

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do CCS  
Serviço de Processamento Técnico

C376a Cavalcante Júnior, Salomão Mascarenhas.  
Avaliação da atividade antitumoral, citotóxica, genotóxica e mutagênica da citrinina através de diferentes sistemas testes / Salomão Mascarenhas Cavalcante Júnior. – 2019.  
88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2019.  
Orientação: Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva.  
Bibliografia

1. Antineoplásicos. 2. Citrinina. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Sarcoma 180. I. Título.

CDD 615.32



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**

**CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E  
MUTAGÊNICA DA CITRININA ATRAVÉS DE DIFERENTES SISTEMAS TESTES**

**SALOMÃO MASCARENHAS CAVALCANTE JÚNIOR**

**TERESINA – PIAUÍ**

**JUNHO /2019**

**SALOMÃO MASCARENHAS CAVALCANTE JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E  
MUTAGÊNICA DA CITRININA ATRAVÉS DE DIFERENTES SISTEMAS TESTES**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva

Coorientadora: Prof. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante

**TERESINA – PIAUÍ**

**JUNHO /2019**

**SALOMÃO MASCARENHAS CAVALCANTE JÚNIOR**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL, CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E  
MUTAGÊNICA DA CITRININA ATRAVÉS DE DIFERENTES SISTEMAS TESTES**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva (Orientador)**  
*Campus Senador Helvidio Nunes de Barros – UFPI*

---

**Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa (Examinador Interno)**  
*Campus Senador Helvidio Nunes de Barros – UFPI*

---

**Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes (Examinador Interno)**  
*Campus Ministro Petrônio Portella – UFPI*

---

**Prof. Dr. Anderson Nogueira Mendes (Examinador Externo)**  
*Campus Ministro Petrônio Portella – UFPI*

**REITOR**

**Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes**

**VICE-REITOR**

Profa. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

**PRÓ-REITOR PARA PÓS-GRADUAÇÃO**

Profa. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por está presente em todos os momentos de minha vida. Aos meus pais, Maria Francisca de Sousa Cavalcante e Salomão Mascarenhas Cavalcante, que sempre contribuíram com a minha educação, mostraram a importância em adquirir conhecimentos e despertaram em mim o desejo de conhecer o mundo científico. Agradeço também aos meus irmãos (Isabela, Fernanda e Samuel) que sempre torceram pelo meu sucesso!

À minha esposa Leilah Eulálio, pelo amor, compreensão, apoio e por dividir comigo todos os esses momentos. Aos meus filhos, Maria Laura e Yuri Salomão, que me deram coragem para superar todos os desafios e mostraram que sempre podemos melhorar. Aos meus sogros (Waltécia e Barreto) que sempre me ajudaram a cuidar dos meus filhos quando eu tinha que passar a noite e a madrugada estudando.

À Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, pela oportunidade de obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas com toda a estrutura necessária para o crescimento de excelentes profissionais.

Ao meu orientador Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva, que mesmo morando em outra cidade sempre foi disponível em compartilhar seus conhecimentos. À minha coorientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante, pela orientação e apoio. À todo o corpo docente da instituição, e a equipe do LAPGENC, que estiveram comigo em todas as etapas dos testes.

*"Se não puder voar, corra.  
Se não puder correr, ande.  
Se não puder andar, rasteje,  
mas continue em frente de qualquer jeito."  
Martin Luther King Jr.*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2 OBJETIVOS</b>	17
<b>2.1 Objetivo Geral</b>	17
<b>2.2 Objetivo Específico</b>	17
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO</b>	18
<b>3.1 Produtos naturais oriundos de fungos endofíticos</b>	18
<b>3.2 Citrinina</b>	19
<b>3.3 Biomarcadores toxicogenéticos</b>	23
<b>3.4 Câncer e Sarcomas</b>	26
<b>REFERÊNCIAS</b>	30
<b>CAPÍTULO I - Avaliação da citotoxicidade, efeitos genotóxicos e mutagênicos da citrinina em linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e em raízes de <i>Allium cepa</i></b>	41
<b>RESUMO</b>	42
<b>ABSTRACT</b>	43
<b>1INTRODUÇÃO</b>	44
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	46
<b>2.1 Obtenção da citrinina e reagentes</b>	46
<b>2.2Manutenção das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	46
<b>2.3 Ensaio do MTT</b>	47
<b>2.4 Ensaio do Cometa em <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	47
<b>2.5Teste cometa e avaliação de aberrações cromossômicas em <i>A. Cepa</i></b>	47
<b>2.6 Análises estatísticas</b>	48
<b>3 RESULTADOS</b>	49
<b>3.1 Avaliação da viabilidade celular em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	49
<b>3.2 Avaliação da genotoxicidade em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i></b>	49
<b>3.3 Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da CIT em <i>A. cepa</i></b>	50
<b>4 DISCUSSÃO</b>	57
<b>5 CONCLUSÃO</b>	60
<b>REFERÊNCIAS</b>	61



<b>CAPÍTULO II - Atividade antitumoral da citrinina avaliada por mecanismos citogenéticos em células de Sarcoma 180</b>	<b>66</b>
<b>RESUMO</b>	<b>67</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>68</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>69</b>
<b>2 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>71</b>
<b>2.1 Obtenção da citrinina e reagentes</b>	<b>71</b>
<b>2.2 Cultura primária de Sarcoma 180</b>	<b>71</b>
<b>2.3 Viabilidade celular por azul de Tripán em cultura primária de S-180</b>	<b>71</b>
<b>2.4 Ensaio cometa</b>	<b>71</b>
<b>2.5 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese CBMN</b>	<b>71</b>
<b>2.6 Análise estatística</b>	<b>73</b>
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>74</b>
<b>3.1 Viabilidade celular pelo ensaio de exclusão de azul de tripan</b>	<b>74</b>
<b>3.2 Efeitos genotóxicos da CIT em cultura primária de S180</b>	<b>75</b>
<b>3.3 Efeitos citogenéticos e morte celular da CIT em cultura primária de S180 avaliados pelo teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN)</b>	<b>76</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>79</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>83</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>84</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{L}$  - Microlitros

ppm- Partes por milhão

AADs – Domínios de Ativação Ácida

AC – Avaliação por dano citogenético

*aldh* –Aldehyde Dehydrogenase

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - American type culture collection

BAX –Proteína X associada a BCL-2

Bcl-2 – Proteína do linfoma de células B 2

CAT – Catalase

CBMN – Micronúcleo com Bloqueio de Citocinese

CIT - Citrinina

CuZnSOD – Cobre-zinco Superóxido Dismutase

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

Dox – Doxorrubicina

E2f1 - Fator de Transcrição E2F 1

EC – Ensaio Cometa

EMA - Agência Européia de Medicamentos

EROs -Espécies reativas de oxigênio

FD – Frequência de Danos

FDA – Food and Drug Administration

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de Hidrogênio

HEK-293 – Células do Rim Humano Embrionário 293

Hsp90 – Proteínas de Choque Térmico 90

ID – Índice de Danos

INCA - Instituto Nacional de Câncer

mA - Miliampère

MAPK - Proteína-quinases Ativadas por Mitógenos

mL - Mililitro

μM - Micromols

MN – Micronúcleo

MnSOD - Manganês Superóxido Dismutase.

MTT- Teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

nm – Nanômetros

OMS – Organização Mundial de Saúde

RAS - Vírus Sarcoma de Rato

S-180 – Sarcoma 180

SOD – Superóxido Dismutase

SOD1 – Superóxido Dismutase Citoplasmática

SOD2 – Superóxido Dismutase Mitocondrial

SOD1SOD2 – Duplo Mutante (Superóxido Dismutase Citoplasmática + Superóxido  
(Dismutase Mitocondrial )

SOD1CAT1 – Duplo Mutante (Superóxido Dismutase Citoplasmática + Catalase)

## LISTA DE FIGURAS

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

**FIGURA 1** – Estrutura química da citrinina 20

**FIGURA 2** – Mecanismos de metástase 28

### CAPÍTULO 1

**FIGURA 1** - Avaliação da viabilidade celular (teste de MTT) de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com citrinina (2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) 51

**FIGURA 2** - Avaliação da viabilidade celular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* cotratadas com citrinina (2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) e peróxido de hidrogênio (10000  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) 52

**FIGURA 3** -Avaliação do índice de danos ao DNA de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com citrinina (2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) 53

**FIGURA 4** - Avaliação do índice de danos ao DNA de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* cotratadas com citrinina (2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) e peróxido de hidrogênio (10000 $\mu\text{M}/\text{mL}$ )

**FIGURA 5:** Perfil fotomicrográfico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* no ensaio cometa 56

### CAPÍTULO 2

**FIGURA 1** - Determinação da  $\text{CI}_{50}$  e viabilidade celular pelo ensaio de exclusão por azul de tripan em S180 após 72 h de exposição a CIT 74

**FIGURA 2** - Genotoxicidade em cultura primária de S180 após 72 h de exposição 75

**FIGURA 3** - Perfil fotomicrográfico de cultura primária de S180 no ensaio cometa 76

**FIGURA 4** - Apoptose e necrose induzidas por CIT em cultura primária de S180 após 72h de exposição 78

## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

TABELA 1 - Principais diferenças entre tumores benignos e malignos	27
--	----

### CAPÍTULO 1

TABELA 1 - Descrição das linhagens e genótipos de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas no estudo	46
---	----

TABELA 2- Avaliação da mutagenicidade e índice de danos ao DNA em raízes de <i>A. cepa</i> tratadas com CIT	55
---	----

### CAPÍTULO 2

TABELA 1 - Avaliação do índice de divisão nuclear (IDN), índice de danos nucleares indicativos de citotoxicidade (IDNC) e danos citogenéticos induzidos por CIT avaliados células de S180 após 72h de exposição pelo teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese	77
---	----

## RESUMO

Os fungos endofíticos são fontes de produtos naturais com potencial para a descoberta de novas moléculas, com atividades biológicas e mecanismos de ação indicativos para o desenvolvimento de formas farmacêuticas e antitumorais. A citrinina (CIT) isolada do *Penicillium citrinum* obtido da alga marinha *Dichotomata marginata* vem sendo relatada por suas atividades tóxicas, citotóxicas, nefrotóxicas, hepatotóxicas e genotóxicas, bem como antioxidante e neuroprotetora, em sua maioria, em cultura de células. Estima-se, para o Brasil no biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Os sarcomas são um grupo de tumores malignos heterogêneos de origem mesenquimal, caracterizados por vários tipos distintos, dependendo do seu tecido de origem. O tratamento envolve cirurgia, radioterapia, quimioterapia citotóxica, endocrinoterapia, dentre outros. Assim, a pesquisa teve por objetivos avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da citrinina em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e em raízes de *Allium cepa* e determinar o potencial antitumoral da citrinina em células tumorais murinas. As concentrações de CIT escolhidas para os testes foram de 2 µM/mL; 4 µM/mL e 8 µM/mL. No presente estudo, a CIT aumentou a frequência de aberrações cromossômicas (AC) em meristema de raízes de *A. Cepa* em todas as concentrações testadas e demonstrou efeitos citotóxicos em todas as linhagens de levedura, com ênfase para as linhagens deficitárias nas defesas antioxidantes, e cotratamento com o agente estressor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os efeitos citotóxicos foram superiores em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> isolado. Na avaliação da atividade antitumoral da CIT em células de Sarcoma 180, observou-se que a CIT induziu citotoxicidade em todas as concentrações testadas, tanto pela redução do índice de divisão nuclear (IDN) quanto pelo índice de divisão nuclear considerando a citotoxicidade (IDNC). Observou-se também um aumento na indução de morte celular por apoptose causado pela CIT.

**Palavras-chave:** Antineoplásicos. Citrinina. *Saccharomyces cerevisiae*. Sarcoma 180.

## ABSTRACT

Endophytic fungi are sources of natural products with potential for the discovery of new molecules, with biological activities and mechanisms of action indicative for the development of pharmaceutical and antitumor forms. Citrinin (CIT) isolated from *Penicillium citrinum* obtained from seaweed *Dichotomata marginata* has been reported for its toxic, cytotoxic, nephrotoxic, hepatotoxic and genotoxic activities, as well as antioxidant and neuroprotective, mostly in cell culture. Cancer is the name given to a set of more than 100 diseases that have in common the disordered (malignant) growth of cells that invade the tissues and organs and can spread (metastasize) to other regions of the body. Dividing rapidly, these cells tend to be very aggressive and uncontrollable, determining the formation of tumors (accumulation of cancer cells) or malignant neoplasms. It is estimated, for Brazil in the biennium 2018-2019, the occurrence of 600 thousand new cases of cancer, for each year. Sarcomas are a group of heterogeneous malignant tumors of mesenchymal origin, characterized by several distinct types, depending on their origin tissue. Treatment involves surgery, radiotherapy, cytotoxic chemotherapy, endocrine therapy among others. The aim of the study was to evaluate the cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of citrinin in *Saccharomyces cerevisiae* and *Allium cepa* strains and to determine the antitumor potential of citrinin in murine tumor cells. The CIT concentrations chosen for the tests were 2  $\mu\text{M}$  / mL; 4  $\mu\text{M}$  / mL and 8  $\mu\text{M}$  / mL. This dissertation was structured in two chapters. Chapter I evaluated the cytotoxicity, genotoxic and mutagenic affects of citrinin in *Saccharomyces cerevisiae* and *Allium cepa* strains. In the present study, CIT increased the frequency of chromosomal aberrations (CA) in *A.* strain root meristem at all tested concentrations and demonstrated cytotoxic effects in all strains, with emphasis on deficient lineages in antioxidant defenses, and cotreatment with the stressor agent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, the cytotoxic effects were higher than the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> alone. Chapter II evaluated the antitumor activity of CIT in Sarcoma 180 cells, and it was observed that CIT induced cytotoxicity in all concentrations tested, both by the reduction of the nuclear division index (IDN) and by the nuclear division index cytotoxicity (IDNC). An increase in the induction of cell death by apoptosis caused by CIT was also observed.

Keywords: Antineoplastic. Citrinin. *Saccharomyces cerevisiae*. Sarcoma 180.

## 1 INTRODUÇÃO

Muitos produtos naturais isolados de diferentes fontes como plantas, insetos, animais, bactérias, fungos ou protozoários apresentam-se como produtos biológicos ativos (STRHOL, 2000) e historicamente constitui-se como a maior fonte de medicamentos (VIEGAS Jr BOLZANI; BARREIRO, 2006). Assim, essas substâncias podem se transformar em uma grande variedade de fármacos, com numerosas indicações terapêuticas (KOEHN; CARTER, 2005).

Historicamente, dentre todos os organismos estudados, os fungos e actinomicetos tem se destacado como os organismos mais importantes na produção de metabólitos secundários (GUNATILAKA, 2006; QUIÑONES-AGUILAR; EVANGELISTA-MAR; RINCÓN-ENRÍQUEZ, 2016). A Citrinina é uma micotoxina de grande importância na agroeconomia e na saúde humana, porém dados sobre sua carcinogenicidade são escassos (CRUZ et al., 2016). Na área oncológica, há uma constante necessidade de novos sistemas terapêuticos mais eficazes para tratar a doença e reduzir os efeitos colaterais do paciente.

De acordo com O.M.S (2011), o câncer vem se configurando como importante problema de saúde pública, com maior incidência em populações de países em desenvolvimento. O número de casos novos cresce a cada ano e a estimativa é que brevemente o câncer ultrapassará as doenças cardiovasculares. Em 2018, as estimativas do INCA (Instituto Nacional de Câncer) foram de aproximadamente 582 mil novos casos de câncer no Brasil (INCA, 2017).

O câncer é considerado uma doença genética, uma vez que resulta de alterações (mutações gênicas e aberrações cromossômicas) em genes que estão comprometidos com o controle da proliferação e diferenciação celular (protooncogenes e genes supressores de tumor) e genes envolvidos nos mecanismos de reparo do DNA (genes mutadores) (ROCHA, 2011). Para Silva (2007), a alta incidência de câncer resulta primariamente da exposição a fatores de risco relacionados ao meio ambiente e ao estilo de vida. Porém, deve-se considerar ainda a existência do risco intrínseco, aquele herdado pelo indivíduo, decorrente de sua constituição genética.

No que concerne ao tratamento, existem três formas básicas de tratar o câncer, quais sejam, a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, que utilizam agentes químicos e físicos, isolados ou em combinação. Geralmente tais procedimentos produzem efeitos adversos ou tóxicos indesejáveis, que na maioria das vezes, não são bem tolerados pelos pacientes oncológicos (BONASSA, 2001), além de apresentarem um alto custo.



Diante disso, busca-se constantemente o desenvolvimento de novos sistemas terapêuticos menos agressivos, que possam gerar produtos inovadores e com possibilidade de aplicação antitumoral, diminuindo as reações adversas típicas dos tratamentos convencionais e com um custo mais acessível para a população necessitada. Nesse contexto, o estudo de fontes naturais no desenvolvimento de fármacos que auxilie no tratamento de neoplasias torna-se indispensável, dada a elevada demanda por novos tratamentos que busquem melhor prognóstico dos pacientes acometidos pelo câncer.

Assim, esse trabalho teve como objetivo investigar *in vitro* a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da citrinina em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e raízes de *Allium cepa* e avaliar a atividade *in vitro* antitumoral da Citrinina contra células de Sarcoma 180 transplantadas em camundongos.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da citrinina em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e em raízes de *Allium cepa* e determinar o potencial antitumoral da citrinina em células tumorais murinas.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar o envolvimento do estresse oxidativo no efeito citotóxico e genotóxico da CIT em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* proficientes ou não em suas defesas antioxidantes.
- Avaliar os efeitos antitumorais da CIT, por meio da viabilidade celular, de mecanismos citogenéticos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose em cultura primária de Sarcoma 180 (S-180), por meio da aplicação do ensaio cometa, teste de exclusão por azul de Tripán e CBMN.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 Produtos naturais oriundos de fungos endofíticos

Devido à resistência as drogas já existentes, houve uma necessidade de busca de novos compostos com atividade biológica úteis ao homem (MARINHO et al., 2011; KOSTYANEV et al., 2015). Embora os fungos sejam, na maior parte das vezes, lembrados pelos danos que causam (micoses e alergias) (SILVA; COELHO, 2006), os mesmos, se destacam por serem bons produtores de metabólitos secundários, onde muitos apresentam atividade biológica útil (MARINHO et al., 2011; AVALOS; LIMÓN, 2015).

