.

RESUMO

Atualmente, muitos estudos que envolvem produtos naturais são contínuos e focalizados em descobrir drogas para as mais diversas áreas terapêuticas. Grande parte dos compostos sintéticos presentes no mercado atual tem origem de produtos naturais, em especial de plantas. O nemorosone é o constituinte majoritário da resina floral de *Clusia rósea* Jacq., Clusiaceae, e da própolis cubana. Estudos *in vitro* relataram atividade citotóxica dessa substância contra várias linhagens de células tumorais incluindo aquelas resistentes a diversas drogas citostáticas, além de apresentar uma baixa citotoxicidade sobre células não-tumorais. Portanto, visando à caracterização da atividade biológica do nemorosone, uma substância com potencial atividade antitumoral e a importância dos testes de toxicidade para a avaliação da segurança pré-clínica de compostos candidatos a drogas, os objetivos desse trabalho se fundamentaram em estudar a influência do nemorosone sobre danos ao DNA pelo teste do Cometa em células mamárias normais (MCF10A) e tumorais (MCF-7 BUS), assim como a sua atividade mutagênica e antimutagênica por meio do teste de Ames, utilizando diferentes linhagens de *Salmonella typhimurium*. Além disso, foi caracterizada sua atividade estrogênica e antiestrogênica através do Ensaio de E-Screen, o qual determina o efeito proliferativo da substância em células MCF-7 sensíveis a estrógenos e também pelo modelo experimental que utiliza leveduras recombinantes (*Recombinant Yeast Assay*). Posteriormente, foi avaliada sua influência sobre o ciclo celular de MCF-7 BUS através de citometria de fluxo e análise de expressão de diferentes genes nessa mesma linhagem celular pela técnica de PCR Array, para a elucidação de possíveis mecanismos de ação do nemorosone, a fim de contribuir para sua recomendação como agente terapêutico. O nemorosone não induziu danos ao DNA de células de mama normais ou cancerígenas após tratamento dessas células durante 3 e 24 horas, quando avaliado pelo Ensaio do Cometa. O composto apresentou maior citotoxicidade para células cancerígenas do que para células normais de mama. No teste de Ames, o nemorosone não apresentou potencial mutagênico frente a nenhuma linhagem testada de *S. typhimurim*, mas, foi antimutagênico inibindo em 53% as mutações induzidas pela mitomicina C frente à linhagem TA102 e em 31% os efeitos mutagênicos da aflatoxina frente à linhagem TA100.

Quanto aos testes de E-Screen e RYA, o composto não demonstrou qualquer atividade estrogênica e, ao contrário, apresentou potencial antiestrogênico em diferentes concentrações pelas duas metodologias. Ensaio de avaliação do ciclo celular mostraram uma redução significativa do número de células na fase G₂/M sem alterar outras fases do ciclo. Na mesma concentração (5x10⁻⁵M), o composto alterou a expressão de 20 genes dessa mesma linhagem celular. Os resultados mostraram que o nemorosone atua diminuindo a expressão de receptores estrogênicos do tipo α e assim, alterando outros genes que levam a diminuição da proliferação celular e indução de apoptose, indicando seu potencial antitumoral.

PALAVRAS-CHAVES: nemorosone, mutagenicidade, genotoxicidade, atividade estrogênica, expressão gênica

ABSTRACT

Currently, a wide range of research involving natural products is focused on the discovery of new drugs in many different therapeutic areas. A great number of the synthetic compounds on the market were derived from natural products, especially plants. Nemorosone is the major constituent of the floral resin of *Clusia rosea* Jacq., Clusiaceae, and in Cuban propolis. *In vitro* studies have shown cytotoxic activity in this substance against various tumor cell lines, including those resistant to various cytotoxic drugs, whereas it has low cytotoxicity to non-tumoral cells. Therefore, in order to characterize the biological activity of nemorosone, a substance with potential antitumor activity, and in view of preclinical testing of the toxicity of drug candidate compounds, the aim of this study was to determine the nemorosone capacity to induce DNA damages in normal breast cells (MCF10A) and breast cancer cells (MCF-7 BUS) by Comet Assay, as well as the mutagenic and antimutagenic activity by Ames test. Moreover, to characterize the estrogenic and antiestrogenic activity by E-Screen Assay, which determines the proliferative effect of the compound in MCF-7 cells sensitive to estrogen and by experimental recombinant yeast model (Recombinant Yeast Assay). Subsequently, nemorosone influence on MCF-7 BUS cell cycle was assessed by flow cytometry analysis and the expression of different genes in the same cell line was evaluated by PCR Array for identification of possible mechanisms of action of the compound, in order to contribute to its recommendation as a therapeutic agent. The nemorosone did not induce damages in normal or cancer breast cells DNA after treatment during 3 and 24 hours, when evaluated by Comet Assay. The compound showed higher cytotoxicity to cancer cells than to normal breast cells. In the Ames test, nemorosone presented no mutagenic potential against any *S. typhimurim* strain tested but was antimutagenic, inhibiting in 53% the mutations induced by mitomycin C in TA102 strain and in 31% the mutagenic effects induced by aflatoxin in TA100.

In the E-Screen and RYA assays, the compound did not show estrogenic activity and, in contrast, presented antiestrogenic potential at different concentrations by the both methods. Assays for cell cycle evaluation showed a significant reduction on G2/M phase cells number without to alter other phases. In the same concentration ($5 \times 10^{-5} \text{M}$), the compound altered the expression of 20

genes in the same cell line. The results showed that nemorosone acts decreasing type α estrogen receptors expression and thus altering other genes expression causing a cell proliferation decrease and apoptosis, confirming their atitumoral potential.

KEY WORDS: nemorosone, mutagenicity, genotoxicity, estrogenic activity, cell cycle, genic expression

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2-ANTR	2-antramino
A,C,G,T	Bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina e timina, respectivamente)
ALS	Sítios álcali lábeis
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BY4741	Linhagem de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CLV	Cromatografia Líquida à vácuo
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
DMEM	<i>Dulbecco's modification of Eagle's medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
E2	Hormônio 17 β - estradiol
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
EEq	Equivalentes de estradiol
EP	Efeito Proliferativo
EPR	Efeito Proliferativo Relativo
ER+	Presença de receptores estrogênicos
Er α	Receptor de estrógeno tipo α
Er β	Receptor de estrógeno tipo β
ERE2	Elemento Responsivo ao Estrógeno
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a um detector de arranjos de diodos
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada a um espectrômetro de massas
IC ₅₀	Concentração Inibitória para 50% das células
ICI 182,780	Antagonista de receptor de estrógeno (<i>fulvestrant</i>)
IM	Índice de Mutagenicidade
M	Média
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
MCF-7 BUS	Linhagem celular de câncer de mama responsiva ao estrógeno
MCF-10A	Linhagem celular de mama normal

MuGal	4-metilumbeliferil β – D-galactosídeo
MYB	Família de genes
NPD	4-nitro- <i>o</i> -fenilenodiamina
OTM	<i>Olive Tail Moment</i>
pH5HE0, pVitBX2, pAAH5, pSFL Δ -178k	Plasmídeos
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
RM	Razão de Mutagenicidade
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RYA	Ensaio com Leveduras Recombinantes (Recombinat Yeast Assay)
S9	Fração microsomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254
TA97a,98, 100 e 102	Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>
TM	<i>Tail Moment</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
YPD	<i>Yeast Nitrogen Base</i>
Y-PER	Tampão de lise

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura química do nemorosone.....	18
Figura 2.	Flor de <i>Clusia rosea</i>	19
Figura 3.	Tipos de respostas endócrinas: a) resposta natural; b) efeito agonista; c) efeito antagonista.....	24
Figura 4.	Mecanismo de ação exercido pelo RYA.....	26
Figura	Fluxograma da análise da expressão gênica por PCR Array.....	49
5.		
Figura 6.	Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento (2 x 10 ⁴ células/orifício) com diferentes concentrações do nemorosone.....	54
Figura 7.	Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 144 horas de tratamento (2 x 10 ⁴ células/orifício) com diferentes concentrações do nemorosone.....	55
Figura 8.	Viabilidade celular em células MCF10A após 24 horas de tratamento (2 x 10 ³ células/orifício) com diferentes concentrações do nemorosone.....	56
Figura 9.	Viabilidade da levedura frente a diferentes concentrações do nemorosone expressa em porcentagem.....	58
Figura 10.	Percentual de atividade estrogênica de diferentes concentrações do nemorosone em relação ao estradiol.....	59
Figura 11.	Percentual de atividade estrogênica induzida pelo 17 β-estradiol (10nM) frente a diferentes concentrações do nemorosone.....	60
Figura 12.	Efeito proliferativo (relação entre a taxa de proliferação apresentada pela substância avaliada e aquela apresentada pelo controle de solvente equivalendo a um EP de 1,0) em células MCF-7 BUS tratadas com nemorosone.....	61
Figura 13.	Eficácia proliferativa relativa (EPR) calculada como a taxa máxima de proliferação da substância avaliada e a taxa máxima obtida pelo 17 β-estradiol, estimando-se 100% para a taxa do estradiol em células MCF-7 tratadas com o nemorosone.....	61
Figura 14.	Viabilidade de células MCF-7 BUS tratadas com 17 β-estradiol e nemorosone em diferentes concentrações.....	62
Figura 15.	Análise do Ciclo celular de MCF-7 BUS por citometria de fluxo em células sem tratamento (A-controle) e tratadas com a concentração de 10 ⁻⁴ M de nemorosone (B).....	63

Figura 16. Análise do Ciclo celular de MCF-7 BUS por citometria de fluxo em células tratadas com as concentrações de 5×10^{-5} (A) e 10^{-5} M (B) de nemorosone..... **64**

Figura 17. Análise do Ciclo celular de MCF-7 BUS por citometria de fluxo em células tratadas com as concentrações de 5×10^{-5} (A) e 10^{-5} M (B) de nemorosone..... **64**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Atividade mutagênica para as linhagens TA97a e TA102 de <i>Salmonella typhimurium</i> expostas ao nemorosone em várias doses, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.....	52
Tabela 2.	Atividade mutagênica para as linhagens TA98 e TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i> expostas ao nemorosone em várias doses, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica.....	52
Tabela 3.	Atividade antimutagênica do nemorosone utilizando as linhagens TA98, TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i>	53
Tabela 4.	Valores médios ± desvio padrão (DP) do <i>Olive Tail Moment</i> (OTM), do <i>Tail Moment</i> (TM) e da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) obtidos pelo ensaio do cometa em células MCF-7 BUS tratadas com nemorosone durante 3 horas e seus controles.....	56
Tabela 5.	Valores médios ± desvio padrão (DP) do <i>Olive Tail Moment</i> (OTM), do <i>Tail Moment</i> (TM) e da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) obtidos pelo ensaio do cometa em células MCF10A tratadas com nemorosone durante 3 horas e seus controles.....	57
Tabela 6.	Valores médios ± desvio padrão (DP) do <i>Olive Tail Moment</i> (OTM), do <i>Tail Moment</i> (TM) e da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) obtidos pelo ensaio do cometa em células MCF-7 BUS tratadas com nemorosone durante 24 horas e seus controles.....	57
Tabela 7.	Valores médios ± desvio padrão (DP) do <i>Olive Tail Moment</i> (OTM), do <i>Tail Moment</i> (TM) da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) e obtidos pelo ensaio do cometa em células MCF10A tratadas com nemorosone durante 24 horas e controles.....	57
Tabela 8.	Valores médios ± desvio padrão (DP), em porcentagem, do número de células MCF-7 BUS distribuídas entre as diferentes fases do ciclo celular após tratamento com diferentes concentrações do nemorosone durante 24 horas	63
Tabela 9.	Aumento ou diminuição na expressão de diferentes genes em células de câncer de mama (MCF-7 BUS) após tratamento com $5 \times 10^{-5} \text{M}$ de nemorosone.....	65
Tabela 10.	Valores de Cts obtidos para cada controle endógeno em cada PCR Array dos controles e testes	66

SUMÁRIO

Resumo	
Abstract	
Lista de abreviaturas	
Lista de Figuras	
Lista de tabelas	
CAPÍTULO I	
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Nemorosone	17
1.2. Mutagênese e Antimutagênese	19
1.3. Genotoxicidade.....	22
1.4. Atividade estrogênica e antiestrogênica.....	23
1.5. Ciclo celular.....	27
1.6. Análise da Expressão Gênica por PCR Array.....	27
2. OBJETIVOS	31
2.1. Geral.....	31
2.2. Específicos.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Nemorosone.....	33
3.2. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade.....	33
3.2.1. Teste de Ames.....	33
3.2.2. Linhagens utilizadas.....	33
3.2.3. Manutenção e estoque das cepas de <i>Salmonella typhimurium</i>	34
3.2.4. Verificação das características genéticas das cepas de <i>S. typhimurium</i>	34
3.2.5. Taxa de reversão espontânea.....	34
3.2.6. Preparo do inóculo de <i>S. typhimurium</i> utilizados no ensaio.....	34
3.2.7. Ensaio de mutagenicidade.....	35
3.2.8. Análise dos resultados.....	36
3.2.9. Ensaio de antimutagenicidade.....	36
3.2.9.1. Teste de viabilidade.....	37
3.3. Linhagens celulares.....	37
3.4. Ensaio de toxicidade para Ensaio do Cometa e E-Screen.....	38
3.4.1. Células MCF-7 BUS.....	38
3.4.2. Células MCF10A.....	39
3.5. Avaliação da genotoxicidade do nemorosone pelo Teste do Cometa.....	40
3.5.1. Análise dos resultados.....	41
3.6. Teste RYA com leveduras recombinantes.....	41
3.6.1. Linhagem e plasmídeos	41
3.6.2. Preparo dos inóculos de <i>S. cerevisiae</i>	42
3.6.3. Ensaio de estrogénicidade e antiestrogénicidade.....	42
3.6.4. Análise dos resultados.....	43
3.7. Teste E-screen com células MCF-7 BUS.....	43
3.7.1. Remoção de estrógenos endógenos do soro fetal bovino.....	44
3.7.2. Análise dos resultados.....	45
3.8. Avaliação do ciclo celular de MCF-7 BUS por citometria de fluxo.....	45
3.8.1. Análise estatística.....	46
3.9. Análise da Expressão gênica por PCR Array.....	46
3.9.1. Extração de RNA	47
3.9.2. Síntese de cDNA.....	48
3.9.3. RT ² Profiler PCR Arrays.....	48

3.9.4.	Análise estatística.....	49
4.	RESULTADOS	52
4.1.	Avaliação da atividade mutagênica do nemorosone pelo Teste de Ames..	52
4.2.	Avaliação da atividade antimutagênica do nemorosone pelo Teste de Ames.....	53
4.3.	Citotoxicidade MCF-7 BUS.....	54
4.4.	Citotoxicidade MCF10A.....	55
4.5.	Ensaio do Cometa.....	56
4.6.	Teste de RYA.....	58
4.6.1.	Ensaio de viabilidade.....	58
4.6.2.	Potencial estrogênico.....	58
4.6.3.	Potencial antiestrogênico.....	59
4.7.	Avaliação da Atividade estrogênica pelo Ensaio de E-Screen.....	60
4.8.	Avaliação da atividade antiestrogênica pelo Ensaio de E-Screen.....	62
4.9.	Avaliação do ciclo celular de MCF-7 BUS, tratadas com nemorosone, por citometria de fluxo.....	62
4.10.	Análise da Expressão Gênica por PCR Array.....	64
5.	DISCUSSÃO	68
5.1.	Mutagênese e antimutagênese.....	68
5.2.	Citotoxicidade e genotoxicidade	70
5.3.	Atividade estrogênica e antiestrogênica	71
5.4.	Ciclo celular e análise da expressão gênica.....	73
6.	CONCLUSÕES	82
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
8.	ANEXOS	97
8.1.	Anexo 1. Tabela de Genes Avaliados na Técnica de PCR Array.....	97
8.2.	Anexo 2. Resultado dos controles de PCR Array para contaminação com DNA genômico e transcriptase reversa.....	100
	CAPÍTULO II	101
	PUBLICAÇÃO REFERENTE AO TRABALHO	102

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Produtos naturais, especialmente plantas medicinais, são fontes de grande importância na descoberta de novas drogas. Estima-se que compostos naturais e seus derivados contribuíram para produção de cerca de um terço dos medicamentos presentes atualmente no mercado (ZHOU *et al.*, 2010).

Os princípios ativos provêm de uma ampla variedade de fontes naturais: vegetais, produtos marinhos ou microrganismos. Existem no Brasil alguns grupos de pesquisa que têm contribuído significativamente para a área da química de produtos naturais, a taxonomia, a farmacologia e outras áreas relacionadas (YUNES *et al.*, 2001).

Diversos agentes antineoplásicos originários de plantas como a vinblastina, vinorelbina, etoposídeo e outros são utilizados como parte de protocolos de tratamento anticâncer (BULANAS e KINGHORN, 2005). Segundo Newman e Cragg (2007), 50% das drogas utilizadas na oncologia atualmente são derivadas de produtos naturais. Nas últimas décadas, muitos estudos têm sido dirigidos à identificação de produtos naturais com propriedades terapêuticas.

Existem aproximadamente 250.000 espécies de vegetais superiores em todo o mundo e, desse total, somente 10% foram biologicamente investigados (CHADWICK e MARSH, 1990). Entre os agentes farmacêuticos descobertos pela extração de produtos naturais de origem vegetal existem drogas comercializadas para diversas enfermidades como a aspirina (analgésico, antiinflamatório), a atropina (dilatador de pupila), o taxol (agente anticâncer), a morfina (analgésico) e a cafeína (estimulante) (ROCHA *et al.*, 2001).

Estima-se que mais de 80% da população mundial utiliza plantas como fonte primária de agentes terapêuticos (BASSO *et al.*, 2005). Algumas das práticas mais comuns envolvem o uso de extratos de plantas que contêm uma ampla diversidade de moléculas, geralmente, com efeitos biológicos desconhecidos (KONAN *et al.*, 2007) e eficácia não comprovada cientificamente (PATEL *et al.*, 2011)

É importante lembrar os riscos intrínsecos relacionados com o consumo desordenado de produtos derivados de plantas e/ou plantas consideradas medicinais. Muitas plantas utilizadas na medicina popular tiveram atividades tóxicas descritas (SANTOS, 2006).

Novas terapias alvo-específicas são necessárias para aumentar a eficácia, reduzir toxicidade e vencer mecanismos de quimiorresistência (SHTIL, 2002). Fitoquímicos possuem boas perspectivas como agentes antitumorais (MATÉS *et al.*, 2011) por apresentarem grande diversidade química e ilimitadas possibilidades de modificações racionais (DIAZ-CARBALLO *et al.*, 2008).

1.1. Nemorosone

Nemorosone (Figura 1) é encontrado em resinas e látex de plantas de diferentes espécies de *Clusia* spp (LOKVAM *et al.*, 2000) e é o constituinte majoritário da resina floral de *Clusia rosea* Jacq. (Figura 2) (CUESTA-RUBIO *et al.*, 2001; POPOLO *et al.*, 2011) e da própolis marrom cubana (CUESTA-RUBIO *et al.*, 2002; CUESTA-RUBIO *et al.*, 2007; PARDO-ANDREU *et al.*, 2011). Essa substância pertence à classe das benzofenonas poli-isopreniladas, um grupo de acilfloroglucinol, o qual é metabólito secundário característico da família *Clusiaceae* (PAGANO *et al.*, 2008).

As atividades antimicrobiana, citotóxica e antioxidante do nemorosone foram relatadas por Cuesta-Rubio *et al* (2001). Essa substância apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra várias linhagens de células tumorais incluindo carcinoma de mama, pulmão, cólon, ovário e fígado (DIAZ-CARBALLO *et al.*, 2003; POPOLO *et al.*, 2011). Os valores dos IC₅₀ desse composto contra diversas linhagens celulares de câncer puderam ser comparados aos da doxorubicina (PICCINELLI *et al.*, 2009). É esperado que compostos que induzem apoptose e têm como alvo células tumorais, sejam drogas antitumorais ideais, pois a morte celular por apoptose, ao contrário da morte por necrose não induz uma resposta inflamatória. Em concentrações abaixo de 5 µM (2,5µg/mL) o nemorosone induz a fragmentação do DNA em células de neuroblastoma, uma típica característica de apoptose, dose dependente. Além disso, essa benzofenona induziu inibição da fase



Figura 2. Flor de *Clusia rósea*
http://www.gardenworld.in/df7c08421_Balsam-apple.html

1.2. Mutagênese e antimutagênese

A mutação pode ser definida como qualquer mudança na seqüência de nucleotídeos ou arranjo do DNA e é classificada em mutações genômicas (afetam o número de cromossomos na célula), mutações cromossômicas (alteram a estrutura de cromossomos individuais) e mutações gênicas (alteram genes individuais) (NUSSBAUM *et al.*, 2002).

As mutações despertam grandes interesses por estarem diretamente relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças degenerativas, tais como câncer e arteriosclerose (DE FLORA, 1998; SEO *et al.*, 2000, SANTOS *et al.*, 2008). O desenvolvimento de cânceres ocorre, muitas vezes, como consequência de mutações sucessivas e expansão do clone mutante. Mutações que inativam genes supressores de tumor ativam proto-oncogenes e telomerasas, estimulam a proliferação e inibem a morte celular, fornecem um grande estímulo na iniciação de um câncer (HAHN e WEINBERG, 2002). Mutações do tipo substituição e deleção de bases são encontradas nesses genes, numa grande variedade de tipos de câncer (GREENBLATT *et al.*, 1994).

Estamos constantemente em contato com agentes mutagênicos, entre eles a radiação solar, poluentes presentes no ar e na água ou mesmo elementos presentes em nossa dieta (SANTOS, 2006). Esses agentes induzem diferentes tipos de lesões no DNA da célula, as quais podem não ser reparadas ou reparados erroneamente. Lesões reparadas erroneamente levam a efeitos biológicos

tais como morte celular, aberrações cromossômicas, mutações, entre outras (NATARAJAN e PALITTI, 2008).

Há muitos anos plantas medicinais tradicionais têm sido usadas contra diversas doenças, incluindo câncer e provaram ser eficientes na cura dos indivíduos que a consomem (VERSCHAEVE e VAN STADEN, 2008). É importante lembrar que a maioria dessas plantas nunca foi submetida a exaustivos testes de toxicidade, os quais são requeridos para compostos farmacêuticos modernos. Baseado no uso tradicional por longos períodos de tempo essas plantas assumiram a característica de serem seguras. (CARDOSO *et al.*, 2006; DÉCIGA-CAMPOS *et al.*, 2007) Porém, pesquisas têm mostrado que várias espécies possuem atividades mutagênica (SANTOS *et al.*, 2011) ou tóxica *in vitro* e propriedades carcinogênicas (DE SÁ FERREIRA e FERRÃO VARGAS, 1999).

A epidemiologia humana e estudos animais têm indicado que riscos de desenvolver câncer podem ser modificados através de mudanças nos hábitos alimentares. A ingestão de antimutagênicos de origem natural e anticarcinogênicos podem inibir um ou mais estágios do processo de carcinogênese e prevenir ou inibir a formação do câncer. Por essa razão, existem grandes perspectivas em relação à aplicação na saúde humana de espécies de plantas que possuem propriedades antimutagênicas (CHEN *et al.*, 2011). Nos últimos anos foi crescente o interesse em antimutagênese de compostos extraídos de plantas (SKANDRANI *et al.*, 2008).

Agentes antimutagênicos têm a capacidade de prevenir a intervenção de um mutágeno com DNA amenizando os efeitos causados (NAMIKI, 1990; FIORIO, 1994). Existem duas categorias de agentes antimutagênicos: os desmutagênicos que promovem a alteração química ou bioquímica dos agentes mutagênicos antes que danifiquem o DNA; e os bioantimutagênicos que suprimem o processo de fixação da mutação, após o DNA ser lesado pelo agente mutagênico (LIVIERO e von BORSTEL, 1996).

A prevenção do desenvolvimento do câncer, através de substâncias químicas que funcionem como agentes antimutagênicos e que tenham a capacidade de interagir com compostos mutagênicos

ou seus metabólitos a fim de reduzir os seus efeitos, é uma alternativa promissora, chamada quimioprevenção (ROY *et al.*, 2003).

Produtos naturais derivados de plantas são frequentemente relatados como agentes quimioeventivos eficientes. Antigenotoxicidade e atividade antioxidante são consideradas cruciais na prevenção de algumas doenças degenerativas (WOZNIAK *et al.*, 2010). Por exemplo, a formação de radicais livres é amplamente investigada como fator de iniciação do câncer e, substâncias que tenham a capacidade de impedir a formação destes radicais livres, são de interesse médico e industrial. As fontes pesquisadas são as mais variadas possíveis: frutos, folhas, caules, raízes dos vegetais, fungos como cogumelos que são utilizados na medicina popular (LAKASHMI *et al.*, 2003).

Plantas que possuem propriedades mutagênicas devem ser consideradas potencialmente prejudiciais à saúde por induzir lesões ao DNA. Plantas com atividades antimutagênicas, por outro lado, podem ser consideradas interessantes para o uso na terapêutica e suas atividades farmacológicas devem ser melhor investigadas (VERSCHAEVE e VAN STADEN, 2008; CHEN *et al.*, 2011).

A avaliação da mutagenicidade pode ser realizada nos diferentes passos de interação do agente mutagênico com o DNA ou de seus efeitos (SANTOS, 2006). Vários ensaios que detectam componentes genotóxicos permitem identificar substâncias com risco potencial à saúde humana.

O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, também conhecido como *Salmonella*/microssomo, ou Teste de Ames, é uma das metodologias mais utilizadas atualmente para identificar mutágenos entre substâncias puras, misturas complexas e amostras ambientais (VARELLA *et al.*, 2004), sendo validado em larga escala por diversos laboratórios (MORTELMANS e ZEIGER, 2000; RIBEIRO *et al.*, 2004).

O teste de Ames caracteriza-se pela utilização de linhagens indicadoras de *Salmonella typhimurium* sensíveis a substâncias capazes de induzir diferentes tipos de mutação. Na presença de agentes mutagênicos, estas linhagens reverterem seu caráter de auxotrofia para a síntese de histidina e

passam a formar colônias em meio desprovido desse aminoácido. Desta forma, através da contagem de colônias por placa, é possível estabelecer a ação mutagênica e/ou antimutagênica de um composto em função de sua concentração (ZEIGER, 2001).

Cada tipo de linhagem bacteriana apresenta diferentes mutações no *operon* histidina, o que permite diferenciar mecanismos de ação. As mutações podem ser substituições de bases ou do tipo *frameshift* (AMES, 1983; MORTELMANS e ZEIGER, 2000). Para identificar agentes mutagênicos de ação indireta adiciona-se às culturas durante os ensaios a chamada fração S9, que contém enzimas de metabolização de xenobióticos e é obtida a partir do fígado de ratos. Todas essas características conferem ao Teste de Ames uma grande capacidade de identificação e caracterização de diferentes agentes mutagênicos e/ou antimutagênicos, com grande eficiência e sensibilidade (SANTOS, 2006).

1.3. Genotoxicidade

Para se conhecer o potencial genotóxico e antigenotóxico de um determinado composto, existem testes de genotoxicidade bem definidos e internacionalmente reconhecidos pelas agências reguladoras como parte da bateria de testes recomendada para o registro de novos produtos que entram no mercado mundial (HAYASHI *et al.*, 2000).

O ensaio do cometa é amplamente usado para detecção de danos ao DNA e reparo em células e tecidos de animais e plantas (MOLLER *et al.*, 2010). O princípio básico deste teste é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas (KNASMUELLER, 2011). Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (a região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migram em direção ao pólo positivo (HARTMANN *et al.*, 2003).

O teste tem sido muito utilizado na identificação de agentes com atividades genotóxicas. A versão alcalina (pH > 13) pode ser usada para detectar danos no DNA (TICE *et al.*, 2000; WITTE *et al.*, 2007, LIAO *et al.*, 2009) do tipo quebras de fita, sítios alcali lábeis (ALS – *alkalib-labile sites*)

e ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína. Ao contrário das outras alterações, essas ligações podem diminuir a migração do DNA, e são detectadas quando há uma diminuição na migração em relação ao controle negativo. Os aumentos nas taxas de migração em relação ao controle indicam quebras de fita e/ou ALS (PFUHLER e WOLF, 1996; MERK e SPEIT, 1999; BURLINSON *et al.*, 2007).

Este teste, em condições especiais *in vitro*, pode ser usado para a detecção de células em apoptose. As células em fases finais do processo de morte celular por apoptose apresentam formas características com mais de 90% do DNA na cauda e pouquíssimo ou nenhum DNA detectável na cabeça do cometa (GONTIJO e TICE, 2003).