Todos os dias, a população é beneficiada por produtos originados de fungos, seja de forma direta ou indiretamente. Principalmente, no desenvolvimento de antibióticos, como exemplo a penicilina sintetizada a partir do *Penicillium chrysogenum*; a ciclosporina isolada na década de 70 a partir do *Tolypocladium inflatum* e *Cylindro carponlucidum*, sendo utilizada para administrar em pacientes transplantados. Além disso, os fungos também são muito utilizados pelo seu poder fermentativo, na síntese de cerveja, vinho e massas em geral (SILVA; COELHO, 2006; CHAMBERGO; VALENCIA, 2016).

Os fungos são heterotróficos, sendo a característica mais marcante a de nutrição absorptiva, onde obtém energia degradando material orgânico encontrados na natureza. Estima-se que existe aproximadamente 1.500.000 espécies de fungos, embora se calcule que menos de 5% tenham sido descritas (HAWKSWORTH, 2001; MAIA; CARVALHO JUNIOR, 2010).

Os fungos endofíticos são importantes fontes de metabólitos secundários utilizados para a descoberta de novas moléculas usadas como medicamentos (PORRAS-ALFARO; BAYMAN, 2011; MACÍAS-RUBALCAVA; SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, 2017). Aproximadamente 60% dos produtos anticâncer e 70% dos medicamentos antimicrobianos são originados de produtos naturais ou derivados (MCALPINE et al., 2005; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Os que apresentam um potencial diversificado de metabólitos secundários são os fungos de ambiente marinhos, onde possuem uma grande fonte de metabólitos farmacologicamente ativos (ANDRADE, 2014).

Aproximadamente 21% dos novos compostos são produzidos a partir de fungos marinhos isolados de algas e 19% a partir de esponjas (RATEB; EBEL, 2011). As substâncias naturais, objeto de estudo desta pesquisa, foram isoladas do fungo endofítico da alga marinha *Dichotomaria marginata*, identificado como *Penicillium citrinum*. A alga pertence à ordem Nemaliales, classe Florideophyceae e família Galaxaura Ceae. Através de

pesquisas feitas em banco de dados por meio da ferramenta SciFinde, identificou-se poucos estudos químico-farmacológicos para esta espécie (ANDRADE, 2014).

Os fungos do gênero *Penicillium* pertencem ao filo Ascomycota, ordem Eurotiales e família Trichomaceae. O filo Ascomycota possui aproximadamente 30.000 espécies descritas e 2000 gêneros (MOORE-LANDECKER, 1996). O gênero *Penicillium* é dividido em quatro subgêneros: *Penicillium*, *Furcatum*, *Biverticillium* e *Aspergilloides*. Segundo Gomes (2011) os fungos pertencentes ao gênero *Penicillium* são muito utilizados como modelo em vários estudos de pesquisa, principalmente os metabólitos secundários que são fontes para produção de novos fármacos para a indústria farmacêutica.

Os metabólitos secundários podem possuir propriedades antitumorais, antibióticas, antivirais, antiparasitárias, hormonais, entre outras (SPECIAN et al., 2014). Sugere-se que as propriedades terapêuticas de uma planta medicinal possam ser devido à interação entre os fitoquímicos bioativos das plantas com os metabólitos produzidos por endófitos, podendo ser resultado da relação mutualística com o microorganismo ou exclusivamente da planta (GUZMÁN-RODRÍGUEZ et al., 2015).

O alcalóide obtido do endófito *Penicillium chrysogenum*, meleagrina, é um exemplo de um metabólito que mostrou capacidade de inibir o crescimento de linhagens de células de câncer de mama MDA-MB-231, MDA-468, BT-474, SK BR-3, MCF-7 e MCF7-Dox (MADY et al., 2016). Cerca de 100 produtos antitumorais foram desenvolvidos entre os anos 1981 a 2006, sendo que 25% eram derivados de produtos naturais, 18% semi-sintéticos de produtos naturais e 9% eram produtos naturais puros (SELIM et al., 2012). Na verdade, 52% dos novos produtos químicos e 47% do total dos medicamentos antitumorais introduzidos no mercado são de origem natural (CHIN et al., 2006). Desde a descoberta de fungos produtores de taxol, um potente agente anticancerígeno, grande atenção foi dada para a pesquisa de produtos naturais derivados de fungos endofíticos.

### 3.2 Citrinina

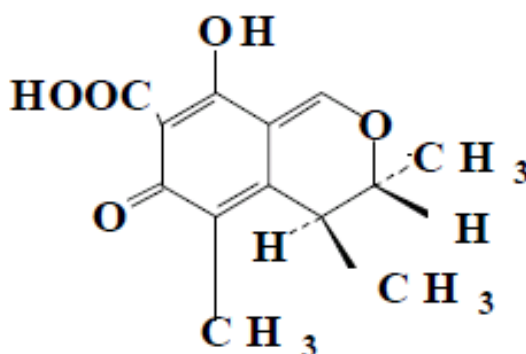
A palavra micotoxina tem origem grega *Mykes* que significa fungo e *Toxicum* que significava veneno ou toxina (PIRES, 2009). As micotoxinas são metabólitos secundários biossintetizados e excretados através das vias metabólicas. Elas compõem um grupo de substâncias químicas tóxicas que podem afetar órgãos e sistemas (MARTORELLI; FREIRE, 2001; DE RUYCK et al., 2015; ADAM et al., 2017). As micotoxicoses ganharam maior atenção a partir de 1960, devido um surto de mortes de aves no Reino Unido (principalmente

Perus), denominada de Turkey X. Observou-se que a grande mortalidade ocorreu devido ao consumo de uma substância produzida pelo fungo *Aspergillus flavus*, denominada Aflatoxina 3, que se encontrava na ração produzida com amendoim importado da África e do Brasil. Sendo assim, suspeitou-se de outros metabólitos que poderiam ser mortais (FREIRE et al., 2008). Embora existam centenas de micotoxinas, poucas foram extensivamente estudadas.

A micotoxina citrinina (CIT), também denominada de *antimicina*, é um metabólito conhecido desde 1931, quando foi isolada a partir de *Penicillium citrinum* e, em seguida, da planta australiana *Crotolaria crispata*. Também pode ser produzida por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Monascus* (FREIRE et al., 2008).

A CIT (**Figura 1**), (3R,4S)-4,6-dihidro-8-hidroxi-3,4,5-trimetil-6-oxo-3H-2-benzopirano-7-ácido carboxílico, possui fórmula molecular C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, e peso molecular de 250,25g/mol (RIBEIRO et al., 1997).

**Figura 1:** Estrutura química da citrinina.



Fonte: RIBEIRO et al. (1997)

A CIT apresenta uma coloração amarelo-limão em pH 4,6 e vermelho em pH 9,9, devido às duplas ligações conjugadas, que absorve luz no comprimento de onda visível. Seu ponto de fusão é em torno de 175° C. É solúvel em etanol aquecido, benzeno e clorofórmio, e praticamente insolúvel em água (BLANC *et al.*, 1995; VIVAN, 2002). A mesma pode ser encontrada em vários produtos agrícolas, tais como frutas secas, milho, produtos pecuários, leite e ovos. Podem contaminar o arroz (grãos), produzindo coloração amarelado, onde sua dose letal varia de 10 a 100 mg/kg, determinada em camundongos (SCOARIZE; FALCIONI, 2013).

A CIT classifica-se como uma micotoxina, devido a sua atividade hepatonefrotóxica em animais e humanos (RIBEIRO et al., 1997). Em algumas espécies de animais, de idade

entre 8 a 12 semanas, foram possíveis observar tremores musculares, dificuldade de locomoção, sialorréia e respiração ofegante (VIVAN, 2002). A citotoxicidade da mesma foi apontada em estudos em *Schizosaccharomyces pombe* por desequilíbrio da homeostase e pela perda de  $K^+$  (BLASKO et al., 2013).

De acordo com Baldi e colaboradores (2004), a CIT nas concentrações 0,1, 0,5 e 1 mM foi capaz de induzir citotoxicidade em células renais de camundongos após 10 horas de exposição, provocando alterações morfológicas de células e de mitocôndrias (CHAGAS et al., 1994). Além disso, apresentou citotoxicidade no teste MTT (teste do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), bem como em estudos de genotoxicidade (KUMAR et al., 2014). A CIT induz EROs e perda mitocondrial por liberação do complexo citocromo C, provocando apoptose, além de mecanismos de peroxidação lipídica em doses de 140 mg/kg e 420 mg/kg (BALDI et al., 2004).

Um dos efeitos de drogas antineoplásicas são as alterações tóxicas e citotóxicas que induzem apoptose celular (XIAO et al., 2003; HE et al., 2016). Nas concentrações de 20 a 100  $\mu$ M, a CIT mostrou-se induzir apoptose em várias culturas de células humanas, incluindo células leucêmicas, por parada no ciclo (Yu et al., 2006). A apoptose, provocada pela formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), está relacionada ao aumento da razão *Bax-Bcl2*, perda do potencial de membrana, indução do citocromo C e ativação de caspases (CHAN, 2007; HÜTTEMANN et al., 2017). A CIT também induz apoptoses em osteoblastos humanos, ativação da proteína *c-Jun* quinase, perda do potencial de membrana mitocondrial e ativação de proteína quinase 2 ativada por caspase 3 e p21 (PAK2) (HUANG et al., 2009).

Estudos em ratos mostraram que a CIT induz apoptose via alteração do potencial de membrana, mas esse mecanismo ainda não foi observado em células humanas (CHAN et al., 2007). A citotoxicidade da CIT está associada a alterações mitocondriais e com o fluxo do íon cálcio e permeabilidade em membranas de células renais e hepáticas, bem como pelas alterações e anormalidades cromossômicas (JESWAL et al., 1996) que podem levar à apoptose (KOGIKA, HAGIWARA, MIRANDOLA, 1993; SINGIREESU et al., 2018).

Hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e citotoxicidade em culturas de células eucarióticas também foram observadas (EFSA, 2012). A CIT apresenta inibição moderada da proliferação celular e indução de estresse oxidativo, o que pode explicar a ação dessa micotoxina em doenças renais. A indução de nefrotoxicidade altera a expressão das proteínas *p53* e *p21*, atenuando o sinal de fosforilação durante o ciclo celular e interferindo na integridade da divisão celular por mecanismos associados a parada do ciclo celular e formação de microtúbulos (CHANG et al., 2009).

Em culturas de células Vero e *in vivo*, a CIT produz fragmentação de DNA e aberrações cromossômicas, mecanismos que também podem explicar sua ação na indução de doenças renais e tumorigênese (BOUSLIM et al., 2008). A administração em ratos, de 9 mg/kg ou 0,1 mg/kg da CIT, induz aberrações cromossômicas e quebras de cromátides (JESWAL, 1996).

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que a CIT induz aberrações cromossômicas e quebras de cromátides irmãs e quebras de fitas de DNA (YU et al., 2006), bem como aneuploidia devido a paradas no ciclo celular. Efeitos genotóxicos também foram observados com o ensaio cometa em células Vero (YU et al., 2006). Esses dados indicam prováveis riscos de carcinogenicidade em células humanas, pois a CIT, por mecanismos moleculares, pode induzir perda de cromossomos, não disjunção, parada de mitose, desorganização dos microtúbulos, inibição de tubulinas e alterações numéricas de cromossomos (CHANG et al., 2008).

Existem relatos sobre a genotoxicidade e citotoxicidade da CIT em células embrionárias, pela indução de mecanismos incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio, atuação sobre os genes *Bax* e *Bcl-2*, perda de membrana mitocondrial, produção de óxido nítrico, liberação de citocromos C, ativação de caspases-9 e caspase 3, ativação do gene *p21* e das proteínas quinase 2 e c-JUN N-terminal. Por outros aspectos, a CIT também causa apoptose por inativação da chaperona HSP90 e degradação de *Ras* e *Rad 1* (CHAN, 2008). A CIT induz peroxidação lipídica e danos oxidativos em 15 mg/kg durante 60 dias. Além desses mecanismos, foi observada fragmentação de DNA indicativa de genotoxicidade e consequente indução de apoptose (KUMAR et al., 2014). Estudos anteriores relatam que as EROs medeiam danos ao DNA induzidos em pele de ratos, com parada do ciclo celular em G0/G1 e G2/M (KUMAR et al., 2011).

Embora a mutagenicidade em animais e humanos ainda seja pouco conhecida, em altas concentrações (800  $\mu$ M) a CIT induz citotoxicidade em células HEK293. Além disso, a exposição das culturas de linfócitos de sangue periférico de humanos, nas concentrações de 10 a 100  $\mu$ M, após 48 horas, aponta que a CIT é capaz de induzir efeitos genotóxicos pela indução de micronúcleos e células binucleadas (DÖNMEZ-ALTUNTAS et al., 2007).

A CIT induz a expressão de genes associados com danos ao DNA, tais como o *Gadd45 $\beta$*  em células humanas levando a riscos toxicológicos (CHANG et al., 2009). Também existem relatos sobre a indução de apoptose e formação de micronúcleos (DONMEZ-ALTUNTAS et al., 2007; YU et al., 2006). Danos ao DNA podem acontecer devido à ação da CIT na produção de EROs por ativação da proteína MAPK (WU et al., 2003). Em ratos, altas

doses de CIT aumenta a expressão de mRNA para *Ccna2* e *Ccnb1* e para fatores de transcrição *E2f1*. Também foram evidenciados genotoxicidade (BOUSLIMI et al., 2008; LIU et al., 2003), aberrações cromossômicas (BOUSLIMI et al., 2008; CHANG et al., 2011) e alterações no ciclo celular (KURODA et al., 2013).

A CIT ativa genes de resposta ao estresse, tais como *AADs*, *FLR1*, *OYE3*, *GRE2* e *MET17*, que são responsáveis pela síntese de glutatona, inibindo assim o crescimento de leveduras em altas concentrações (100 ppm). Entretanto, a CIT não induz a expressão de genes de reparo de DNA (IWAHASHI et al., 2007). A CIT possui efeitos tóxicos, mitogênicos e genotóxicos em linhagem HepG2, pela formação de micronúcleos e pela fragmentação de DNA, entretanto, mutagenicidade não foi observada em teste com *Salmonella/microsoma* (KNASMULLER et al., 2004).

Além das atividades citotóxicas, genotóxicas e apoptóticas, a CIT induz imunotoxicidade em linhagem celular de macrófagos RAW264, tendo o óxido nítrico como um pró-inflamatório mediador, com indução de peroxidação lipídica (SUGIYAMA et al., 2013). Em baixas concentrações (2,5 a 10  $\mu$ M), a CIT pode suprimir peroxidação lipídica (LIU et al., 2010). Além disso, a CIT induz organotoxicidade em vários modelos embrionários com malformação, edema pericardial e acúmulo de sangue em ventrículos e átrios, além de modular a expressão de *tbx2a* e *aldh 1 e 2* e *cspg2*, indicando cardiotoxicidade (WU et al., 2013).

### 3.3 Biomarcadores toxicogenéticos

O setor da genética que estuda os processos que alteram a base genética é a genotoxicidade (SCHEREN; STROHSCHOEN, 2013). A mesma é induzida por agentes químicos e/ou físicos que interagem com o DNA, podendo ocasionar quebras de fitas, mutações de ponto e alterações estruturais e numéricas aos cromossomos (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). Atualmente está sendo bastante pesquisada, devido está relacionada à mutagênese, envelhecimento celular, câncer, entre outras.

A função primária da avaliação de genotoxicidade é investigar, usando células ou organismos, algum tipo de mutação ou alterações nas células somáticas que possam ser transmitidas às futuras gerações por meio dos gametas (SCHEREN; STROHSCHOEN, 2013). Considerando isso, os testes de genotoxicidade tornaram essenciais para validação de drogas. Sendo assim, possuem comitês internacionais e nacionais de regulamentação, como a Food and Drug Administration (FDA), Agência Européia de Medicamentos (EMA) e Agência



Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, Brasil) (HARTMANN, 2004; ARALDI et al., 2015; SPONCHIADO et al., 2016). Essas diretrizes detectam eventos mutagênicos, tais como pequenas deleções, recombinações mitóticas ou alterações cromossômicas detectáveis ao microscópio e alterações moleculares (pontuais ou gênicas) (SILVA; FONSECA, 2003). Essas alterações no material genético podem ser detectadas com aplicação de biomarcadores citogenéticos e/ou moleculares.

Para realizar análise de detecção de danos ao material genético, geralmente são realizadas com aplicação de diversos testes não clínicos, em estudos *in vitro* e *in vivo*, a exemplo do teste em *Salmonella typhimurium* (teste de AMES), cometa, micronúcleos, *Allium cepa*, aberrações cromossômicas e mutações de genes em roedores (GAJARDO; BEARDMORE, 2012; VERRI; MOURA; DE MOURA, 2018). Diversos estudos nacionais e internacionais também apontam que os testes para detecção de genotoxicidade apresentam correlações positivas para carcinogenicidade. O Ensaio Cometa e o Teste de Micronúcleos são indicados na avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade, especialmente de forma associada (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015).

O ensaio cometa (EC) ou também denominado de técnica da eletroforese celular em microgel, é largamente empregado para avaliar danos e reparos de DNA em células individuais. Possui, como princípio, degradar as membranas celulares, induzir a migração eletroforética do DNA liberado em matriz de agarose. Quando vista ao microscópio, nota-se que a célula adquire uma forma aparente de um cometa (cabeça, região nuclear e cauda), com presença de fragmentos de DNA migrando em direção ao anodo. As medidas do comprimento da cauda como a densidade de DNA fornecem dados sobre o estado do DNA da amostra (BRIANEZI; CAMARGO; MIOT, 2009; WANG et al., 2016).