O ensaio do cometa é um ótimo método para detectar danos de genotoxicidade, mostrando sensibilidade, rapidez e custo eficaz (TICE, 2000).

1.4. Atividade estrogênica e antiestrogênica

Fitoestrógenos são compostos produzidos naturalmente pelas plantas, capazes de mimetizar o hormônio humano 17- β estradiol (SETCHELL, 2001; KO, 2010). Esses compostos podem interferir com a ação do hormônio interagindo com receptores estrogênicos ou modulando concentrações de estrógeno endógeno (MATSUMURA, 2005).

Segundo os estudos de Mosselmann *et al.* (1996), são vários os fatores que determinam a ação biológica de um estrogênio, como a afinidade do hormônio pelo receptor, diferenças na expressão dos receptores nos tecidos-alvo, alterações da conformação do complexo hormônio-receptor e diferenças de expressão de proteínas de adaptação e fosforilação.

Existem diferenças biológicas entre os mecanismos de ação dos fitoestrogênios, dos estrógenos naturais e dos sintéticos. Os estrógenos naturais são potentes, facilmente metabolizados pelo fígado, têm meia-vida curta e não se acumulam nos tecidos. Os fitoestrogênios são pouco potentes, têm meia-vida mais longa e tendem a se acumular na gordura e nos tecidos (MOSQUETE *et al.*, 2005).

A atividade biológica de um estrógeno se dá pela ocupação do complexo hormônio-receptor no núcleo celular. A variação da potência de ação está relacionada aos níveis plasmáticos e à retenção do complexo no núcleo, diferenciando os estrógenos mais fracos dos mais potentes (MOSELNANN *et al.*, 1996; SPEROFF e FRITZ, 2005). Os fitoestrogênios podem exercer efeitos estrogênicos ou antiestrogênicos, dependendo da dose, ao se aderirem aos receptores hormonais (ROBERTS, 2010) (Figura 3).

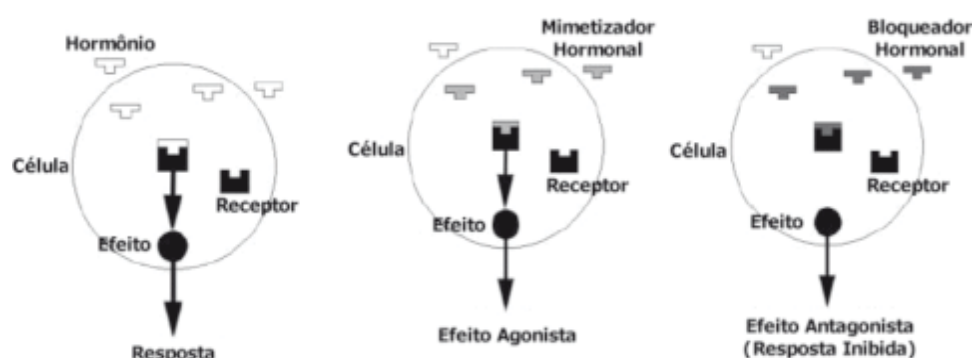


Figura 3. Tipos de respostas endócrinas: a) resposta natural; b) efeito agonista; c) efeito antagonista

Pesquisas *in vitro* e *in vivo* mostraram evidências da potencial influência de fitoestrógenos sobre estados de regulação de hormônios e indicam que dietas à base de vegetais podem explicar a variação epidemiológica de muitas doenças dependentes de hormônio (ADLERCREUTZ e MAZUR, 1997). É reconhecido que o aumento da incidência de câncer de mama e testículos em humanos pode ser causado por interferentes endócrinos que atuam como estrógeno (SAFE, 2005).

Os possíveis riscos e benefícios associados ao consumo de plantas que possuem atividades estrogênicas levam a necessidade de se caracterizar o potencial estrogênico de vegetais e sementes comumente presentes na dieta ou usados como plantas medicinais (AGRADI *et al.*, 2002).

Vários compostos químicos naturais e sintéticos identificados têm demonstrado induzir respostas dependentes de estrógeno, incluindo produtos farmacêuticos, pesticidas, produtos químicos industriais e metais pesados (GIESY *et al.*, 2002, SOTO *et al.*, 2009).

Diversos ensaios *in vitro* foram desenvolvidos para investigar o potencial estrogênico de um grande número de substâncias, investigando diferentes etapas do mecanismo de ação proposto para esses hormônios. A maioria desses ensaios está classificada dentro de uma das três categorias: a) ensaios de ligação competitiva ao receptor de estrógenos, que verificam a afinidade de ligação de um composto químico ao receptor estrogênico; b) ensaios de informação gênica, que determinam se a transcrição e tradução gênica são dependentes da interação do receptor de estrógenos com seu ligante; e c) ensaios de proliferação celular, que avaliam o aumento do número de células alvo, durante a fase exponencial de proliferação. Assim, esses ensaios atuam em diferentes níveis de complexidade biológica na resposta celular aos estrogénos (FANG *et al.*, 2000).

Atualmente, o uso de medicamentos que possuem atividade antiestrogênica são utilizados afim de evitar o desenvolvimento do câncer hormônio dependente. Esses compostos podem bloquear a ligação dos estrogênios aos seus receptores no epitélio mamário, inibir seletivamente os receptores de estrógeno ou agirem como inibidores da aromatase (enzima implicada na formação do 17 β -estradiol e seus precursores). Essas ações constituem uma estratégia para a prevenção do câncer de mama. Entre esses fármacos, destacam-se os fitoestrogênios como soja, grão de bico, alfafa, entre outros (ROSA LIMA, 2006; GOBBI *et al.*, 2007, EDEN, 2012).

Vários ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos para identificar e avaliar substâncias que mimetizam a ação do estrógeno natural 17- β estradiol (BAKER, 2001). Para a avaliação do potencial estrogênico utilizou-se o ensaio com leveduras recombinantes (RYA) e o ensaio do E-screen que avaliam a presença de substâncias capazes de interferir no funcionamento normal do sistema endócrino, os interferentes endócrinos (GARCIA-REYERO *et al.*, 2005, SOTO *et al.*, 1995).

O teste RYA é um dos mais empregados para avaliar o potencial estrogênico de substâncias ou amostras ambientais. Esse ensaio inclui a utilização de células de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) geneticamente modificadas expressando um sensor, o receptor de estrógeno humano (HE0), e um repórter, contendo o elemento responsivo de estrógeno (ERE2) do gene da

vitelogenina B1 de *Xenopus laevis*, o qual promove a expressão da β -galactosidase pela ativação do gene lacZ (GARCIA-REYERO *et al.*, 2005). Esta enzima hidrolisa lactose, glicose e galactose. Quando as células modificadas de leveduras são expostas ao estrógeno, este se liga ao receptor de estrógeno e, então, o gene lacZ é ativado e produz β -galactosidase. Isso permite que a levedura utilize lactose como substrato. Neste teste é utilizado como substrato 4-metilumbeliferona β -D-galactopiranosídeo (MuGal). A hidrólise deste substrato promove a formação de um produto fluorescente, 4-metilumbeliferona, o qual é medido em espectrofotômetro (355nm de excitação e 460nm de emissão) (Figura 4). Uma curva dose-resposta relacionando a atividade da enzima β -galactosidase com a concentração de estradiol é usada para atribuir um valor estradiol-equivalente.

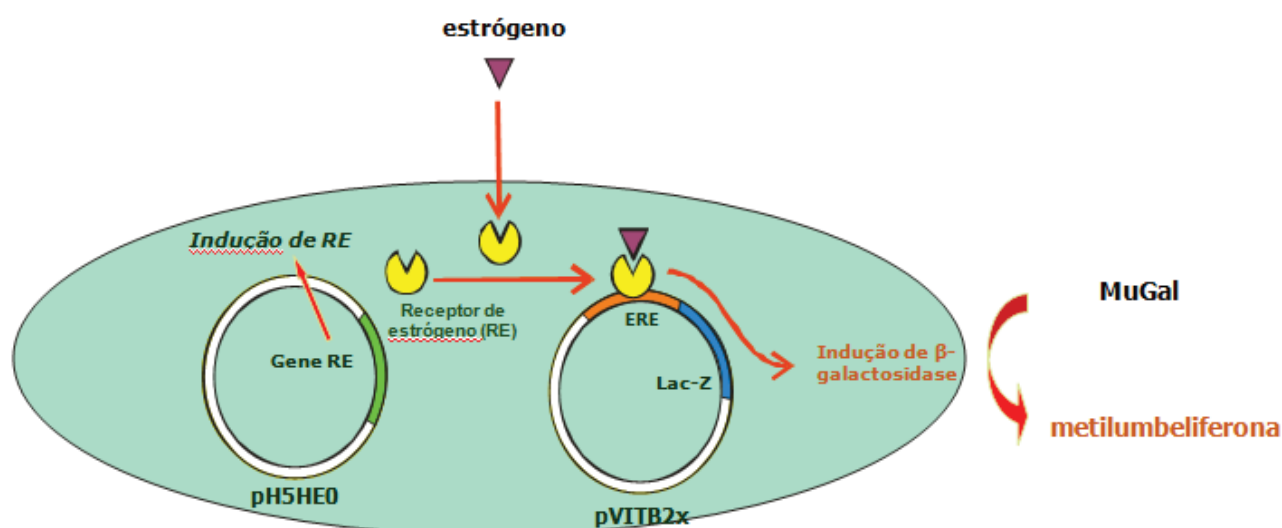


Figura 4. Mecanismo de ação exercido pelo RYA

O ensaio E-Screen explora o princípio de que células humanas de câncer de mama MCF-7 proliferam na presença de substâncias químicas que ativam receptores estrogênicos direta ou indiretamente (SOTO *et al.*, 1995; SPINK *et al.*, 2006). Este teste quantitativo, compara o crescimento celular entre culturas de MCF-7 tratadas com 17 β -estradiol e culturas tratadas com diferentes concentrações da substância suspeita de apresentar atividade estrogênica (SOTO *et al.*, 1995).

1.5. Ciclo celular

O ciclo celular é o fenômeno básico de manutenção do número de células de um organismo/tecido e corresponde à série de acontecimentos e alterações compreendidas entre uma mitose e outra (BERCKMANS *et al.*, 2009). O ciclo da divisão celular é coordenado e regulado por meio de eventos em que as células duplicam seu material genético e, posteriormente, entram em divisão (SCHAEFER, 1998).

O ciclo celular divide-se em fases que apresentam funções e tempos de duração distintos. O processo de divisão nuclear e a separação das células filhas ocorrem na mitose (fase M); o período entre uma mitose e outra é denominado Interfase. A replicação do DNA nuclear ocorre somente na fase S (período de síntese). O intervalo entre o término da mitose e o começo da síntese de DNA é chamado de fase G1, e o intervalo entre o final da síntese de DNA e o início da mitose é a fase G2: essas fases propiciam um tempo adicional para o crescimento celular (ALBERTS *et al.*, 1997; MORGAN *et al.*, 2007).

A perda da regulação normal do ciclo celular é uma característica de cânceres humanos e, normalmente, envolve falhas nos pontos de checagem do processo de divisão celular (NEBERT, 2012). A citometria de fluxo é a metodologia de escolha para avaliar o ciclo celular. Esse ensaio estima o conteúdo de DNA de células individuais ou de grandes populações de forma rápida e precisa, revelando a distribuição de células em cada fase específica do ciclo celular. As fases do ciclo celular são determinadas pela caracterização do conteúdo de DNA nuclear ligado ao iodeto de propídio (DARZYNKIEWICZ *et al.*, 2010).

1.6. Análise da Expressão Gênica por PCR Array

O rápido avanço das pesquisas em genética e biologia molecular, consequência do atual progresso das tecnologias empregadas nessas áreas, exige que técnicas mais avançadas sejam incorporadas aos testes clássicos de citogenética para melhor compreensão de como os compostos interagem com o DNA (GARCIA-CAÑAS *et al.*, 2010).

A análise da expressão gênica global pode ser realizada com o uso da técnica de *microarray* enquanto a expressão de genes individuais é frequentemente avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR) quantitativa em tempo real (GOHIL e CHAKRABORTY, 2004).

Os *microarrays* de DNA são coleções de oligonucleotídeos, segmentos de DNA fita única (denominadas sondas), geralmente anexados a uma lâmina de vidro em locais pré-definidos, representando milhares de genes. São utilizadas duas amostras de RNA em situações distintas, um controle e a amostra. Após a extração do RNA mensageiro e confecção do DNA complementar (cDNA), as amostras de cDNA são diferencialmente marcadas com compostos fluorescentes, geralmente as cianinas CY3 e CY5. Este cDNA marcado é, então, desnaturado por aquecimento e hibridado com os oligonucleotídeos na lâmina de *microarray* e um *scanner* especial realiza a leitura da intensidade da fluorescência nos comprimentos de onda referente aos 2 compostos fluorescentes utilizados. As imagens digitalizadas são analisadas por um *software* específico que irá converter a cor e a intensidade da fluorescência em um conjunto de valores numéricos (STORHOFF *et al.*, 2004). A análise da vasta quantidade de dados de *microarrays* é uma tarefa árdua e os resultados positivos encontrados devem ser validados pela técnica de PCR em tempo real.

O sistema “RT² Profiler PCR Array” representa a união da RT-qPCR Syber Green (no qual fluoróforos se ligam à fita-dupla de DNA, emitindo fluorescência) com a capacidade de avaliação de múltiplos genes do *microarray* podendo ser aplicado em estudos de toxicologia, oncologia, imunologia, entre outros. Neste sistema, dezenas a centenas de genes de vias metabólicas específicas podem ser avaliadas simultaneamente sem a necessidade da validação exigida pela técnica do *microarray*. PCR Arrays estão disponíveis para várias vias metabólicas, entre elas, apoptose, transdução de sinais, câncer, e genes de resposta ao stress oxidativo (BALUCHAMY *et al.*, 2010; SERPELONI, 2011).

O nemorosone apresenta atividade citotóxica para diferentes linhagens de câncer e é uma substância seletiva, ou seja, possui baixa citotoxicidade para células não-tumorais. Além disso, foi

observado que essa benzofenona induz a apoptose, característica de grande importância para os antitumorais ideais. Essa substância exerceu atividade citotóxica sobre linhagens humanas de células de câncer resistentes a diversas drogas citostáticas. Com isso, acredita-se que o nemorosone possa ser utilizado no futuro em terapias anticâncer de primeira e segunda linha.

Porém, produtos naturais podem ser lesivos ao DNA ou atuarem como interferentes endócrinos. Esses alteradores ou interferentes endócrinos são substâncias que, mesmo em concentrações extremamente baixas, são capazes de alterar o funcionamento natural do sistema endócrino podendo causar diversas anormalidades, entre elas câncer de testículo, mama e próstata.

Devido a esses fatores e visando a caracterização biológica do nemorosone, tornou-se relevante avaliar o seu potencial genotóxico, mutagênico, antimutagênico, estrogênico, antiestrogênico e seus efeitos sobre o ciclo celular.

Além disso, ensaios para avaliação da expressão gênica poderão contribuir para a identificação de possíveis mecanismos de ação e encorajar a realização de outras investigações, a fim de permitir sua recomendação como agente medicinal.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente trabalho tem por objetivo caracterizar o potencial mutagênico, genotóxico e estrogênico do nemorosone e possíveis alterações que esse composto possa induzir sobre o ciclo de células cancerígenas. Além disso, quantificar a expressão de diferentes genes que possam apresentar caráter pró-apoptótico, regulador do ciclo celular, promotor de reparo do DNA, indutor de angiogênese, entre outros, através da técnica de PCR Array.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade mutagênica do nemorosone através de ensaios de mutação gênica reversa usando as linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 e a atividade antimutagênica utilizando as linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*, com e sem ativação metabólica pela fração S9.
- Avaliar citotoxicidade do nemorosone frente às linhagens celulares MCF-7 BUS e MCF10A
- Avaliar o potencial genotóxico do nemorosone *in vitro* usando células tumorais MCF-7 BUS e MCF10A, tratadas durante 3 e 24 horas, por meio do teste do Cometa
- Avaliar a atividade estrogênica e antiestrogênica do nemorosone utilizando o modelo experimental com leveduras recombinantes (RYA) e o teste E-Screen com células MCF-7 BUS sensíveis a estrógenos.
- Avaliar, através de citometria de fluxo, alterações sobre o ciclo das células MCF-7 BUS induzidas pelo nemorosone
- Quantificar a expressão de 84 genes, em nível de RNAm, ligados as vias de ciclo celular, apoptose, receptores esteroidais, entre outras, através da técnica de PCR Array utilizando células tumorais (MCF-7 BUS)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Nemorosone

Flores de *Clusia rosea* Jacq., Clusiaceae, foram coletadas em Havana (Cuba) e identificadas pelo Dr. Victor Fuentes Fiallo. Nemorosone foi extraído da resina floral de *C. rosea* e isolado como previamente reportado por Cuesta-Rubio *et al.*, (2001). Primeiramente, nemorosone foi cristalizado da resina floral de *Clusia rosea* empregando-se a mistura EtOH-H₂O. O produto foi submetido à cromatografia líquida à vácuo (CLV) em sílica gel com C₆H₁₂-EtOAc para purificação e homogeneização. O composto foi identificado através de ressonância magnética nuclear (RMN) e sua pureza foi verificada por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de diodos (HPLC-DAD) e Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (HPLC-MS).

O nemorosone foi fornecido pelo Dr. Osmany Cuesta-Rubio Professor Titular do Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana (Cuba) com quem mantivemos uma colaboração de trabalho.

3.2. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade

3.2.1. Teste de Ames

3.2.2. Linhagens utilizadas

As linhagens TA97a TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, empregadas neste trabalho foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames, da Universidade Berkeley, Califórnia, USA. A cepa TA98 apresenta mutação no gene *his D* (*hisD3052*) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para a reversão oito resíduos repetitivos de GC, e detecta compostos mutagênicos que deslocam o quadro de leitura do DNA (*frameshift*). A mutação *hisG46* presente na cepa TA100 ocorre através da substituição do códon selvagem GGG (CCC) – prolina – por GAG (CTC) – leucina. Assim, essa cepa detecta agentes mutagênicos que ocasionam substituições, principalmente neste par G-C. A cepa TA102 contém a mutação ochre TAA no gene *hisG* e detecta eficientemente mutágenos como formoldeído, glioxal,

vários hidroperóxidos, bleomicina, fenilidrazina, raios-X, luz UV, estreptonigrina e agentes *cross-link*, como mitomicina-C. A cepa TA97a também detecta mutágenos do tipo *frameshift* e apresenta mutação no gene *hisD 6610* e são alvos para mutação os resíduos GC (MARON e AMES, 1983).

3.2.3 Manutenção e estoque das cepas de *Salmonella typhimurium*

As cepas de *S. typhimurium* ficaram estocadas em tubos para congelamento (1,5mL), e mantidas à -70° C para que se mantivessem inalteradas todas as suas características genéticas. Para cada 0,9mL de cultura, foi adicionado 0,1mL de dimetilsulfóxido (DMSO) que é um crioprotetor.

3.2.4. Verificação das características genéticas das cepas de *S. typhimurium*

As características genéticas das cepas de *S. typhimurium* foram checadas rotineiramente, antes do preparo dos estoques para congelamento. A dependência da histidina, presença de mutação *rfa*, presença de deleção *uvrB* e a presença de plasmídios de resistência também foram verificadas.

3.2.5. Taxa de reversão espontânea

A reversão espontânea das cepas-teste para independência à histidina foi medida rotineiramente sendo que a frequência de reversão é característica para cada cepa. As colônias revertentes prototróficas para a histidina, são facilmente visíveis em placas de ágar mínimo glicosado com traços de histidina e biotina, em contraste com as colônias auxotróficas, que formaram uma fina camada de crescimento bacteriano (“background”).

3.2.6. Preparo do inóculo de *S. typhimurium* utilizados no ensaio

Semeou-se com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade do crescimento da cultura em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid n. 2). Incubou-se a 37° C por 14 horas em banho-maria com agitação (160 rpm) de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL. Após

crescimento manteve-se a cultura sob refrigeração durante o período que a mesma não estava sendo utilizada.

3.2.7. Ensaio de mutagenicidade

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), o nemorosone em concentrações de 0,005, 0,01, 0,02 e 0,03 mg/placa foi misturado a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4, 0,1 ml de cultura de bactérias e incubadas de 20-30 minutos a 37°C. Nos ensaios com ativação metabólica, foram adicionados, em substituição ao tampão fosfato, 0,5 mL da mistura S9. Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de “top ágar” (agar de superfície), contendo traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados a mistura presente nos tubos. O conteúdo de cada tubo, assim composto, foi levemente homogeneizado em vórtex e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “top-ágar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Ao término desse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os controles positivos utilizados nos ensaios sem ativação metabólica foram: 4-nitro-*o*-fenilenodiamino (NPD)(10µg/placa) para linhagens TA97a e TA98, azida sódica (2,5µg/placa) para a linhagem TA100 e daunomicina (3µg/placa) para a linhagem TA102. Nos ensaios com ativação metabólica foi empregado o composto 2-antramino (2-ANTR)(0,63µg/placa) para as linhagens TA97a, TA98 e TA100 e 2-aminofluoreno (10µg/placa) para a linhagem TA102. Os controles negativos foram feitos com o solvente da amostra, ou seja, com o DMSO.

3.2.8. Análise dos resultados

Forma de análise dos resultados

Os dados da mutagenicidade foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myres do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA, por intermédio da Dra Maria Inês Inato (CETESB). Esse programa permite avaliar o

efeito dose-resposta através do cálculo da análise de variância (ANOVA-teste F) entre as médias do número de revertentes nas diferentes doses testadas e o controle negativo, seguido de uma regressão linear. O modelo do programa escolhido para a análise dos dados foi o de Bernstein *et al.* (1982).

A partir dos resultados obtidos, foi também calculada a razão de mutagenicidade (RM) pra cada dose analisada, que é a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos mais induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo. A amostra foi considerada positiva quando a RM foi maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas e quando houve uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos.

3.2.9. Ensaios de antimutagenicidade

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* e também foi empregada a metodologia de pré-incubação em placas, desenvolvida por Maron e Ames (1983) sendo que, neste ensaio diferentes concentrações do nemorosone foram misturadas a 0,1mL de cultura de bactérias e um agente mutagênico (10µg/placa de 4-nitro-*o*-fenilenodiamino para TA98, 0,5 µg/placa de aflatoxina para TA100 e 0,5 µg/placa de mitomicina C para TA102). Em seguida o conteúdo de cada tubo assim composto foi levado a estufa a 37°C por um período de 20-30 minutos.

Decorrido este tempo, a essa mistura foram adicionados 2mL de ágar superfície (“top agar”) suplementado com traços de histidina e biotina, depois foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “top-agar”, as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C. Após esse tempo procedeu-se a contagem do número de colônias revertentes por placa. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

O cálculo da porcentagem da inibição da mutagenicidade foi realizado de acordo com Tachino *et al.* (1994) onde:

$$\text{Inibição} = 1 - \frac{\text{revertentes induzidos/placa (com inibidor)}}{\text{revertentes induzidos por placa (sem inibidor)}} \times 100$$

A ausência do efeito antimutagênico foi considerada quando um valor inferior a 25% foi obtido; um efeito moderado quando um valor entre 25 e 40% foi obtido; forte antimutagenicidade em valores superiores a 40% (NEIGI *et al.*, 2003; LIRA *et al.*, 2008).

3.2.9.1. Teste de viabilidade

O teste de viabilidade foi aplicado para todas as concentrações de nemorosone utilizadas nos ensaios de antimutagenicidade.

Para o desenvolvimento do teste de viabilidade procedeu-se da mesma maneira para o método de pré-incubação em placas, ou seja, misturou-se num tubo de ensaio o mutágeno a ser utilizado no ensaio, a bactéria, o tampão (ou S9) e a amostra a ser testada. Após homogeneizar em vórtex, ao conteúdo de cada tubo foi adicionado em tubos com 900µL de solução fisiológica estéril a fim de se obter uma diluição de 1:10 e em seguida homogeneizado e 100µL transferido para outro tubo com mesma quantidade de solução fisiológica e este procedimento foi repetido até obter-se uma diluição de 10^{-5} . Do tubo contendo a diluição de 10^{-5} retirou-se 0,1mL e semeou-se com alça de Drigalsky em placas com ágar nutriente, em seguida encubou-se por 24h a 37°C. Decorrido este período, as colônias foram contadas e calculadas as unidades formadoras de colônias/mL (UFC= diluição X número de colônias X 10). O percentual de viabilidade para cada tratamento foi comparado com o número de colônias do controle negativo (bactéria e DMSO).

De acordo com Vargas *et al.* (1993) foram consideradas citotóxicas as amostras que apresentaram um percentual de viabilidade menor que 60%.

3.3. Linhagens celulares

- Células MCF-7 BUS

A linhagem MCF-7 BUS foi gentilmente cedida pela Dra. Marieta Fernandez da Universidade de Granada-Espanha, é derivada de câncer de mama humano e responsiva a

estrógeno. A linhagem MCF-7 BUS encontra-se estocada em nitrogênio líquido (-195°C), em alíquotas de 1×10^6 células/mL em uma solução de congelamento composta 50% de meio de cultura (DMEM, Sigma-Aldrich), 40% de soro bovino fetal (Gibco) e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich).

- Células MCF10A

A linhagem MCF10A consiste em células de mama humana normais e foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani do Laboratório de Oncologia do Departamento de Radiologia da Faculdade de Medicina da USP. Esta linhagem encontram-se estocada em nitrogênio líquido (-195°C), em alíquotas de 1×10^6 células/mL em uma solução de congelamento composta por 95% de soro de cavalo e 5% de DMSO (Sigma-Aldrich).

3.4. Ensaios de toxicidade para Ensaio do Cometa e E-Screen

3.4.1. Células MCF-7 BUS

Foram transferidos 500µL de uma suspensão de 4×10^4 células/mL para microplacas de 24 orifícios. Após 24 horas de aderência o meio de cultura foi removido e adicionados os controles e nemorosone nas concentrações 10^{-9} M a 10^{-5} M, diluídos em 500 µL de meio de manutenção (OH e CHUNG, 2004).

O controle positivo dos ensaios foi feito com DMSO 30%, em meio de cultura. O controle negativo foi feito com meio de cultura de manutenção e considerado como 100% de viabilidade celular. As substâncias testadas foram diluídas em DMSO 0,25% a partir do qual foi realizado um controle de solvente.

A viabilidade celular foi avaliada após 24 e 144 horas (6 dias) de tratamento, usando o ensaio colorimétrico da sulforodamina B (SKEHAN *et al.*, 1990, RASMUSSEN e NIELSEN, 2002), corante que se liga a aminoácidos básicos das proteínas celulares e, por avaliação colorimétrica, fornece uma estimativa da massa protéica total, que é relacionada ao número de

células vivas que foram fixadas. Após 24h e 6 dias, as células foram fixadas com ácido tricloroacético 10% e incubadas a 4 °C por 30 minutos, lavadas com água de torneira gelada e tratadas com 500 µL de uma solução de sulforodamina a 0,4% em ácido acético 1%, incubando-se por 30 minutos a 4 °C na ausência de luz. Após lavagem com ácido acético 1% (cinco vezes), a placa foi deixada em repouso, em temperatura ambiente, para secagem. O corante ligado às células foi solubilizado com 200 µL de Tris base 10 mM (pH = 10,5) por agitação durante 20 minutos. Finalmente, alíquotas de 100 µL foram transferidas para uma microplaca de 96 orifícios e a intensidade do corante foi lida no leitor de microplacas Synergy™ H1, Biotec, em 492 nm.

Foram consideradas citotóxicas as concentrações das amostras que promoveram viabilidade celular inferior a 80%.

3.4.2. Células MCF10A

Foram transferidos 50µL de uma suspensão de 4×10^4 células/mL para microplacas de 96 orifícios. Após 24 horas de aderência o meio de cultura foi removido e adicionados os controles e nemorosone nas concentrações 10^{-9} M a 10^{-5} M, diluídos em 100 µL de meio de manutenção (OH e CHUNG, 2004).

O controle positivo dos ensaios foi feito com DMSO 30%, em meio de cultura. O controle negativo foi feito com meio de cultura de manutenção e considerado como 100% de viabilidade celular. As substâncias testadas foram diluídas em DMSO 0,25% a partir do qual foi realizado um controle de solvente.

A viabilidade celular foi avaliada após 24 horas, usando o ensaio colorimétrico da sulforodamina B, descrito acima (SKEHAN *et al.*, 1990, RASMUSSEN e NIELSEN, 2002).