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, e sim lesões genômicas, que podem ser reparadas, caso não seja reparada, pode ocasionar mutação (CONTIJO; TICE, 2003; GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). Pode detectar danos facilmente no DNA, são eles: danos álcali-labeis, *crosslinks*, quebras (simples ou duplas) e os resultantes de reparo por excisão. As vantagens em relação aos testes bioquímicos e citogenéticos, é que o ensaio cometa pode ser utilizado para qualquer tipo de célula desde que individualizada, sendo necessário somente em um pequeno número das mesmas e não requer células em divisão (RANDON, 2006; SINGH, 2018).

As vantagens fornecidas pelo ensaio incluem simplicidade, baixo custo e tempo, já que o protocolo pode ser executado em menos de 24 horas. Permite assim, analisar a genotoxicidade em tecidos que estão em contato direto com a substância testada. O EC foi

adotado como parte da bateria de testes de validação de novos medicamentos pelas indústrias farmacêuticas, após receber como padronização da metodologia no Workshop Internacional sobre Procedimentos de Testes de Genotoxicidade (ARALDI et al., 2015).

Os fármacos e as nanopartículas podem induzir toxicidade celular. Dentre os mecanismos de toxicidade, incluem-se os danos ao material genético, que podem ser observados através do Ensaio Cometa (EC) (VANDGHANOONI; ESKANDANI, 2011). O Ensaio Cometa vem sendo reconhecido internacionalmente, assim como o de micronúcleos *in vivo*, para avaliação do potencial genotóxico de químicos carcinógenos. A sua versão alcalina é, dentre vários, um método que estima os danos ao DNA e também determina a eficácia de reparo. O teste pode ser aplicado em estudos de monitoramento clínico, entendimento da patogênese do câncer e de doenças degenerativas, predição de tumores, radiações e quimioterapias e estudos de infertilidades, assim como avaliação de riscos ocupacionais e ambientais (GUNASEKARANA; GLADWIN; CHAND, 2015; OGUNSUYI et al., 2018). Diversas células podem ser usadas em estudos de biomonitoramento clínico, tais como células mononucleares do sangue periférico, células do epitélio bucal, nasal, epitelial, espermas, como também biópsias de tecidos (LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009; SINGH, 2018).

Em 1951 foi introduzido o termo Micronúcleo (MN) que também é denominado como corpos de Howell-Jolly (HAYASHI; KRISHNA, 2000; BRITO; SINGSDAL; HOLTE, 2018). Os MN são fragmentos acêntricos expelidos do núcleo principal nas fases finais da anáfase. Sendo formado pela aneugênese (perda de cromossomos) ou clastogênese (quebra de centrômeros) (BOLOGNESI; FENECH, 2012). São considerados MN aqueles formados e separados do núcleo principal da célula, com o tamanho aproximadamente de 1/5 a 1/20 do tamanho deste núcleo e ainda que não ultrapassem em 1/3 o tamanho do núcleo principal (MARQUES, 2011).

Os MNs têm sido propostos desde 1959, como marcadores de danos citogenéticos, embora somente em 1970 houve a análise de frequência de MNs por Boller e Schimid, sendo a última empregada em eritrócitos policromáticos de medula óssea (KIRSCH-VOLDERS et al., 2003). O MN tem sido amplamente utilizado em estudos de genotoxicidade (ARALDI et al., 2015).

As agências reguladoras e a comunidade científica têm aceitado o Teste de Micronúcleos, em medula óssea de camundongos, como ferramenta apropriada para avaliar a segurança de um produto (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2007; IGL et al., 2019). Para avaliação de genotoxicidade de químicos *in vitro*, o Teste de Micronúcleos com Bloqueio de Citocinese é recomendado (CBMN) (EL-ZEIN; VIRAL; ETZEL, 2011; DHILLON et al.,

2018). As vantagens fornecidas pelo teste de MNs incluem facilidade, rapidez na análise, não necessidade de células em metáfase, sensibilidade, precisão e detecção de outros parâmetros como as pontes dicêntricas (RANDON, 2006).

### **3.4 Câncer e sarcoma**

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) é irrefutável que o câncer é um problema de saúde pública, exigindo suporte em campos políticos, econômicos, físicos e emocionais, principalmente nos países de média e baixa renda, sendo que nas próximas décadas, o impacto do câncer na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (INCA, 2016). No biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano foi estimada no Brasil. Excluindo-se o câncer de pele não melanoma (aproximadamente 170 mil casos novos) (INCA, 2018a). O mesmo constitui como a segunda causa responsável pelo maior número de mortes no mundo, superado apenas pelas doenças cardiovasculares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2014). Entretanto, projeta-se que em breve, nos países desenvolvidos, os cânceres ultrapassarão as doenças cardiovasculares (CARVALHO et al., 2014).

Neoplasia é o nome científico do câncer, que significa ‘’ novo crescimento’’, as células neoplásicas consistem em uma proliferação mesmo na ausência de fatores de crescimento, enquanto as células normais não conseguem. Entretanto, o que diferencia um tumor benigno de um maligno, é que este consegue penetrar outros tecidos e formar novos tumores (BELIZÁRIO, 2002).

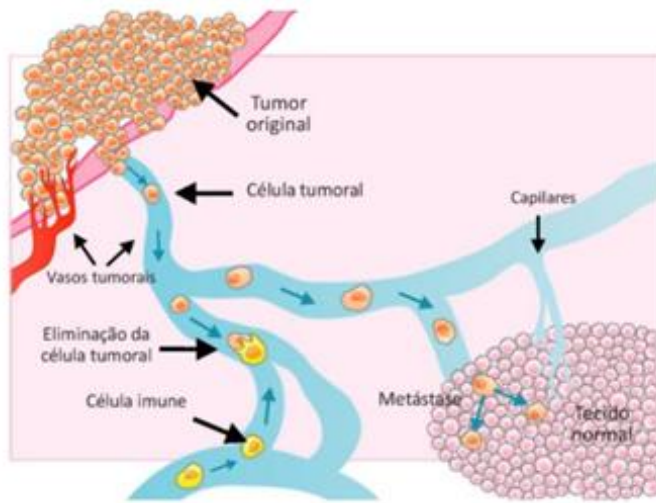
**Tabela 1:** Principais diferenças entre tumores benignos e malignos

<b>Tumor benigno</b>	<b>Tumor maligno</b>
Formado por células bem diferenciadas (semelhantes às do tecido normal); estrutura típica do tecido de origem	Formado por células anaplásicas (diferentes das do tecido normal); atípico; falta de diferenciação
Crescimento progressivo; pode regredir; mitoses normais e raras	Crescimento rápido; mitoses anormais e numerosas
Massa bem delimitada, expansiva; não invade nem infiltra tecidos adjacentes	Massa pouco delimitada, localmente invasivo; infiltra tecidos adjacentes
Não ocorre metástase	Metástase frequentemente presente

Fonte: Instituto Nacional do Câncer (2018b)

Para determinar uma célula neoplásica é necessário adquirir as seguintes capacidades biológicas e vantagens metabólicas: crescimento desordenado de células, imortalização celular, perda da função e da capacidade de diferenciação ou especialização, infiltração progressiva, invasão do tecido circunjacente, que pode resultar na formação de metástase (BELIZÁRIO, 2002; CAO et al., 2015; GRIESMANN et al., 2017).

Denomina-se de metástase (**Figura 2**) quando as células cancerosas invadem a corrente sanguínea ou linfática, sendo transportados para outras áreas do corpo, onde começam a crescer e formar novos tumores, saindo do sítio primário para um novo foco proliferativo, sendo a principal característica do câncer (INCA, 2018b). Cerca de 30% dos pacientes com diagnóstico de tumores sólidos (excluindo-se os cânceres de pele não melanoma) desenvolvem metástases (COTRAN, 2000; HERNANDEZ et al., 2018).

**Figura 2:** Mecanismos de metástase

**Fonte:** Instituto Nacional do Câncer

Os tumores podem ser causados por diferentes fatores, podendo ser externas ou internas ao organismo, interação entre fatores geneticamente predeterminados, quanto aspectos ambientais (ambiente de consumo, sociocultural e ocupacional). Hoje é bem estabelecido o papel que sua etiologia desempenha (BRAY et al., 2012; LU et al., 2016).

Estudos experimentais têm demonstrado que vários fatores são capazes de induzir agressão ao genoma e levar ao desenvolvimento neoplásico, como os químicos (e.g. presentes no cigarro), físicos (e.g. raio ultravioleta) e biológicos (e.g. vírus Epstein-Barr) (Loeb&Loeb, 2000; WU et al., 2016). As terapias utilizadas atualmente para o tratamento do câncer são realizadas através de cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou transplantes de medula óssea. Em muitos casos, envolvem combinações entre agentes químicos e físicos, combinados ou separadamente, o que provoca efeitos colaterais e/ou resistência para o paciente (BAST JÚNIOR et al., 2003; LANDRY; GARSA; GLASTONBURY, 2016; CROSSNOHERE et al., 2018). Sendo assim, as principais metas é a obtenção da cura, prolongamento da vida útil e melhora da qualidade de vida (INCA, 2018b).

Intitula-se carcinoma, o tumor que se inicia em tecidos epiteliais, pele ou mucosas. Caso seja em tecidos conjuntivos, músculos, cartilagem ou ossos, ele é designado sarcoma (INCA, 2018a). Os sarcomas apresentam-se em duas categorias: 20% descendem do sarcoma de osso e aproximadamente 80% são provenientes de tecidos moles (músculo, nervo, vasos sanguíneos, bainha de nervo, gordura e outros tecidos conjuntivos). Estes estabelecem um grupo heterogêneo de tumores sólidos raros de origem celular mesenquimatosa, possuindo

características patológicas e clínicas diferentes (DEMETRI et al., 2010; RATAN; PATEL, 2016)

Coletivamente, os sarcomas de partes moles são neoplasias malignas relativamente raras, e representam aproximadamente 1% de todos os tumores em adultos e 15% de todas as neoplasias pediátricas. Entretanto, é mais encontrado na idade adulta, especialmente em maiores de 50 anos (LAHAT; LZAR; LEV, 2008; VON MEHREN et al., 2016). A maioria dos locais acometidos são as extremidades (43%), seguidos em ordem de frequência membros inferiores, vísceras (19%), retroperitônio (15%), tronco/tórax (10%) e outras localizações (13%) (CLARK et al., 2005; CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK, 2017).

O tratamento dos sarcomas de baixo grau consiste na ressecção completa do tumor com margens cirúrgicas adequadas, com ampla margem de segurança de 2 a 4 cm, possibilitando maior sobrevida, evitando as perdas funcionais sempre que possível (TUNN; KETTELHACK; DÜRR, 2009; RAMU et al., 2017). Entretanto, pacientes com risco de recorrência possam assegurar o controle local, através de novas estratégias como a radioterapia (WILMAR et al., 2008). A radioterapia está bem relacionada aos sarcomas de alto grau com mais de 5 cm, operados com margens comprometidas, ou menores do que 1 cm. O uso da quimioterapia é controverso para boa parte das lesões (ALEKTIAR et al., 2002; CASALI et al., 2018).

Os fármacos mais potentes para o tratamento de pacientes com sarcomas avançados de tecidos moles são: ifosfamida e antraciclina, da maioria dos subtipos histológicos, encontram-se excluídos os tumores estomacais gastrointestinais. Entretanto, se os pacientes apresentarem resistência as estas drogas, terão poucas opções para o tratamento (MILANO et al., 2006; SEDDON et al., 2017; SAVANI; MURUGAN; SKUBITZ, 2019).

A manutenção de células tumorais de sarcoma 180 podem ser realizadas de duas maneiras, a primeira, por meio de cultura celular (suspensão *in vitro*) e a segunda, através da inoculação em camundongos, nos músculos, permitindo a formação de tumores sólidos, ou inoculando na cavidade intraperitoneal, desenvolvendo assim, um tumor ascítico. Desde a descoberta, ela tem sido mantida por transplantes sucessivos (ZUCKERBERG, 1973; YI et al., 2017). Entre 90 a 100% dos casos, o tumor se desenvolve, após a inoculação (BUCCHI, 2002). Sendo assim, há um regresso natural desses 10%.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, A.; ADAM, M.; TABANA, Y. M.; MUSA, K. B.; SANDAI, D. A. Effects of different mycotoxins on humans, cell genome and their involvement in cancer. **Oncology reports**, v. 37, n. 3, p. 1321-1336, 2017.
- ALEKTIAR, K. M.; LEUNG, D; ZELEFSKY, MJ, BRENNAN, MF. Adjuvant radiation for stage II-B soft tissue sarcoma of the extremity. **J ClinOncol**.v. 20, n. 6, p. 1643-650, 2002.
- ANDRADE, T. J. A. S. **Investigação Química e Biológica dos Metabólitos Secundários Derivados de Macroalgas Marinhas e Microrganismos Associados**. 358 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara – SP, 2014.
- ARALDI, R. P.; DE MELO, T. C.; MENDES, T. B.; DE SÁ JÚNIOR, P. L.; NOZIMA, B. H. N.; ITO, E. T.; DE CASSIA STOCCO, R. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: a review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 72, p. 74-82, 2015.
- ARALDI, R. P.; MELO, T. C.; MENDES, T. B., SÁ JÚNIOR, P. L., NOZIMA, B. H. N., TIEMI, E.; CARVALHO, R. F.; SOUZA, E. B.; STOCCO, R. C. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**,v. 72, p. 74–82, 2015.
- AVALOS, J.; LIMÓN, M. C. Biological roles of fungal carotenoids. **Current genetics**, v. 61, n. 3, p. 309-324, 2015.
- BALDI, A.; LOSIO, M.N.; CHELI, F.; REBUCCI, R. **Evaluation of the protective effects of  $\alpha$ -tocopherol and retinol against ochratoxinA cytotoxicity**. **British Journal of Nutrition**, v.91, p. 504-512, 2004.
- BAST Jr. R.C., KUFÉ, D.W., POLLOCK, R.E., WEICHSELBAUM, R.R, HOLLAND, J.F., FREI, E., **Holland - Frei Cancer Medicine**, 6 ed., BC Decker INC., Hamilton, 2003.
- BELIZÁRIO, J.E. O próximo desafio reverter o câncer. Departamento de Farmacologia. **J. Ciência Hoje**, São Paulo, v. 31, n. 184, p. 51-59, 2002.
- BLANC P. J.; LORET M.O.; GOMA, G. Production of citrinin by various species of *Monascus*. **Biotechnology Letters**, v.17, n.3, p.291-294, 1995.
- BLASKÓ, Á.; MIKE, N.; GRÓF, P.; GAZDAG, Z.; CZIBULYA, Z.; NAGY, L.; KUNSÁGI-MÁTÉ, S.; PESTI, M. Citrinin-induced fluidization of the plasma membrane of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 636-642, 2013.
- BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v. 7, p. 1125-1137, 2012.
- BONASSA, E. M. A. **Enfermagem em terapêutica oncológica**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu, 2001.

BOUSLIMI, A.; OUANNES, Z.; GOLLI, E.E.; BOUAZIZ, C.; HASSEN, W.; BACHA, H. Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxina and citrinin: individual and combined effects. **Toxicology Mechanisms Methods**, v. 18, p. 341-349, 2008.

BRAY F. JEMAL, A. GREY, N. FERLAY, J. FORMAN, D. Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. **J. Lancet Oncol**, v. 13, p. 790-801, 2012.

BRIANEZI, G.; CAMARGO, J. L. V.; MIOT, H. A. Desenvolvimento e validação de técnica quantitativa de análise de imagem para avaliação do teste do cometa corado pela prata. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 45, n. 4, p. 325-334, ago. 2009.

BRITO, M. D; SINGSDAL, K.; HOLTE, H. The Two Types of Detached Nuclear Fragments Behind the Howell-Jolly Eponyme. **Hem Disease Therapies: JHDT-114. DOI**, v. 2017, p. 2577-1418, mai. 2018. DOI 10.29011/2577-1418. 000014. Disponível em: <<https://pdfs.semanticscholar.org/d8dd/e0698321fccb19320797346c3c83a6f4dfde.pdf>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

BUCCHI, D. F. **Efeitos do medicamento homeopático. Método Canova em camundongos normais e portadores do tumor Sarcoma 180**. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2002.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. Comprehensive and integrated genomic characterization of adult soft tissue sarcomas. **Cell**, v. 171, n. 4, p. 950, 2017.

CAO, H.; XU, E.; LIU, H.; WAN, L.; LAI, M. Epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer metastasis: a system review. **Pathology-Research and Practice**, v. 211, n. 8, p. 557-569, 2015.

CARVALHO. M. D.; MOURA, L.; PRADO, R. R.; ESCALANTE, J. C.; SCHMID, M. I.; DUNCAN, B. B. Mortalidade por doenças crônicas não transmissíveis no Brasil e suas regiões, 2000 a 2011. **Ver. Epidemiol Serv Saúde**, v. 23, n. 4, p. 599-608, 2014.

CASALI, P. G.; ABECASSIS, N.; BAUER, S.; BIAGINI, R.; BIELACK, S.; BONVALOT, S.; BUONADONNA, A. Soft tissue and visceral sarcomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 29, n. Supplement 4, p. iv51-iv67, 2018.

CHAGAS, G. M.; KLIIPPEL, M.L.W.; CAMPELLO, A.P.; BUCHI, D.F.; OLIVEIRA, M.B.M. Alterations Induced by Citrinin in Cultured Kidney Cells. **Cell structure and function**, v.19, p. 103-108, 1994.

CHAMBERGO, F. S.; VALENCIA, E. Y. Fungal biodiversity to biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 100, n. 6, p. 2567-2577, 2016.



CHAN, W.H. Effects of Citrinin on Maturation of Mouse Oocytes, Fertilization, and Fetal Development in Vitro and in Vivo. **Toxicology Letters**, v. 180, p. 28-32, 2008.

CHAN, W.H.; WU, H.J.; SHIAO, N.H. Apoptotic signaling in meth-ylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.100, p.1056–1069, 2007.

CHANG, C.H.; YU, F.Y.; WANG, L.T.; LIN, Y.S.; LIU, B.H. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, p. 281-287, 2009.