A citotoxicidade foi realizada somente por 24 horas, pois, essa linhagem celular não foi utilizada nos Ensaio de E-Screen, onde as células são tratadas por 144 horas para avaliação de proliferação.

3.5. Avaliação da genotoxicidade do nemorosone pelo Teste do Cometa

O teste para a análise de danos no DNA foi realizada de acordo com protocolo proposto por Tice *et al.* (2000) e Singh *et al.* (1988) com algumas modificações. Foram utilizadas-se as linhagens MCF-7 BUS e MCF10A.

Foram transferidos 500µL de uma suspensão de 4×10^4 células/mL de cada linhagem celular para microplacas de 24 orifícios. Após 3 e 24h o meio de cultura completo foi substituído por meio de cultura sem soro adicionado de nemorosone nas concentrações de 10^{-9} M a 10^{-5} M, que foram determinadas em experimentos preliminares de citotoxicidade. Além disso, foram utilizados controle de meio, controle de solvente (0,25% de DMSO) e controle positivo (metil metanosulfonato 2 µM por 3 horas).

Após os tratamentos de 3 e 24 horas as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas, centrifugadas e misturadas com 100µL de agarose de baixo ponto de fusão (0,25%), esse volume foi transferido para lâminas previamente cobertas com uma camada de agarose de ponto de fusão normal (1,5%). O material foi coberto com uma lamínula (24x60mm) e deixado a 4°C por 5 minutos. Após esse período, a lamínula foi retirada e as lâminas mergulhadas em solução de lise recém preparada a 4°C (NaCl 2,5 M, EDTA 100mM, Tris 10mM, Triton X-100 1% e DMSO 10%, pH10,0) por 24h na geladeira. Após a lise, as lâminas foram imersas em uma solução alcalina (NaOH 300mM e EDTA 1mM, pH 13,0) por 20 minutos a 4°C na cuba de eletroforese. Transcorrido este tempo as mesmas foram submetidas a uma corrente elétrica de 25V e 300mA por 20 minutos a 4°C.

Após a eletroforese, as lâminas foram lavadas em solução de neutralização (Tris 0,4M, pH 7,5) por 15 minutos, secas à temperatura ambiente e fixadas em etanol absoluto por 5 minutos. Todas as lâminas foram confeccionadas em triplicata e armazenadas em geladeira até o momento da análise.

3.5.1. Análise dos resultados

A análise das lâminas foi realizada após coloração com brometo de etídio (20µg/mL), em microscópio de fluorescência (OLYMPUS® XM10) usando emissão de 590nm e objetiva de 40X. Foram capturadas aproximadamente 35 imagens de nucleóides íntegros e em forma de cometa, aleatoriamente, de cada uma das triplicatas. As imagens foram analisadas pelo programa Comet Score 1.5. Os parâmetros considerados pela leitura do programa foram: porcentagem de DNA na cauda do cometa (% DNA), o *Tail Moment* (TM) e o *Olive Tail Moment* (OTM). Os parâmetros foram avaliados pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do pós teste de Dunns (BAUER *et al.*, 1998).

3.6. Teste RYA com leveduras recombinantes

3.6.1. Linhagem e plasmídeos

Para o experimento foi utilizada a linhagem BY4741 (MATa *ura3Δ0 leu2Δ0 his3Δ1 met15Δ0*) de *S. cerevisiae* obtida da EUROSCARF, Frankfurt, Alemanha, transformadas com os plasmídeos pH5HEO e pVITB2x, gentilmente cedida pelo Dr Benjamin Piña do CSIC-Barcelona, Espanha. O plasmídeo de expressão pH5HEO contém o receptor de estrógeno humano (HEO) (GREEN e CHAMBON, 1991) clonado no vetor de expressão constitutivo da levedura, pAAH5. O plasmídeo repórter pVITB2x é derivado do pSFLA-178k, que contém o promotor CYC1 que regula o gene da β-galactosidase em *E. coli*. O plasmídeo pVITB2x contém duas cópias do elemento responsivo a estrógeno (ERE2) pseudo-palindrômico do gene vitelogenina B1 de *X. laevis* inserido no sitio único KpnI de pSFLA-178K (GARCÍA-REYERO *et al.*, 2004).

3.6.2. Preparo dos inóculos de *S. cerevisiae*

O teste de RYA foi realizado essencialmente como descrito em Garcia-Reyero *et al.* (2005).

A levedura BY4741 transformada com os plasmídeos pH5HEO e pVITB2x foi descongelada do estoque à -70 °C e crescida a 30 °C, por 2-3 dias em meio mínimo SD (base

nitrogenada sem aminoácidos 6,0 g/L, glicose 20 g/L) com ausência de uracila e leucina (-Ura-Leu) suplementado dos aminoácidos prototróficos necessários (0,1 g/L de histidina e metionina). A seguir, as leveduras cresceram em meio rico YPD (extrato de levedura 5 g/L, peptona 10 g/L e glicose 20 g/L) por mais 1-2 dias. Então, 10 μ L dessa cultura foi inoculada em 30 mL de meio mínimo, o qual foi incubado a 30 °C até atingir D.O._{600nm} = 0,1.

3.6.3 Ensaio de estrogenicidade e antiestrogenicidade

O nemorosone foi dissolvido em dimetilsulfóxido e testado em placas de microtitulação de polipropileno de 96 poços (NUNC, Roskilde, Dinamarca), nas concentrações de 0,002 μ g a 40 μ g/poço. De acordo com os resultados dos testes de viabilidade, 40 μ g/poço foi a maior concentração onde a viabilidade da levedura foi de 80%.

À primeira fileira da placa de microtitulação foram adicionados 90 μ L da cultura de leveduras e 10 μ L do nemorosone em diferentes concentrações iniciais. Nas demais fileiras foram adicionados 50 μ L da cultura de leveduras e então realizada diluições sucessivas, onde 25 μ L foram transferidos seqüencialmente da primeira para a segunda fileira e assim sucessivamente. Obtendo-se assim soluções com fatores de diluição de 1:10, 1:30, 1:90, 1:270, 1:810. Cinco concentrações do nemorosone foram testadas em triplicata, em cada placa.

Como controle negativo foi utilizado DMSO a 10% (maior concentração de solvente utilizado no ensaio) e como controle positivo utilizou-se 17- β -estradiol (Sigma Aldrich – Brasil) a 10 nM/orifício. O controle de viabilidade consistiu de 25 μ L provenientes da primeira fileira de diluição do composto teste, levedura e 17- β -estradiol a 10 nM.

As microplacas foram incubadas por 6 horas a 30 °C com agitação. Em seguida, 50 μ L de tampão de lise (Y-PER, Pierce, Rockford, USA) foram adicionados a cada orifício e a microplaca foi novamente incubada na mesma temperatura por mais 30 minutos. A seguir, foram adicionados 50 μ L de tampão suplementado com 0,1% de mercaptoetanol e 0,25% da solução de 4-

metilumbeliferona β -D-galactopiranosídeo (MuGal). Após breve centrifugação a 1000 rpm, as microplacas foram lidas em espectrofotômetro (355 nm de excitação e 460 nm de emissão).

Para avaliar a atividade antiestrogênica da benzofenona seguiu-se o mesmo protocolo de avaliação da estrogenicidade, acrescentando-se 10 nM de 17- β -estradiol em cada orifício da microplaca junto à levedura e ao nemorosone testado nas concentrações de 40 a 5 μ g. Com isso, avaliou-se a capacidade do mesmo em reduzir o efeito estrogênico induzido pela presença do hormônio.

Nos ensaios de atividade antiestrogênica foi utilizado como controle negativo o solvente da amostra (DMSO 10%) e como controle positivo o 17- β -estradiol 10 nM. Foi também avaliada, através de um plaqueamento em meio YPD e contagem das colônias de levedura, a toxicidade da suspensão contendo leveduras junto a maior concentração de nemorosone testada e 10 nM de 17- β -estradiol. Afim de descartar uma possível redução da fluorescência devido a toxicidade.

3.6.4. Análise dos resultados

A fluorescência foi medida durante 20 minutos (uma medida por minuto) e os valores da atividade da β -galactosidase foram avaliados pelo aumento das unidades de fluorescência em relação ao tempo, usando o método de regressão linear padrão. Este ensaio quantifica a atividade estrogênica, a qual é calculada como equivalentes de estradiol (EEQ), ou seja, a quantidade de estradiol que produz uma resposta semelhante a da amostra avaliada (NOGUEROL *et al.* 2006).

Para os ensaios de atividade antiestrogênica o resultado foi expresso em porcentagem, estimando-se 100% para a taxa do estradiol. Os parâmetros obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA, seguida de pós-teste de Dunett (assumindo $p < 0,05$).

3.7. Teste E-screen com células MCF-7 BUS

O teste do E-screen, que utiliza a linhagem celular MCF-7 BUS, foi realizado em microplacas com 24 orifícios, conforme descrito por Rasmussen e Nielsen (2002). Foram semeados

500µL de uma suspensão de 4×10^4 células/mL. Após 24 horas o meio de cultura foi substituído por outro meio com soro livre de estrógenos (10% de soro fetal bovino tratado com carvão/dextrana) e foram realizados os tratamentos (nemorosone 10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M). Após 6 dias, as células foram reveladas pelo método da sulforodamina B, conforme descrito no item 3.3.

A preparação do ensaio de antiestrogenicidade consistiu na mesma seqüência de procedimentos para o ensaio de estrogenicidade, sendo acrescentada, antes da incubação, a concentração de 10^{-8} M de uma solução de 17-β estradiol em cada orifício. Após incubação por 6 dias, os mesmos procedimentos de leitura foram realizados e os parâmetros de proliferação calculados para verificar se as substâncias tinham a capacidade de inibir a ação do estradiol *in vitro*.

Para controle dos ensaios de estrogenicidade e antiestrogenicidade foi utilizado como controle positivo o 17 β-estradiol (10^{-8} M), como controle de solvente 0,25% de DMSO e como controle negativo utilizou-se meio sem vermelho de fenol com soro fetal bovino sem hormônio e meio com vermelho de fenol (com soro fetal bovino sem tratamento).

3.7.1. Remoção de estrógenos endógenos do soro fetal bovino

A remoção de estrógenos endógenos foi realizada por meio do tratamento do soro fetal bovino com carvão-dextrana. A técnica consistiu em incubar 500 mL de soro a 56° C (banho-maria) por 1 hora para a inativação das proteínas plasmáticas. Aproximadamente 25g de carvão ativado (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) foi adicionado a 240 mL de água destilada e aliquoteado em tubos de centrífuga em um volume de 40 mL cada. A suspensão foi submetida à centrifugação (3000 rpm por 10 minutos). Esse procedimento foi repetido 3 vezes com água. Os sobrenadantes de lavagem foram descartados e substituídos pelo mesmo volume de uma solução dextrana T70 (0,5% do volume total de soro), utilizando os mesmos tubos de centrífuga. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o soro a ser tratado foi adicionado ao carvão-dextrana em cada tubo de centrífuga. A mistura carvão soro foi submetida à incubação a 37 ° C por 1 hora, sob agitação.

Após centrifugação, o sobrenadante foi esterilizado através de membrana filtrante e estocado a -70° C até o uso (SOTO *et al.*, 1995).

3.7.2. Análise dos resultados

Após leitura das placas foram determinados os parâmetros de atividade estrogênica. Um dos parâmetros calculados foi o efeito proliferativo (EP), que estabelece a taxa máxima de proliferação induzida pela substância em células MCF7-BUS. Esse parâmetro é obtido pela relação entre a taxa de proliferação apresentada pela substância avaliada ou pelo 17 β -estradiol e aquela apresentada pelo controle de solvente (DMSO 0,25%).

$$EP = \text{absorbância do composto} / \text{absorbância do controle negativo}$$

Outro parâmetro estabelecido é o efeito proliferativo relativo (EPR), que estabelece uma relação entre a taxa máxima de proliferação da substância avaliada e a taxa máxima obtida pelo 17 β -estradiol.

$$EPR = (EP - 1 (\text{composto teste}) / EP - 1 (17 \beta\text{-estradiol})) \times 100$$

Para determinar a atividade antiestrogênica, o crescimento celular induzido pelo 17 β -estradiol foi considerado como 100% de proliferação. A partir desse valor foram calculadas as inibições induzidas pelo nemorosone nas diferentes concentrações testadas.

Os parâmetros obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA (assumindo $p < 0,05$) seguida de pós-teste de Dunett.

3.8. Avaliação do ciclo celular de MCF-7 BUS por citometria de fluxo

Para o estudo do ciclo celular 4×10^5 células (MCF-7 BUS) foram transferidas para microplacas de seis orifícios. Após a aderência das células (24 horas) essas foram tratadas com

diferentes concentrações de nemorosone (10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M e 10^{-7} M) durante 24 horas. Em seguida, as células foram tripsinizadas, transferidas para tubo Falcon e lavadas com PBS por três vezes. O procedimento seguiu o protocolo da Becton-Dickinson (Cycle Test Plus DNA Reagent Kit). Foi adicionada a cada amostra a solução A do kit (Tripsina e espermina) e incubada por 10 minutos, em seguida adicionou-se a solução B (inibidor da tripsina e ribonuclease A) e após 10 minutos adicionou-se a solução C (Iodeto de propídio). Passados 10 minutos da adição da solução C, as amostras foram lidas ao citômetro (BD FACSCanto) em até três horas. O software de aquisição utilizado foi FACSDiva versão 6.3.1 e para análise das células utilizou-se o software MODFIT LT 3.2.

As fases do ciclo celular foram determinadas pela caracterização do conteúdo de DNA nuclear ligado ao iodeto de propídio. Núcleos com intensidades de fluorescência menores foram considerados em fase G₀-G₁; núcleos com intensidade de fluorescência alta foram considerados como em fase G₂-M; núcleos com intensidade de fluorescência intermediária foram considerados em fase S. Como controle negativo, foram utilizadas células MCF-7 BUS crescidas em meio de cultura e como controle de solvente utilizou-se células crescidas em meio de cultura adicionado de DMSO 0,25%.

3.8.1. Análise estatística

Para comparação entre os grupos tratados e controles foi utilizado ANOVA segundo um único critério e pós-teste Dunnet's (software GraphPad Prism V4). Como grau de significância de 95% ($p < 0.05$) (TELFORD *et al.*, 1991).

3.9. Análise da Expressão Gênica por PCR Array

Para análise da expressão gênica 4×10^5 células de câncer de mama (MCF-7 BUS) foram tratadas com 5×10^{-5} M de nemorosone (teste) ou meio de cultivo adicionado de 0,25% de DMSO (controle), em triplicata, em microplacas de seis orifícios. Esse tratamento foi repetido em 3

diferentes microplacas. As células de cada triplicata do controle e teste foram misturadas em um *pool* de células. Essas células foram submetidas à extração do RNA, síntese de cDNA e então realizada a técnica de RT-qPCR Array em triplicata para controle e teste.

3.9.1. Extração de RNA

As células foram submetidas ao procedimento de extração de RNA total segundo o protocolo do fabricante do RNeasy Mini Kit (SABiosciences; Frederick, MD, USA) que inclui os passos de lise das células, purificação do RNA, tratamento com DNase e eluição do RNA com água livre de nuclease fornecido pelo fabricante.

Para a quantificação das amostras de RNA total, uma alíquota de 2 μ L foi diluída em 198 μ L de água livre de nuclease. A quantificação do RNA total foi realizada por leitura espectrofotométrica em comprimento de onda 260 nm, sendo a quantidade de RNA total dada pela multiplicação do valor de absorbância a 260nm pelo fator 40 e o resultado multiplicado pelo fator de diluição, o que permite a estimativa da concentração de RNA total em μ g/mL. O grau de pureza das soluções de RNA foi avaliado pelas razões $A_{260/280}$. Uma solução pura de RNA apresenta razão $A_{260/280}$ em torno de 2,0, razões inferiores a 1,7 são indicativas de contaminação. Devem ser utilizadas razões entre 1,8 e 2,2. A integridade do RNA foi avaliada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão de corrida TBE (10,8 g/L Tris Base, 5,5 g/L ácido bórico e 4 mL de EDTA 0,5 mM/L, pH=8). Imediatamente antes da eletroforese as amostras de RNA foram desnaturadas (65°C por 5 minutos, seguido de banho de gelo por 10 min) em solução de formamida (60% do volume final), 1 μ L de brometo de etídio (1mg/mL) e 1/10 do volume da solução de tampão de carregamento 10X (50mM Tris-HCl pF7.6, 0,25% de azul de bromofenol, 60% glicerol)(MASEK *et al.*, 2005).

A corrida eletroforética foi realizada a 6,5V/cm durante 20 minutos. A integridade do RNA foi avaliada em transiluminador de luz ultravioleta observando-se a integridade das bandas de RNA. Todas as amostras de RNA foram mantidas em freezer -80°C.

3.9.2. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada com o kit RT² First Strand Kit (SABiosciences; Frederick, MD, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O produto da reação de RT-PCR foi diluído em 91µL de água duplamente destilada e mantido a -20°C até o momento do uso.

3.9.3. RT² Profiler PCR Arrays

As reações de PCR Array foram realizadas com o kit RT² Profiler PCR Array (Breast Cancer Pathway) (SABiosciences; Frederick, MD, USA) para 84 genes de acordo com o protocolo do fabricante. O mix para as reações de PCR Array foi preparado com RT² SYRB Green/ROX qPCR Master Mix (SABiosciences; Frederick, MD, USA) suficiente para uma microplaca, água duplamente destilada e cDNA de cada amostra. O mix foi homogeneizado e 25µL da solução distribuída em cada um dos 96 orifícios da placa de PCR Array que já continham os iniciadores de interesse. Além dos 84 genes de células de câncer de mama, as placas continham 5 diferentes controles endógenos, um controle para contaminação por DNA genômico, controle da transcriptase reversa e controle positivo para PCR. A distribuição dos genes analisados e dos controles na placa pode ser observada no anexo 1. O equipamento utilizado para as reações de RT-qPCR foi o Applied Biosystems 7500 PCR Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e as condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15s e 60°C por 1 minuto. Em seguida foi realizada a curva de dissociação elevando-se a temperatura de 65 a 95°C, com variação de 2°C por minuto.

A Figura 5 demonstra os passos realizados desde a obtenção do RNA até os gráficos de análise dos resultados.

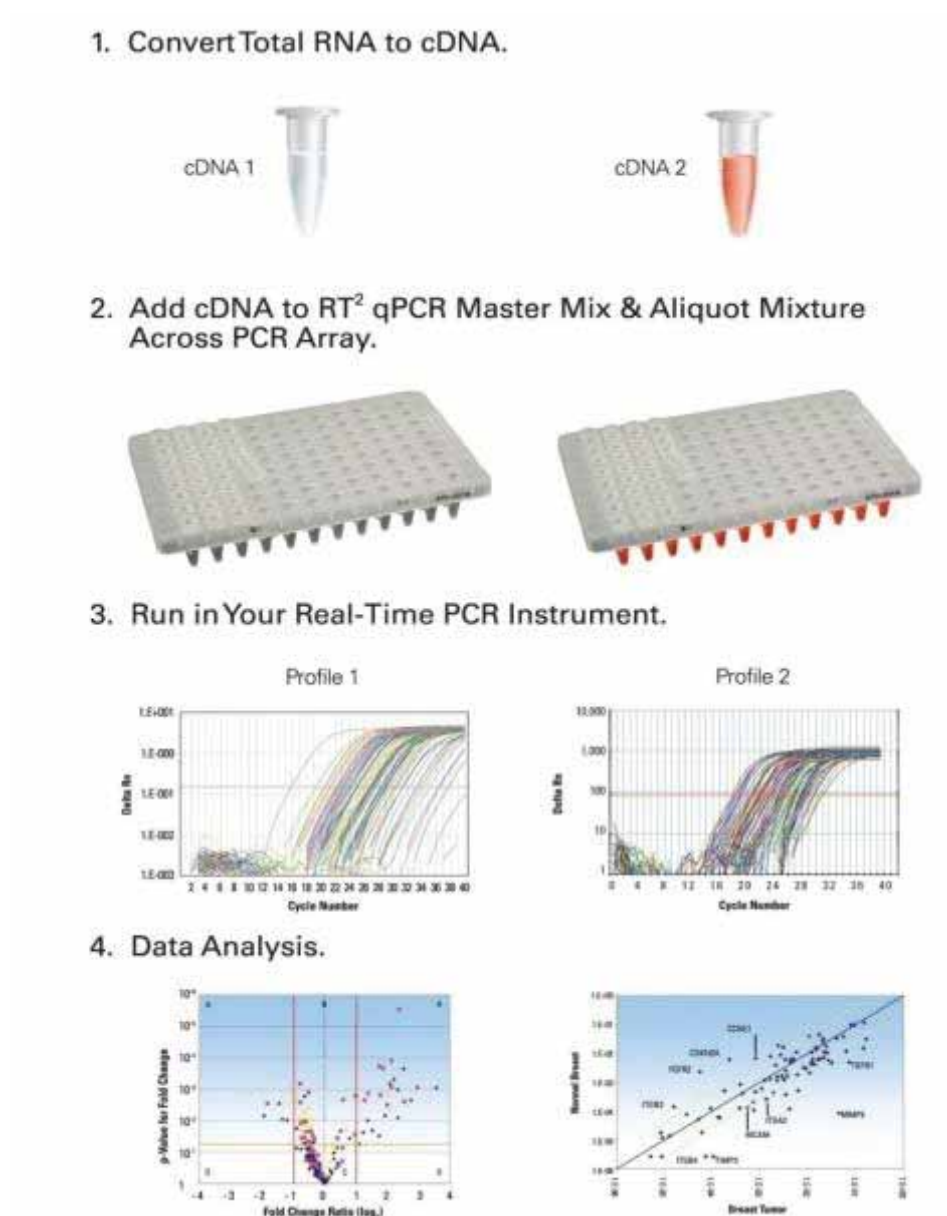


Figura 5. Fluxograma da análise da expressão gênica por PCR Array. Esquema ilustrando o sistema de PCR em tempo real (RT² ProfilerTM PCR Array System) e as fases desde a obtenção do RNA até a análise dos resultados.

3.9.4 Análise estatística

Após a amplificação das amostras, os cálculos da expressão diferencial foram realizados pelo programa RT² Profiler PCR Array Data Analysis Super-Array-SABiosciences. Os genes que apresentaram valores de ciclo *threshold* (Ct) acima de 35 foram considerados não expressos. A normalização e quantificação relativa da expressão gênica foram realizadas pelo método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK *et al.*, 2001), seguido do Teste t de Student para avaliar a significância das diferenças na

expressão gênica entre controle e teste. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados estão representados como diferença (*fold regulation*) na expressão gênica, que foi normalizada pela média geométrica de cinco genes de controle endógeno.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação da atividade mutagênica do nemorosone pelo Teste de Ames

Os resultados da avaliação da mutagenicidade do nemorosone, realizada através do ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames), estão apresentados nas Tabelas 1 e 2, que mostram o número de revertentes obtido para cada linhagem, bem como as razões de mutagenicidade.

Tabela 1 - Atividade mutagênica expressa pela média (M) e desvio padrão (DP) do número de revertentes/placa para as linhagens TA97a e TA102 de *Salmonella typhimurium* expostas ao nemorosone em várias doses, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamento mg/placa	Nº de revertentes/placa ±DP/(IM)			
	TA 97a		TA 102	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0,00 ^a	123,2±6	221,3±2,3	196,7±11,5	285,1±67
0,005	112,4±18(0,9)	243,7±3,5(1,1)	176,3±15,7(0,9)	291,1±35(1,0)
0,01	158±1(1,3)	260,7±3,2(1,1)	199,7±5(1,0)	324±8(1,1)
0,02	139,4±12(1,1)	236,7±6,4(0,9)	173,3±25,7(0,9)	295,8±29(1,0)
0,03	153,4±22(1,2)	170,1±2(0,8)	203,2±29,3(1,0)	255,6±33(0,9)
Controle positivo	782±72 ^b	1277±33 ^c	1496±190 ^d	1338±33 ^e

(IM) = razão de mutagenicidade

^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido; Controle positivo (C+): ^e2-aminofluoreno na presença de S9; ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamino (NPD); ^c2-antramino na presença de S9; ^ddaunomicina, em ausência de S9.

Tabela 2 - Atividade mutagênica expressa pela média (M) e desvio padrão (DP) do número de revertentes/placa para as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella typhimurium* expostas ao nemorosone em várias doses, com (+S9) e sem (-S9) ativação metabólica

Tratamento mg/placa	Nº de revertentes/placa ±DP/(IM)			
	TA 98		TA 100	
	-S9	+S9	-S9	+S9
0,00 ^a	32,3±3	33,7±2,3	214,7±14,36	166,3±10
0,005	42±2(1,2)	37,7±3,5(1,1)	183,7±14,19(0,8)	163,4±9,5(1,0)
0,01	35,7±8,7(1,1)	35,7±3,2(1,1)	226,4±11,53(1,2)	200,2±4(1,2)
0,02	44,3±13(1,3)	31,8±6,4(0,9)	184,7±8(0,8)	176,1±14(1,1)
0,03	26,1±16(0,8)	26,3±2(0,8)	219,7±23,29(1,0)	159,8±20(1,0)
Controle positivo	2150±720 ^b	1107±2 ^d	2734±53 ^c	1241±53 ^d

(IM) = razão de mutagenicidade

^aControle negativo: DMSO, dimetilsulfóxido ; Controle positivo: ^b4-nitro-*o*-fenilenodiamino; ^cazida sódica; ^d2-antramino na presença de S9.

O nemorosone foi avaliado quanto a sua atividade mutagênica nas concentrações de 0,005 mg/placa a 0,03 mg/placa, acima dessa concentração apresentou indícios de citotoxicidade para as diferentes linhagens bacterianas. A benzofenona não apresentou atividade mutagênica nos ensaios com e sem metabolização para nenhuma linhagem testada, pois não induziu aumento do número de

revertentes quando comparada ao controle negativo e o IM foi menor que 2,0 em todas as concentrações.

4.2. Avaliação da atividade antimutagênica do nemorosone pelo Teste de Ames

Os resultados da avaliação da antimutagenicidade do nemorosone, realizada através do ensaio de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames), estão apresentados na Tabela 3, que mostra a média do número de revertentes obtido para cada linhagem, bem como os valores dos controles positivos, associações de tratamentos (mutágeno e nemorosone em diferentes concentrações) e percentuais de inibição.

Tabela 3 - Atividade antimutagênica expressa pela média, desvio padrão do número de revertentes e percentual de inibição (valor entre parênteses) do nemorosone, frente a compostos mutagênicos diretos (-S9): NPD e mitomicina C) e indireto (+S9: aflatoxina), utilizando as linhagens TA98, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*.

Tratamento mg/placa	TA98	TA100	TA102
	NPD	Aflatoxina	Mitomicina C
C+	972±20	1376,33±30	2105,67±42,3
0,0025	936,67±27(3,63)	1255,67±37(8,7)	2072,67±34,5(1,6)
0,005	808,67±10(16,8)	1278,67±24(7,0)	2013,33±24,2(4,4)
0,01	808,33±7,6(16,8)	1307,33±21(5,0)	2063,67±28,4(2,0)
0,02	816,67±19(16,0)	1045±19(24,0)	1803,64±9,9(14,3)
0,03	815±24(16,2)	940±20(31,0)	990,57±11,1(53,0)

NPD (4-nitro-*o*-fenilenodiamino – 10,0 µg/placa); Aflatoxina – 0,5 µg/placa; Mitomicina C (0,5 µg /placa)

Nos testes realizados com a linhagem TA102 foi possível observar uma redução significativa no número de colônias revertentes na maior concentração testada, mostrando o efeito protetor do nemorosone contra a mitomicina C. A benzofenona foi capaz de inibir em 53% a taxa de revertência induzida pelo mutágeno, mostrando a forte capacidade antimutagênica do composto. Nos testes realizados com a linhagem TA100 ocorreu uma redução de 31% na taxa de reversão induzida pela aflatoxina, na maior concentração de nemorosone testada, o que indica moderada capacidade antimutagênica do composto. Não foi observada nenhuma redução significativa no número de colônias revertentes induzidas pelo mutágeno NPD nos ensaios com a linhagem TA98.

4.3. Citotoxicidade MCF-7 BUS

O nemorosone não apresentou toxicidade para as células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento, nas concentrações de 10^{-9} M a 10^{-6} M (Figura 6). Somente na maior concentração testada (10^{-5} M) houve uma redução significativa no crescimento celular quando comparada ao controle de solvente, onde a viabilidade foi de 72,4%. Essas concentrações da benzofenona e número de células por orifício, foram utilizadas para o Teste do Cometa e E-Screen. O valor do IC_{50} do composto foi $2,5 \times 10^{-5}$ M após 24 horas de tratamento.

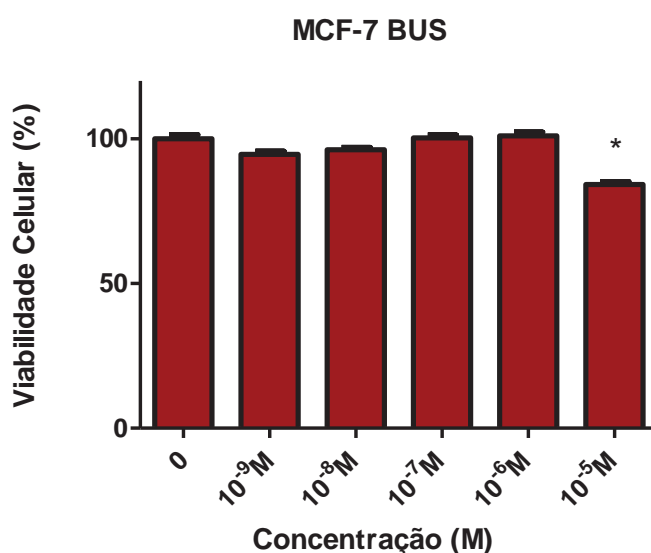


Figura 6. Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 24 horas de tratamento (2×10^4 células/orifício) com diferentes concentrações do nemorosone. * $p < 0,05$

Após seis dias de tratamento o nemorosone não apresentou toxicidade para as células MCF-7 BUS nas concentrações de 10^{-9} M a 10^{-6} M. Na concentração de 10^{-5} M, a maior testada, houve uma maior queda no crescimento celular em relação ao tratamento de 24 horas, onde a viabilidade foi de aproximadamente 40% quando comparada ao controle de solvente (Figura 7). Essas concentrações e tempo de tratamento foram utilizados para o Teste de E-Screen.

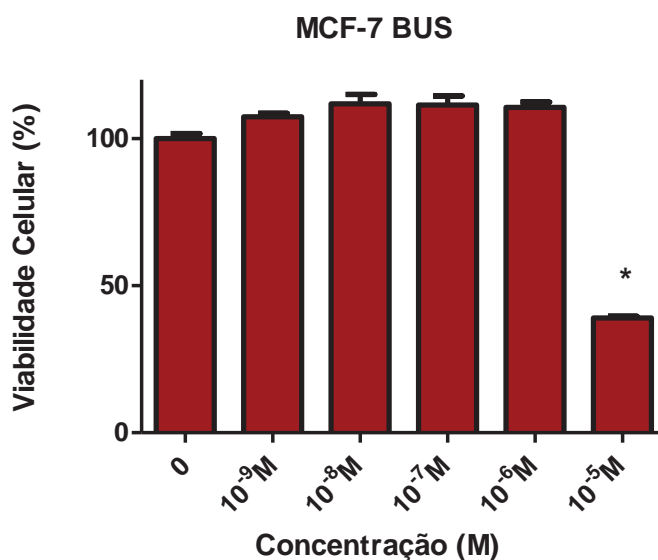


Figura 7. Viabilidade celular em células MCF-7 BUS após 144 horas de tratamento (2×10^4 células/orifício) com diferentes concentrações do nemorosone. * $p < 0,05$

4.4. Citotoxicidade MCF10A

O nemorosone não apresentou toxicidade para as células MCF10A após 24 horas de tratamento nas concentrações testadas (Figura 8). Neste ensaio foi utilizado uma concentração celular menor que os ensaios com a linhagem MCF-7 BUS (2×10^3 células/orifício) e expostas a mesma concentração do composto. Esses resultados evidenciam que a benzofenona apresenta uma maior toxicidade para células tumorais de mama do que para células normais de mama humana.

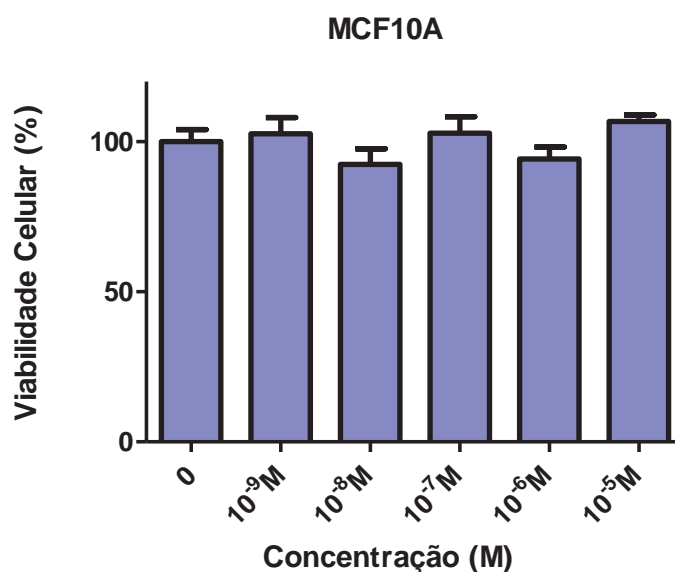


Figura 8. Viabilidade celular em células MCF10A após 24 horas de tratamento (2×10^3 células/orifício) com diferentes concentrações do nemorosone.

4.5. Ensaio do Cometa

A avaliação dos danos ao DNA das células MCF-7 BUS e MCF10A induzidos pelo tratamento com nemorosone (10^{-9} a 10^{-5} M) durante 3 e 24 horas, calculados pelos parâmetros: porcentagem de DNA na cauda (%DNA), *Olive Tail Moment* (OTM) e *Tail Moment* (TM), estão representados nas Tabelas 4, 5, 6 e 7. Os resultados obtidos mostraram que o composto não induziu genotoxicidade ao DNA das linhagens MCF10A e MCF-7 BUS. Quando comparados ao controle negativo, nenhum parâmetro avaliado apresentou diferença significativa.

Tabela 4 – Valores médios \pm desvio padrão (DP) do *Olive Tail Moment* (OTM), do *Tail Moment* (TM) e da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) obtidos pelo ensaio do cometa em células MCF-7 BUS tratadas com nemorosone durante 3 horas e seus controles.

Tratamentos	OTM	TM	%DNA
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
Controle	1,56 \pm 2,00	0,83 \pm 2,00	8,17 \pm 6,56
DMSO	1,84 \pm 2,57	1,15 \pm 2,88	8,26 \pm 7,67
10 ⁻⁹ M	1,23 \pm 1,88	0,79 \pm 1,69	7,75 \pm 8,32
10 ⁻⁸ M	1,51 \pm 1,75	0,86 \pm 1,53	9,45 \pm 8,32
10 ⁻⁷ M	1,35 \pm 1,47	0,71 \pm 1,67	6,17 \pm 7,98
10 ⁻⁶ M	1,51 \pm 1,89	0,75 \pm 1,52	9,01 \pm 8,02
10 ⁻⁵ M	1,11 \pm 1,73	0,67 \pm 1,77	7,67 \pm 7,98

Foram analisadas aproximadamente 100 células por tratamento.

Controle: Meio de cultura (DMEM)

Controle de DMSO: Usado 0,25% de DMSO

Tabela 5 – Valores médios \pm desvio padrão (DP) do *Olive Tail Moment* (OTM), do *Tail Moment* (TM) e da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) obtidos pelo ensaio do cometa em células MCF10A tratadas com nemorosone durante 3 horas e seus controles.

Tratamentos	OTM	TM	%DNA
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
Controle	1,90 \pm 2,56	1,40 \pm 3,00	9,80 \pm 10,17
DMSO	2,27 \pm 1,25	1,66 \pm 0,73	9,92 \pm 8,99
10 ⁻⁹ M	1,95 \pm 2,42	1,08 \pm 3,70	8,10 \pm 9,17
10 ⁻⁸ M	1,64 \pm 2,52	1,09 \pm 1,88	8,31 \pm 9,70
10 ⁻⁷ M	1,26 \pm 1,44	0,93 \pm 0,88	7,67 \pm 5,70
10 ⁻⁶ M	1,63 \pm 2,07	0,98 \pm 2,10	8,23 \pm 8,79
10 ⁻⁵ M	1,58 \pm 2,14	0,86 \pm 1,85	7,76 \pm 8,31

Foram analisados 100 células por tratamento.

Controle: Meio de cultura (DMEM)

Controle de DMSO: Usado 0,25% de DMSO

Tabela 6 – Valores médios \pm desvio padrão (DP) do *Olive Tail Moment* (OTM), do *Tail Moment* (TM) e da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) obtidos pelo ensaio do cometa em células MCF-7 BUS tratadas com nemorosone durante 24 horas e seus controles.

Tratamentos	OTM	TM	%DNA
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
Controle	1,69 \pm 3,83	0,97 \pm 4,70	3,65 \pm 7,45
DMSO	2,05 \pm 3,29	0,76 \pm 2,88	4,98 \pm 3,52
10 ⁻⁹ M	1,52 \pm 1,92	0,45 \pm 1,08	4,47 \pm 6,00
10 ⁻⁸ M	2,05 \pm 3,78	0,82 \pm 2,76	5,77 \pm 5,89
10 ⁻⁷ M	2,35 \pm 1,98	1,16 \pm 4,97	6,17 \pm 5,12
10 ⁻⁶ M	2,32 \pm 2,96	1,17 \pm 3,21	6,17 \pm 4,00
10 ⁻⁵ M	0,94 \pm 1,60	0,34 \pm 2,65	2,48 \pm 6,76

Foram analisados 100 células por tratamento.

Controle: Meio de cultura (DMEM)

Controle de DMSO: Usado 0,25% de DMSO

Tabela 7 – Valores médios \pm desvio padrão (DP) do *Olive Tail Moment* (OTM), do *Tail Moment* (TM) da porcentagem de DNA na cauda (% DNA) e obtidos pelo ensaio do cometa em células MCF10A tratadas com nemorosone durante 24 horas e controles.

Tratamentos	OTM	TM	%DNA
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
Controle	1,78 \pm 2,18	0,89 \pm 1,43	10,93 \pm 4,27
DMSO	2,53 \pm 2,07	1,44 \pm 2,88	15,27 \pm 4,78
10 ⁻⁹ M	2,27 \pm 1,50	2,20 \pm 1,08	11,78 \pm 3,16
10 ⁻⁸ M	1,84 \pm 0,29	1,20 \pm 2,76	13,04 \pm 5,25
10 ⁻⁷ M	1,48 \pm 0,28	1,12 \pm 0,97	10,23 \pm 7,91
10 ⁻⁶ M	2,44 \pm 3,62	2,21 \pm 4,21	13,46 \pm 4,52
10 ⁻⁵ M	1,83 \pm 2,40	1,33 \pm 2,65	11,38 \pm 3,87

Foram analisados 100 células por tratamento.

Controle: Meio de cultura (DMEM)

Controle de DMSO: Usado 0,25% de DMSO

4.6. Teste de RYA

4.6.1. Ensaio de viabilidade

Os valores referentes à determinação da viabilidade das leveduras frente a diferentes concentrações do nemorosone estão representados na Figura 9 onde o nemorosone foi testado numa faixa de 40 a 125µg/orifício, para determinação da concentração que permitisse pelo menos 80% de viabilidade. Observou-se que na concentração de 40µg/orifício a viabilidade do teste foi de 82% (Figura 9), o que indicou que os ensaios de atividade estrogênica e determinação dos EEq (equivalentes de estradiol) deveriam ser realizados e analisados em concentrações inferiores a essa.

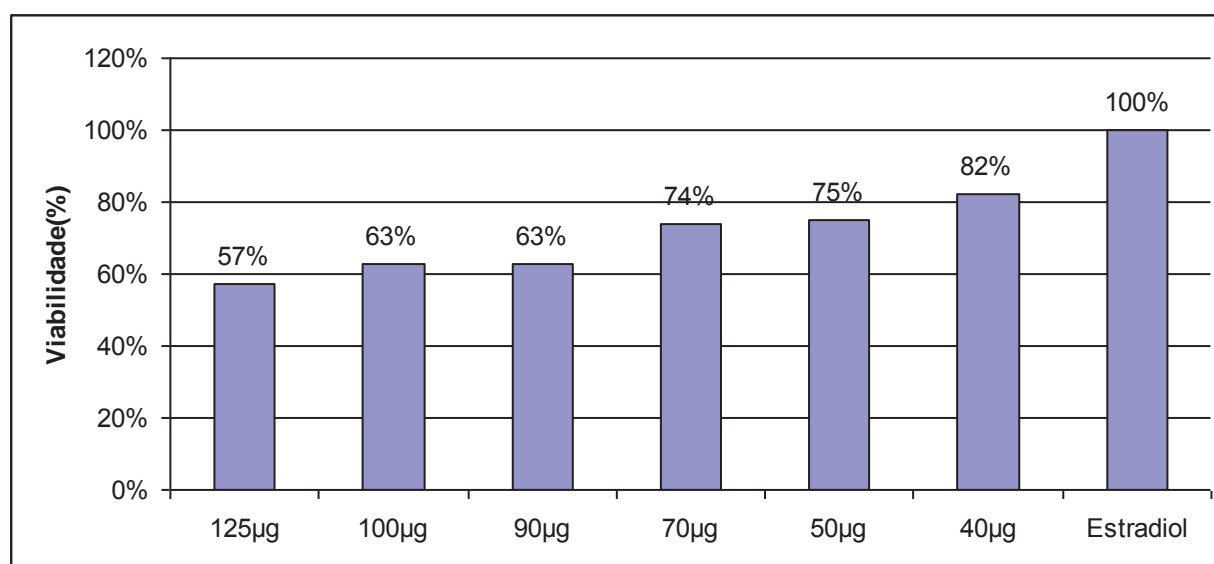


Figura 9. Viabilidade da levedura frente a diferentes concentrações do nemorosone expressa em porcentagem

4.6.2. Potencial estrogênico

Os testes foram realizados numa faixa de 0,002 a 40µg/orifício e os resultados do ensaio de RYA estão ilustrados na Figura 10, que representa o potencial estrogênico em porcentagem, considerando-se a fluorescência emitida pelo controle positivo (17-β-estradiol) como 100%. Esses dados mostram ausência de diferença entre os percentuais da atividade estrogênica do nemorosone e controle negativo.

O potencial estrogênico foi avaliado através do cálculo de equivalentes de estradiol (EEq), ou seja, a quantidade de estradiol (em nanomolar) necessária para produzir uma resposta semelhante

a do nemorosone. Os valores de EEq obtidos foram negativos, confirmando a ausência de atividade estrogênica para todas as concentrações testadas.

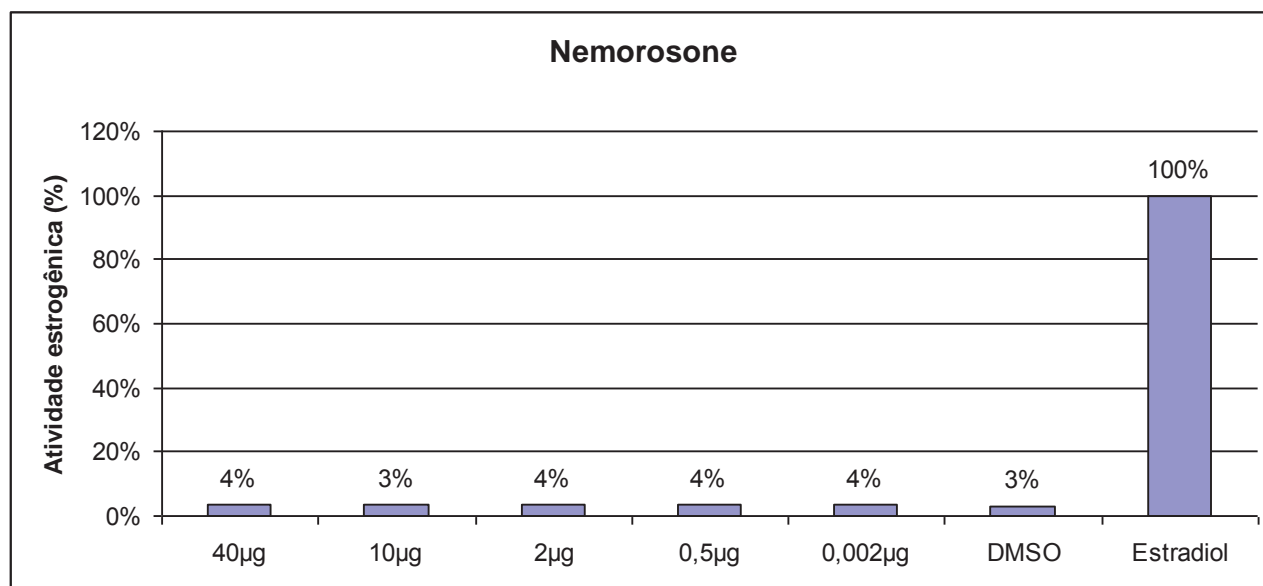


Figura 10. Percentual de atividade estrogênica de diferentes concentrações do nemorosone em relação ao estradiol.

4.6.3. Potencial antiestrogênico

Os testes foram realizados numa faixa de 5 a 40µg/orifício e os resultados do ensaio de RYA estão ilustrados na Figura 11, que representa o potencial estrogênico (em porcentagem) induzido pelo 17-β-estradiol frente as diferentes concentrações avaliadas do nemorosone. A fluorescência emitida pelo controle positivo (17-β-estradiol) foi considerada como 100%. O composto reduziu significativamente a fluorescência emitida pelo hormônio estradiol nas concentrações de 10 a 40µg/orifício. Onde, na maior concentração testada, a benzofenona reduziu a fluorescência emitida em 42%.

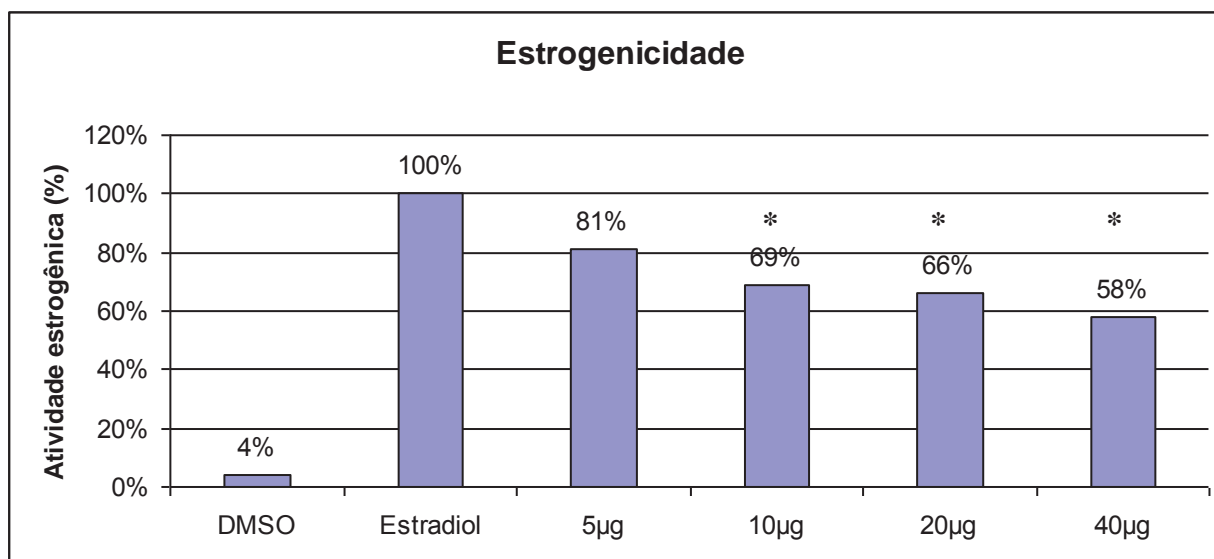


Figura 11. Percentual de atividade estrogênica induzida pelo 17 β -estradiol (10nM) frente a diferentes concentrações do nemorosone.

* $p < 0,05$

4.7. Avaliação da atividade estrogênica pelo Ensaio de E-Screen

O nemorosone foi testado pelo Ensaio de E-Screen nas concentrações de 10^{-9} a 10^{-5} M e não induziu proliferação celular (EP e EPR%) em nenhuma dessas concentrações testadas. O crescimento celular foi semelhante ao do controle negativo. Esses resultados indicam que o composto não apresenta atividade estrogênica nas concentrações e metodologia empregadas. Os resultados estão expressos nas Figuras 12 e 13.

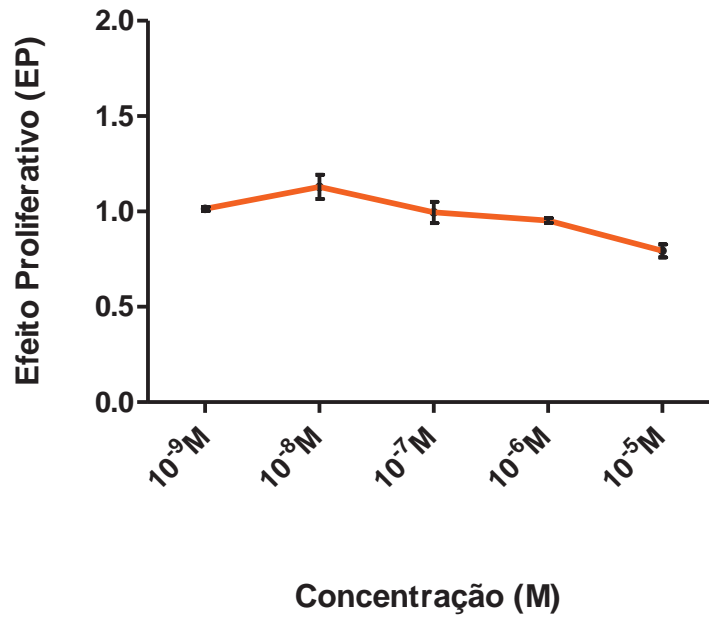


Figura 12. Efeito proliferativo (relação entre a taxa de proliferação apresentada pela substância avaliada e aquela apresentada pelo controle de solvente equivalendo a um EP de 1,0) em células MCF-7 BUS tratadas com nemorosone.

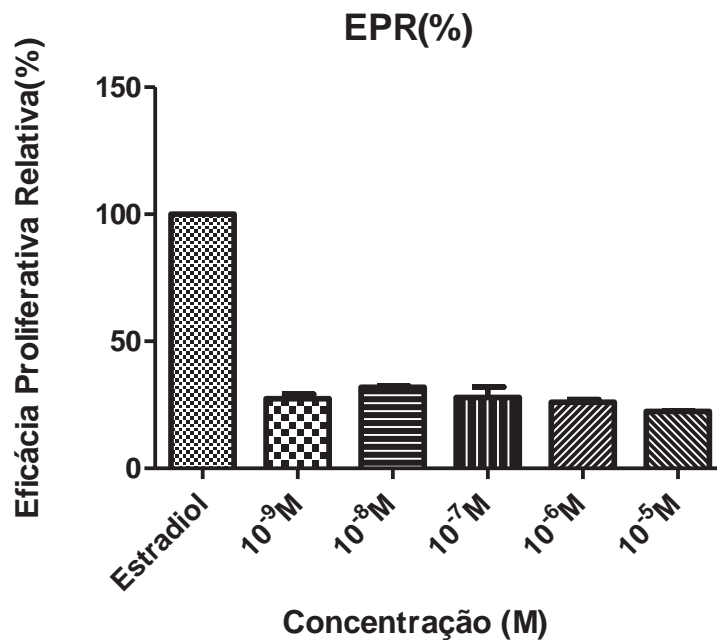


Figura 13. Eficácia proliferativa relativa (EPR) calculada como a taxa máxima de proliferação da substância avaliada e a taxa máxima obtida pelo 17 β -estradiol, estimando-se 100% para a taxa do estradiol em células MCF-7 BUS tratadas com o nemorosone.

4.8. Avaliação da atividade antiestrogênica pelo Ensaio de E-Screen

A capacidade antiestrogênica do nemorosone foi testada pelo ensaio de E-Screen nas concentrações de 10^{-9} a 10^{-5} M frente ao 17 β -estradiol. Nas concentrações de 10^{-5} M, 10^{-6} e 10^{-8} M o composto reduziu significativamente a proliferação celular em 75%, 9% e 10%, respectivamente. Esses resultados indicam que o composto apresentou atividade antiestrogênica e estão expressos na Figura 14.

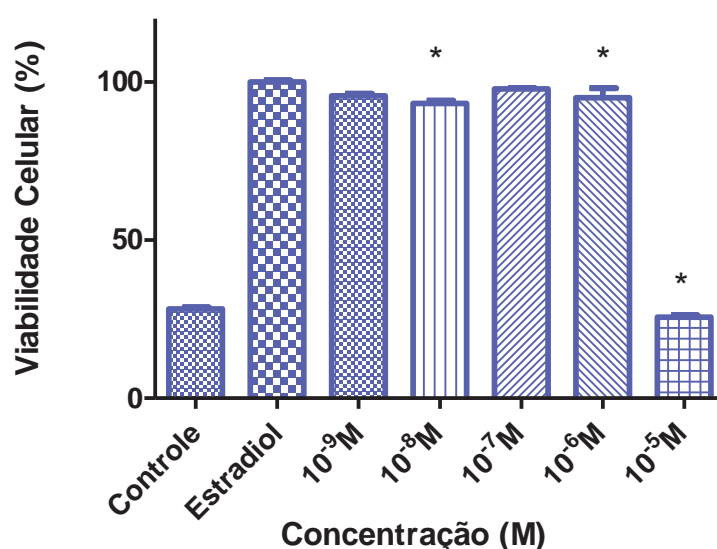


Figura 14. Viabilidade de células MCF-7 BUS tratadas com 17 β -estradiol e nemorosone em diferentes concentrações. A proliferação celular induzida pelo hormônio estradiol foi considerada 100% de viabilidade. * $p < 0,05$

4.9. Avaliação do ciclo celular de MCF-7 BUS, tratadas com nemorosone, por citometria de fluxo

Alterações no ciclo celular da linhagem MCF-7 BUS frente ao nemorosone foram avaliadas por citometria de fluxo. As concentrações utilizadas de benzofenona foram 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 10^{-6} e 10^{-7} M. As fases G1 e S não sofreram alterações significativas, mas ocorreu aumento na porcentagem de células na fase G1. A fase G2 sofreu uma significativa redução frente ao tratamento com as duas maiores concentrações do nemorosone. Os resultados estão representados da Tabela 8 e nas Figuras 15 a 20.