CHANG, Y.; KONG, Q.; SHAN, X.; TIAN, G.; ILIEVA, H.; CLEVELAND, D.W. Messenger RNA Oxidation Occurs Early in Disease Pathogenesis and Promotes Motor Neuron Degeneration in ALS. **Plos one**, v.3, p.28-49, 2008.

CHIN, Y.W.; BALUNAS, M.J.; CHAI, H.B.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v.8, p. 239–253, 2006.

CLARK M.A., FISCHER C., JUDSON I., THOMAS J.M. Soft-Tissue Sarcomas in Adults - review article. **N Engl J Med**. v. 353, p. 701-11, 2005.

CONTIJO, A. M. M.; TICE, R. Teste do cometa para detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D. M. F., MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, 2003.

COTRAN, R.S., KUMAR, V., COLLINS, T. **Robbins Pathologic basis of diseases**. 6nd ed. WB Saunders Company: Philadelphia, 2000.

CROSSNOHERE, N.; RICHARDSON, D. R.; SMITH, B. D.; REINHART, C.; O'DONOGHUE, B.; LOVE, S.; BRIDGES, J. F. Understanding the Collateral Damage of Treating Acute Myeloid Leukemia: **An Estimate of Patient-Reported Side Effect Rates from a National Survey**. 2018.

CRUZ, J. S.; COSTA, G. L.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. História, Aplicações, Atividade e Modificações da Citrinina.**Rev. Virtual Quim**. v. 8, n. 3, p. 650-664, 2016.

DEMETRI, G.D., ANTONIA, S., BENJAMIN, R.S., BUI, M.M., CASPER, E.S., CONRAD, U.E ... WAYNE, J. Sarcoma de tecido mole. **Revista JNCCN da National Comprehensive Cancer Network**, v. 8, p. 630-670, 2010.

DE RUYCK, K.; DE BOEVRE, M.; HUYBRECHTS, I.; DE SAEGER, S. Dietary mycotoxins, co-exposure, and carcinogenesis in humans: Short review. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 766, p. 32-41, oct-dec2015. DOI. 10.1016/j.mrrev.2015.07.003 Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26596546>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

DHILLON, V. S.; YEOH, E.; SALISBURY, C.; BUTTERS, J.; DI MATTEO, A.; OLVER, I.; FENECH, M. Cytokinesis Block Micronucleus Cytome (CBMN Cyt) Assay Biomarkers and Their Association With Radiation Sensitivity Phenotype in Prostate Cancer Cases and DNA Repair Gene hOGG1 (C1245G) Polymorphism. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 59, n. 9, p. 813-821, 2018.

DÖNMEZ-ALTUNTAS, H.; DÜMLUPINAR, G.; IMAMOĞLU, N.; ZUHAL HAMURCU, Z.; LIMAN, B.C. Effects of the mycotoxincitrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. **Journal of applied toxicology**, v. 27, p. 337-341, 2007.

EL-ZEIN, R.; VRAL, A.; ETZEL, C.J. Cytokinesis-blocked micronucleus assay and cancer risk assessment. **Mutagenesis**, v. 26, p. 101-106, 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Scientific opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed. Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM), Italy, 23 mar. 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2605>>. Acesso em 18 mar. 2018.

FREIRE, F. C. O.; VIEIRA, I. G. P.; GUEDES, M. I. F.; MENDES, F. N. P. Micotoxinas: Importância na alimentação e na saúde humana e animal. **Embrapa Agroindústria Tropical**, v.1, p. 01-48, 2008.

GAJARDO, G. M.; BEARDMORE, J. A. The brine shrimp artemia: adapted to critical life conditions. **Frontiers in Physiology**, v. 3, p. 1-8, 2012.

GOMES, D. C. **Produção de Esclerotiorina Por *Penicillium sclerotiorume* e obtenção de derivados com aplicação potencial em alimentos**. 122 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2011.

GOMES-FIGUEREIDO, J. A. **Bioprospecção, caracterização morfológica e molecular de endófitos de *Maytenus ilicifolia*, com ênfase em *Pestalotiopsis* spp.** 136 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Setor de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia, Parasitologia e Patologia Básica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

GRIESMANN, H.; DREXEL, C.; MILOSEVIC, N.; SIPOS, B.; ROSENDAHL, J.; GRESS, T. M.; MICHL, P. Pharmacological macrophage inhibition decreases metastasis formation in a genetic model of pancreatic cancer. **Gut**, v. 66, n. 7, p. 1278-1285, 2017.

GUNASEKARANA, V.; RAJ, G. V.; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, p. 1-5, 2015.

GUNATILAKA, A. A. L. Natural products from plant-associated microorganisms: distribution, structural diversity, bioactivity, and implications of the occurrence. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 3, p. 509 – 526, 2006.

GUZMÁN-RODRÍGUEZ, J. J.; OCHOA-ZARZOSA, A.; LÓPEZ-GÓMEZ, R.; LÓPEZ-MEZA, J. E. Plant antimicrobial peptides as potential anticancer agents. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

HARTMANN, A. **Use of the alkaline in vivo Comet assay for mechanistic genotoxicity investigations**, *Mutagenesis*, [S.I.], v. 19, p. 51–59, 2004.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews drug discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

HAWKSWORTH, D.L. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. **Mycological Research**, v. 105, p. 1422- 32, dec. 2001.

HE, G.; HE, G.; ZHOU, R.; PI, Z.; ZHU, T.; JIANG, L.; XIE, Y. Enhancement of cisplatin-induced colon cancer cells apoptosis by shikonin, a natural inducer of ROS in vitro and in vivo. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 469, n. 4, p. 1075-1082, 2016.

HERNANDEZ, R. K.; WADE, S. W.; REICH, A.; PIROLI, M.; LIEDE, A.; LYMAN, G. H. Incidence of bone metastases in patients with solid tumors: analysis of oncology electronic medical records in the United States. **BMC cancer**, v. 18, n. 1, p. 44, 2018.

HUANG, Y.T.; LAI, C.Y.; LOU, S.L.; YEH, J.M.; CHAN, W.H. Activation of JNK and PAK2 is essential for citrinin-induced apoptosis in a human osteoblast cell line. **Environmental Toxicology**, v. 24, p. 342-356, 2009.

HÜTTEMANN, M.; MAHAPATRA, G.; LEE, I.; GROSSMAN, L. I.; VAISHNAV, A.; MORAES, C. T.; EDWARDS, B. F. Regulation of Cytochrome C by Phosphorylation: Mitochondrial Respiration and Apoptosis. **Biophysical Journal**, v. 112, n. 3, p. 438a, 2017.

IGL, B. W.; BITSCH, A.; BRINGEZU, F.; CHANG, S.; DAMMANN, M.; FRÖTSCHL, R.; NERN, M. The rat bone marrow micronucleus test: Statistical considerations on historical negative control data. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 102, p. 13-22, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), Estimativa 2016, **Incidência de Câncer no Brasil**, INCA, Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <[http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa\\_2016.pdf](http://www.inca.gov.br/bvscontrolecancer/publicacoes/edicao/Estimativa_2016.pdf)>. Acesso em: 18 mar. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), Estimativa 2018, **Incidência de Câncer no Brasil**, INCA, Rio de Janeiro, 2018f. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/estimativa-2018.pdf>> Acesso em: 18 mar. 2018. (2018a).

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), **O que é o Câncer?** Rio de Janeiro, 2018f. Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 18 mar. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. 41ª ed. rev. Rio de Janeiro: INCA, 2018b1. 128 p.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer. 2ª ed. rev. e atual. Rio de Janeiro: INCA; 2012.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. **Coordenação de Educação. Estimativa 2018: incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2017.

IWAHASHI, H.; KITAGAWA, E.; SUZUKI, Y.; UEDA, Y.; ISHIZAWA, Y.; NOBUMASA, H.; KUBOKI, Y.; HOSODA, H.; IWAHASHI, Y. Evaluation of toxicity of the mycotoxin citrinin using yeast ORFDNA microarray and Oligo DNA microarray. **Genomics**, v.8, p. 95-100, 2007.

JESWAL P. Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of *Mus musculus*. **Cytobios**, v.86, p. 29–33, 1996.

KIRSH-VOLDERS, M.; SOFUNI, T.; AARDEMA, A.; ALBERTINI, S.; EASTMOND, D.; FENECH, M.; et al., **Report from the in vitro micronucleus assay working group**, *Mutat. Res.* v. 540, p. 153–163, 2003.

KNASMÜLLER, S.; CAVIN, C.; CHAKRABORTY, A.; DARROUDI, F.; MAJER, B.J.; HUBER, W.W.; EHRLICH, V.A. Structurally related mycotoxins ochratoxin a, ochratoxin b, and citrinin differ in their Genotoxic Activities and in Their Mode of Action in Human-Derived Liver (HepG2) Cells: Implications for Risk Assessment. **Nutrition and Cancer**, v.50, p. 190-197, 2004.

KOEHN, F.E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews**, v. 4, p. 206 – 220, 2005.

KOGIKA, M. M.; HAGIWARA, M. K.; MIRANDOLA, R. M. Experimental citrinin nephrotoxicosis in dogs: renal function evaluation. **Veterinary & Human Toxicology**, v. 35, p.136–140, 1993.

KOSTYANEV, T.; BONTEN, M. J. M.; O'BRIEN, S.; STEEL, H.; ROSS, S.; FRANCOIS, B.; HARBARTH, S. The Innovative Medicines Initiative's New Drugs for Bad Bugs programme: European public–private partnerships for the development of new strategies to tackle antibiotic resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 2, p. 290-295, 2015.

KRISHAN, G.; HAYASHI, M. **In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation**. *Mutat. Res.* v. 455, p. 155–166, 2000.

KUMAR, M.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A.K.; SANKAR, M.; PATIL, R.D.; SINGH, N.D. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A- and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Toxicology Industrial Health**, v. 30, p. 90-98, 2014.

KUMAR, R.; DWIVEDI, P.D.; DHAWAN, A.; DAS, M.; ANSARI, K.M. Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. **Toxicological Sciences**, v. 122, p. 557-566, 2011.

KURODA, K.; ISHII, Y.; TAKASU, S.; KIJIMA, A.; MATSUSHITA, K.; WATANABE, M.; TAKAHASHI, H.; KONISHI, Y.S.; SAKAI, H.; YANAI, T.; NOHMI, T.; OGAWA, K.; UMEMURA, T. Cell cycle progression, but not genotoxic activity, mainly contributes to citrinin-induced renal carcinogenesis. **Toxicology**, v. 311, p. 216-224, 2013.

LAHAT, G.; LAZAR, A.; LEV, D. Sarcoma Epidemiology and etiology: potential environmental and genetic factors. **Surgical Clinics of North America**, v. 8, p. 451 – 481, 2008.

LANDRY, D.; GARSA, A. A.; GLASTONBURY, C. M. Imaging of cerebral radionecrosis: collateral damage from head and neck radiation. **Neurographics**, v. 6, n. 3, p. 151-158, 2016.

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

LIU, B.H.; CHI, J.Y.; HSIAO, Y.W.; TSAI, K. D.; LEE, Y.J.; LIN, C.C.; HSU, S.C, YANG S-M AND LIN T-H. The fungal metabolite, citrinin, inhibits lipopolysaccharide/interferon-gamma-induced nitric oxide production in glomerular mesangial cells. **International Immunopharmacology**, v. 10, p. 1608-1615, 2010.

LIU, B.H.; YU, F.Y.; WU, T.S.; LI, S.Y.; SU, M.C.; WANG, M.C.; SHIH, S.M. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, p. 255–263, 2003.

LOEB K.R.; LOEB L.A. Significance of multiple mutations in cancer. **Carcinogenesis**, v. 21, p. 379-85, 2000.

LU, Y.; SEGELMAN, J.; NORDGREN, A.; LINDSTRÖM, L.; FRISELL, J.; MARTLING, A. Increased risk of colorectal cancer in patients diagnosed with breast cancer in women. **Cancer epidemiology**, v. 41, p. 57-62, 2016.

MACÍAS-RUBALCAVA, M. L.; SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R. E. Secondary metabolites of endophytic Xylaria species with potential applications in medicine and agriculture. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 15, 2017.

MADY, M.S.; MOHYELDIN, M.M.; EBRAHIM, H.Y.; ELSAYED, H.E.; HOUSSEN, W.E.; HAGGAG, E.G.; SOLIMAN, R.F.; EL SAYED, K.A. The indole alkaloid meleagrins, from the olive tree endophytic fungus *Penicillium chrysogenum*, as a novel lead for the control of c-Met-dependent breast cancer proliferation, migration and invasion. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 113–122, 2016.

MAIA, L. C., CARVALHO JUNIOR, A. A. **Introdução: os fungos do Brasil**. Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 43-48, 2010.

MARINHO A. M. R.; MARINHO P. S.; FILHO E. R.; FERREIRA I. C. P. Policetídeos isolados de *Penicillium herquei*. **Rev. Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 38-45, 2011.

MARQUES, A. E. M. **Comparação entre contagens de eritrócitos periféricos pelo teste do micronúcleo píceo em *Astyanax fasciatus* submetida à contaminação por sulfato de cobre**. 37 f. Monografia (disciplina Estágio em Genética) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

MARTORELLI, R. A.; FREIRE, R. B. Ocratoxina A, aflatoxina 81 e citrinina como agentes moduladores da produção de anticorpos em aves e mamíferos. **Rev. bras. Ci. Vet.**, v. 8, n. 1, p. 51-54, jan./abr. 2001

- McALPINE, J.B.; BACHMANN, B.O.; PIRAEI, M.; TREMBLAY, S.; ALARCO, A.M.; ZAZOPOULOS, E.; FARNET, C.M. Microbial genomics as a guide to drug discovery, structural elucidation: ECO02301, a novel antifungal agent, as an example. **Journal Of Natural Products**, v. 68, p.493–496, 2005.
- MILANO, A; APICE, G; FERRARI, E; FAZIOLI, F; ROSA, AS, et al. New emerging drugs in soft tissue sarcoma. **Crit Rev Oncol Hematol**,v.59, p.74–84, 2006.
- MOORHEAD, P.S.; NOWEL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, v.20, p. 613-616, 1960.
- MOORE-LANDECKER, E. **Fundamentals of the fungi**. 4th ed. Upper Saddle River: Prentice Hall, 1996. 300 p
- MOREAU, R. L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.
- MSPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A.C.; AZEVEDO, J.L; PAMPHILE, J.A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR CientCiêncBiolSaúde**, v. 16, n. 4, p. 345-51, 2004.
- RIBEIRO, S.M.; CHAGAS, G.M.; CAMPELO, A.P.; KLUPPEL, M.L. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effects on the homeostasis of reactive oxygen species. **Cell Biochemistry and Function**,v.15, p.203-209, 1997.
- OGUNSUYI, O. I.; FADOJU, O. M.; COKER, M. M.; AKINRINADE, S. O.; OYEYEMI, I. T.; ALABI, O. A.; BAKARE, A. A. Nano-Genotoxicity Evaluation: A Review. **Nanotoxicology: Toxicity Evaluation, Risk Assessment and Management**, p. 463, 2018.
- PIRES, S. R. R.; **Dissertação de Mestrado**, Universidade Nova de Lisboa, 2009.
- PISTA, J.; UVA, A. S. A utilização de indicadores biológicos em saúde ocupacional. **Revista portuguesa de saúde pública**, [S. I.], v. 6, 2006.
- PORRAS-ALFARO, A.; BAYMAN, P. Hidden fungi, emergent properties: endophytes and microbiomes. **Annual Review Phytopathology**, v.49. p. 291–315, 2011.
- QUIÑONES-AGUILAR, E. E.; EVANGELISTA-MAR, Z.; RINCÓN-ENRÍQUEZ, G. Los actinomicetos y su aplicación biotecnológica. [S.I], 2016.
- RAMU, E. M.; HOUDEK, M. T.; ISAAC, C. E.; DICKIE, C. I.; FERGUSON, P. C.; WUNDER, J. S. Management of soft-tissue sarcomas; treatment strategies, staging, and outcomes. **SICOT-J**, v. 3, 2017.
- RANDON, F. R. **Avaliação dos níveis de genotoxicidade e estresse oxidativo em manipuladores de quimioterápicos em serviços de oncologia**. 88 f.Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, 2006.
- RATAN, R.; PATEL, S. R. Chemotherapy for soft tissue sarcoma. **Cancer**, v. 122, n. 19, p. 2952-2960, 2016.

RATEB; M. E; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Product Reports** ., v. 28, p. 290-334, 2011.

RIZE, M. M. R; FALCIONI, R. Micotoxina citrinina, propriedades e contaminações de grãos, animais e problemas na saúde. **Arquivos do MUDI**, v. 17, n. 2, p. 319-337.

ROCHA, R. S. **Avaliação do uso do teste de micronúcleo em Células esfoliadas como biomarcador para o desenvolvimento do câncer oral em usuários de bebidas alcoólicas e anti-sépticos bucais**. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2011.

SAVANI, M.; MURUGAN, P.; SKUBITZ, K. M. Long-term cure of soft tissue sarcoma with pegylated-liposomal doxorubicin after doxorubicin and ifosfamide failure. **Clinical sarcoma research**, v. 9, n. 1, p. 1, 2019.

SCHEREN, K.; STROHSCHOEN, A. A. G. Padronização do teste cometa como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Rev. Destaques Acadêmicos**, v. 5, n. 3, 2013.

SCOARIZE, M.M.R; FALCIONI, R. Micotoxina citrinina, propriedades e contaminações de grãos, animais e problemas na saúde. **Arquivos do MUDI**, v17, n 2, 319-337

SEDDON, B.; STRAUSS, S. J.; WHELAN, J.; LEAHY, M.; WOLL, P. J.; COWIE, F.; MARPLES, M. Gemcitabine and docetaxel versus doxorubicin as first-line treatment in previously untreated advanced unresectable or metastatic soft-tissue sarcomas (GeDDiS): a randomised controlled phase 3 trial. **The lancet oncology**, v. 18, n. 10, p. 1397-1410, 2017.