Tabela 8 – Valores médios \pm desvio padrão (DP), em porcentagem, do número de células MCF-7 BUS distribuídas entre as diferentes fases do ciclo celular após tratamento com diferentes concentrações do nemorosone durante 24 horas

Tratamentos	G1	S	G2/M
	Média \pm DP	Média \pm DP	Média \pm DP
Controle	52,20 \pm 2,91	41,27 \pm 2,78	6,86 \pm 0,12
10 ⁻⁷ M	55,67 \pm 0,57	37,56 \pm 1,28	7,42 \pm 0,38
10 ⁻⁶ M	57,02 \pm 0,24	36,79 \pm 1,16	6,63 \pm 0,77
10 ⁻⁵ M	55,03 \pm 0,69	38,02 \pm 0,84	8,01 \pm 0,17
5x10 ⁻⁵ M	54,52 \pm 2,30	41,62 \pm 1,71	4,31 \pm 0,64*
10 ⁻⁴ M	55,39 \pm 1,19	41,78 \pm 0,40	2,10 \pm 0,40*

Controle: Usado 0,25% de DMSO

*p<0,05

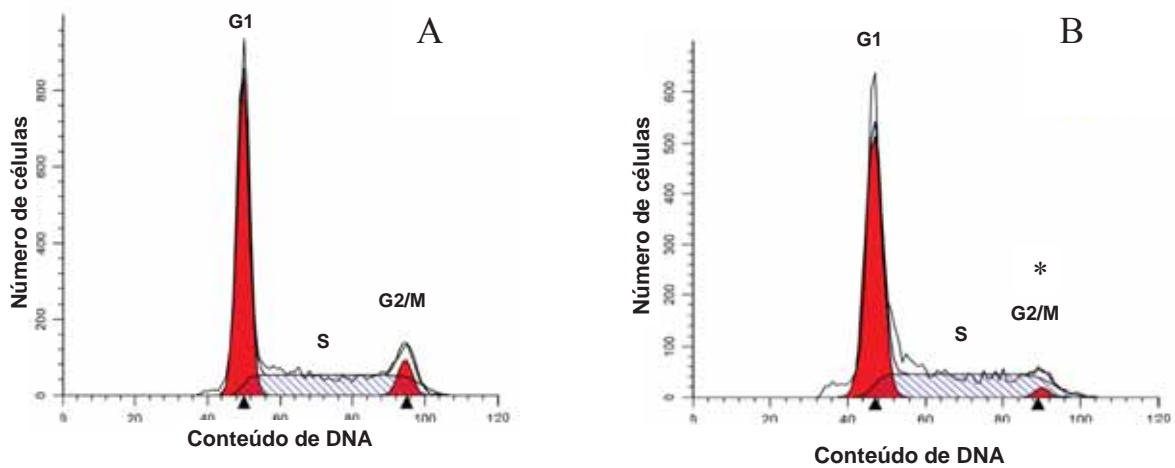


Figura 15. Análise do Ciclo celular de MCF-7 BUS por citometria de fluxo em células sem tratamento (A-controle) e tratadas com a concentração de 10⁻⁴M de nemorosone (B). * p < 0,05

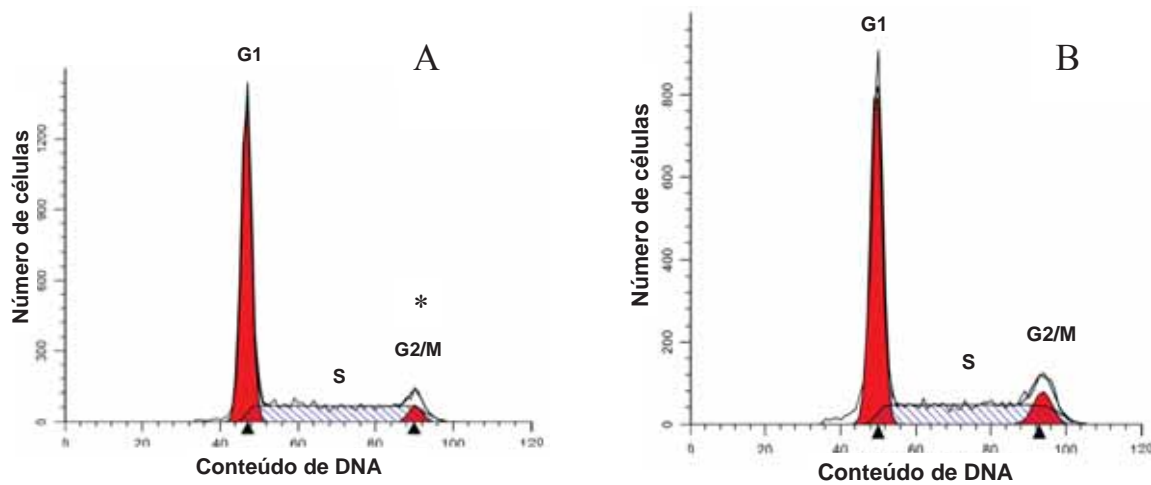


Figura 16. Análise do Ciclo celular de MCF-7 BUS por citometria de fluxo em células tratadas com as concentrações de 5×10^{-5} (A) e 10^{-5} M (B) de nemorosone. * $p < 0,05$

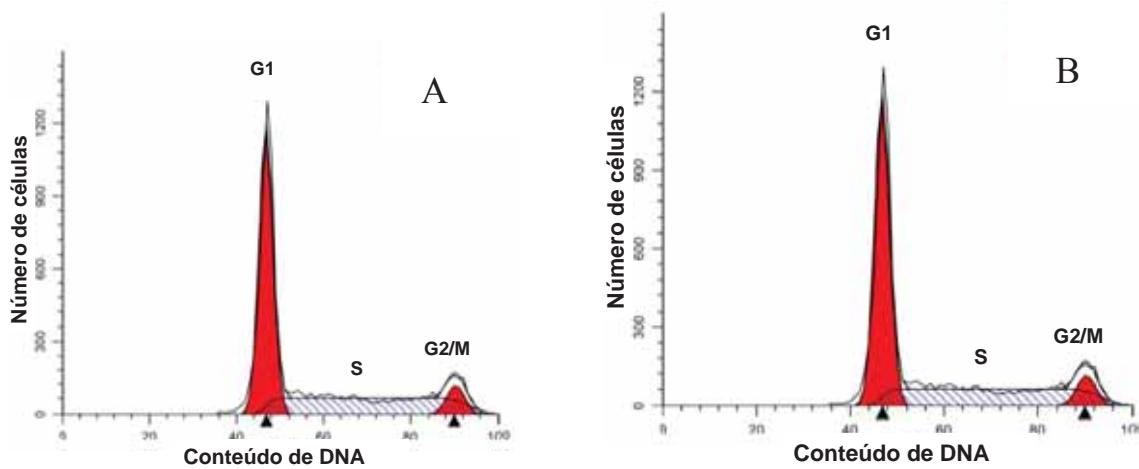


Figura 17. Análise do Ciclo celular de MCF-7 BUS por citometria de fluxo em células tratadas com as concentrações de 10^{-6} (A) e 10^{-7} M (B) de nemorosone. * $p < 0,05$

4.10. Análise da Expressão Gênica por RT² Profiler PCR Array

Os resultados da expressão gênica para células de câncer de mama (MCF-7 BUS) tratadas com 5×10^{-5} M de nemorosone estão representados pelo número de vezes que aumentaram ou diminuíram a expressão quando comparados às células controle (não tratadas). Foram considerados

somente os genes que apresentaram alterações na expressão com nível de significância $p < 0,05$. Entre os 84 genes avaliados na via de câncer de mama, 20 (23,8%) apresentaram alterações na expressão quando comparados ao controle. Desses, 11 (55%) apresentaram a expressão aumentada e 9 (45%) apresentaram a expressão diminuída (Tabela 9).

Tabela 9. Aumento ou diminuição na expressão de diferentes genes em células de câncer de mama (MCF-7 BUS) após tratamento com $5 \times 10^{-5} \text{M}$ de nemorosone

Gene	Descrição do Gene	Aumento/ diminuição na Expressão do Gene	Valor de P
<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli	-3,79	0,0419
<i>CCND1</i>	Cyclin D1	-1,90	0,0179
<i>CCNE1</i>	Cyclin E1	-2,38	0,0004
<i>ESR1</i>	Estrogen receptor 1	-2,10	0,0189
<i>ESR2</i>	Estrogen receptor 2 (ER beta)	2,00	0,0312
<i>GRB7</i>	Growth factor receptor-bound protein 7	1,99	0,0223
<i>IGFBP3</i>	Insulin-like growth factor binding protein 3	-2,58	0,0093
<i>KRT19</i>	Keratin 19	-4,09	0,0006
<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1	1,45	0,0274
<i>MAPK3</i>	Mitogen-activated protein kinase 3	1,72	0,0317
<i>MKI67</i>	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	-1,51	0,0256
<i>MLH1</i>	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)	1,85	0,0369
<i>MUC1</i>	Mucin 1, cell surface associated	-1,59	0,0218
<i>MYC</i>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	2,04	0,0014
<i>NOTCH1</i>	Notch 1	2,85	0,0041
<i>PGR</i>	Progesterone receptor	-3,08	0,0303
<i>PRDM2</i>	PR domain containing 2, with ZNF domain	2,10	0,0133
<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1	1,58	0,0442
<i>TP53</i>	Tumor protein p53	2,05	0,0163
<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A	2,82	0,0007

Os valores mostrados representam media do aumento ou diminuição na expressão do gene em triplicata. Foram considerados estatisticamente positivos valores com valor de $p < 0,05$

Para todas as placas de PCR Array realizadas, controles para contaminação com DNA genômico e de transcriptase reversa foram avaliados e os resultados estavam de acordo com as condições ótimas para o sucesso das reações (Anexo 2).

As placas de PCR Array contêm os controles endógenos *ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* e *RPLP0*. Os valores de Cts obtidos para gene controle endógeno, em cada reação realizada, podem ser observados na Tabela 10. Considerando-se que a variação dos valores de Ct de cada gene, entre os dois grupos avaliados (controle e teste) não foi crítica, todos os genes estudados foram considerados adequados para serem usados como controles endógenos e a média de Ct desses genes foi utilizada como controle endógeno, conforme sugestão do fabricante.

Tabela 10. Valores de Cts obtidos para cada controle endógeno em cada PCR Array dos controles e testes

Símbolo do Gene	Poço	Controle			Teste		
		Exp1	Exp2	Exp3	Exp1	Exp2	Exp3
<i>ACTB</i>	H1	19,4	19,8	18,9	19,7	19,1	19,9
<i>B2M</i>	H2	22,1	23,8	22,5	23,2	22,6	23,9
<i>GAPDH</i>	H3	19,2	19,3	18,2	19,3	18,2	20,2
<i>HPRT1</i>	H4	23,1	24,9	23,6	24,7	23,7	25,4
<i>RPLP0</i>	H5	17,9	18,4	17,2	17,7	16,9	18,3
	Média cada experimento	20,3	21,2	20,1	20,9	20,1	21,5

Valores e média dos Cts de cada gene endógeno para todos os experimentos. Exp= experimento

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1. Mutagênese e antimutagênese

Nos últimos 20 anos, o interesse em estudar extratos de plantas e compostos isolados vem crescendo junto com o número de investigações quanto a suas atividades biológicas em humanos e animais (VEIGA *et al.*, 2005).

Estudos mostram que o nemorosone apresenta atividade tóxica para diversas células tumorais e possui seletividade, não sendo tóxico para células normais. Além disso, é reconhecido que um dos mecanismos pelo qual essa substância induz morte celular é por apoptose, o que é característico de um antitumoral ideal. Com isso acredita-se que esse composto possa ser utilizado no futuro em terapias anticâncer de primeira e segunda linha (DIAZ-CARBALLO *et al.*, 2008).

Drogas usadas no tratamento do câncer são conhecidas por sua capacidade de impedir o crescimento celular. As células de câncer têm como característica a proliferação descontrolada e é esperado que essas células sejam o único alvo das drogas utilizadas no tratamento dessa doença. Por outro lado, um efeito comumente associado aos agentes quimioterápicos é que juntamente com as células de câncer, células e tecidos normais também são afetados e mortos (KEYOMARSI e PARDEE, 2003).

O mecanismo de ação das drogas utilizadas na terapia anticâncer é a diminuição da proliferação celular ou indução de apoptose (PENG *et al.*, 2003). A inibição da proliferação celular ocorre mais freqüentemente por dois mecanismos: - um deles é quando a droga intercala nas cadeias de DNA e impede a replicação; o segundo é quando a droga interfere com a inibição de enzimas envolvidas na síntese de DNA (POMMIER *et al.*, 1998). A propriedade de intercalar nas cadeias de DNA, freqüentemente produz mutações aleatórias em células normais (HOFFMANN *et al.*, 2003). O acúmulo de diversas mutações aleatórias pode levar a aberrações nas células e possível conversão de células não-cancerígenas a cancerígenas (FERGUSON e DENNY, 1987). Desta maneira é indispensável que as drogas quimioterápicas sejam cuidadosamente submetidas não somente a

testes de avaliação de atividades anticâncer ou antitumorais, mas também quanto ao seu potencial mutagênico (NARAYANAN *et al.*, 2005).

O presente estudo avaliou a possível atividade mutagênica do nemorosone através de Teste de Ames e para isso foram usadas quatro linhagens com diferentes mutações preexistentes no operon histidina: *Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100 a TA102. Um sistema exógeno de ativação (mistura S9) foi adicionado às culturas de *S. typhimurium* durante o ensaio para mimetizar a metabolização *in vivo* da benzofenona através do sistema de oxidação citocromo P450, extraído de fígado de ratos.

Os resultados mostraram que em nenhuma das concentrações e linhagens utilizadas, a substância induziu o aumento do número de colônias revertentes de forma significativa. Fica evidenciado que o composto não apresenta atividade mutagênica.

Muitos efeitos adversos de agentes quimioterápicos estão relacionados ao risco da geração de stress oxidativo lesando diversos tecidos, com isso estudos são focados em pesquisar agentes com atividade protetora e antioxidante. Tzanova e cols (2009) relataram a baixa toxicidade de benzofenonas e capacidade de redução de espécies reativas de oxigênio induzidas pelo *tert*-Butil hidroperóxido em três linhagens celulares além da proteção de células não-cancerígenas da morte celular induzida pelo mesmo composto.

Quando avaliado quanto à atividade antimutagênica o nemorosone reduziu em 53% a capacidade da mitomicina C causar mutações na linhagem TA102 de *S. typhimurium*. A mitomicina C é uma droga utilizada na terapia anticâncer e os efeitos genotóxicos desses compostos em células não-tumorais são de especial importância, pois, podem induzir tumores secundários em pacientes com câncer (AYDEMIR *et al.*, 2005).

É relatado que compostos extraídos de plantas podem modular a atividade genotóxica de drogas anticâncer e assim reduzir efeitos colaterais (SIDDIQUE *et al.*, 2010). Na maior concentração testada, o nemorosone reduziu em 31% a capacidade mutagênica da aflatoxina frente à linhagem TA100. A aflatoxina é uma potente micotoxina elaborada pelo fungo *Aspergillus* sp e

muitas vezes detectada em diversos tipos de alimentos, incluindo: queijos, leite, carnes, sementes e sucos de frutas (BULLERMAN 1986; EL-NEKEETY *et al.*,2011). Além de mutações gênicas, a aflatoxina pode induzir quebras no DNA, síntese de DNA, inibir mecanismos de reparo, causar aberrações cromossomais, micronúcleo, etc (MADRIGAL-SANTILLÁN *et al.*, 2009). A capacidade do nemorosone de reduzir danos ao DNA causados pela micotoxina, conseqüentemente pode prevenir o desenvolvimento do câncer

5.2. Citotoxicidade e genotoxicidade

Foram realizados testes de citotoxicidade para avaliar concentrações de nemorosone a serem utilizadas nos ensaios E-Screen e Cometa. Foi observada citotoxicidade do nemorosone após 24 horas de tratamento, na concentração de 10^{-5} M, para a linhagem MCF-7 BUS. O composto, nessa concentração, reduziu cerca de 30% do crescimento celular quando comparado ao controle que continha somente células e meio de manutenção. Esses experimentos foram realizados tratando 500 μ L de uma suspensão de 4×10^4 células/mL com 10^{-5} M da benzofenona. Já para a linhagem MCF10A, uma concentração de células 10 vezes menor que a usada para as células cancerígenas (50 μ L da suspensão 4×10^4 células/mL) foram tratados com a mesma concentração do composto e não apresentou indícios de diminuição do crescimento celular. Isso evidenciou que o nemorosone apresenta alta toxicidade para células tumorais e baixa toxicidade para células normais.

Preet *et al.* (2011) relataram que a quinacrina, droga anti-malária, tem grande atividade anticâncer por inibir proliferação celular de células de câncer de mama (MCF-7 BUS) sem alterar células epiteliais normais de mama (MCF10A). Essa inibição está ligada a inibição da topoisomerase, danos ao DNA e alterações no ciclo celular.

No ensaio do cometa foram avaliados os danos ao DNA das células MCF-7 BUS e MCF10A, induzidos pelo nemorosone nas concentrações de 10^{-9} a 10^{-5} M. A concentração de 10^{-5} M, que se apresentou citotóxica nos ensaios de toxicidade, foi também utilizada no experimento para avaliar sua capacidade genotóxica. Os resultados obtidos mostraram que o composto não

induziu genotoxicidade ao DNA das duas linhagens celulares em nenhuma concentração testada, quando comparados ao controle negativo.

5.3. Atividade estrogênica e antiestrogênica

Numerosos extratos de plantas usados como medicamentos naturais têm atividade endócrina, como o extrato de uma árvore indiana (*Azadirachta indica*), usada medicinalmente como contraceptivo e abortivo (FACONER *et al.*, 2003).

Terapias de reposição hormonal, feitas com estrógenos exógenos para amenizar os sintomas da menopausa, muitas vezes não são bem aceitas entre as mulheres, pois têm sido relacionadas ao aumento do risco de câncer de mama (BERAL, 2003) e doenças cardiovasculares (HODIS *et al.*, 2003).

A maioria das células de carcinoma de mama expressam receptores de estrógeno do tipo Era (MICHALIDES *et al.*, 2004; POPOLO *et al.*, 2011). Os fitoestrógenos podem se ligar a esses receptores e induzir a proliferação dessas células cancerígenas (KARAYIANNAKIS *et al.* 1996).

Existe uma grande evidência epidemiológica de que a dieta alimentar esteja relacionada ao desenvolvimento do câncer de mama, sendo um fator importante em sua etiologia (OLEA *et al.*, 1999). Essa idéia fortalece o foco da quimioproteção, estimulando vários grupos de investigação a buscarem constituintes no meio ambiente e na dieta com propriedades anticâncer (ANDROUTSOPOULOS *et al.*, 2009).

Os possíveis riscos associados ao consumo de plantas que possuem atividade estrogênica levam à necessidade de se caracterizar o potencial estrogênico de vegetais e sementes comumente presentes na dieta humana ou usados como plantas medicinais (AGRADI *et al.*, 2002).

Através do ensaio com leveduras recombinantes (RYA) foi avaliado o potencial estrogênico do nemorosone nas concentrações de 0,002 a 40µg/orifício. Nesse teste a expressão do gene repórter é monitorada pela atividade enzimática, os substratos usados geram produtos fáceis de detectar e quantificar. Duas características das leveduras contribuem para o sucesso do ensaio: A

primeira é que esses micro-organismos não possuem um sistema endógeno de receptores nucleares semelhantes ao dos vertebrados, o que poderia interferir no ensaio. A segunda é que nas leveduras a estrutura nativa dos receptores é preservada o que é de grande importância, pois a correta estrutura do ligante no domínio de ligação do receptor determina a especificidade do sistema, isto é, a capacidade de distinguir ligantes de não-ligantes (NOGUEROL *et al.*, 2006).

A atividade estrogênica da benzofenona também foi avaliada pelo ensaio E-Screen, que explora o princípio de que células humanas de câncer de mama MCF-7 BUS proliferam na presença de substâncias químicas que ativam receptores estrogênicos direta ou indiretamente. Neste ensaio as células MCF-7 BUS foram tratadas com as concentrações de nemorosone de 10^{-9} a 10^{-5} M.

O nemorosone não apresentou atividade estrogênica pelo método de RYA e E-Screen nas concentrações testadas, o que é um fator positivo para a utilização desse composto na terapia anticâncer.

Diversos compostos com atividade antiestrogênica são utilizados para bloquear o desenvolvimento do câncer hormônio dependentes, tais como os inibidores seletivos de receptores de estrógeno (tamoxifeno) ou inibidores de aromatase (GOBBI *et al.*, 2007). O nemorosone foi avaliado quanto ao seu potencial antiestrogênico através do Teste de RYA onde junto às leveduras foi adicionado a benzofenona (5 a 40µg/orifício) e o 17 β-estradiol. A capacidade do composto teste em reduzir a fluorescência induzida pelo hormônio foi medida. Os resultados desse ensaio mostraram uma redução na fluorescência de até 42% para a maior concentração testada (40µg/orifício) o que indica que o nemorosone apresenta potencial antiestrogênico.

A atividade antiestrogênica da benzofenona também foi avaliada pelo método de E-Screen, onde a proliferação das células MCF-7 BUS foi medida após crescimento na presença de 17 β-estradiol junto ao nemorosone nas concentrações de 10^{-9} a 10^{-5} M, durante seis dias. Os resultados foram analisados através do ensaio da sulforodamina B onde se observou redução significativa da proliferação celular nas concentrações de 10^{-5} , 10^{-6} e 10^{-8} M confirmando que o composto apresenta atividade antiestrogênica.

Popolo *et al.* (2011) relataram que o nemorosone exerceu atividade antiproliferativa dose-dependente em células MCF-7 que apresentam receptores de estrógeno tipo α ($Er\alpha+$) e não foi tóxico contra células MDA-MD-231 (carcinoma humano de mama) que não apresentam receptores do tipo α ($Er\alpha-$) nem contra células LNCaP, uma linhagem de carcinoma de próstata humana que não possui receptores de estrógeno α e β ($Er\alpha$)($Er\beta$). Essa atividade antiproliferativa parece estar ligada a uma interação entre nemorosone e receptores estrogênicos do tipo α ($Er\alpha+$), pois essa atividade foi reduzida significativamente na presença do estradiol e aumentada na presença do antagonista de receptor α ICI 182,780.

Esses resultados estão de acordo com os obtidos nesse trabalho, onde o nemorosone foi tóxico para células MCF-7BUS, porém não apresentou indícios de toxicidade para células MCF10A que também não apresentam receptores estrogênicos α e β .

A concentração de 10^{-5} M da benzofenona apresentou significativa diminuição da proliferação celular nos ensaios de citotoxicidade após seis dias (40% de proliferação), mas de acordo com os resultados dos ensaios de antiestrogenicidade, não é possível afirmar se esse mecanismo de toxicidade está relacionado somente à capacidade antiestrogênica do composto ou a outro mecanismo de inibição de proliferação.

5.4. Ciclo celular e análise da expressão gênica

A decisão quanto à morte ou sobrevivência celular se origina na fase G2/M do ciclo celular. Assim, atingir essa fase é essencial a sobrevivência das células que não foram reparadas em G1 e S (ERENPREISA e CRAGG, 2001). Em G2/M há a verificação não somente quanto ao término do processo de replicação, mas também quanto à integridade do material genético (LUKAS *et al.*, 2004).

Após avaliação do ciclo celular de MCF-7 BUS por citometria de fluxo, os resultados obtidos mostraram que nas maiores concentrações testadas (10^{-4} M e 5×10^{-5} M) o nemorosone reduziu significativamente a fase G2/M do ciclo, aumentou discretamente o número de células na

fase G1, sem alterar a fase S. Popolo *et al.*, (2011) relataram alterações no ciclo celular induzidas pelo nemorosone em células MCF-7, onde ocorreu aumento de células na fase G0/G1. Apesar das alterações significativas terem ocorrido em diferentes fases, as duas linhagens celulares são derivadas de carcinoma humano de mama, ocorreu arraste de células na fase G1 e os resultados indicam redução da proliferação celular.

Para avaliação da expressão gênica foi utilizada a técnica de RT-qPCR Array, onde um amplo número de genes pode ser avaliado ao mesmo tempo nas mesmas condições experimentais (WESCOTT *et al.*, 2007). Essa PCR permitiu a análise simultânea da expressão de 84 genes de câncer de mama envolvidos em diferentes vias como: angiogênese, ciclo celular, apoptose, adesão, entre outras. Em um total de 84 genes, 20 apresentaram alterações na expressão após tratamento com 5×10^{-5} M de nemorosone.

Diversos genes ligados ao ciclo celular foram alterados, como: *APC* (-3,79), *CCND1* (-1,90), *CCNE1* (-2,38), *MKI67* (-1,51), *MYC* (2,04), *TP53* (2,05). Os genes *CCND1* e *CCNE1*, cujas expressões foram reduzidas após tratamento com nemorosone, são responsáveis pela codificação de ciclinas, definidas como uma família de proteínas reguladoras do ciclo celular que se ligam as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) e governam passos que levam a divisão de células de mamíferos. A expressão das cíclicas D, E, A e B são essenciais para o sucesso da transição de células através das fases G1, S e G2/M do ciclo celular, com isso, perturbações nessas proteínas levam a uma proliferação celular não controlada (TOBIN e BERGH, 2012).

A ciclina D1 além de reguladora do ciclo celular, principalmente da fase G1, pode ser uma indicadora de funcionalidade de receptores estrogênicos. Quando ligada ao estrogênio, esses receptores regulam positivamente o gene *CCND1* e a expressão da ciclina D1. Células Er+ apresentam alta expressão de ciclinas D1 e células Er- apresentam níveis baixos dessa proteína (TOBIN e BERGH, 2012). Uma baixa expressão de receptores estrogênicos ou uma ocupação desses receptores com antagonistas estrogênicos podem levar a uma regulação negativa de *CCND1*.

Alterações na expressão de ciclina E estão associadas não somente a desregulações da fase G1 do ciclo celular, mas também sobre a fase S e G2 (HUNT e KEYOMARSI *et al.*, 2005). A diminuição na expressão dessas ciclinas pode explicar a redução na proliferação celular e diminuição do número de células na fase G2/M do ciclo celular. Modelos experimentais têm relatado o complexo ciclina E-cdk2 e seus inibidores associados p21 e p27 como importantes mediadores antiestrogênicos em células cancerígenas (AKLI e KEYOMARSI, 2004). O estradiol (E₂) tem demonstrado regular positivamente a atividade deste complexo de ciclina-quinase sobre a fase G1 (PLANAS-SILA e WEINBERG, 1997). Por outro lado, o tratamento de células de câncer de mama com os antiestrogênicos puros resulta em inibição do complexo E-cdk2 (HUNT e KEYOMARSI *et al.*, 2005). Com isso, a capacidade antiestrogênica do nemorosone pode explicar a inibição dessas ciclinas.

A proteína Ki-67, codificada pelo gene *MKI67*, é ausente em células quiescentes e expressa em tecidos em proliferação. Existe um grande interesse no seu papel como marcador de proliferação (DE AZAMBUJA *et al.*, 2007). Evidências indicam que os níveis de Ki-67 são baixos durante G1 e início da fase S e aumentam progressivamente para atingir um máximo durante a mitose (URRUTICOECHEA, 2005). Alta expressão de Ki-67 está relacionada com aumento do tamanho do tumor e presença de metástases (PENG, 2012). Nossos resultados mostraram que o nemorosone diminuiu a expressão de *MKI67* em 1,51 vezes o que leva a uma redução na proliferação das células cancerígenas.

Outra evidência de que a benzofenona avaliada atua como um composto antitumoral é a indução do aumento da expressão do supressor tumoral *TP53* em 2,05 vezes. Alshatwi *et al.* (2011) relataram a atividade antitumoral do extrato metanólico de limão sobre linhagem de células MCF-7 *in vitro*. A morte celular por apoptose foi analisada utilizando o ensaio TUNEL e associada ao aumento da expressão de *TP53* e caspase-3. O gene *TP53* codifica a proteína p53, um fator de transcrição induzido pelo stress, que exerce atividades antiproliferativas através da regulação de genes envolvidos no controle da apoptose, checkpoints do ciclo celular, reparação do DNA,

senescência e metabolismo (ANAGANTI *et al.*, 2011). A perda da função normal dessa proteína é a alteração genética mais comum em todos os tipos de câncer de mama (BOULAIZ, *et al.*, 2011).

O gene *MLH1* também está envolvido na apoptose e é regulado pela proteína p53. (KAPLAN e GUNDUZ, 2012). A resposta celular a danos no DNA requer a ativação de *MLH1*, que pode cooperar com o gene supressor de tumor *Tp53* para promover a parada no ciclo e morte celular. Juntamente com o gene *TP53*, *MLH1* também foi positivamente regulado (1,85 vezes) pelo nemorosone (CHEN e SADOWSKI, 2005).

Outro gene regulado positivamente pela benzofenona foi *MYC* (2,04 vezes mais expresso). O aumento da expressão de *MYC* transforma células em cultura, provoca tumores malignos em animais e humanos e é encontrado em muitos tumores. Porém, esse poderoso oncogene também pode atuar como um supressor de motilidade celular, reduzir a capacidade de invasão e metástase. Liu *et al.* (2012) relataram que a expressão elevada de *MYC* reduziu a motilidade e invasão de células de câncer de mama *in vitro*. Além da sua capacidade de invasão local, sua capacidade em formar metástases distantes também foi reduzida. Concomitantemente, o aumento na expressão de *MYC* inibiu focos de adesão.

A via de transdução de sinal Wnt tem um papel bem estabelecido na promoção da proliferação e diferenciação celular em vertebrados e invertebrados. Estudos recentes revelaram que, durante o desenvolvimento normal, a sinalização Wnt também tem um papel essencial na promoção da apoptose. Em algumas células que não são normalmente destinadas a morrer, a perda da expressão do gene *APC* ativa sinalizações Wnt que resultam em morte apoptótica excessiva, revelando que a *APC* é necessário para promover a sobrevivência da célula em diferentes contextos de desenvolvimento (BENCHABANE *et al.*, 2009). O gene *APC* está envolvido em diferentes vias como ciclo celular, adesão, apoptose e danos ao DNA e sua expressão foi reduzida em 3,79 vezes após tratamento com nemorosone.

Confirmando os resultados dos ensaios de RYA e E-Screen que indicaram atividade antiestrogênica do nemorosone, os resultados da PCR Array mostraram uma diminuição na

expressão do gene que codifica receptores de estrógeno α (ESR1)(2 vezes menos expresso) e um aumento na expressão do gene de receptor de estrógeno β (ESR2)(2,1 vezes mais expresso). É conhecido que células de câncer de mama frequentemente dependem de estrógeno para se proliferar. Com isso, o tratamento desse tipo de câncer com compostos antiestrogênicos leva a alterações no ciclo celular ou apoptose. O efeito proliferativo do estradiol é mediado por $ER\alpha$ que regula múltiplos fatores envolvidos no ciclo celular (FRASOR *et al.*, 2003). Por outro lado, $ER\beta$ tem uma função antiproliferativa e na maioria dos casos, quando ativado, trabalha como um inibidor do $ER\alpha$ (LOFGREN *et al.*, 2006).

Compostos seletivos para receptores estrogênicos do tipo β podem apresentar uma capacidade antiproliferativa mais potente do que os não seletivos, como é o caso do E_2 que ativa receptores α e β . A alta ingestão de fitoestrógenos está associada com uma baixa incidência de câncer de mama, (ADLERCREUTZ, 2002) devido ao fato de se ligarem seletivamente a $ER\beta$ e recrutarem correguladores para $ER\beta$ ativar a transcrição ou repressão, enquanto o E_2 se liga igualmente a $ER\alpha$ e $ER\beta$ (AN *et al.* 2001). PARUTHIYIL *et al.* (2004) relataram que fitoestrógenos e estrógenos desenhados para ativar seletivamente $ER\beta$ não induzem a formação de câncer de mama, sendo também uma alternativa mais segura para ser utilizada em formulações de reposição hormonal.

O gene *PGR* que codifica receptores de progesterona é um importante gene que tem sua transcrição diretamente regulada pelo $ER\alpha$. Para confirmar a importância do 17β -estradiol na expressão de *PGR* através de $ER\alpha$, Wong Jeong *et al.* (2012) trataram células MCF-7 com o antagonista de $ER\alpha$ ICI 182.780 e esse tratamento inibiu a expressão de *PGR*. Por outro lado, células $ER\alpha$ - (negativo) não alteraram níveis de expressão de *PGR* após tratamento com E_2 , isso mostra a relação entre a diminuição da expressão de *PGR*(-3,08) e *ESR1*($ER\alpha$)(-2,10).

Outro exemplo de que o estrógeno regula a proliferação e propriedades invasivas de células de câncer de mama que apresentam receptor de estrógeno foi relatado por Choi *et al.* (2000), que identificaram que a queratina 19 (K19), codificada pelo gene *KRT19*, um dos principais filamentos

intermediários celulares, está sob regulação rápida e direta do estrogênio em células MCF-7. O acúmulo maior de proteína K19 é observada por 8 horas após exposição ao E₂ e esses níveis continuam aumentando em até 24-48 horas após o tratamento. A supressão do gene *KRT19* após a adição de ICI 182.780 (antiestrogênico) sugere que receptores estrogênicos são responsáveis por essa regulação. A K19 é uma das principais proteínas do citoesqueleto das células epiteliais e representa um marcador para células tumorais epiteliais. Além disso, está relacionada à disseminação metastática precoce devido a sua liberação na corrente sanguínea. Essa proteína pode ser encontrada na medula-óssea de pacientes com cancer mama levando a uma metástase (ALIX-PANABIÈRES *et al.*, 2009). A expressão do gene *KRT19* foi 4,09 vezes menos expresso após tratamento com a benzofenona.

A glicoproteína humana tipo mucina, MUC1, é encontrada na membrana plasmática de células secretoras epiteliais normais. MUC1 é expresso em níveis elevados em toda a superfície das células de carcinoma. A alta expressão de MUC1 encontrada em carcinomas humanos e certas malignidades hematológicas induz a transformação e a resistência à apoptose induzida por agentes genotóxicos, espécies reativas de oxigênio e de hipóxia. Estudos demonstram que a MUC1 se liga diretamente a caspase-8 e, assim, impede a ativação da via do receptor de morte apoptótica por via extrínseca (AGATA *et al.*, 2008). *MUC1* foi regulado negativamente pelo nemorosone (-1,59) o que indica um aumento a suscetibilidade a apoptose.

O aumento da expressão de *THBS1* em células de carcinoma da mama e células de glioblastoma diminui o crescimento de tumores em modelos animais. Esta atividade supressora é devido, pelo menos em parte, a atividade anti-angiogênica de trombospondina (TSP1), codificada por esse gene. *THBS1* antagoniza a proliferação estimulada de fatores de crescimento e migração de células endoteliais (CHANDRASEKARAN *et al.*, 1999). Chandrasekaran, *et al.* (1999) demonstraram que a atividade anti-angiogênica é o principal mecanismo para a supressão do crescimento do tumor em células de carcinoma da mama, (MDA-MB-435), transfectadas com *THBS1*. Por super-expressão a trombospondina inibiu fortemente o crescimento do tumor *in vivo*

(SARGIANNIDOU *et al.*, 2001) mas não alterou significativamente a motilidade e proliferação *in vitro*. Contudo, doses exógenas mais elevadas de TSP1 inibiram diretamente a proliferação destas células *in vitro*. Em nossos estudos esse gene foi 1,58 vezes mais expresso.

Zheng *et al.* (2007) relataram que a super-expressão do gene *NOTCH1* (2, 85 vezes mais expresso neste estudo) inibiu o crescimento de células A549 de adenocarcinoma de pulmão *in vitro* através da parada do ciclo celular e suprimiu o crescimento de tumores em ratos. Outro gene regulado positivamente (2,10 vezes) foi *PRDM2* ou *RIZ*. Esse gene é um supressor tumoral inativado em cânceres humanos. Estudos pré-clínicos em animais mostraram que um adenovírus recombinante que expressa esse gene, pode suprimir o crescimento de xeno-enxertos de câncer de cólon. Portanto, *RIZ* promete ser um bom alvo na geração de produtos de terapia genética (GELI *et al.*, 2010).

A via de MAPK/ERK (proteína-quinase ativada por mitógeno) é uma das vias de sinalização mais importantes e estudadas. Pois, regula o crescimento, a proliferação, diferenciação e sobrevivência de muitos tipos de células (ORTON *et al.*, 2005). As MAPK abrangem grande número de proteínas, tais como ERK1-ERK3 (quinase regulada por sinal extracelular), codificadas pelos genes *MAPK1(ERK2)* e *MAPK3(ERK1)*. O nemorosone aumentou a expressão dos genes *MAPK1(ERK2)* e *MAPK3(ERK1)* em 1,45 e 1,72 vezes, respectivamente. A ativação da via de ERK1/2 é normalmente associada a proliferação e sobrevivência celular. No entanto, essa via estimula a apoptose em resposta a doxorubicina, taxol ou o tamoxifeno (antagonista de receptor estrogênico) em células MCF-7 (BACUS *et al.*, 2001; YEH *et al.*, 2004, ZHENG *et al.*, 2007).

Outros genes como: *GRB7*, *IGFBP3* e *VEGFA* também foram alterados mas não há relação observada entre essa alteração com a diminuição na proliferação ou qualquer atividade pró-apoptótica.

As alterações na expressão de diversos genes ligados ao ciclo celular, apoptose e via de receptores esteroidais justificam a atividade antiproliferativa desse composto. O nemorosone afetou a expressão de receptores estrogênicos, o que levou a alterações na expressão de diversos outros

genes. Isso justifica a maior citotoxicidade desse composto frente a células MCF-7 BUS ($E\alpha+$, $E\beta+$) do que frente a células normais de mama MCF10A ($E\alpha-$, $E\beta-$). A atividade antitumoral dessa benzofenona parece estar relacionada a sua atividade antiestrogênica.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Esses estudos contribuíram para esclarecer a capacidade mutagênica, genotóxica e estrogênica do nemorosone, além de sua ação sobre o ciclo celular e alterações na expressão de diferentes genes de células de câncer de mama (MCF-7 BUS).

O nemorosone não apresentou atividade mutagênica nas concentrações avaliadas pelo Teste de Ames e foi capaz de inibir mutações induzidas pela mitomicina C e aflatoxina apresentando potencial antimutagênico.

De acordo com os resultados obtidos pudemos observar que o composto apresentou maior citotoxicidade frente a células de câncer de mama do que frente a células normais de mama; não apresentou atividade genotóxica e estrogênica e inibiu os efeitos induzidos pelo hormônio 17 β -estradiol, mostrando-se antiestrogênico.

O nemorosone reduziu significativamente a fase G2/M do ciclo celular de MCF-7 BUS e alterou a expressão de 20 genes ligados a via de receptores esteroidais, ciclo celular, apoptose, supressores tumorais, entre outros, dessa mesma linhagem celular. De acordo com os resultados obtidos, o nemorosone apresenta promissora atividade antitumoral sobre câncer de mama.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLERCREUTZ, H. Phytoestrogens and breast cancer. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.**, v.83, p. 113–118, 2002
- ADLERCREUTZ, H.; MAZUR, W. Phyto-oestrogens and Western diseases. **Ann Med.**, v.29, p. 95-120, 1997.
- AGATA, N.; AHMAD, R.; KAWANO, T.; RAINA, D.; KHARBANDA, S.; KUFU, D. MUC1 oncoprotein blocks death receptor-mediated apoptosis by inhibiting recruitment of caspase-8. **Cancer Res.**, v.68, n.15, p.6136-44, 2008.
- AGRADI, E.; FICO, G.; CILLO, F.; FRANCISCI, C.; TOMÈ, F. Estrogenic activity of *Nigella damascena* extracts, evaluated using a recombinant yeast screen. **Phytother Res.**, v.16, p.414-6, 2002.
- AKLI, S.; KEYOMARSI, K. Low-molecular-weight cyclin E: the miss-ing link between biology and clinical outcome. **Breast Cancer Res.**, V.6, n.5, p.188-91, 2004.
- ALBERTS, D.S.; EINSPAHR, J.; RITENBAUGH, C.; AICKIN, M.; REES-MCGEE, S.; ATWOOD, J.; EMERSON, S.; MASON-LIDDIL, N.; BETTINGER, L.; PATEL, J.; BELLAPRAVALU, S.; RAMANUJAM, P.S.; PHELPS, J.; CLARK, L. The effect of wheat bran fiber and calcium supplementation on rectal mucosal proliferation rates in patients with resected adenomatous colorectal polyps. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v.6, p.161-9, 1997.
- ALIX-PANABIÈRES, C.; VENDRELL, J.P.; SLIJPER, M.; PELLÉ, O.; BARBOTTE, E.; MERCIER, G.; JACOT, W.; FABBRO, M.; PANTEL, K. Full-length cytokeratin-19 is released by human tumor cells: a potential role in metastatic progression of breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v.11, n.3, p. R39, 2009.
- ALSHATWI, A.A.; SHAFI, G.; HASAN, T.N.; AL-HAZZANI, A.A.; ALSAIF, M.A.; ALFAWAZ, M.A.; LEI, K.Y.; MUNSHI, A. Apoptosis-mediated inhibition of human breast cancer cell proliferation by lemon citrus extract. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v.12, n.6, p.1555-9, 2011.
- AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, v. 221, p. 1256 - 1264, 1983.
- ANAGANTI, S.; FERNÁNDEZ-CUESTA, L.; LANGERØD, A.; HAINAUT, P.; OLIVIER, M. p53-Dependent repression of focal adhesion kinase in response to estradiol in breast cancer cell-lines. **Cancer Lett.**, v.300, n.2, p.215-24, 2011.
- ANDROUTSOPOULOS, V.; WILSHER, N.; ARROO, R.J.; POTTER, G.A. Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450. **C Let.**, v. 274, p. 54 - 60, 2009.
- AYDEMIR, N.; CELIKLER, S.; BILALOGLU, R. In vitro genotoxic effects of the anti-cancer drug gemcitabine in human lymphocytes. **Mutat Res.**, v.582, p. 35–41,2005.
- BACUS, S.S.; GUDKOV, A.V.; LOWE, M.; LYASS, L.; YUNG, Y.; KOMAROV, A.P. KEYOMARSI, K.L.; YARDEN, Y.; SEGER, R. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. **Oncogene**, v.20, n.2, p.147-55, 2001.
- BALUCHAMY, S.; ZHANG, Y.; RAVICHANDRAN, P.; RAMESH, V.; SODIPE, A.; HALL, J.C.; JEJELOWO, O.; GRIDLEY, D.S.; WU, H.; RAMESH, G.T. Differential oxidative stress gene

expression profile in mouse brain after proton exposure. **In Vitro Cell Dev Biol Anim.**, v.46, n.8, p.718-25, 2010.

BAKER, V.A. Endocrine disrupters-testing strategies to assess human hazard. **Toxicol in Vitro**, v. 15, p. 413–19, 2001.

BASSO L.A., DA SILVA L.H., FETT-NETO A.G., DE AZEVEDO W.F. JR, MOREIRA IDE S., PALMA M.S., CALIXTO J.B., ASTOLFI FILHO S., DOS SANTOS R.R., SOARES M.B., SANTOS D.S. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases--a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v.100,n.6, p.475-506, 2005

BAUER, E; RECKNAGEL, R.; FIEDLER, U.; WOLLWEBER, L.; BOCK, C.; GREULICH, K. The distribution of the tail moments in single cell gel electrophoresis (Comet assay) obeys a Chi-square (χ^2) not a Gaussian distribution, **Mutat Res.**, v. 398, p. 101–110, 1998.

BENCHABANE, H.; AHMED, Y. The adenomatous polyposis coli tumor suppressor and Wnt signaling in the regulation of apoptosis. **Adv Exp Med Biol.**, v.656, p.75-84, 2009.

BERAL, V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. **Lancet.**, v.362. p.419-27, 2003.

BERCKMANS, B; DE VEYLDER, L. Transcriptional control of the cell cycle, **Curr Opin Plant Biol.**, v.5, p.599-605, 2009.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J.; PIKE, MC. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutat Res.**, v.97, p.267-81, 1982.

BOULAIZ, H.; ALVAREZ, P.J.; PRADOS, J.; MARCHAL, J.; MELGUIZO, C.; CARRILLO, E.; PERAN, M.; RODRÍGUEZ, F.; RAMÍREZ, A.; ORTÍZ, R.; ARÁNEGA, A. gef Gene Expression in MCF-7 Breast Cancer Cells is Associated with a Better Prognosis and Induction of Apoptosis by p53-Mediated Signaling Pathway. **Int J Mol Sci.**, v.12, n.11, 2011.

BULANAS, M.J; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sci.**, v.78, p.431-41, 2005.

BULLERMAN, L.B. Mycotoxins and food safety. **Food Technol.**, V. 40, P. 59-66, 1986.

BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS A. R.; ESCOBAR, P.; HONMS, M.; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMA, M; SASAKI, Y. F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutat Res.**, v. 627, p. 31-35, 2007.

CARDOSO, C.R.P.; CÓLUS, I.M.S.; BERNARDI, C.C.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, p. 55–63, 2006.

CHADWICK, D. J.; MARSH, J.; **Bioactive Compounds from Plants**. John Wiley, New York, USA, 1990.

CHANDRASEKARAN, S.; GUO, N.; RODRIGUES, R.G.; KAISER, J.; ROBERTS, D. D. Pro-adhesive and Chemotactic Activities of Thrombospondin-1 for Breast Carcinoma Cells Are Mediated by $\alpha 3\beta 1$ Integrin and Regulated by Insulin-like Growth Factor-1 and CD98. **J Biol Chem.**, v.274, n.16, p.11408-16, 1999.

CHEN, H.H.; CHIANG, W.; CHANG, J.Y.; CHIEN Y.L.; LEE, C.K.; LIU, K.J.; CHENG, Y.T.; CHEN, T.F.; KUO, Y.H.; KUO, C.C. Antimutagenic Constituents of Adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) with Potential Cancer Chemopreventive Activity. **J Agric Food Chem.**, Article ASAP, 2011.

CHEN, J.; SADOWSKI, I. Identification of the mismatch repair genes PMS2 and MLH1 as p53 target genes by using serial analysis of binding elements. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v.102, n.13, p.4813-8, 2005.

CHOI, I.; GUDAS, L.J.; KATZENELLENBOGEN, B.S. Regulation of keratin 19 gene expression by estrogen in human breast cancer cells and identification of the estrogen responsive gene region. **Mol Cell Endocrinol.**, v.164, n.1-2, p.225-37, 2000.

CORDELL, G.A.; KINGHORN, A.D.; PEZZUTO, J.M. Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. In: *Bioactive Natural Products: Detection, isolation and structure determination*, COLEGATE, S.M. e MOLYNEUX, R.J. Eds CRC Press, Boca Raton, USA, 1993, p. 199-200.

CUESTA-RUBIO, O.; FRONTANA-URIBE, B.A.; RAMÍREZ-APAN, T.; CÁRDENAS, J. Polyisoprenylated benzophenones in cuban propolis; biological activity of nemorosone. **Z Naturforsch. [C]**, v. 57, p. 372-378, 2002.

CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A.L.; FERNANDEZ, M.C.; HERNÁNDEZ, I.M.; ROSADO, A.; RASTRELLI, L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. **Agric Food Chem.**, v. 55, p. 7502-9, 2007.

CUESTA-RUBIO, O.; VELEZ-CASTRO, H.; FRONTANA-URIBE, B.A.; CARDENAS, J. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 270-83, 2001.

DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of the cell cycle: In search for perfect methodology for DNA content analysis in tissue specimens. **Cell Cycle**, v.9, p.3395-6, 2010.

DE AZAMBUJA, E.; CARDOSO, F.; DE CASTRO, G. JR.; COLOZZA, M.; MANO, M.S.; DURBECQ. V.; SOTIRIOU, C.; LARSIMONT, D.; PICCART-GEBHART, M.J.; PAESMANS, M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. **Br J Cancer.**, v.96, n.10, p.1504-13, 2007.

DE FLORA, S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Res.**, v. 402, p. 151 - 158, 1998.

DE SÁ FERREIRA, I.C.F.; FERRÃO VARGAS, V.M. Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/microsome assay. **Phytother Res.**, v. 13, p. 397-400, 1999.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; RIVERO-CRUZ, I.; ARRIAGA-ALBA, M.; CASTAÑEDA-CORRAL, G.; ANGELES-LÓPEZ, G.E.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. **J Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 334–342, 2007.

DÍAZ-CARBALLO, D.; MALA, S.; BARDENHEUER, W.; FREISTUEHLER, M.; REUSCH, H.P. Cytotoxic activity of nemorosone in neuroblastoma cells. **J Cell Mol Med.**, v. 12, p. 2598-608, 2008.

DÍAZ-CARBALLO, D.; MALAK, S.; FREISTÜHLER, M.; ELMAAGACLI, A.; BARDENHEUER, W.; REUSCH, H.P. Nemorosone blocks proliferation and induces apoptosis in leukemia cells. **Int J Clin Pharmacol Ther.**, v.46, n.8, p.428-39, 2008.

DIAZ-CARBALLO, D.; SEEBER, S.; STRUMBERG, D.; HILGER, R.A. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. **Int J Clin Pharmacol Ther.**, v.41, p. 622-3, 2003.

EDEN, J.A. Phytoestrogens for menopausal symptoms: a review. **Maturitas**, v.72, n.2, p.157-9, 2012.

EL-NEKEETY, A.A.; MOHAMED, S.R.; HATHOUT, A.S.; HASSAN, N.S.; ALY, S.E.; ABDEL-WAHHAB, M.A. Antioxidant properties of *Thymus vulgaris* oil against aflatoxin-induced oxidative stress in male rats. **Toxicol.**, v.57, p.984-91, 2011.

ERENPREISA, J.; CRAGG, M.S. Mitotic death: a mechanism of survival? A review. **Cancer Cell Int.**, v.23, p.1, 2001

FALCONER, I.R.; MOORE, M.R.; CHAPMAN, H.F.; RANMUTHUGALA, G.R. Review of endocrine disruptors in the context of Australian drinking water, Occasional Paper N. 7, **CRC for Water Quality and Treatment**, 2003.

FANG H., TONG W., PERKINS R., SOTO A.M., PRECHTL N.V., SHEEHAN D.M. Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities **Environ Health Perspect.**, v.108, n.8, p.723-9, 2000.

FERGUSON, L.R., TURNER, P.M. Mutagenic, recombinogenic and antimitochondrial effects of nitracrine analogues in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mutat Res.**, v.187, p. 209–17, 1987.

FIORIO, R.; VELLOSI, R.; BRONZETTI, G. Effects of spermine on formation of HGPRT mutants induced by ethylmethanesulfonate, methylmethanesulfonate, and mitomycin C in V79 Chinese hamster cells. **Environ Mol Mutagen.**, v.23, p. 94-8, 1994.

FRASOR, J.; DANES, J.M.; KOMM, B.; CHANG, K.C.; LYTTLE, C.R.; KATZENELLENBOGEN, B.S. Profiling of estrogen up- and down-regulated gene expression in human breast cancer cells: insights into gene networks and pathways underlying estrogenic control of proliferation and cell phenotype. **Endocrinol.**, v.144, p.4562-74, 2003.

GARCÍA-CAÑAS, V.; SIMÓ, C.; LEÓN, C.; CIFUENTES, A. Advances in Nutrigenomics research: novel and future analytical approaches to investigate the biological activity of natural compounds and food functions. **J Pharm Biomed Anal.**, v.51, n.2, p. 290-304, 2010.

GARCIA-REYERO, N.; REQUENA, V.; PETROVIC, M.; FISCHER, B.; HANSEN, P. D.; DÍAZ, A.; VENTURA, F.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Estrogenic potential of halogenated derivatives of nonylphenol ethoxylates and carboxylates. **Environ Toxicol Chem**, v. 23, n. 3, p. 705 – 711, 2004.

GARCIA-REYERO, N.; PIÑA, B.; GRIMALT, J. O.; FERNÁNDEZ, P.; FONTS, R.; POLVILLO, O.; MARTRAT, B. Estrogenic activity in sediments from European mountain lakes. **Environ Sci Technol.**, v. 39, p. 1427-35, 2005.

GELI, J.; KISS, N.; KOGNER, P.; LARSSON, C. Suppression of RIZ in biologically unfavourable neuroblastomas. **Int J Oncol.**, v.37, n.5, p.1323-30, 2010.

GIESY, J.P.; HILSCHEROVA, K.; JONES, P.D.; KANNAN, K.; MACHALA, M. Cell bioassays for detection of aryl hydrocarbon (AhR) and estrogen receptor (ER) mediated activity in environmental samples. **Mar Pollut Bull.**, v.45, p.3-16, 2002.

GOBBI S., CAVALLI A., NEGRI M., SCHEWE K.E., BELLUTI F., PIAZZI L., HARTMANN R.W., RECANATINI M., BISI A. Imidazolylmethylbenzophenones as highly potent aromatase inhibitors. **J Med Chem.**, v.50,n.15,p.3420-22, 2007.

GOHIL, K.; CHAKRABORTY, A.A. Applications of microarray and bioinformatics tools to dissect molecular responses of the central nervous system to antioxidant micronutrients. **Nutrition.** v.20, n.1, p.50-5, 2004.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: **Mutagênese Ambiental.** Org: Ribeiro, L. R.; Salvadori, D.D M. F.; Marques, E. K. Canoas: Ulbra, p. 247-279, 2003.

GREEN, S.; CHAMBON, P. The oestrogen receptor: from perception to mechanism. In **Nuclear Hormone Receptors** (Parker, M. G., ed.), pp 15-38, Academic Press, London, 1991.

GREENBLATT, M.S.; BENNETT, W.P.; HOLLSTEIN, M.; HARRIS, C.C. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4855-78, 1994.

HAHN, W.C.; WEINBERG, R.A.. Rules for making human tumor cells. **N Engl J Med.**, v.347, p.1593-603, 2002.

HARTMANN, A. A.; ARGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R. R.; 4TH International Comet Assay Whorkshop. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v.18, p. 45-51, 2003.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J.T.; GATEHOUSE, D.G.; ADLER, I.D.; BLAKEY, D.H.; DERTINGER, S.D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environ Mol Mutagen.**, v. 35, p. 234-52, 2000.

HODIS, H. N.; MACK, W. J.; AZEN, S. P.; LOBO, R. A.; SHOUBE, D.; MAHRER, P. R.; FAXON, D.P.; CASHIN-HEMPHILL, L.; SANMARCO, M. E.; FRENCH, W. J.; SHOOK, T. L.; GAARDER, T. D.; MEHRA, A. O.; RABBANI, R.; SEVANIAN, A.; SHIL, A. B.; TORRES, M.; VOGELBACH, K. H.; SELZER, R.H. Hormone therapy and the progression of coronary-artery atherosclerosis in postmenopausal women. **N Engl J Med.**, v. 349. p. 535-45, 2003.

HOFFMANN, G.R., CALCIANO, M.R., LAWLESS, B.M., MAHONEY, K.M.. Frameshift mutations induced by three classes of acridines in the lacZ reversion assay in Escherichia coli:

potency of responses and relationship to slipped mispairing models. **Environ Mol Mutagen.**, v. 42, p. 111–21, 2003.

HUNT, K.K.; KEYOMARSI, K. Cyclin E as a prognostic and predictive marker in breast cancer. **Semin Cancer Biol.**, v.15, n.4, p.319-26, 2005.

KAPLAN, E.; GÜNDÜZ, U. Expression analysis of TOP2A, MSH2 and MLH1 genes in MCF7 cells at different levels of etoposide resistance. **Biomed Pharmacother.**, v.66, n.1, p.29-35, 2012.

KARAYIANNAKIS, A.J.; BASTOUNIS, E.A.; CHATZIGIANNI, E.B.; MAKRI, G.G.; ALEXIOU, D.; KARAMANAKOS, P. Immunohistochemical detection of oestrogen receptors in ductal carcinoma *in situ* of the breast.. **Eur J Surg Oncol.** , v.22, p. 578-82, 1996.

KEYOMARSI, K.; PARDEE, A. B. Selective protection of normal proliferating cells against the toxic effects of chemotherapeutic agents. **Prog Cell Cycle Res.**, v.50, p. 527-32, 2003.

KNASMUELLER, S.; HOLLAND, N.; WULTSCH, G.; JANDL, B.; BURGAS, S.; MISÍK, M.; NERSESYAN, A. Use of nasal cells in micronucleus assays and other genotoxicity studies. **Mutagenesis**, v. 26, p. 231-8, 2011.

KO K.P., PARK S.K., PARK B., YANG J.J., CHO L.Y., KANG C., KIM C.S., GWACK J., SHIN A., KIM Y., KIM J., YANG H.K., KANG D., CHANG S.H., SHIN H.R., YOO K.Y. Isoflavones from phytoestrogens and gastric cancer risk: a nested case-control study within the Korean Multicenter Cancer Cohort. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v.19, n.5,p.1292-300, 2010.

KONAN N.A., BACCHI E.M., LINCOPAN N., VARELA S.D., VARANDA E.A. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). **J Ethnopharmacol.**, v.110, n.1, p. 30-8, 2007.

LAKASHMI, B.; AJITH, T. A.; SHEENA, N.; GUNAPALAN, N.; JANARDHANA, K. K.; Antiperoxidative, anti-inflammatory, and antimutagenic activities of ethanol extract of the mycelium of *Ganoderma lucidum* occurring in South India. **Teratogen Carcinogen Mutagen.** Suppl 1, p. 85-97, 2003.

LIAO, W.; MCNUTT, M.A.; ZHU, W.G. The comet assay: a sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 49, p. 46-53, 2009.

LIRA, W.M.; DOS SANTOS, F.V.; SANNOMYA, M.; RODRIGUES, C.M. VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. **J Med Food**, v.11, n.1, p.111-9, 2008.

LIU, H.; RADISKY, D.C.; YANG, D.; XU, R.; RADISKY, E.S.; BISSELL, M.J.; BISHOP, J.M. MYC suppresses cancer metastasis by direct transcriptional silencing of αv and $\beta 3$ integrin subunits. **Nat Cell Biol.**, v.14, n.6, p.567-74, 2012.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, v.25, p.402-8, 2001.

LIVIERO, L.; VON BORSTEL, R. C. The 4th International Conference on Mechanisms of antimutagenesis and anticarcinogenesis: a summary. **Mutat Res.**, v.350, p.287-93, 1996.

LÖFGREN, L.; SAHLIN, L.; VON SCHOULTZ, B.; FERNSTAD, R.; SKOOG, L.; VON SCHOULTZ, E. Expression of sex steroid receptor subtypes in normal and malignant breast tissue - a pilot study in postmenopausal women. **Acta Oncol.**, v.45, n.1, p.54-60, 2006.

LOKVAM, J.; BRADDOCK, J.F.; REICHARDT, P.B.; Clausen, T.P. Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). **Phytochemistry**,v.55, p.29-34, 2000.

LUKAS, J.; LUKAS, C.; BARTEK, J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. Review. **DNA Repair**, v.8-9, p.997-1007, 2004.

MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; MORALES-GONZÁLEZ, J.A.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M.; REYES-ARELLANO, A.; MADRIGAL-BUJAI DAR, E. Investigation on the protective effect of alpha-mannan against the DNA damage induced by aflatoxin B(1) in mouse hepatocytes. **Int J Mol Sci.**, v. 10, p. 395-406, 2009.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat Res**, v. 113, p. 173-215, 1983.