SELIM, K.A.; EL-BEIH, A. A.; ABDEL-RAHMAN, T. M.; EL-DIWAANY, A. I. Biology of Endophytic Fungi. **Current Research in Environmental & Applied Mycology**, v. 2, p.31–82, 2012

SILVA R. R., COELHO G. D. **Fungos principais grupos e aplicações biotecnológicas**. Instituto de Botânica. São Paulo, 2006.

SILVA, J. M. **Cânceres hematológicos na região sul de Minas Gerais**. 181 f. Tese (Doutorado em saúde Coletiva) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SILVA, J.; FONSECA, M. B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. *In*: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SINGH, Z. Comet assay as a sensitive technique in occupational health studies; A literature review. **Journal of Occupational Health and Epidemiology**, v. 7, n. 4, p. 240-245, 2018.

SINGIREESU, S. S. N. R.; MISRA, S.; MONDAL, S. K.; YERRAMSETTY, S.; SAHU, N. Costunolide induces micronuclei formation, chromosomal aberrations, cytostasis, and mitochondrial-mediated apoptosis in Chinese hamster ovary cells. **Cell biology and toxicology**, v. 34, n. 2, p. 125-142, 2018.

SPECIAN, V.; ORLANDELLI, R. C.; FELBER, A.C.; AZEVEDO, J.L; PAMPHILE, J. A. Metabólitos Secundários de Interesse Farmacêutico Produzidos por Fungos Endofíticos. **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde** 2014;16(4):345-51

SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L.; SILVA, C. D.; SOLEY, B. S.; DE MELLO-SAMPAYO, C.; CABRINI, D. A.; OTUKI, M. F. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A systematic review. **Journal of ethno pharmacology**, v. 178, p. 289-296, 2016.

STROHL, W.E. The role of natural products in a modern drug discovery program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39-41, 2000.

SUGIYAMA, K.; YAMAZAKI, R.; KINOSHITA, M.; KAMATA, Y.; TANI, F.; MINAI, Y.; KONISHI, Y.S. Inhibitory effect of citrinin on lipopolisaccharide-induced nitric oxide production by mouse macrophage cells. **Mycotoxin research**, v.29, p. 229-234, 2013.

TUNN, P. U.; KETTELHACK, C.; DÜRR, H. R. Standardized approach to the treatment of adult soft tissue sarcoma of the extremities. **Recent Results in cancer Research**, v. 179, p. 211- 228, 2009.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. *Synadenium um bellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 631-638, 2007.

VANDGHANOONI, S.; ESKANDANI, M. Comet assay: a method to evaluate genotoxicity of nano-drug delivery system. **Bio Impacts**, v. 1, p. 87-97, 2011.

VERRI, A. M.; MOURA, A. D. A.; DE MOURA, V. M. Testes Citogenéticos na Avaliação da Genotoxicidade de Produtos Naturais Provindos de Plantas Medicinais. **Revista UNINGÁ Review**, v. 30, n. 1, 2018.

VIEGAS Jr., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos natuarais e a química moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VIVAN, J. **Produção da micotoxina citrinina por *Penicillium spp.*** Minas Gerais, Brasil, 2002.

VON MEHREN, M.; RANDALL, R. L.; BENJAMIN, R. S.; BOLES, S.; BUI, M. M.; CONRAD, E. U.; KANE, J. M. Soft tissue sarcoma, version 2.2016, NCCN clinical practice guidelines in oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 14, n. 6, p. 758-786, 2016.

WANG, J.; WANG, J.; WANG, G.; ZHU, L.; WANG, J. DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in the earthworm *Eisenia fetida*. **Chemosphere**, v. 144, p. 510-517, 2016.

WILMAR, J. M.; SARMENTO, B. J. Q.; SILVEIRA JÚNIOR, L. P.; ABREU D. C. B.; ABREU NETO, I. P.; FERREIRA, E. C. Sarcomas de Partes Moles: Resultados do Tratamento dos Tumores de Baixo Grau. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n.1, p. 17-24, 2008.



WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global status report on noncommunicable diseases 2010**. Geneva: World Health Organization, 176 p, apr. 2011. Disponível em: <[https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44579/9789240686458\\_eng.pdf;jsessionid=70A33A97BE75FC320D9FBB79B13F44C1?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44579/9789240686458_eng.pdf;jsessionid=70A33A97BE75FC320D9FBB79B13F44C1?sequence=1)>. Acesso em: 20 mar. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Health Statistics and Informatics Department 2014**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em: 18 mar. 2018.

WU, L.; WANG, W.; YAO, K.; ZHOU, T.; YIN, J.; LI, T.; YANG, L.; HE, L.; YANG, X.; ZHANG, H.; WANG, Q.; HUANG, R.; YIN, Y. Effects of Dietary Arginine and Glutamine on Alleviating the Impairment Induced by Deoxynivalenol Stress and Immune Relevant Cytokines in Growing Pigs. **Plosone**, v. 8, p. 69-52, 2013.

WU, S.; POWERS, S.; ZHU, W.; HANNUN, Y. A. Substantial contribution of extrinsic risk factors to cancer development. **Nature**, v. 529, n. 7584, p. 43, 2016.

XIAO, D.; PINTO, J. T.; SOH, J. W.; DEGUCHI, A.; GUNDERSEN, G. G.; PALAZZO, A. F.; YOON, J. T.; SHIRIN, H.; WEINSTEIN, I. B. Induction of apoptosis by the garlic-derived compound S-allyl mercaptocysteine (SAMC) is associated with microtubule depolymerization and c-Jun NH(2)-terminal kinase 1 activation. **Cancer Research**, v. 63, p.6825–6837, 2003.

YI, R.; QI, Y. C.; ZHAO, X.; PARK, K. Y. Anti-tumor activities of bamboo salt on sarcoma 180 tumor-bearing BALB/c mice. **Research Article - Biomedical Research**, v. 28, n. 9,p. 2017.

YU, F. Y.; LIAO, Y. C.; CHANG, C. H.; LIU, B. H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. **Toxicology Letters**, v. 161, p.143–151, 2006.

YU-TING HUANG, Y.; LAI, C.; LOU, S. L.; YEH, J.M.; CHAN,W. Activation of JNK and PAK2 is essential for citrinin-induced apoptosis in a human osteoblast cell line. **Environmental Toxicology**, v.24, p. 343–356, 2009.

ZUCKERBERG, C. Ultrastructure of Sarcoma 180. **Cancer Research**, v.33, p. 2278 – 2282, 1973.

# Capítulo 1

---

Avaliação da citotoxicidade, efeitos genotóxicos e mutagênicos da citrinina em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e em raízes de *Allium cepa*

## Avaliação da citotoxicidade, efeitos genotóxicos e mutagênicos da citrinina em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* e em raízes de *Allium cepa*

Autores

*Salomão Mascarenhas Cavalcante Júnior*<sup>1,2</sup>, *Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante*<sup>2,3</sup>  
*Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>2</sup> Núcleo de Tecnologia farmacêutica, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>3</sup> Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

### RESUMO

A descoberta de inúmeras moléculas com potencial terapêutico tem impulsionado o desenvolvimento de novas drogas pela indústria farmacêutica. Nesse sentido, as micotoxinas tem demonstrado capacidade terapêutica, como a antitumoral, a exemplo da citrinina produzida por fungos dos gêneros *Penicillium*, *Monascus* e *Aspergillus*. Assim, o estudo avaliou os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da citrinina (CIT) em diversas linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) e em células de *Allium cepa* nas concentrações de 2, 4 e 8  $\mu\text{M/mL}$ . CIT induziu citotoxicidade em células de *S. cerevisiae* pela redução da viabilidade celular, avaliada pelo ensaio MTT, e em raízes de *A. cepa* pela redução do índice mitótico. A genotoxicidade nas concentrações usadas foi observada pelo aumento do índice de danos ao DNA em ambos os modelos testados. Também foi observado o aumento na formação de aberrações cromossômicas bem como de micronúcleos em raízes de *A. cepa*. CIT devido sua citotoxicidade, e indução de efeitos genotóxicos e mutagênicos por mecanismos aneugênicos e/ou clastogênicos, é um candidato a estudos futuros como um possível agente terapêutico para patologias como o câncer.

**Palavras-chave:** Citrinina. Genotoxicidade. Estresse oxidativo.

## ABSTRACT

The use of natural products for the treatment of diseases has become a popular practice within developed countries. The discovery of numerous molecules with therapeutic potential has driven the development of new drugs by the pharmaceutical industry. Mycotoxins have demonstrated therapeutic capacity, such as antitumor, for example the citrinin produced by fungi of the genus *Penicillium*, *Monascus* and *Aspergillus*. This study evaluated the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of citrinin (CIT) in several strains of *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) and *Allium cepa* cells (*A. cepa*) at concentrations of 2,4 and 8 $\mu$ M/mL. CIT induced cytotoxicity in *S. cerevisiae* cells by reducing cell viability, as assessed by the MTT assay, and in *A. cepa* roots by reducing the mitotic index. Genotoxicity at the concentrations used was observed by increasing the DNA damage index in both models tested. It was also observed the increase in the formation of chromosomal aberrations as well as micronuclei in roots of *A. cepa*. CIT due to its cytotoxicity, and induction of genotoxic and mutagenic effects by aneugenic and / or clastogenic mechanisms, is a candidate for future studies as a possible therapeutic agent for pathologies such as cancer.

**Key words:** Citrinin. Genotoxicity. Oxidative stress.

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais para o tratamento de enfermidades se tornou uma prática popular dentro de países desenvolvidos (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL 2005) e advindo delas a descoberta de inúmeras moléculas com potencial terapêutico que devido à descrição do comportamento químicos se tornaram fontes de identificação e desenvolvimento de novas drogas, dando indicativos da sua funcionalidade para as indústrias farmacêutica (ATANASOV et al, 2015; BEUTLER, 2009).

Micotoxinas derivadas do metabolismo de fungos encontradas em alimentos e plantações são associadas a doenças agudas e crônicas que acometem animais e humanos expostos (HUSSEIN; BRASEL, 2001). Em contrapartida, estas mesmas substâncias demonstraram ter a capacidade terapêutica, como atividade antitumoral, antibiótica, antiangiogênica e outras (PAPATHANASSIU, 2003). A citrinina é uma das mais de 300 micotoxinas isoladas e quimicamente caracterizadas que causam danos ao humano (ALASSANE-KPEMBI et al., 2017). Ela é produzida por fungos dos gêneros *Penicillium*, *Monascus* e *Aspergillus* e apresentam alta nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e carcinogenicidade, efeito possivelmente causado pela alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial, indução de apoptose e formação de micronúcleos (KELLER et al, 2018; CHAN et al., 2009).

Tais efeitos tornam a citrinina um forte candidato a agente antitumoral, já que o câncer se trata de uma doença causada pelo acúmulo de mutações, com consequente perda do controle proliferativo (TOMASETTI; LI; VOGELSTEIN, 2017) e com uma grande importância de saúde pública por apresentar uma contínua e crescente taxa de mortalidade e morbidade, acometendo principalmente pacientes idosos (MILLER et al., 2016; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2018).

O teste de *A. cepa* apresenta grande sensibilidade para análise de efeitos tóxicos de substâncias, pois permitem a análise conjunta simples de diferentes parâmetros, proporcionando resultados de maneira rápida e eficiente (SILVEIRA et al., 2017). A levedura *S. cerevisiae* devido ao alto grau de similaridade das atividades celulares em relação ao ser humano, tem sido utilizada por vários pesquisadores como um modelo eucariótico para estudar os mecanismos moleculares subjacentes às doenças humanas (ALUGOJU; PERIYASAMY; DYAVAI AH, 2018; OCAMPO; LIU; BARRIENTOS, 2013), inclusive para estudos de monitoramento do estresse oxidativo (HOSTETTER; OSBORN; DEROSE, 2012). As mutações caracterizadas por falta de produção de enzimas antioxidantes como a

superóxido dismutase manganês (MnSOD) e cobre-zinco (CuZnSOD) favorecem o uso destas linhagens em estudos de danos oxidativos (FARRUGIA; BALZAN, 2012).

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo analisar o envolvimento do estresse oxidativo no efeito citotóxico e genotóxico da CIT em diferentes linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, bem como analisar efeitos citotóxicos e mutagênicos em meristemas de raízes de *Allium cepa*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção da citrinina e reagentes

O composto citrinina foi obtido na Sigma-Aldrich, CAS 518-75-2; O MTT ([3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio brometo] 98%, foi adquirido na Sigma (St. Louis, MO). O peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), dimetil sulfoxido (DMSO), sulfato de cobre, peptona bacteriológica, ágar, dextrose e extrato de levedura foram obtidos da Dinâmica Química Contemporânea LTDA. Procedeu-se a solubilização da citrinina nas concentrações de 2, 4 e 8 μM/mL, em solução de DMSO a 0,5%, do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em água destilada na concentração de 10000 μM/mL e Sulfato de cobre foi solubilizado na concentração de 3,7 μM/mL em água desclorificada.

### 2.2 Manutenção das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

As linhagens foram cultivadas em meio YEL (0,5% de extrato de levedura, 2% de peptona bacteriológica e 2% de glicose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária. A linhagem EG118 é defectiva no sistema enzimático que envolve a enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD - produto do gene *SOD1*), enquanto a EG110 apresenta mutação na *SOD* mitocondrial (MnSOD - produto do gene *SOD2*); EG133 é o duplo mutante defectivo para *SOD1* e *SOD2*; a linhagem EG223 é defectiva na enzima catalase (*CAT1*); a EG é o duplo mutante defectivo para *SOD1* e *CAT1*; e EG103 corresponde à linhagem selvagem, portanto proficiente nestas enzimas (**Tabela 1**).

**Tabela 1.** Descrição das linhagens e genótipos de *S. cerevisiae* utilizadas no estudo.

Descrição	Genótipo	Origem
EG103 ( <i>SOD</i> <sup>WT</sup> )	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	
EG118 ( <i>Sod1</i> Δ)	sod1::URA3 all other markers as EG103	
EG110 ( <i>Sod2</i> Δ)	sod2::TRP1 all other markers as EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 ( <i>Sod1</i> Δ <i>Sod2</i> Δ)	sod1::URA3 sod2::TRP1 double mutant all other markers as EG103	
EG223 ( <i>Cat1</i> Δ)	EG103, except cat1:: TRP1	
EG ( <i>Sod1</i> Δ <i>Cat1</i> Δ)	EG103, except sod1:: URA3 and cat1:: TRP1	

Fonte: Adaptado de De Lima (2008).

### 2.3 Ensaio do MTT

O ensaio MTT foi realizado conforme Kiruthika e Padma (2013) com adaptações. Um total de  $1 \times 10^6$  células das diferentes linhagens de *S. Cerevisiae* foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 31°C durante 68 h ao tratamento com citrinina (2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) e cotratamento da mesma com peróxido de hidrogênio a 10 mM. Após as 68 h foi acrescentado 50  $\mu\text{L}$  de MTT aos poços. A placa foi incubada a 31°C durante 4 horas com agitação suave. As células foram ressuspensas em 200 $\mu\text{L}$  de DMSO durante a noite no escuro. A absorvância foi lida a 550 nm em leitor de placas de microtítulo.

### 2.4 Ensaio do cometa em *Saccharomyces cerevisiae*

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Azevedo et al. (2011) com adaptações. Para avaliação genotóxica, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do tratamento com citrinina (2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) e cotratamento da mesma com peróxido de hidrogênio a 10000  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , foram coletadas após 68 h de e foram incubadas com 10  $\mu\text{L}$  zimoliase 2mg/mL e após 4 h de incubação, as amostras foram submetidas ao ensaio cometa. O material celular foi misturado com uma fina camada de agarose *lowmelting point* 0,75% (90  $\mu\text{L}$ ) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal a 1,5%. As lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10 com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso) por até 72 horas a 4°C. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH > 13) por 20 minutos e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0.90 V/cm) por 15 minutos em cuba de eletroforese. Ao final, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris 0,4 M, pH 7.5 e coradas com solução de prata. Os resultados foram expressos em índice de danos (ID). O ID foi calculado por meio da fórmula:  $\text{ID} = \Sigma$  (número de células em determinada classe de dano X classe de dano), que variou de 0 a 400.

### 2.5 Teste cometa e avaliação de aberrações cromossômicas em *A. Cepa*

Inicialmente foi iniciado o teste de *A. cepa* de acordo com o procedimento demonstrado por (ISLAM ET AL., 2017). As cebolas foram lavadas com água da torneira; removeram as raízes velhas e secas, a membrana externa e o parênquima central da coroa de brotamento (fazendo uma pequena incisão circular) para facilitar a absorção das soluções e a uniformidade de brotamento e crescimento radicular. Após este processo, as cebolas foram



expostas a cada concentração de CIT (2, 4, 8  $\mu\text{M/mL}$ ), controle negativo (água desclorificada), controle positivo (sulfato de cobre 3,7  $\mu\text{M/mL}$ ) e foram mantidas por 48 h no escuro à temperatura ambiente. Após a incubação, as raízes foram removidas e fixadas em solução de Carnoy (metanol e ácido acético) por 24 h; as raízes não avaliadas imediatamente foram armazenadas em etanol a 70% para posterior análise no ensaio cometa alcalino.

O teste cometa foi realizado com o método descrito por Liman (2013). Após o tratamento com solução de carnoy, as regiões meristemáticas das raízes foram cortadas em pequenos pedaços e tratadas com Tris-HCl 0,4 M (pH 7,5) durante a noite para obter o extrato nuclear. Então, através da utilização de agarose *lowmelting point* 0,75%, o extracto nuclear foi espalhado sobre as lâminas previamente preparados (agarose de ponto de fusão normal a 1,5 % em tampão fosfato salino (PBS; pH 7,4). As lâminas foram então secas em estufa a 37 °C durante 1,5 h e realizada electroforese a 25 V, 300 mA durante 15 min. As lâminas foram secas como acima e depois fixadas em solução carnoy durante 10 min. Após três banhos em água destilada, as lâminas foram coradas e seguidas pela observação fotomicroscópica com aumento de 400x. O perfil genotóxico foi determinado com base no nível de dano ao DNA, conforme descrito anteriormente (PAZ et al., 2018).

Em seguida, as raízes do mesmo bulbo utilizadas para o ensaio cometa foram removidas e lavadas com água destilada, seguido de secagem à temperatura ambiente e transferidas para frascos de cor âmbar contendo o reagente de Schiff. Em seguida, as raízes foram tratadas com o reagente de Schiff por 2 h, seguido de lavagem em água corrente até a remoção completa do corante. As raízes foram então colocadas em uma lâmina onde a região meristemática foi separada, colocando uma gota de carmim acético a 2% no topo e cobrindo com lamínulas. As fotomicrografias foi realizada com microscópio óptico de 1000  $\times$  de ampliação. O ID foi calculado por meio da fórmula:  $ID = \Sigma$  (número de células em determinada classe de dano X classe de dano), que variou de 0 a 400.

## 2.6 Análises estatísticas

A fim de determinar as diferenças entre os tratamentos, os foram dados expressos como a média  $\pm$  desvio padrão foram comparados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de *Tukey* (considerando valores significantes de  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$ ), por meio do programa *Graphpad* (*software* intuitivo para a Ciência, San Diego, CA). Todos os estudos foram realizados em quintuplicata, a partir de avaliações biológicas independentes.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Avaliação da viabilidade celular em células de *Saccharomyces cerevisiae*

A CIT, em todas as concentrações testadas, reduziu de forma significativa a viabilidade celular em todas as linhagens quando comparadas ao CN, com exceção da concentração de 2  $\mu\text{M}/\text{mL}$  para a linhagem Sodwt (**Figura 1**). Não houve diferenças significativas entre as concentrações de CIT e o tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  na linhagem duplo mutante Sod1 $\Delta$ Sod2 $\Delta$  e na proficiente (Sodwt). Foi observado que nas linhagens Sod1 $\Delta$ , Sod2 $\Delta$  e Cat $\Delta$ , a CIT obteve maior viabilidade celular em relação ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ , enquanto na linhagem duplo mutante Sod1 $\Delta$ Cat1 $\Delta$ , o efeito foi oposto (**Figura 1**).

A associação entre as concentrações de CIT e  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziu a viabilidade em todas as linhagens em comparação ao CN como já esperado (**Figura 2**) pelos dados descritos na figura 1. Não houve diferença significativa entre as concentrações no cotratamento em relação a de  $\text{H}_2\text{O}_2$  isolada para a linhagem Sodwt, mas em todas as linhagens mutantes, a associação de CIT com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , reduziu a viabilidade celular em relação ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  de forma isolada, exceto para a concentração de 2  $\mu\text{M}/\text{mL}$  na linhagem Sod1 $\Delta$ .

#### 3.2 Avaliação da genotoxicidade em células de *Saccharomyces cerevisiae*

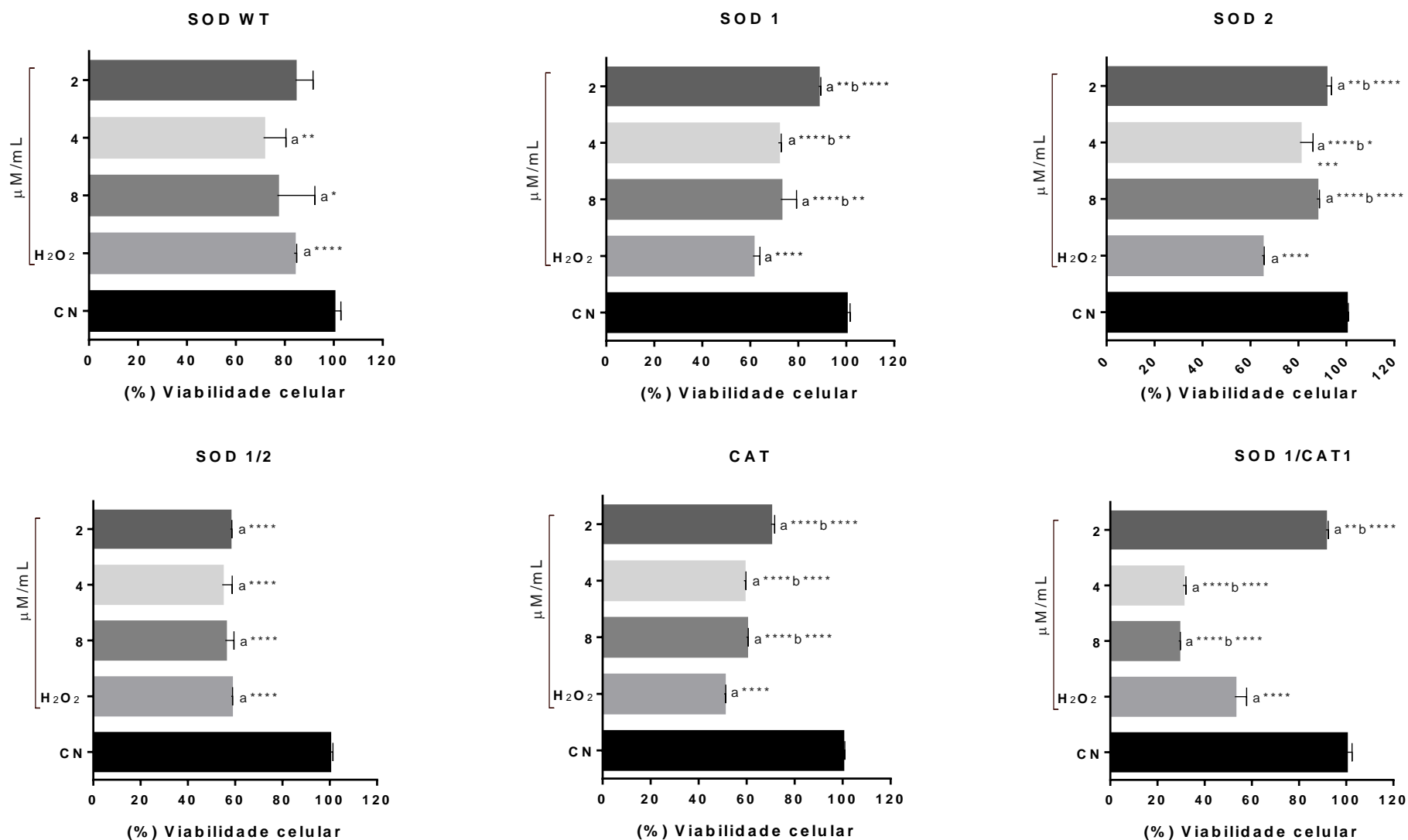
A CIT, em todas as concentrações testadas, induziu aumento significativo do índice de danos ao material genético das linhagens de levedura em relação ao CN, mas foram inferiores se comparado ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Figura 3**).

O cotratamento de CIT com  $\text{H}_2\text{O}_2$  em todas as linhagens, induziu efeitos genotóxicos significativos em relação CN (**Figura 4**) e mesmo se comparado a CIT de forma isolada (**Figura 3**). Não houve diferença significativa de danos induzidos pelo esquema de cotratamento com CIT na linhagem Sodwt quando comparada ao  $\text{H}_2\text{O}_2$ . No entanto foi observado um maior índice de danos induzidos por todos os esquemas de cotratamento para a linhagem Sod1 $\Delta$  e apenas o que contém a maior concentração (8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) nas demais linhagens mutantes em relação ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  (**Figura 4**). Na figura 5 é o possível observar um aumento na classe de danos nas células de levedura que não são proficientes em suas defesas antioxidantes (Sod1 $\Delta$ Cat1 $\Delta$ ) em relação as células proficientes (SodWT).

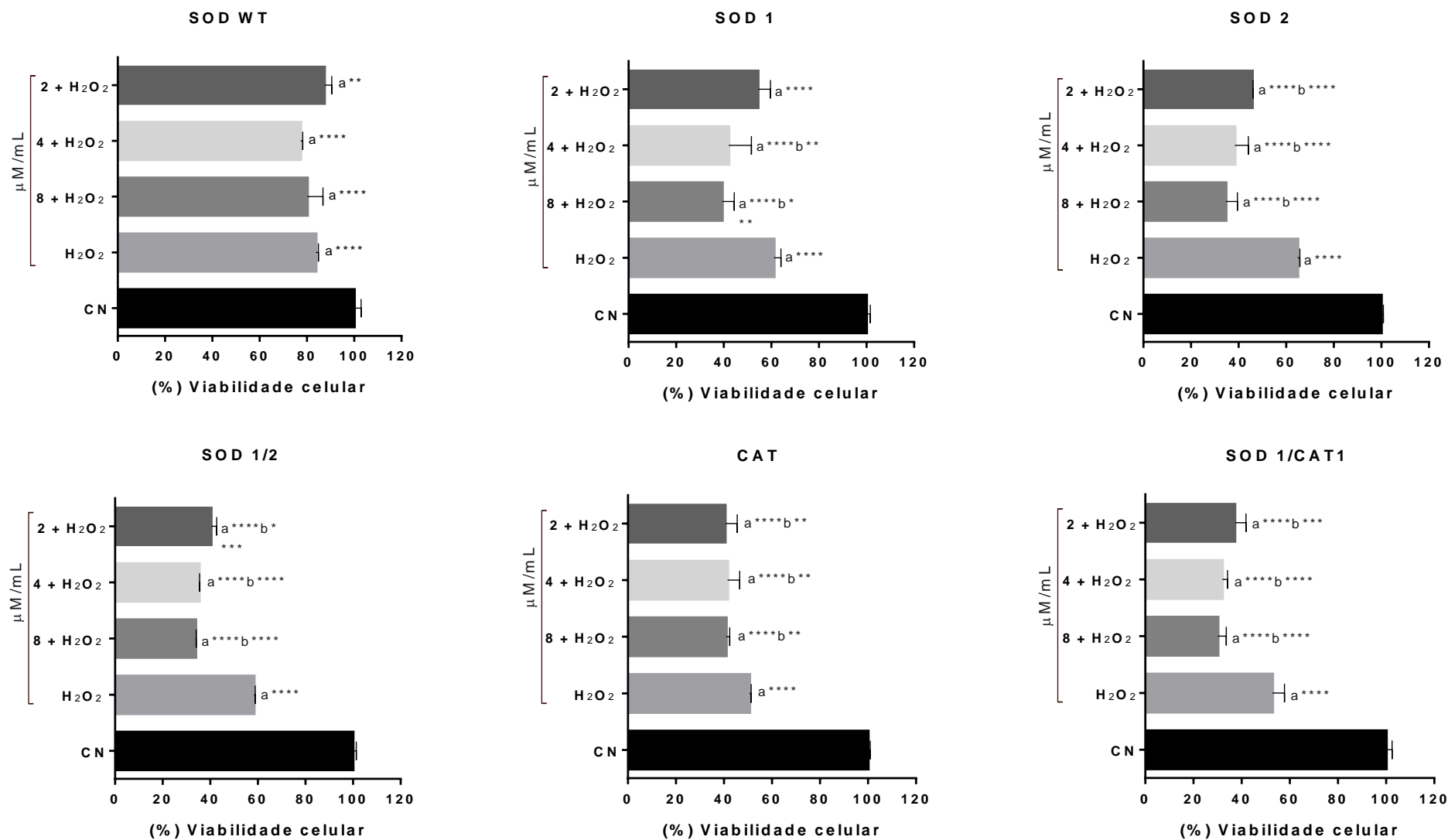
### 3.3 Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da CIT em *A. cepa*

CIT induziu aumento do índice de danos em meristema de *A. cepa* quando comparado ao CN, mas obteve menor efeito genotóxico se comparado ao CP (**Tabela 2**). Em relação a mutagenicidade avaliada por danos citogenéticos (aberrações cromossômicas - AC), CIT induziu aumento significativo de micronúcleos, cromossomos soltos, atrasos anafásicos e maior formação de pontes em relação ao CN (**Tabela 2**).

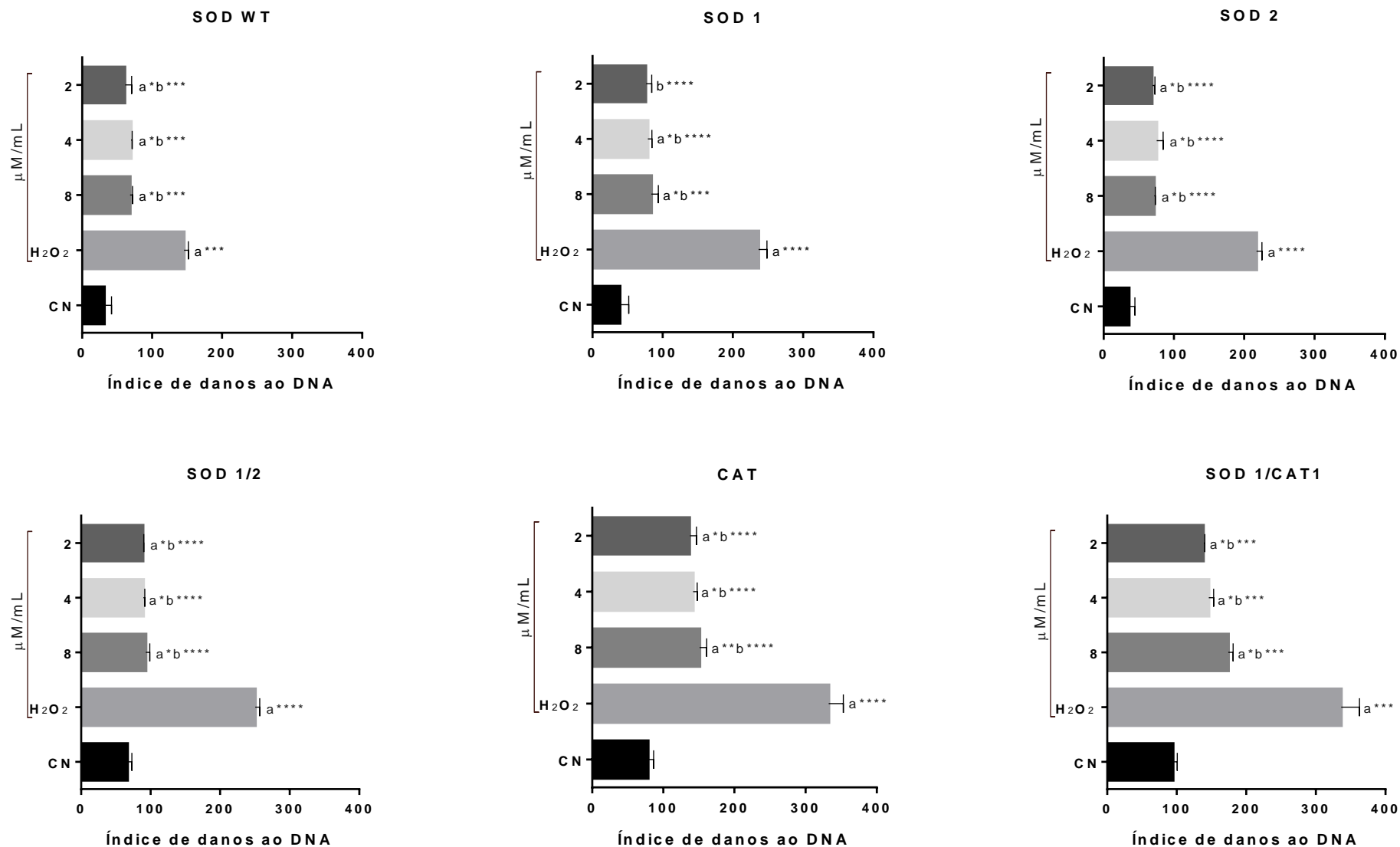
**Figura 1:** Avaliação da viabilidade celular (teste de MTT) de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com citrinina (2,4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas.  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de hidrogênio (10000  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. Valores significantes de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparado ao grupo CN (a),  $\text{H}_2\text{O}_2$ (b).