MASEK, T.; VOPALENSKY, V.P.; SUCHOMELOVA, P.; POSPISEK, M. Denaturing RNA electrophoresis in TAE agarose gels. **Anal Biochem.**, v.336, n.1, p.46-50, 2005.

MATÉS, J.M.; SEGURA, J.A.; ALONSO, F.J.; MÁRQUEZ, J. Anticancer antioxidant regulatory functions of phytochemicals. **Curr Med Chem.**, v. 18, p. 2315-38, 2011.

MATSUMURA, A., GHOSH, A., POPE, G.S., DARBRE, P.D. Comparative study of oestrogenic properties of eight phytoestrogens in MCF7 human breast cancer cells. **J Steroid Biochem Mol Biol.**, v.94, p. 431-43, 2005.

MERK, O.; SPEIT, G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. **Environ Mol Mutagen.**,v. 33, p. 167-172, 1999.

MICHALIDES, R.; GRIEKSPoor, A.; BALKENENDE, A.; VERWOERD, D.; JANSSEN, L.; JALINK, K.; FLOORE, A.; VELDS, A.; VAN'T VEER, L.; NEEFJES, J. Tamoxifen resistance by a conformational arrest of the estrogen receptor alpha after PKA activation in breast cancer. **Cancer Cell**, v.6, p. 597-605, 2004.

MØLLER, P.; MÖLLER, L.; GODSCHALK, R.W.; JONES, G.D. Assessment and reduction of comet assay variation in relation to DNA damage: studies from the European Comet Assay Validation Group. **Mutagenesis**, v.25, p.109-11, 2010.

MORGAN, D.O. The Cell-Cycle control system. In: MORGAN, D.O.: The cell cycle: Principles of control, **New Science Press**, 2007, London, England, p. 28-57.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Assay. **Mut Res.**, v. 455, p. 29 - 60, 2000.

MOSQUETTE, R.; SIMÕES, M.J.; JÚNIOR, J.M.S.; SIMÕES, R.S.; SILVA, I.D.C.G.; CARVALHO, N.A.; BARACAT, E.C. Mecanismos Moleculares e Efeitos das Isoflavonas em Mulheres. **Arq Bras Fitom Cient.**, v. 2, n. 1, p. 24 - 32, 2005.

- MOSSELMANN, S.; POLMAN, J.; DIJKEMA, R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. **FEBS letts**, v. 392, n° 1, p. 49 - 53, 1996.
- NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Crit Rev Food Sci Nutr.**, v.29, p. 273-300, 1990.
- NARAYANAN, R.; TIWARI, P.; INOA, D.; ASHOK, B.T. Comparative analysis of mutagenic potency of 1-nitro-acridine derivatives. **Life Sci.**, v. 77, p. 2312-23, 2005.
- NATARAJAN, A.T.; PALITTI, F. DNA repair and chromosomal alterations. **Mutat Res.**, v.657, p. 3-7, 2008.
- NEBERT, D. W. Transcription factors and cancer: an overview. **Toxicol.** v.181-2, p. 131-41, 2002.
- NEIGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. **Food Chem.**, v. 80, p. 393-7, 2003.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod.**, v.66, p.1022-37, 2003.
- NOGUEROL, T. N.; BORONAT, S.; CASADO, M.; RALDÚA, D.; BARCELÓ, D.; PIÑA, B. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. **Anal Bioanal Chem.**, v. 385, p. 1012-19, 2006.
- NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; HURTINGTON, F. W. **Thompson & Thompson Genética Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002, 387 pp.
- OH, S-M.; CHUNG, K-H.; Estrogenic activities of *Ginkgo biloba* extracts. **Life Sci.**, v. 74, p. 1325 - 1335, 2004.
- OLEA, N.; PAZOS, P.; FERNÁNDEZ, M.F.; RIVAS, A.; OLEA-SERRANO, F.; PEDRAZA, V. Phyto and mycoestrogens (xenoestrogens) as a preventable cause of breast cancer. I. **J. Med. Biol. Environ.**, v. 27, n°1, p. 55 - 60, 1999.
- ORTON, R.J.; STURM, O. E.; VYSHEMIRSKY, V.; CALDER, M.; GILBERT, D.R.; KOLCH, W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. **Biochem J.**, v.392, n.2, p.249-61, 1005.
- PAGANO, B.; PAVONE, M.; PICCINELLI, A.L.; RASTRELLI, L.A.; CUESTA-RUBIO, O.; MATTIA, C.A.; BARONE, V. Structural and conformational investigation of nemorosone: A combined X-ray and quantum mechanical study. **Chemical Physics Letters**, v. 462, p. 158-63, 2008.
- PARDO-ANDREU, G.L.; NUÑEZ-FIGUEREDO, Y.; TUDELLA, V.G.; CUESTA-RUBIO, O.; RODRIGUES, F.P.; PESTANA, C.R.; UYEMURA, S.A.; LEOPOLDINO, A.M.; ALBERICI, L.C.; CURTI, C. The anti-cancer agent guttiferone-A permeabilizes mitochondrial membrane: Ensuing energetic and oxidative stress implications. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v. 15, p. 282-9, 2011.
- PARUTHIYIL, S.; PARMAR, H.; KEREKATTE, V.; CUNHA, G.R.; FIRESTONE, G.L.; LEITMAN, D.C. Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. **Cancer Res.**, v.64, n.1, p.423-8, 2004.

PATEL, M.; BESSONG, P.; LIU, H. Traditional medicines, HIV, and related infections: workshop 2C. **Adv Dent Res.** v.23, p. 159-64, 2011.

PENG, Y. Potential prognostic tumor biomarkers in triple-negative breast carcinoma. **Beijing Da Xue Xue Bao.**, v.44, n.5, 2012.

PENG, J.P.; LIU, L.T.; CHANG, H.C.; HUNG, W.C. Enhancement of chemotherapeutic drug-induced apoptosis by acycloxygenase-2 inhibitor in hypopharyngeal carcinoma cells. **Cancer Letters**, v. 201, p. 157–63, 2003.

PFUHLER, S.; WOLF, H. U. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. **Environ Mol Mutagen.** v. 27, p. 196-201, 1996.

PICCINELLI, A.L.; CAMPONE, L.; DAL PIAZ, F.; CUESTA-RUBIO, O.; RASTRELLI, L. Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. **J Am Soc Mass Spectrom.**, v.20, n.9, p.1688-98, 2009.

PLANAS-SILVA, M.D.; WEINBERG, R.A. Estrogen-dependent cyclin E–cdk2 activation through p21 redistribution. **Mol Cell Biol.**, v.17, p.4059-69, 1997.

POPOLO A, PICCINELLI LA, MORELLO S, CUESTA-RUBIO O, SORRENTINO R, RASTRELLI L, PINTO A. Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. **Nat Prod Commun.** v.12, p.1711-16, 2009.

POPOLO, A.; PICCINELLI, A.L.; MORELLO, S.; SORRENTINO, R.; OSMANY, C.R.; RASTRELLI, L.; ALDO, P. Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. **Can J Physiol Pharmacol.**, v.89, p. 50-7, 2011.

POMMIER, Y.; POURQUIER, P.; FAN, Y.; STRUMBERG, D. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. **Biochim Biophys Acta**, v. 1400, p. 83–105, 1998.

PREET, R.; MOHAPATRA, P.; MOHANTY, S.; SAHU, S.K.; CHOUDHURI, T.; WYATT, M.D.; KUNDU, C.N. Quinacrine has anti-cancer activity in breast cancer cells through inhibition of topoisomerase activity. **Int J Cancer**, 2011. Artigo em impressão.

RASMUSSEN, T.H.; NIELSEN, J.B. Critical parameters in the MCF-7 cell proliferation bioassa(E-Screen). **Biomarkers**, v. 7, p.322-36, 2002.

RIBEIRO, A.; AIUB, C.; STANKEVICINS, L.; da COSTA, V.; FERREIRA, F.; MAZZEI, J.; MOURA, R.S.; FELZENSZWALB, I.; Genotoxic evaluation of a vinifera skin extract that present pharmacological activities. **Food Chem.Toxicol.**, v. 42, p. 969 - 973, 2004.

ROBERTS, H. Safety of herbal medicinal products in women with breast cancer. **Maturitas.** v. 66, n.4, p. 363-69, 2010.

ROCHA, A.B.; LOPES, R.M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Curr Opin Pharmacol.**, v. 1, p. 364-9, 2001.

ROSA LIMA, S.M.R. **Fitomedicamentos na Prática Ginecológica e Obstétrica.** São Paulo, SP, Atheneu, 2006.

ROY, M.; CHAKRABARTY, S.; SINHA, D.; BHATTACHARYA, R.K.; SIDDIQI, M. Anticlastogenic, antigenotoxic and apoptotic activity of epigallocatechin gallate: a green tea polyphenol. **Mutat Res.**, v. 523-524, p.33-41, 2003.

SAFE, S. Clinical correlates of environmental endocrine disruptors. **Trends Endocrinol Metab.**, v.16, p. 139-44, 2005.

SANTOS, F.V. Avaliação da mutagenicidade *in vivo* e *in vitro* de compostos obtidos de plantas nativas do cerrado. **Tese de doutorado**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-UNESP, Araraquara, SP, 2006.

SANTOS, F.V.; NASSER, A.L.; BISO, F.I.; MOREIRA, L.M.; SANTOS, V.J.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A. Genotoxicity of polar and apolar extracts obtained from *Qualea multiflora* and *Qualea grandiflora*. **J Ethnopharmacol.**, v.138, n.1, p.105-10, 2011.

SANTOS, F.V.; TUBALDINI, F.R.; CÓLUS, I.M.; ANDRÉO, M.A.; BAUAB, T.M.; LEITE, C.Q.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenicity of *Mouriri pusa* Gardner and *Mouriri elliptica* Martius. **Food Chem Toxicol.**, v.46, n.8, p.2721-7, 2008.

SARGIANNIDOU, I.; GEORGE, J. Z.; TUSZYNSKI, P. The Role of Thrombospondin-1 in Tumor Progression. **Exp Biol Med.**, v.226, n.8, p.726-33, 2001.

SCHAEFER, K.A. The cell cycle: a review. **Vet Pathol.**, v.35, p.461-78, 1998.

SEO, K.Y.; JELINSK, S.A.; LOECHLER, E.L.; Factors that influence the mutagenic patterns of DNA adducts from chemical carcinogens. *Mutation Res.*, v. 463, p. 217 – 246, 2000.

SERPELONI, J.M. Atividade antigenotóxica de compostos da dieta e sua influência na expressão de genes de resposta ao estresse oxidativo. **Tese de doutorado**. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, SP, 2012.

SETCHELL, K.D. Soy isoflavones--benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). **J Am Coll Nutr.**, v. 20, p.354-62, 2001.

SHTIL, A.A. Emergence of multidrug resistance in leukemia cells during chemotherapy: mechanisms and prevention. **J Hemathoter Stem Cell Res.**, v. 11, p.231-41, 2002.

SIDDIQUE Y.H., ARA G., BEG T., GUPTA J., AFZAL M. Assessment of cell viability, lipid peroxidation and quantification of DNA fragmentation after the treatment of anticancerous drug mitomycin C and curcumin in cultured human blood lymphocytes. **Exp Toxicol Pathol.**, 2009.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp Cell Res.**, v. 175, p. 184-91, 1988.

SKANDRANI, I.; BOUHLEL, I.; LIMEM, I.; BOUBAKER, J.; BHOURI, W.; NEFFATI, A.; SGHAIER, MB.; KILANI, S.; GHEDIRA, K.; GHEDIRA-CHEKIR, L. *Moricandia arvensis* extracts protect against DNA damage, mutagenesis in bacteria system and scavenge the superoxide anion. **Toxicol In Vitro**, 2008.

SKEHAN, P. STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; *et al.* New Colorimetric Cytotoxic Assay for Anticancer-Drug Screening. **J. Nat.Cancer Inst.**, v. 82, nº 13, p. 1107 - 1112, 1990.

SOTO, A.M.; SONNENSCHNEIN, C.; CHUNG, K.L.; FERNANDEZ, M.F.; OLEA, N.; SERRANO, F.O. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. **Environ Health Perspect.**, v.103, p.113-22, 1995.

SPEROFF, L.; FRITZ, M.A. Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. Philadelphia, USA, Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

SPINK, B.C.; COLE, R.W.; KATZ, B.H.; GIERTHY, J.F.; BRADLEY, L.M.; SPINK, D.C. Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation by MCF-10A breast epithelial cells in coculture. **Cell Biol Int.**, v.30, p.227-38, 2006.

STORHOFF, J.J.; LUCAS, A.D.; GARIMELLA, V.; BAO, Y.P.; MÜLLER, U.R. Homogeneous detection of unamplified genomic DNA sequences based on colorimetric scatter of gold nanoparticle probes. **Nat Biotechnol.**, v.22, n.7, p.883-7, 2004.

TACHINO, N., GUO, D., DASWOOD, W. M., YAMANE, S., LARSEN, R., DASHWOOD, R., Mechanisms of the *in vitro* antimutagenic action of chlorophyllin against benzo(a)pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. **Mutat Res.**, v. 308,191-203. 1994.

TELFORD, W.G.; KING, L.E.; FRAKER, P.J. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. **Citometry**, v.13, p.137-43, 1992.

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

TOBIN, N.P.; BERGH, J. Analysis of Cyclin D1 in Breast Cancer: A Call to Arms. **Curr Breast Cancer Rep.**, v.4, n.3, p.171-3, 2012.

TZANOVA T, GEROVA M., PETROV O., KARAIIVANOVA M., BAGREL D. Synthesis and antioxidant potential of novel synthetic benzophenone analogues. **Eur J Med Chem.**, v.44, n.6, p.2724-30, 2009.

URRUTICOECHEA, A.; SMITH, I.E.; DOWSETT, M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. **J Clin Oncol.**, v.23, n.28, p.7212-20, 2005.

VARELLA, S.D.; POZETTI, G.L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E.A.; Mutagenic activity of sweepings and pigments of a household-was factory assayed with *Salmonella typhimurium*. **Food Chem Toxicol.**, v. 42, p. 2029 - 2035, 2004.

VARGAS VM, MOTTA VE, HENRIQUES JA. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. **Mutat Res.**, v. 319(1), p. 31-45, 1993.

VEIGA JR, V. F. ; PINTO, A. C. ; MACIEL, M. A. M. . Plantas medicinais: Cura segura? **Quím Nova**, v. 28, p. 519-28, 2005.

VERSCHAEVE, L.; VAN STADEN, J. Mutagenic and antimutagenic properties of extracts from South African traditional medicinal plants. **J Ethnopharmacol.**, v. 119, p. 575-87, 2008.

WITTE, I; PLAPPERT, U.; WALL, H.; HARTMANN, A. Genetic Toxicity Assessment: Employing the Best Science for Human Safety Evaluation Part III: The Comet Assay as an Alternative to *In Vitro* Clastogenicity Test for Early Drug Candidate Selection. **Toxicol Sci.**, v. 97, p. 21-26, 2007.

WESCOTT, D.C.; PINKERTON, M.N.; GAFFEY, B.J.; BEGGS, K.T.; MILNE, T.J.; MEIKLE, M.C. Osteogenic gene expression by human periodontal ligament cells under cyclic tension. **J Dent Res.**, v.86, n.12, p.1212-6, 2007.

WON JEONG, K.; CHODANKAR, R.; PURCELL, D.J.; BITTENCOURT, D.; STALLCUP, M.R. Gene-specific patterns of coregulator requirements by estrogen receptor- α in breast cancer cells. **Mol Endocrinol.**, v.26, n.6, p.955-66, 2012.

WOZNIAK, K.; KOLACINSKA, A.; BLASINSKA-MORAWIEC, M.; MORAWIEC-BAJDA, A.; MORAWIEC, Z.; ZADROZNY, M.; BLASIAK, J. The DNA-damaging potential of tamoxifen in breast cancer and normal cells. **Arch Toxicol.**, v.81, n. 7, p.519-527, 2007.

YEH, P.Y.; CHUANG, S.E.; YEH, K.H.; SONG, Y.C.; CHANG, L.L.; CHENG, A.L. Phosphorylation of p53 on Thr55 by ERK2 is necessary for doxorubicin-induced p53 activation and cell death. **Oncogene.**, v.23, n.20, 2004.

YUNES, R.A. *et al.* Fitofármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova**, v.24, n.1, São Paulo, SP, 2001.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? **Mutat Res.**, v.492, p.29-38, 2001.

ZHENG, A.; KALLIO, A.; HÄRKÖNEN, P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen. **Endocrinol.**, v.148, n.6, p.2764-77, 2007.

ZHENG, Q.; QIN, H.; ZHANG, H.; LI, J.; HOU, L.; WANG, H.; ZHANG, X.; ZHANG, S.; FENG, L.; LIANG, Y.; HAN, H.; YI, D. Notch signaling inhibits growth of the human lung adenocarcinoma cell line A549. **Oncol Rep.**, v. 17, n. 4, p. 847–52, 2007.

ZHOU X, LI Y, CHEN X. Computational identification of bioactive natural products by structure activity relationship. **J Mol Graph Model.**, 2010

8. ANEXOS

8. ANEXO

8.1. Anexo 1. Tabela de Genes Avaliados na Técnica de PCR Array

Position	GeneBank	Symbol	Description
A01	NM_000927	<i>ABCB1</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1
A02	NM_004827	<i>ABCG2</i>	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2
A03	NM_003812	<i>ADAM23</i>	ADAM metallopeptidase domain 23
A04	NM_005163	<i>AKT1</i>	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A05	NM_000038	<i>APC</i>	Adenomatous polyposis coli
A06	NM_000044	<i>AR</i>	Androgen receptor
A07	NM_000051	<i>ATM</i>	Ataxia telangiectasia mutated
A08	NM_004322	<i>BAD</i>	BCL2-associated agonist of cell death
A09	NM_000633	<i>BCL2</i>	B-cell CLL/lymphoma 2
A10	NM_001168	<i>BIRC5</i>	Baculoviral IAP repeat containing 5
A11	NM_007294	<i>BRCA1</i>	Breast cancer 1, early onset
A12	NM_000059	<i>BRCA2</i>	Breast cancer 2, early onset
B01	NM_003914	<i>CCNA1</i>	Cyclin A1
B02	NM_053056	<i>CCND1</i>	Cyclin D1
B03	NM_001759	<i>CCND2</i>	Cyclin D2
B04	NM_001238	<i>CCNE1</i>	Cyclin E1
B05	NM_004360	<i>CDH1</i>	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
B06	NM_001257	<i>CDH13</i>	Cadherin 13, H-cadherin (heart)
B07	NM_001798	<i>CDK2</i>	Cyclin-dependent kinase 2
B08	NM_000389	<i>CDKN1A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)
B09	NM_000076	<i>CDKN1C</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)
B10	NM_000077	<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)
B11	NM_000757	<i>CSF1</i>	Colony stimulating factor 1 (macrophage)
B12	NM_001323	<i>CST6</i>	Cystatin E/M
C01	NM_001904	<i>CTNNB1</i>	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa
C02	NM_001909	<i>CTSD</i>	Cathepsin D
C03	NM_001963	<i>EGF</i>	Epidermal growth factor
C04	NM_005228	<i>EGFR</i>	Epidermal growth factor receptor
C05	NM_004448	<i>ERBB2</i>	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)
C06	NM_000125	<i>ESR1</i>	Estrogen receptor 1
C07	NM_001437	<i>ESR2</i>	Estrogen receptor 2 (ER beta)
C08	NM_004496	<i>FOXA1</i>	Forkhead box A1
C09	NM_002051	<i>GATA3</i>	GATA binding protein 3
C10	NM_005269	<i>GLI1</i>	GLI family zinc finger 1
C11	NM_005310	<i>GRB7</i>	Growth factor receptor-bound protein 7
C12	NM_000852	<i>GSTP1</i>	Glutathione S-transferase pi 1
D01	NM_006497	<i>HIC1</i>	Hypermethylated in cancer 1
D02	NM_002165	<i>ID1</i>	Inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein
D03	NM_000618	<i>IGF1</i>	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)
D04	NM_000875	<i>IGF1R</i>	Insulin-like growth factor 1 receptor

D05	NM_000598	<i>IGFBP3</i>	Insulin-like growth factor binding protein 3
D06	NM_000600	<i>IL6</i>	Interleukin 6 (interferon, beta 2)
D07	NM_002228	<i>JUN</i>	Jun proto-oncogene
D08	NM_000224	<i>KRT18</i>	Keratin 18
D09	NM_002276	<i>KRT19</i>	Keratin 19
D10	NM_000424	<i>KRT5</i>	Keratin 5
D11	NM_002273	<i>KRT8</i>	Keratin 8
D12	NM_002745	<i>MAPK1</i>	Mitogen-activated protein kinase 1
E01	NM_002746	<i>MAPK3</i>	Mitogen-activated protein kinase 3
E02	NM_002750	<i>MAPK8</i>	Mitogen-activated protein kinase 8
E03	NM_002412	<i>MGMT</i>	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase
E04	NM_002417	<i>MKI67</i>	Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67
E05	NM_000249	<i>MLH1</i>	MutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli)
E06	NM_004530	<i>MMP2</i>	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)
E07	NM_004994	<i>MMP9</i>	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)
E08	NM_001018016	<i>MUC1</i>	Mucin 1, cell surface associated
E09	NM_002467	<i>MYC</i>	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
E10	NM_000269	<i>NME1</i>	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in
E11	NM_017617	<i>NOTCH1</i>	Notch 1
E12	NM_000176	<i>NR3C1</i>	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1 (glucocorticoid receptor)
F01	NM_000926	<i>PGR</i>	Progesterone receptor
F02	NM_002658	<i>PLAU</i>	Plasminogen activator, urokinase Progesterone receptor
F03	NM_015866	<i>PRDM2</i>	PR domain containing 2, with ZNF domain
F04	NM_000314	<i>PTEN</i>	Phosphatase and tensin homolog
F05	NM_000963	<i>PTGS2</i>	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)
F06	NM_013258	<i>PYCARD</i>	PYD and CARD domain containing
F07	NM_000965	<i>RARB</i>	Retinoic acid receptor, beta
F08	NM_007182	<i>RASSF1</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 1
F09	NM_000321	<i>RB1</i>	Retinoblastoma 1
F10	NM_000602	<i>SERPINE1</i>	Serpin peptidase inhibitor, clade E (nexin, plasminogen activator inhibitor type 1), member 1
F11	NM_006142	<i>SFN</i>	Stratifin
F12	NM_003012	<i>SFRP1</i>	Secreted frizzled-related protein 1
G01	NM_012319	<i>SLC39A6</i>	Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6
G02	NM_004787	<i>SLIT2</i>	Slit homolog 2 (Drosophila)
G03	NM_003068	<i>SNAI2</i>	Snail homolog 2 (Drosophila)
G04	NM_005417	<i>SRC</i>	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)
G05	NM_003226	<i>TFF3</i>	Trefoil factor 3 (intestinal)
G06	NM_000660	<i>TGFB1</i>	Transforming growth factor, beta 1
G07	NM_003246	<i>THBS1</i>	Thrombospondin 1
G08	NM_000546	<i>TP53</i>	Tumor protein p53
G09	NM_005427	<i>TP73</i>	Tumor protein p73
G10	NM_000474	<i>TWIST1</i>	Twist homolog 1 (Drosophila)

G11	NM_003376	<i>VEGFA</i>	Vascular endothelial growth factor A
G12	NM_005080	<i>XBPI</i>	X-box binding protein1
H01	NM_001101	<i>ACTB</i>	Actin, beta
H02	NM_004048	<i>B2M</i>	Beta-2-microglobulin
H03	NM_002046	<i>GAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H04	NM_000194	<i>HPRT1</i>	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase1
H05	NM_001002	<i>HPLP0</i>	Ribosomal protein, large, P0
H06	SA_00105	<i>HGDC</i>	Human Genomic DNA Contamination
H07	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H08	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H09	SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control
H10	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H11	SA_00103	PPC	Positive PCR Control
H12	SA_00103	PPC	Positive PCR Control

CAPÍTULO II

PUBLICAÇÃO REFERENTE AO
TRABALHO

Assesment of estrogenic, mutagenic and antimutagenic activity of nemorosone

Mariana S. Camargo,¹ Soraya D. Varela,¹ Ana Paula S. de Oliveira,¹ Flávia Ap. Resende,¹ Osmay Cuesta-Rubio,² Wagner Vilegas,³ Eliana A. Varanda^{*,1}

¹Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Brazil,

²Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba,

³Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Brazil.

Aop15311

Received 20 Dec 2010

Accepted 19 Jun 2011

Abstract: Currently, a wide range of research involving natural products is focused on the discovery of new drugs in many different therapeutic areas. A great number of the synthetic compounds on the market were derived from natural products, especially plants. Nemorosone is the major constituent of the floral resin of *Clusia rosea* Jacq., Clusiaceae, and in Cuban propolis. In vitro studies have shown cytotoxic activity in this substance against various tumor cell lines, including those resistant to various cytotoxic drugs, whereas it has low cytotoxicity to non-tumoral cells. Therefore, in order to characterize the biological activity of nemorosone, a substance with potential antitumor activity, and in view of preclinical testing of the toxicity of drug candidate compounds, the main aim of this study was to determine the mutagenic and antimutagenic activity of nemorosone by the Ames test, using the strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 of *Salmonella typhimurium*. Secondly, to characterize the estrogenic activity in an experimental recombinant yeast model (Recombinant Yeast Assay) mutagenic activity was observed at in any of the concentrations in any of the test strains. To evaluate the antimutagenic potential, direct and indirect mutagenic agents were used: 4 nitro-*o*-phenylenediamine (NPD), mitomycin C (MMC) and aflatoxin B1 (AFL). Nemorosone showed moderate antimutagenic activity (inhibition level 31%), in strain TA100 in the presence of AFL, and strong antimutagenic activity in TA102 against MMC (inhibition level 53%). Estrogenic activity was observed, with an EEq of 0.41±0.16 nM at various tested concentrations.

Keywords:

Ames test
antimutagenic activity
estrogenic activity
nemorosone

ISSN 0102-695X

Introduction

Nemorosone is found in the resin and latex of plants of *Clusia* (fam. Clusiaceae, syn. Guttiferae) species (Lokvam et al., 2000) and it is the major constituent of *Clusia rosea* Jacq. floral resins (Cuesta-Rubio et al., 2001; Popolo et al., 2011) and brown Cuban propolis (Cuesta-Rubio et al., 2002; Cuesta-Rubio et al., 2007; Pardo-Andreu et al., 2011). This compound belongs to the class of polycyclic polyisoprenylated benzophenones, a group of acylphloroglucinol derivatives which are characteristic secondary metabolites of the Guttiferae family (Pagano et al., 2008).

The cytotoxicity of nemorosone in several human cancer cell lines has been reported in the past years (Cuesta-Rubio et al., 2002; Diaz-Carballo et al., 2003; Popolo et al., 2011). This compound showed cytotoxic activity *in vitro* against a range of tumor cell lines, such as breast, colon, ovary, liver and lung

carcinoma (including both wild type and chemotherapy-refractory) and it presents low cytotoxicity against normal cell lines (Diaz-Carballo, et al. 2003; Diaz-Carballo et al., 2008; Popolo et al., 2011). The National Cancer Institute (USA), which considers that a pure compound is active when its IC₅₀ is lower than 4 µg/mL (Cordell et al., 1993); nemorosone showed IC₅₀ values lower than 3.6 µg/mL against several cancer cell lines (Cuesta-Rubio et al. 2001).

Antineoplastic agents of plant origin, such as vinblastine, vinorelbine, etoposide, teniposide and others, are currently used as parts of anticancer treatment protocols (Bulanas & Kinghorn, 2005). Phytochemicals have very good prospects as anticancer agents on account of their great chemical diversity and unlimited potential for rational modification (Diaz-Carballo et al., 2008).

Compounds capable of provoking mutations are found in our daily diet, drinks and medication

as well as in polluted air and water. It is known that mutations are a major factor for the onset of cancer. However, chemoprevention, that is the prevention of cancer development by chemical substances that act as antimutagenic agents, with the capacity to interact with mutagenic compounds or their metabolites and reduce their effects, is one possible way to prevent cancer (Nogueira et al., 2006; Lira et al., 2008; Chen et al., 2011).

In recent years, endocrine disrupting chemicals (EDC) have become a major issue in the field of environmental science, owing to their ability to interact with human estrogen receptors, thus interfering with the endocrine system (Crews et al., 2000; Brix et al., 2010). Epidemiological studies and animal experiments have shown that estrogen can have carcinogenic properties. Studies to clarify the molecular mechanisms of carcinogenesis by estrogen suggest that estrogen causes carcinogenic effects by combining genotoxicity and stimulation of cell proliferation (Bhat et al., 2003; Cavalieri et al., 2000).

The main aim of this study was to assess the mutagenic and antimutagenic activity of nemorosone by the *Salmonella* reversion assay, which is widely used for the detection of mutagenic and antimutagenic agents, especially those present in plant extracts. To elucidate further the biological activity of this compound, its estrogenic activity was also tested by recombinant yeast assay.

Materials and Methods

Chemicals

Dimethylsulfoxide (DMSO), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium salt (NADP), D-glucose-6-phosphate disodium salt, magnesium chloride, L-histidine monohydrate, D-biotin, sodium azide (SAZ), 2-anthramine (2-ANTR), 4-nitro-*o*-phenylenediamine (NPD), mitomycin C (MMC), aflatoxin B₁ (AFL), 17 β -estradiol, Triton X-100, SDS 10%, 2-mercaptoethanol, 4-methylumbelliferyl β -D-galactoside were purchased from Sigma Chemical Co (St. Louis, USA). Oxoid Nutrient Broth No. 2 (Oxoid, England) and Difco Bacto Agar (Difco, USA) were used as bacterial media.

Plant material

Flowers of *Clusia rosea* Jacq., Clusiaceae, were collected in Havana (Cuba) in September 2009 and identified by Dr. Victor Fuentes Fiallo. A voucher specimen (No. 9576) was deposited in the Herbarium of La Estacion Experimental de Plantas Medicinales de Guira de Melena.

Nemorosone was extracted from the floral resins of *C. rosea* and isolated as previously reported (Cuesta-Rubio et al., 2001) In brief, nemorosone was crystallized from floral resins of *Clusia rosea* employing a mixture of EtOH-H₂O. The product was subject to a VLC on silica gel with C₆H₁₂-EtOAc mixtures to purify it to homogeneity. It was identified through 1-D and 2-D NMR experiments, and its purity was verified by HPLC-DAD and HPLC-MS.

Ames mutagenicity assay

The *Salmonella* mutagenicity assay was performed by the pre-incubation method, for 20-30 min with *Salmonella typhimurium* strains, TA97a, TA98, TA100 and TA102, with and without metabolic activation (Maron & Ames, 1983). The metabolic activation mixture (S9 mix) was freshly prepared before each test from an Aroclor-1254-induced rat liver fraction purchased (lyophilized) from Molttox Molecular Toxicology Inc. (Boone, NC). *S. typhimurium* strains were kindly provided by Dr. B. Ames, University of California, Berkeley, CA, USA. The benzophenone was diluted in dimethylsulfoxide and tested at concentrations of 5, 10, 20 and 30 μ g/plate. The chosen sublethal concentrations were based on the toxicity of the benzophenone to the strains. Toxicity was apparent either as a reduction in the number of his⁺ revertants, or as an alteration in the auxotrophic background. The various concentrations of nemorosone to be tested were added to 500 μ L of buffer (pH 7.4) and 100 μ L of *S. typhimurium* inoculum. After that, 2 mL of top agar was added to the mixture and poured on to a plate containing minimal agar. The plates were incubated at 37 °C for 48 h and the his⁺ revertant colonies were counted manually. The influence of metabolic activation was tested by replacing the buffer with 500 μ L of S9 mixture (4%). All experiments were performed in triplicate. The standard mutagens used as positive controls in experiments without S9 mix were 4-nitro-*o*-phenylenediamine (NPD-10 μ g/plate) for TA98 and TA97a, sodium azide (2.5 μ g/plate) for TA100 and daunomycin (3 μ g/plate) for TA102, while 2-anthramine (0.63 μ g/plate) was used in the experiments with metabolic activation for TA98, TA100 and TA97a and 2-aminofluorene (10 μ g/plate) for TA102.

The statistical analysis was performed with the Salanal computer program using the Bernstein model (Bernstein et al., 1982). The data (revertants/plate) were assessed by analysis of variance (ANOVA), followed by linear regression. The mutagenic index (MI) was also calculated for each dose, as the average number of revertants per plate divided by average number of revertants per plate of the negative (solvent) control. A sample was considered positive when MI \geq 2 for at least

one of the tested doses and if the response was dose dependent (Varella et al., 2004; Santos et al., 2010).

Ames antimutagenicity assay

In accordance with the pre-incubation method, developed by Maron & Ames (1983), various concentrations of nemorosone were mixed with 100 μ L of *S. typhimurium* inoculum and the mutagenic agent (NPD, AFL or MMC), and incubated at 37 °C for 20-30 min. After this, 2 mL of top agar was added, supplemented with traces of histidine and biotin, and the content of each tube was lightly homogenized and poured onto a plate of minimal glucose agar. After the top agar solidification, the plates were incubated for 48 h at 37 °C, and the number of revertant colonies per plate was counted. The entire assay was performed in triplicate. The percentage of mutagenicity inhibition was calculated as in Tachino et al. (1994), where:

$$\% \text{ Inhibition} = 1 - \frac{\frac{\text{induced revertants}}{\text{plate (with inhibitor)}}}{\frac{\text{induced revertants}}{\text{plate (without inhibitor)}}} \times 100$$

The antimutagenic effect was considered negligible when a value lower than 25% was obtained, moderate when a value between 25% and 40% was obtained and strong at values greater than 40% (Neigi et al., 2003).

Cell viability was also determined in each antimutagenesis experiment to assess the bactericidal potential of the mutagens. The responses were considered toxic when sample survival was less than 60% of the total observed for the negative control (Vargas et al., 1993).

Recombinant yeast assay (RYA)

Yeast strain BY4741 (MATa *ura3 Δ 0 leu2 Δ 0 his3 Δ 1 met15 Δ 0*) from Euroscarf (Frankfurt, Germany) was transformed with plasmids pH5HE0 and pVitBX2, as described elsewhere (Garcia-Reyero et al., 2001). Expression plasmid pH5HE0 contains the human estrogen hormone receptor HE0 (Green & Chambon, 1991) cloned into the constitutive yeast expression vector pAAH5. The reporter plasmid pVITB2x contains two copies of the pseudopalindromic estrogen responsive element ERE2 from *X. laevis* vitellogenin B1 gene (5'AGTCACTGTGACC-3') inserted into the unique *Kpn*I site of pSFL Δ -178k (Garcia-Reyero et al., 2005). In brief, transformed yeast cells were first grown overnight in non-selective medium (YPD) at 30 °C.

Next, they were grown overnight in minimal medium (6.7 g/L yeast nitrogen base without amino acids, Difco, Basel, Switzerland; 20 g/L glucose, supplemented with 0.1 g/L of prototrophic markers as required). The final culture was adjusted to an optical density (OD) of 0.1 and distributed in a siliconized 96-well polypropylene microtiter plate. Aliquots of 10 μ L nemorosone solution at a final concentration giving 15 μ g/well were added to 90 μ L of yeast culture and these initial inoculum were used for subsequent serial dilutions (1:10, 1:30, 1:90, 1:270 and 1:810). Positive controls were made by adding 17 β -estradiol at a final concentration of 10 nM. For a toxicity control, 10 nM 17 β -estradiol was added to a sample with a dilution factor of 1:30. Plates were incubated for 6 h at 30 °C under mild shaking. After incubation, 50 μ L of the yeast cells lysis reagent Y-PER™ (Pierce™, Rockford, IL, USA) was added to each well and further incubated at 30 °C for 30 min. Finally, 50 μ L of assay buffer was added to the lysed cells. The assay buffer was prepared by mixing 100 mL Z-buffer, 1 mL Triton X-100, 1 mL 10% SDS, 70 μ L 2-mercaptoethanol and 21 mg 4-methyl umbelliferyl- β -D-galactoside. Z-Buffer is a mix of: 60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl and 1 mM MgSO₄, pH 7.0.

After brief centrifugation, plates were read in a spectrofluorometer (Tecan SpectraFluor Plus), set at 355 nm excitation and 460 nm emission. Fluorescence was recorded for 20 min (one measurement per min); β -galactosidase activity was calculated as rate of the increase in arbitrary fluorescence units per min, using standard linear regression methods. Estrogenicity values are reported as nM concentration (in the sample) equivalent to 17 β -estradiol (EEQ). These values were calculated by adjusting β -galactosidase values from serial dilutions of each sample to the Hill equation by nonlinear methods (Noguerol et al., 2006). The entire assay was performed on four replicates.

Results and Discussion

The explosive growth of phytotherapy has created a new awareness of the potential value of natural products as anticancer agents (Diaz-Carballo et al., 2003). It may be hoped that, if nemorosone can be developed into a clinical drug in the future, it would prove valuable in both first and second-line therapies (Diaz-Carballo et al., 2008).

Tumor cells possess the characteristic of proliferating much faster than normal cells, so cell proliferation is used as one of the targets for the development of chemotherapeutic agents (Green et al., 2011). These drugs however, when administered to patients, may kill normal cells and thus result in debilitating side effects (Keyomarsi & Pardee, 2003;

Brumlik et al., 2008).

Most anti-tumoral agents are designed to action cell proliferation (Green et al., 2011) and apoptosis induction (Peng et al., 2003). Drugs inhibit DNA synthesis by two mechanisms that are generally associated: the drug either binds to DNA by intercalation and stops the replication (Liu et al., 2011); or interferes directly with molecules required for DNA polymerization and/or initiation of replication (Pommier et al., 1998; Bruning & Mylonas et al., 2011). The ability of such drugs to intercalate into DNA can induce mutations in normal cells (Hoffmann et al., 2003). The accumulation of several random mutations can lead to aberrations in the cells and conversion of non-carcinogenic cells into carcinogenic cells (Ferguson & Denny, 1995; Raynaud et al., 2008). Thus it is essential that chemotherapeutic drugs be carefully tested not only for anticancer or antitumor activity, but also for their potential mutagenicity (Narayan et al., 2005).

The Ames test is used worldwide as an initial screen to determine the mutagenic potential of new chemicals and drugs. The test is also used to furnish data for submission to regulatory agencies, for the registration or acceptance of many chemicals, including drugs and biocides. International guidelines have been developed for use by corporations and testing laboratories, to ensure uniformity of testing procedures (Mortelmans & Zeiger, 2000).

In this study, the mutagenicity of nemorosone was assessed by the Ames test, using four different concentrations of the compound and four bacterial strains (*Salmonella typhimurium* TA97a, TA98, TA100 and TA102), each strain carrying different mutations in various genes in the histidine operon. A metabolic activation system (S9 mix) was added to *S. typhimurium* during the assay to metabolize the nemorosone by the cytochrome P450, enzymes extracted from rat liver. The results show that nemorosone did not induce any increase in the number of revertant colonies, indicating

the absence of mutagenic activity. The results for mutagenic activity of nemorosone are presented in Table 1, showing the number of revertants/plate, the standard deviation and the mutagenic index (MI) after treatment with this benzophenone. The mutagenic index (MI) was not higher than 2 at any tested concentration.

Given that oxidative stress is strongly implicated in the toxicity of chemotherapy, much effort has been focused on the research of diverse antioxidants as potential chemoprotective agents. Tzanova et al. (2009) demonstred the low toxicity of benzophenones to three cell lines and potent destruction of reactive oxygen species generated by *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP). Interestingly, one of the investigated benzophenones was shown to protect non-cancerous cells against tBHP-induced death.

The antimutagenic activity of nemorosone was also assessed by the Ames test and the results are displayed in Table 2. The benzophenone was tested in association with direct (NPD and MMC) and indirect mutagens (AFL) using strains TA98, TA102 and TA100, respectively. When strain TA98 was used in association with NPD was used, no reduction in the number of revertant colonies was observed. For strain TA100, a moderate protective effect was observed when tested with AFL (31% inhibition). However, in strain TA102, nemorosone showed a strong protective effect when tested with MMC (53% inhibition). Mitomycin C is a well known anti-tumor drug whose genotoxic effects in non-tumor cells are of special significance, owing to the possibility that it may induce secondary tumors in cancer patients (Aydemir et al., 2005). It is quite possible that plants and their components may modulate the genotoxicity of anticancer drugs and thus may reduce the chances of cancer patients developing secondary tumors (Siddique et al., 2009). The present results show that nemorosone can reduce the mutagenic damage of one anti-cancer drug therapy (mitomycin C) reducing the probability of secondary tumors being induced in the cancerous patients treated with this drug.

Table 1. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants and mutagenic index (in brackets) in strains TA98, TA100, TA102 and TA97a exposed to nemorosone at various doses, with (+S9) or without (-S9) metabolic activation.

Treatment µg/plate	Revertants/plate in <i>S. typhimurium</i> strains							
	TA98		TA100		TA102		TA97a	
	-S9 ^a	+S9 ^b	-S9 ^c	+S9 ^b	-S9 ^d	+S9 ^e	-S9 ^a	+S9 ^b
DMSO	32.3±3	33.7±2.3	214.7±14.3	166±10	196.67±11.5	285±67	123.2±6	221.3±2.3
5	42±2(1.2)	37.7±3.5(1.1)	183.7±14.1(0.8)	163±9.5(1)	176±15.7(0.9)	291±35(1)	112.4±18(0.9)	243.7±3.5(1.1)
10	35.7±8(1.1)	35.7±3.2(1.1)	226±11.5(1.2)	200±4(1.2)	199.67±5(1)	324±8(1.1)	158±1(1.3)	260.7±3.2(1.1)
20	44.3±13(1.3)	31.8±6.4(0.9)	184.7±8(0.8)	176±14(1.1)	173.3±25.7(0.9)	295±29(1)	139.4±12(1.1)	236.7±6.4(0.9)
30	26.08±16(0.8)	26.3±2(0.8)	219.7±23.3(1)	159±20(1)	203±29.3(1)	255±33(0.9)	153.4±22(1.2)	170.1±2(0.8)
Control +	2150±720	1107±23	2734±53	1241±53	1496±190	1338±33a	782±72	1277±33

DMSO: 75 µL/plate(negative control); Control+Positive control: ^a4-Nitro-o-phenylenediamine(NPD-10 µg/plate); ^b2-anthramine (0,63.g/plate); ^cSodium azide, (2.5 µg/plate); ^dDaunomycin (3.0 µg/plate); ^e2-aminofluorene (10 µg/plate).

Table 2. Antimutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants and percent inhibition (in brackets) by nemorosone of direct (-S9) and indirect (+S9) mutagens, in strains TA98, TA100 and TA102 of *S. typhimurium*.

Treatment µg/plate	TA98	TA100	TA102
	NPD	Aflatoxin	Mitomycin C
Control+	972±20	1376.3±30	2105.7±42.3
2.5	936.7±27(3.6)	1255.7±37(8.7)	2072.7±34.5(1.6)
5	808.7±10(16.8)	1278.7±24(7)	2013.3±24.2(4.4)
10	808.3±7.6(16.8)	1307.3±21(5)	2063.8±28.4(2)
20	816.7±19(14)	1045±19(24)	1803.4±9.9(14.3)
30	815±24(16.2)	940±20(31)	990.6±11.1(53)

Control+ - Positive Control: NPD - 4-nitro-*o*-phenylenediamine (10µg/plate)(-S9); Aflatoxin B1 (0.5 µg/plate) (+S9); Mitomycin C (0.5 µg/plate)(-S9).

The possible health risks and benefits associated with the consumption of plant estrogens underline the need to characterize the estrogenic potency of vegetables and seeds commonly present in the diet or used as medicinal plants (Agradi et al., 2002).

The estrogenic activity of nemorosone, evaluated by the recombinant yeast assay (RYA) based on vertebrate estrogen receptors, is a convenient measure of the potential for endocrine disruption of a substance or an environmental sample (Garcia-Reyero et al., 2005; Brix et al., 2010). This assay makes use of an engineered yeast strain that harbors two foreign genetic elements: a vertebrate receptor, in this case, a human estrogen receptor, ER, and a reporter gene whose expression is made dependent on the presence of estrogens and whose final product concentration is easy to measure. This is a simplified version of the mechanism by which natural estrogens operate in vertebrates. The fundamental similarity of the transcriptional machinery in all eukaryotes ensures that it also works in yeast, in a similar way.

In breast carcinoma, the estrogen receptor (Er α) is present in 75% of cases (Popolo et al., 2011). The phytoestrogens interact with these receptors inducing cancerous cell proliferation (Karayiannakis et al., 1996). The estrogenicity of nemorosone was assessed at various concentrations (0.19-15 µg/well) by RYA and the compound exhibited 0.41nM±0.16 EEq. Figure 1 shows plots of the increase in fluorescence at in different concentrations of the benzophenone and methanol (negative control) against time (for 20 min). There are no significant differences between slopes of the nemorosone linear plots and the negative control. Figure 2 shows the mean β -galactosidase activity, in fluorescence units, induced by nemorosone and the negative control, plotted against dilution factor.

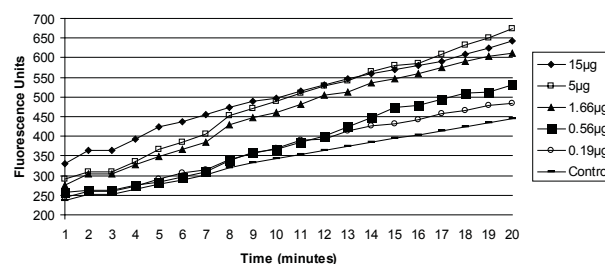


Figure 1. Plots of the increase in fluorescence (in fluorescence units) with time for various nemorosone concentrations and negative control in the RYA system. Concentrations of nemorosone are indicated on the right margin. β -galactosidase activity was calculated from the slopes of lines fitted to the data by standard linear regression methods. Values are means of four experiments performed in triplicate.

These results shows that nemorosone, at various concentrations, has no estrogenic activity detectable by this method but does possesses a protective activity against some kinds of induced mutation.

Further studies should be performed to assess the biological activity of this benzophenone and clarify its mechanism of action.

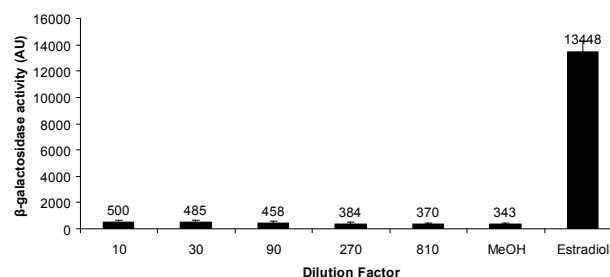


Figure 2. Dose/response plot for various nemorosone dilutions, 17 β -estradiol and negative control (methanol) in the RYA system. The graph shows mean the β -galactosidase activity in fluorescence units for each nemorosone dilution, from four experiments performed in triplicate.

References

- Agradi E, Fico G, Cillo F, Francisci C, Tomè F 2002. Estrogenic activity of *Nigella damascena* extracts, evaluated using a recombinant yeast screen. *Phytother Res* 16: 414-416.
- Aydemir N, Celikler S, Bilalouglu R 2005. *In vitro* genotoxic effects of the anti-cancer drug gemcitabine in human lymphocytes. *Mutat Res* 582: 35-41.
- Bhat HK, Calaf G, Hei TK, Loya T, Vadgama JV 2003. Critical role of oxidative stress in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci* 100: 3913-3918.
- Bernstein L, Kaldor J, McCann J, Pike MC 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat Res* 97: 267-281.
- Brix R, Nogueroles TN, Piña B, Balaam J, Nilsen AJ, Tollefsen KE, Levy W, Schramm KW, Barceló D 2010. Evaluation of the suitability of recombinant yeast-

- based estrogenicity assays as a pre-screening tool in environmental samples. *Environ Int* 36: 361-367.
- Brumlik MJ, Daniel BJ, Waehler R, Curiel DT, Giles FJ, Curiel TJ 2008. Trends in immunoconjugate and ligand-receptor based targeting development for cancer therapy. *Expert Opin Drug Deliv* 5: 87-103.
- Brüning A, Mylonas I 2011. New emerging drugs targeting the genomic integrity and replication machinery in ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet* 283: 1087-1096.
- Bulanas MJ, Kinghorn AD 2005. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* 78: 431-441.
- Cavaliere E, Frenkel K, Liehr JG, Rogan E, Roy D 2000. Estrogens as endogenous genotoxic agents--DNA adducts and mutations. *J Natl Cancer Inst Monogr* 27: 75-93.
- Chen HH, Chiang W, Chang JY, Chien YL, Lee CK, Liu KJ, Cheng YT, Chen TF, Kuo YH, Kuo CC 2011. Antimutagenic constituents of adlay (*Coix lachrymajobi* L. var. ma-yuen Stapf) with potential cancer chemopreventive activity. *J Agr Food Chem*, Article in print
- Cordell GA, Kinghorn AD, Pezzuto JM 1993. Separation, structure elucidation and bioassay of cytotoxic natural products. In Colegate SM, Molyneux RJ (eds.) *Bioactive natural products: detection, isolation and structure determination*. Boca Raton: CRC Press, p. 199-200.
- Cuesta-Rubio O, Frontana-Urbe BA, Ramirez-Apan T, Cárdenas J 2002. Polyisoprenylated benzophenones in cuban propolis; biological activity of nemorosone. *Z Naturforsch* 57: 372-378.
- Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Fernandez MC, Hernández IM, Rosado A, Rastrelli L 2007. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red, and yellow Cuban varieties of propolis. *J Agr Food Chem* 55: 7502-7509.
- Cuesta-Rubio O, Velez-Castro H, Frontana-Urbe BA, Cardenas J 2001. Nemorosone, the major constituent of floral resins of *Clusia rosea*. *Phytochemistry* 57: 270-283.
- Crews D, Willingham E, Skipper J K 2000. Endocrine disruptors: present issues, future directions. *Q Rev Biol* 75: 243-260.
- Diaz-Carballo D, Malak M, Freistuhler A, Elmaagacli A, Bardehheuer W, Reusch HP 2008. Nemorosone blocks proliferation and induces apoptosis in leukemia cells. *Int J Clin Pharmacol Ther* 46: 428-439.
- Diaz-Carballo D, Seeber S, Strumberg D, Hilger RA 2003. Novel antitumoral compound isolated from *Clusia rosea*. *Int J Clin Pharmacol Ther* 41: 622-633.
- Ferguson LR, Denny WA 1995. Anticancer drugs: an underestimated risk or an underutilized resource in mutagenesis. *Mutat Res* 331: 1-26.
- Garcia-Reyero N, Grau E, Castillo M, López de Alda M, Barceló D, Piña B 2001. Monitoring of endocrine disruptors in surface waters by the yeast recombinant assay. *Environ Toxicol Chem* 20: 1152-1158.
- Garcia-Reyero N, Piña B, Grimalt J O, Fernández P, Fonts R, Polvillo O, Martrat B 2005. Estrogenic activity in sediments from European mountain lakes. *Environ Sci Technol* 39: 1427-1435.
- Green S, Chambon P 1991. The estrogen receptor: from perception to mechanism. In: MG Parker, Ed., *Nuclear Hormone Receptors*, Academic Press, London, p 15-38.
- Green MR, Woolery JE, Mahadevan D 2011. update on aurora kinase targeted therapeutics in oncology. *Expert Opin Drug Discov* 6: 291-307.
- Karayiannakis AJ, Bastounis EA, Chatzigianni EB, Makri GG, Alexiou D, Karamanakos P 1996. Immunohistochemical detection of oestrogen receptors in ductal carcinoma in situ of the breast. *Eur J Surg Oncol* 22: 578-582.
- Hoffmann GR, Calciano MR, Lawless BM, Mahoney KM 2003. Frameshift mutations induced by three classes of acridines in the lacZ reversion assay in *Escherichia coli*: potency of responses and relationship to slipped mispairing models. *Environ Mol Mutagen* 42: 111-121.
- Keyomarsi K., Pardee AB 2003. Selective protection of normal proliferating cells against the toxic effects of chemotherapeutic agents. *Progr Cell Cycle Res* 50: 527-532.
- Lira WD, Santos FV, Sannomiya M, Rodrigues CM, Vilegas W, Varanda EA 2008. Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays. *J Med Food* 11: 111-119.
- Liu Y, Kumar A, Depauw S, Nhili R, David-Cordonnier MH, Lee MP, Ismail MA, Farahat AA, Say M, Chackal-Catoen S, Batista-Parra A, Neidle S, Boykin DW, Wilson WD 2011. Water-mediated binding of agents that target the dna minor groove. *J Am Chem Soc* 133: 10171-10183.
- Lokvam J, Braddock JF, Reichardt PB, Clausen TP 2000. Two polyisoprenylated benzophenones from the trunk latex of *Clusia grandiflora* (Clusiaceae). *Phytochemistry* 55: 29-34.
- Maron DM, Ames BN 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat Res* 113: 173-215.
- Mortelmans K, Zeiger E 2000. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 455: 29-60.
- Narayanan R, Tiwari P, Inoa D, Ashok BT 2005. Comparative analysis of mutagenic potency of 1-nitro-acridine derivatives. *Life Sci* 77: 2312-2323.
- Neigi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS 2003. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem* 80: 393-397.
- Nogueira ME, Passoni MH, Biso FI, Longo MC, Cardoso CRP, Santos LC, Varanda EA 2006. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimurium*. *Toxicol in Vitro* 20: 361-66.
- Noguerol TN, Boronat S, Casado M, Raldúa D, Barceló D, Piña B 2006. Evaluating the interactions of vertebrate receptors with persistent pollutants and antifouling pesticides using recombinant yeast assays. *Anal Bioanal Chem* 385: 1012-1019.
- Pagano B, Pavone M, Piccinelli AL, Rastrelli L, Cuesta-Rubio O, Mattia CA, Barone V 2008. Structural

- and conformational investigation of nemorosone: a combined X-ray and quantum mechanical study. *Chem Phys Lett* 462: 158-163.
- Pardo-Andreu GL, Nuñez-Figueredo Y, Tudella VG, Cuesta-Rubio O, Rodrigues FP, Pestana CR, Uyemura SA, Leopoldino AM, Alberici LC, Curti C 2011. The anti-cancer agent nemorosone is a new potent protonophoric mitochondrial uncoupler. *Mitochondrion* 11: 255-263.
- Peng JP, Liu LT, Chang HC, Hung WC 2003. Enhancement of chemotherapeutic drug-induced apoptosis by acycloxygenase-2 inhibitor in hypopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Lett* 201: 157-163.
- Pommier Y, Pourquier P, Fan Y, Strumberg D 1998. Mechanism of action of eukaryotic DNA topoisomerase I and drugs targeted to the enzyme. *Biochim Biophys Acta* 1400: 83-105.
- Popolo A, Piccinelli AL, Morello S, Sorrentino R, Osmany CR, Rastrelli L, Aldo P 2011. Cytotoxic activity of nemorosone in human MCF-7 breast cancer cells. *Can J Physiol Pharmacol* 89: 50-57.
- Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, Olausen KA, Soria JC 2008. Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Crit Rev Oncol Hematol* 66: 99-117.
- Santos F V, Calvo TR, Colus I M S, Vilegas W, Varanda EA 2010. Mutagenicity of two species of the genus *Alchornea* measured by *Salmonella microsoma* assay and micronucleus test. *Rev Bras Farmacogn* 20: 382-389.
- Siddique YH, Ara G, Beg T, Gupta J, Afzal M 2009. Assessment of cell viability, lipid peroxidation and quantification of DNA fragmentation after the treatment of anticancerous drug mitomycin C and curcumin in cultured human blood lymphocytes. *Exp Toxicol Pathol* 62: 503-508.
- Tachino N, Guo D, Daswood WM, Yamane S, Larsen R, Dashwood R 1994. Mechanisms of the *in vitro* antimutagenic action of chlorophyllin against benzo(a)pyrene: studies of enzyme inhibition, molecular complex formation and degradation of the ultimate carcinogen. *Mutat Res* 308: 191-203.
- Tzanova T, Gerova M, Petrov O, Karaivanova M, Bagrel D 2009. Synthesis and antioxidant potential of novel synthetic benzophenone analogues. *Eur J Med Chem* 44: 2724-2730.
- Varella SD, Pozetti GL, Vilegas W, Varanda EA 2004. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. *Food Chem Toxicol* 42: 2029-2035.
- Vargas VMF, Mota VEP, Henriques JAP 1993. Mutagenic activity detected by the Ames test in riverwater under the influence of petrochemical industries. *Mutat Res* 45: 319-331.

*Correspondence

Eliana Aparecida Varanda
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus Araraquara
Rodovia Araraquara-Jaú, km 1, 14801-902 Araraquara-SP, Brazil
varandae@fcfar.unesp.br
Tel.: +55 16 3301 6951
Fax: +55 16 3301 6940