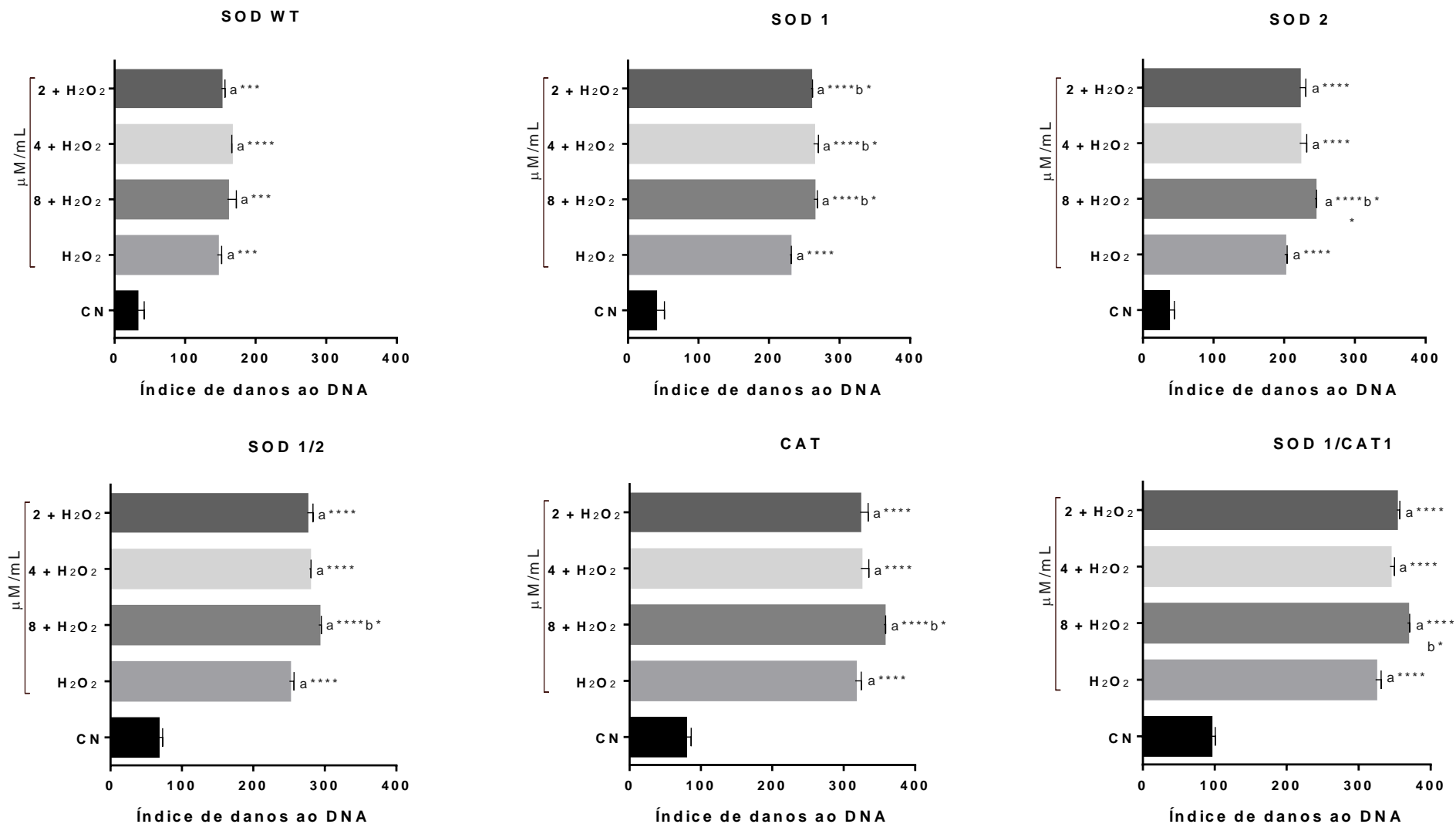
**Figura 2:** Avaliação da viabilidade celular de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* cotratadas com citrinitina (2,4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) e peróxido de hidrogênio (10000  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas.  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de hidrogênio. ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. Valores significantes de  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$  comparado ao grupo CN (a),  $\text{H}_2\text{O}_2$ (b)



**Figura 3:** Avaliação do índice de danos ao DNA de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com citrinina (2,4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas.  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de hidrogênio (10000  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. Valores significantes de \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparado ao grupo CN (a),  $\text{H}_2\text{O}_2$ (b).



**Figura 4:** Avaliação do índice de danos ao DNA de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* cotratadas com citrinina (2,4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) e peróxido de hidrogênio (10000  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas.  $\text{H}_2\text{O}_2$ : Peróxido de hidrogênio. ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. Valores significantes de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparado ao grupo CN (a),  $\text{H}_2\text{O}_2$ (b).



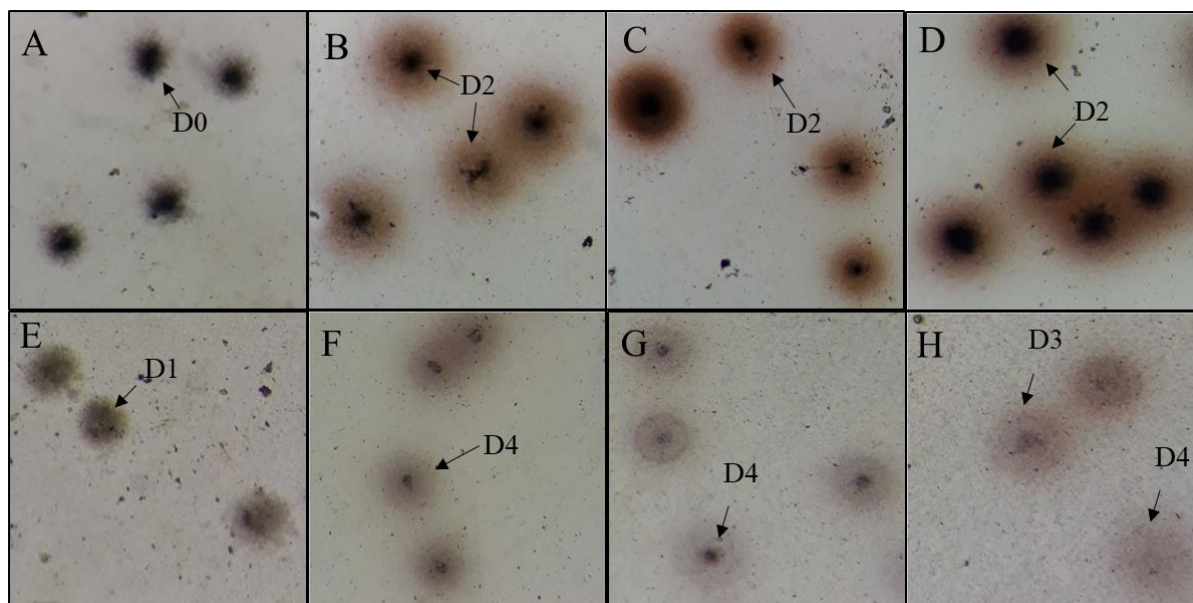
**Tabela 2:** Avaliação da mutagenicidade e índice de danos ao DNA em raízes de *A. cepa* tratadas com CIT

Tratamento	Concentração ( $\mu\text{M/mL}$ )	Tipos de alterações cromossômicas (% AC)				ID
		Micronúcleos	Pontes	Cromossomos soltos	Atrasos	
CN	-	$0,5 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,0$	$0,8 \pm 0,2$	$1,0 \pm 0,3$	$40 \pm 11,3$
CP	3,7	$11 \pm 2,1(a^{****})$	$18,7 \pm 2,3(a^{****})$	$15,2 \pm 0,8(a^{****})$	$21,2 \pm 3,2(a^{****})$	$202 \pm 10,4(a^{****}b^{****})$
CIT	2	$2,3 \pm 1,1(a^{****}b^{****})$	$1,8 \pm 1,4(b^{****})$	$2,8 \pm 0,5(a^*b^{****})$	$7,7 \pm 2,6(a^{**}b^{****})$	$122 \pm 15(a^{****}b^{****})$
	4	$2,2 \pm 1,1(a^{****}b^{****})$	$3,2 \pm 2,1(b^{****})$	$2,7 \pm 0,4(a^*b^{****})$	$8,3 \pm 1,5(a^{***}b^{****})$	$131,6 \pm 7,9(a^{****}b^{****})$
	8	$2,7 \pm 1,5(a^{****}b^{****})$	$4,2 \pm 1,3(a^{**}b^{****})$	$10,5 \pm 1,9(a^{****}b^{****})$	$13 \pm 2,4(a^{****}b^{****})$	$150 \pm 12(a^{****}b^{****})$

Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de cinco experimentos independentes. AC: aberrações cromossômicas. ID: índice de danos. CN: Controle negativo. CIT: citrinina. CP: Sulfato de cobre ( $37,5 \mu\text{M/mL}$ ). ANOVA, uma via, seguido de pós-teste de Tukey. Valores significantes de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparado ao grupo CN (a), CP(b).



**Figura 5:** Perfil fotomicrográfico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* no ensaio cometa. A: CN (SodWT). B: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10000 µM/mL (SodWT). C: CIT 8 µM/mL (SodWT). D: CIT 8 µM/mL + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10000 µM/mL (SodWT). E: CN (Sod1ΔCat1Δ). F: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10000 µM/mL (Sod1ΔCat1Δ). G: CIT 8 µM/mL (Sod1ΔCat1Δ). H: CIT 8 µM/mL + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10000 µM/mL (Sod1ΔCat1Δ). CN: células não tratadas. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio. CIT: citrinina. Dano 0 (D0). Dano tipo 1 (D1). Dano tipo 2 (D2). Dano tipo 3 (D3). Dano tipo 4 (D4). Coloração com prata. Aumento de 400X.



## 4 DISCUSSÃO

Muitas intervenções farmacológicas utilizadas pela medicina derivam de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012). No entanto, o cenário farmacêutico mundial de novas drogas enfrenta cada vez mais dificuldades para a produção de novos agentes terapêuticos, mesmo diante da necessidade da pesquisa e descoberta de novos produtos naturais com atividades farmacológicas que vão servir de base para a produção de novos medicamentos (ATANASOV et al., 2015). Os produtos naturais são derivados de organismos vivos, os quais possuem características adquiridas e otimizadas ao longo do processo evolutivo, levando a atingir diferentes funções biológicas (APPENDINO; FONTANA; POLLASTRO, 2010). A CIT é um produto natural que pode ser extraído de diversas fontes como fungos (BENNETT; KLITCH, 2003), bem como pode ser sintetizada em laboratórios (O'NEIL, 2013).

A CIT é conhecida principalmente por suas propriedades tóxicas (FLAJS; PERAICA, 2009; BLASKÓ et al., 2013), nefrotóxicas e hepatotóxicas (BENNETT; KLICH, 2003; FLAJS; PERAICA, 2009). No entanto, possui outras atividades biológicas, como antimicrobiana (HARAGUCHI et al., 1987) anticancerígena (CHANG et al., 2009) e neuroprotetora (NAKAJIMA et al., 2016), o que faz dela um composto de grande interesse para possíveis aplicações farmacêuticas. Diversos autores relatam toxicidade dérmica e morte celular por apoptose em pele de ratos induzida por CIT via estresse oxidativo (FLAJS; PERAICA, 2009; DOI; UETSUKA, 2014). Estudos descrevem que alterações tóxicas e citotóxicas são relacionadas aos efeitos de drogas antineoplásicas, pois são mecanismos de indução de morte celular (CHATELUT; DELORD; CANAL, 2003; DELOU; BIASOLI; BORGES, 2016), principalmente de células com elevada taxa replicativa, que tem como possíveis alvos os ácidos nucléicos e seus precursores (REMESH, 2018).

No presente estudo, CIT demonstrou efeitos citotóxicos em todas as linhagens, com ênfase para as linhagens deficitárias nas defesas antioxidantes, e em cotratamento com o agente estressor H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, os efeitos citotóxicos foram superiores em relação ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> isolado, demonstrando que o estresse oxidativo é um dos principais mecanismos de citotoxicidade e inibição de proliferação celular. Iwahashi et al. (2007) citam que em concentrações acima de 100 µg/mL, CIT inibe crescimento de leveduras, com ausência de expressão de genes de reparo de DNA. Além disso, em concentrações acima de 250 µg/mL, CIT induz citotoxicidade em células de *Schizosaccharomyces pombe* (BLASKÓ

et al., 2013). Em células HEK293, CIT induz parada do ciclo celular e interfere na expressão das proteínas *p53* e *p21*, interferindo no ciclo e divisão celular (CHANG et al., 2009). O efeito citotóxico da CIT também tem sido associado a alterações na permeabilidade de íons em membranas mitocondriais em células renais e hepáticas (CHAGAS et al., 1995; DA LOZZO, OLIVEIRA, CARNIERI, 1998).

Outros efeitos citotóxicos referentes a CIT já foram descritos, como a indução de parada do ciclo celular e apoptose em linhagens de leucemia humana (YU et al., 2006; CHAN, 2007), nefrotoxicidade e hepatotoxicidade em animais (ALEO et al., 1991; KOGIKA; HAGIWARA; MIRANDA, 1993; FLAJS; PERAICA, 2009; SHI; PAN, 2012). Em contrapartida, Gayathri et al. (2015) descreveram que CIT em concentração de até 12,5 µg/mL, não apresentou citotoxicidade, mas foi evidenciada alterações microtubulares, o que pode interferir na organização do DNA durante a divisão celular, aumentando o risco de efeitos mutagênicos. Diversos autores descrevem que alterações a nível cromossômico causadas por CIT, induzem a morte celular por apoptose, com destaque a nível renal (KOGIKA; HAGIWARA; MIRANDOLA, 1993; JESWAL et al., 1996).

O ensaio cometa na versão alcalina é um ensaio confiável e validado como biomarcador de genotoxicidade (COLLINS et al., 2014). CIT, isoladamente, demonstrou efeitos genotóxicos em todas as linhagens de leveduras, bem como em meristema de *A. cepa*, compatível com os resultados da avaliação da viabilidade celular (**Figura 2**), exceto na menor concentração para a linhagem Sodwt (**Figura 4**). Diversos estudos citam a importância da aplicação de testes de citotoxicidade em conjunto com a avaliação da genotoxicidade, pois concentrações não citotóxicas podem apresentar efeitos genotóxicos (MACHADO et al., 2005; HARTMANN; SPEIT, 1997; STORER et al., 1996; ELIA et al., 1993). Kumar et al. (2014) observaram, *in vivo*, após tratamento de 60 dias em ratos, peroxidação lipídica, fragmentação de DNA e indução de apoptose, provenientes de danos oxidativos causados por CIT. Também foi observada genotoxicidade por CIT em células Vero pelo ensaio cometa (YU et al., 2006).

A genotoxicidade induzida por CIT pode estar vinculada a formação de EROs nas linhagens de levedura analisadas. Diversos estudos evidenciam a genotoxicidade induzida por CIT (LIU et al., 2003; KNASMÜLLER et al., 2004; BOUSLIMI et al., 2008). Kumar et al. (2011) relatam que a formação de EROs induzidas por CIT medeiam lesões ao DNA em pele de ratos, bem como leva ao aumento da expressão de

genes de regulação do ciclo e morte celular do *p53*, *p21/waf1* e *Bax*. Esse processo de estresse oxidativo causado por CIT foi observado na presença da ativação da proteína MAPK (CHAN; WU; SHIAO, 2007; FARRUGIA; BALZAN, 2012). Outros mecanismos de genotoxicidade da CIT com envolvimento de EROs foram observadas em células embrionárias, acompanhada de produção de óxido nítrico, aumento da expressão gênica de *Bax* e *Bcl-2*, alterações na membrana mitocondrial, aumento na liberação de citocromos C, caspase 9 e 3, aumento da expressão do gene *p21* (CHAN, 2008).

Avaliação de danos ao DNA por testes de genotoxicidade em entidades químicas é realizada por diversos tipos de testes para investigar mutações genéticas, bem como aberrações cromossômicas estruturais e numéricas (ICH, 2018). CIT, no presente estudo, aumentou o número de AC em meristema de raízes de *A. cepa*. Diversos estudos relatam tanto *in vitro* e *in vivo* que a CIT induz aberrações cromossômicas e quebras de cromátides irmãs e quebras de fitas de DNA (YU et al., 2006; JESWAL, 1996), aneuploidia (YU et al., 2006) e aberrações cromossômicas (BOUSLIMI et al., 2008; CHANG et al., 2011).

A literatura ressalta a atividade anticâncer e quimiopreventiva de uma infinidade de agentes naturais que já passaram por ensaios clínicos. Muitos se mostraram promissores tanto sozinhos, como em terapia combinada quando administradas juntamente com agentes quimioterápicos padrão. Portanto, o desenvolvimento acelerado de quimiopreventivos e quimioterápicos a partir de fontes naturais são de grande importância (BISHAYEE; SETHI, 2016). Micotoxinas, com ênfase para citrinina, são uma fonte a serem explorada nesse sentido (NASKAR; CHAKRAVERTY; GHOSH, 2015).

A citrinina é um composto que possui perfil genotóxico em células humanas (FLAJS; PERAICA, 2009) que induz estresse oxidativo, ou aumenta a permeabilidade das membranas mitocondriais (BHAT; RAI; KARIM, 2010), mecanismos semelhantes a diversos agentes anticâncer (NAFFES et al., 2015; KELLENI; AMIN; ABDELRAHMAN, 2015). Portanto mediante aos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos apresentados e endossados pela literatura, CIT deve ser melhor analisada para sua potencial aplicação em terapias contra o câncer.

## 5 CONCLUSÃO

A CIT induziu efeitos citotóxicos em linhagens mutantes e proficientes de *S. cerevisiae*, bem como induziu efeitos genotóxicos pelo aumento no índice de danos nessas linhagens e em meristema de raízes de *A. cepa*. Além disso, a CIT provocou a formação de danos mutagênicos pela formação de aberrações cromossômicas (micronúcleos, fragmentos, atrasos e perdas cromossômicas) em todas as concentrações testadas. Esses resultados sugerem as perspectivas de estudos futuros para o uso desse composto como um possível agente terapêutico para patologias como o câncer.

## REFERÊNCIAS

- ALASSANE-KPEMBI, I.; SCHARTZMAYR, G.; TARANU, I.; MARIN, D.; PUEL, O.; OSWALDO, I. P. Mycotoxins co-contamination: Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 16, p. 3489-3507, 2017.
- ALEO, M. D.; WYATT, R. D.; SCHNELLMANN, R. G. The role of altered mitochondrial function in citrinin-induced toxicity to rat renal proximal tubule suspensions. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 109, p. 455-463, 1991.
- ALUGOJU, P.; PERIYASAMY, L.; DYAVAIAH, M. Quercetin enhances stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae* tel1 mutant cells to different stressors. **Journal of food science and technology**, p. 1-12, 2018.
- APPENDINO, G.; FONTANA, G.; POLLASTRO, F. 3.08—Natural products drug discovery. **Comprehensive Natural Products II**. Elsevier, Oxford, v. 205, 2010.
- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCHEK, C.; UHRIN, P.; TEMM, L. V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.
- AZEVEDO, F.; MARQUES, F.; FOKT, H.; OLIVEIRA, R.; JOHANSSON, B. Measuring oxidative DNA damage and DNA repair using the yeast comet assay. **Yeast**, v. 28, n. 1, p. 55-61, 2011.
- BENNETT, J.W.; KLICH, M. Mycotoxins. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, p. 497-516, 2003.
- BEUTLER, J. A. Natural products as a foundation for drug discovery. **Current protocols in pharmacology**, v. 46, n. 1, p. 9.11. 1-9.11. 21, 2009.
- BLASKÓ, Á.; MIKE, N.; GRÓF, P.; GAZDAG, Z.; CZIBULYA, Z.; NAGY, L.; KUNSÁGI-MÁTÉ, S.; PESTI, M. Citrinin-induced fluidization of the plasma membrane of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 636-642, 2013.
- BOUSLIMI, A.; OUANNES, Z.; GOLLI, E.E.; BOUAZIZ, C.; HASSEN, W.; BACHA, H. Cytotoxicity and oxidative damage in kidney cells exposed to the mycotoxins ochratoxina and citrinin: individual and combined effects. **Toxicology Mechanisms Methods**, v. 18, p. 341-349, 2008.
- CHAGAS, G. M.; OLIVEIRA, M. B.; CAMPELLO, A.P.; KLUPPEL, M.L. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. III. Effects on renal cortical and liver mitochondrial swelling. **Journal of Applied Toxicology**, v. 15, p. 91-95, 1995.
- CHAN, W. H. Effects of Citrinin on Maturation of Mouse Oocytes, Fertilization, and Fetal Development in Vitro and in Vivo. **Toxicology Letters**, v. 180, p. 28-32, 2008.

CHAN, W. H.; WU, H. J.; SHIAO, N. H. Apoptotic signaling in meth-ylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.100, p.1056–1069, 2007.

CHANG, C. H.; YU, F. Y.; WANG, L. T.; LIN, Y. S.; LIU, B. H. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 237, n. 3, p. 281-287, 2009.

CHATELUT, E.; DELORD, J. P.; CANAL, P. Toxicity patterns of cytotoxic drugs. **Investigational new drugs**, v. 21, n. 2, p. 141-148, 2003.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; MORETTI, M. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutation research/reviews in mutation research**, v. 759, p. 27-39, 2014.

DA LOZZO, E. J.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARNIERI, E. G. S. Citrinin- induced mitochondrial permeability transition. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 12, n. 5, p. 291-297, 1998.

DE LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.)**.182 p.Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. São Paulo, 2008.

DELOU, J.; BIASOLI, D. BORGES, H. L. The complex link between apoptosis and autophagy: a promising new role for RB. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, n. 4, p. 2257-2275, 2016.

DOI, K.; UETSUKA, K. Mechanisms of Mycotoxin-induced Dermal Toxicity and Tumorigenesis Through Oxidative Stress-related Pathways. **Journal of Toxicologic Pathology**, v.27, p. 1-10, 2014.

ELIA, M. C.; STORER, R. D.; HARMON, L. S.; KRAYNAK, A. R.; MCKELVEY, T. W.; HERTZOG, P. R.; KEENAN, K. P.; DELUCA, J. G.; NICHOLS, W. W. Cytotoxicity as measured by trypan blue as a potentially confounding variable in the in vitro alkaline elution/rat hepatocyte assay. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 291, n. 3, p. 193-205, 1993.

FARRUGIA, G.; BALZAN, R. Oxidative stress and programmed cell death in yeast. **Frontiers in Oncology**, v. 2, n. 64, p. 1-21, 2012.

FLAJS, D.; PERAICA, M. Toxicological properties of citrinin. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 457-464, 2009.

GAYATHRI, L.; DHIVYA, R.; DHANASEKARAN, D.; PERIASAMY, V.S.; ALSHATWI, A.A.; AKBARSHA, M.A. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2 cell. **Food and Chemical Toxicology**, v.83, p.151-163, 2015.

HARAGUCHI, H.; HASHIMOTO, K.; SHIBATA, K.; TANIGUCHI, M.; OI, S. Mechanism of antifungal action of citrinin. **Agricultural and biological chemistry**, v. 51, n. 5, p. 1373-1378, 1987.

HARTMANN, A.; SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology letters**, v. 90, n. 2-3, p. 183-188, 1997.

KRISHAN, G.; HAYASHI, M. **In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation**. *Mutat. Res.* 455 (2000) 155–16

HOSTETTER, A. A.; OSBORN, M. F.; DEROSE, V. J. RNA-Pt Adducts Following Cisplatin Treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. **ACS Chemical Biology**, v. 7, n. 1, p. 218–225, 2012.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION (ICH) OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE. **Guidance on Genotoxicity Testing and Data Interpretation for Pharmaceuticals Intended for Human use, code S2 (R1)**, version 4, nov. 2011. Disponível em: <[https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Safety/S2\\_R1/Step4/S2R1\\_Step4.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf)>. Acesso em: 9 jul. 2018.

ISLAM, M. T.; STRECK, L.; DE ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, S. W. C.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; DA COSTA JUNIOR, J. S. Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere**, v. 177, p. 93-101, 2017.

IWAHASHI, H.; KITAGAWA, E.; SUZUKI, Y.; UEDA, Y.; ISHIZAWA, Y.; NOBUMASA, H.; KUBOKI, Y.; HOSODA, H.; IWAHASHI, Y. Evaluation of Toxicity of the Mycotoxin Citrinin Using Yeast ORF DNA Microarray and Oligo DNA Microarray. **BMC Genomics**, v. 8, n. 95, p. 1-13, 2007.

JESWAL P. Citrinin-induced chromosomal abnormalities in the bone marrow cells of *Mus musculus*. **Cytobios**, v.86, p. 29–33, 1996.

KELLENI, M. T.; AMIN, E. F.; ABDELRAHMAN, A. M. Effect of metformin and sitagliptin on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats: impact of oxidative stress, inflammation, and apoptosis. **Journal of toxicology**, v. 5, p. 1-8, 2015.

KELLER, J.; BORZEKOWSKI, A.; HAASE, H.; MENZEL, R.; RUEB, L.; KOCH, M. Toxicity assay for citrinin, zearalenone and zearalenone-14-sulfate using the nematode *Caenorhabditis elegans* as model organism. **Toxins**, v. 10, n. 7, p. 284, 2018.

KIRUTHIKA, B.; PADMA, P. R. Zea mays leaf extracts protect *Saccharomyces cerevisiae* cell against oxidative stress-induced cell death. **Journal of Acute Medicine**, v. 3, n. 3, p. 83-92, 2013.

KNASMÜLLER, S.; CAVIN, C.; CHAKRABORTY, A.; DARROUDI, F.; MAJER, B.J.; HUBER, W.W.; EHRLICH, V.A. Structurally related mycotoxins ochratoxin a ochratoxin b, and citrinin differ in their Genotoxic Activities and in Their Mode of



Action in Human-Derived Liver (HepG2) Cells: Implications for Risk Assessment. **Nutrition and Cancer**, v.50, p. 190-197, 2004.

KOGIKA, M. M.; HAGIWARA, M. K.; MIRANDOLA, R. M. Experimental citrinin nephrotoxicosis in dogs: renal function evaluation. **Veterinary & Human Toxicology**, v. 35, p.136–140, 1993.

KUMAR, M.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A.K.; SANKAR, M.; PATIL, R.D.; SINGH, N.D. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A- and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Toxicology Industrial Health**, v. 30, p. 90-98, 2014.

KUMAR, R.; DWIVEDI, P.D.; DHAWAN, A.; DAS, M.; ANSARI, K.M. Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. **Toxicological Sciences**, v. 122, p. 557-566, 2011.

LIMAN, R. Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by Allium and Comet assay. **Chemosphere**, v. 93, n. 2, p. 269-273, 2013.

LIU, B. H.; YU, F. Y.; WU, T. S.; LI, S. Y.; SU, M. C.; WANG, M. C.; SHIH, S. M. Evaluation of genotoxic risk and oxidative DNA damage in mammalian cells exposed to mycotoxins, patulin and citrinin. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 191, p. 255–263, 2003.

MACHADO, M. P.; RODRIGUES FILHO, E.; TEREZAN, A. P.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Cytotoxicity, genotoxicity and antimutagenicity of hexane extracts of *Agaricus blazei* determined *in vitro* by the comet assay and CHO/HGPRT gene mutation assay. **Toxicology in vitro**, v. 19, n. 4, p. 533-539, 2005.

MILLER, K. D.; SIEGEL, R. L.; LIN, C. C.; MARIOTTO, A. B.; KRAMER, J. L.; ROWLAND, J. H.; STEIN, K. D.; ALTERI, R.; JEMAL, A. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, n. 4, p. 271-289, 2016.

NAFEES, S., RASHID, S., ALI, N., HASAN, S. K., & SULTANA, S. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: role of NFκB/MAPK pathway. **Chemico-biological interactions**, v. 231, p. 98-107, 2015

NAKAJIMA, Y.; IGUCHI, H.; KAMISUKI, S.; SUGAWARA, F.; FURUICHI, T.; SHINODA, Y. Low doses of the mycotoxin citrinin protect cortical neurons against glutamate-induced excitotoxicity. **The Journal of toxicological sciences**, v. 41, n. 2, p. 311-319, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

OCAMPO, A.; LIU, J.; BARRIENTOS, A. NAD<sup>+</sup> salvage pathway proteins suppress proteotoxicity in yeast models of neurodegeneration by promoting the clearance of misfolded/oligomerized proteins. **Human molecular genetics**, v. 22, n. 9, p. 1699-1708, 2013.

O'NEIL, M. J. **The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals**. Ed. 15th Fifteenth Edition, New ed. [S.I.], Royal Society of Chemistry, 2013.

PAPATHANASSIU, A. E. **Mycotoxin derivatives as antimetabolic agents**. US 6,528,489, 4 mar. 2003.

PAZ, M. F. C. J.; DE ALENCAR, M. V. O. B.; GOMES JUNIOR, A. L.; DA CONCEIÇÃO MACHADO, K.; ISLAM, M. T.; ALI, E. S.; DE CARVALHO, R. M. Correlations between Risk Factors for Breast Cancer and Genetic Instability in Cancer Patients—A Clinical Perspective Study. **Frontiers in Genetics**, v. 8, p. 236, 2018.

REMESH, A. Toxicities of anticancer drugs and its management. **International Journal of Basic & Clinical Pharmacology**, v. 1, n. 1, p. 2-12, 2017.

SHI, Y.C.; PAN, T.M. Red mold, diabetes, and oxidative stress: a review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 94, p. 47-55, 2012.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2018. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SILVEIRA, G. L.; LIMA, M. G. F.; DOS REIS, G. B.; PALMIERI, M. J.; ANDRADE-VIERIA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

STORER, R. D.; MCKELVEY, T. W.; KRAYNAK, A. R.; ELIA, M. C. BARNUM, J. E.; HARMON, L. S.; NICHOLS, W. W.; DELUCA, J. G. Revalidation of the *in vitro* alkaline elution/rat hepatocyte assay for DNA damage: improved criteria for assessment of cytotoxicity and genotoxicity and results for 81 compounds. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 368, n. 2, p. 59-101, 1996.

TOMASETTI, C.; LI, L.; VOGELSTEIN, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330-1334, 2017.

VEIGA JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

YU, F. Y.; LIAO, Y. C.; CHANG, C. H.; LIU, B. H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. **Toxicology Letters**, v. 161, n. 2, p. 143-151, 2006.

## Capítulo 2

---

Avaliação da atividade antitumoral da citrinina em células de Sarcoma 180

## Avaliação da atividade antitumoral da citrinina em células de Sarcoma 180

Autores

*Salomão Mascarenhas Cavalcante Júnior*<sup>1,2</sup>, *Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante*<sup>2,3</sup> *Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva*<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>2</sup> Núcleo de Tecnologia farmacêutica, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

<sup>3</sup> Docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí, Brasil

### RESUMO

Conforme a Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer se tornou a segunda maior causa morte no mundo, com uma taxa crescente de câncer para as próximas décadas. O uso de agentes naturais, obtidos de várias fontes, tem demonstrado eficácia terapêutica significativa contra essa patologia. Citrinina (CIT) é uma micotoxina originalmente isolada de *Penicillium citrinum*, mas já observada em uma grande variedade de outros fungos, que possui potencial citotóxico e genotóxico. Esse estudo avaliou os efeitos de CIT em cultura primária de Sarcoma 180, por mecanismos citotóxicos e citogenéticos indicativos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose. As células foram tratadas com CIT (2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) e submetidas aos ensaios de citotoxicidade por Azul de Tripán (viabilidade celular), bem como ao ensaio cometa e teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese. A doxorrubicina (3,7  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) e o peróxido de hidrogênio (10 10000  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) foram utilizados como controle positivo. A citotoxicidade de CIT foi observada em Sarcoma 180 pela redução da viabilidade celular e dos índices de divisão celular, incluindo a apoptose e necrose. A genotoxicidade nas concentrações usadas foi evidenciada pelo aumento do índice de danos ao DNA nos modelos testados. CIT, em todas as concentrações, induz mecanismos aneugênicos e/ou clastogênicos em Sarcoma 180, por indução de micronúcleos, como também outras anormalidades nucleares, tais como pontes nucleoplásmicas e brotos nucleares. CIT, nas concentrações de 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ , também induziu aumento no número de apoptoses e necroses. CIT devido sua citotoxicidade e por mecanismos citogenéticos associados com instabilidade genética, incluindo morte celular por apoptose e necrose, deve ser melhor avaliado como um possível recurso a ser explorado em terapias oncológicas.

**Palavras-chave:** Citrinina, genotoxicidade, apoptose, necrose, Sarcoma 180

## ABSTRACT

According to the World Health Organization (WHO), cancer has become the biggest cause of death in the world, with an increasing rate of cancer for the coming decades. The use of natural agents, obtained from several sources, has demonstrated significant therapeutic efficacy against this pathology. Citrinin (CIT) is a mycotoxin originally isolated from *Penicillium citrinum*, but already observed in a large variety of other fungi, which has cytotoxic and genotoxic potential. This study evaluated the effects of CIT on primary culture of Sarcoma 180 by cytotoxic and cytogenetic mechanisms indicative of genotoxicity, mutagenicity, apoptosis and necrosis. Cells were treated with CIT (2,4 and 8 $\mu$ M/mL) and submitted to cytotoxicity tests by Tripan Blue (cell viability), as well as the comet assay and micronucleus test with cytokinesis blockade. Doxorubicin (3.7 $\mu$ M/mL) and hydrogen peroxide (10000  $\mu$ M/mL) were used as a positive control. CIT cytotoxicity was observed in Sarcoma 180 by reducing cell viability and cell division indices, including apoptosis and necrosis. Genotoxicity at the concentrations used was evidenced by the increased DNA damage index in the models tested. CIT, at all concentrations, induces aneugenic and / or clastogenic mechanisms in Sarcoma 180, by induction of micronuclei, as well as other nuclear abnormalities, such as nucleoplasmic bridges and nuclear buds. CIT, at concentrations of 4 and 8 $\mu$ M/mL, also induced an increase in the number of apoptosis and necrosis. CIT due to its cytotoxicity and cytogenetic mechanisms associated with genetic instability, including cell death due to apoptosis and necrosis, should be better evaluated as a possible resource to be explored in cancer therapies.

**Keywords:** Citrinin, genotoxicity, apoptosis, necrosis, Sarcoma 180

## 1 INTRODUÇÃO

Conforme as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS), a partir de 2011 o câncer se tornou a segunda maior causa morte no mundo, perdendo apenas para as doenças cardíacas (FERLAY et al., 2018). Existe uma taxa crescente de câncer para as próximas décadas, principalmente em países de média e baixa renda, com uma previsão de mais de 20 milhões de novos casos de câncer esperados anualmente em 2025 (BRAY, 2014).

O uso de agentes naturais tem demonstrado eficácia terapêutica significativa contra essa patologia. Diversas terapias oncológicas foram desenvolvidas, dentre elas os agentes quimioterápicos, incluindo o taxol, a vincristina e a vinblastina, (BISHAYEE; SETHI, 2016), a doxorubicina (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2012) dentre outros.

Produtos naturais podem servir como atalhos ou recursos-chave de candidatos a novos medicamentos (CUI; YANG; CHEN, 2018). Esses produtos, obtidos de várias fontes, têm sido usados para a prevenção e tratamento de várias doenças crônicas a vários séculos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). As micotoxinas fúngicas são metabólitos secundários que possuem uma ampla variedade estrutural e funcional, contribuindo para a multiplicidade de sua classificação. Já foram descritos efeitos citotóxicos e genotóxicos, tais como mutagenicidade e carcinogenicidade a essas micotoxinas, os quais fazem delas um potencial agente antineoplásico (PÓCSI; KIRÁLY; BÁNFALVI, 2018).

Modelos com sarcoma são fundamentais para o entendimento da biologia molecular do câncer. Os sarcomas são distinguidos por aberrações moleculares tais como mutações, deleção intergenes, amplificações de genes e translocações (QUESADA; AMATON, 2012). O sarcoma 180 (S180) é bastante utilizado em estudos experimentais com taxa de disseminação e índice de proliferação determinados, permitindo o estudo comparativo no uso de substâncias potencialmente tóxicas.

A citrinina (CIT) é uma micotoxina originalmente isolada de *Penicillium citrinum*, mas já observada em uma grande variedade de outros fungos (*Aspergillus niveus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus*, *Monascus ruber*, *Monascus purpureus* e *Penicillium camemberti*) (ABRAMSON et al, 1999). A CIT possui propriedades antibióticas, bacteriostáticas, antifúngicas e antiprotozoárias. É também conhecida como uma hepato-nefrotoxina em uma ampla gama de espécies

(ABOU-ZEID, 2012). Devido ao seu grande potencial citotóxico e genotóxico, o presente estudo teve por objetivo a avaliação dos efeitos antitumorais da CIT, por meio da viabilidade celular, de mecanismos citogenéticos de genotoxicidade, mutagenicidade, apoptose e necrose em cultura primária de Sarcoma 180 (S-180), por meio da aplicação do ensaio cometa e CBMN.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção da citrulina e reagentes

O composto citrulina foi obtido na Sigma-Aldrich CAS 518-75-2; A doxorubicina (DOX) foi obtida da Eurofarma Laboratórios S.A. (São Paulo, Brasil). O meio de cultura RPMI 1640, penicilina, estreptomicina e azul de tripan foram obtidos da GIBCO® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). Procedeu-se a solubilização da citrulina nas concentrações de 2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$  e da DOX na concentração de 3,6  $\mu\text{M}/\text{mL}$  em solução de DMSO a 0,5%.

### 2.2 Cultura primária de Sarcoma 180

Os procedimentos de manutenção do tumor Sarcoma 180 (S180) em camundongos, linhagem *Swiss*, foram previamente aprovados pelo comitê de ética em experimentação animal da UFPI (008/2015). Células tumorais foram mantidas por passagem semanal em líquido ascítico de camundongos. De forma posterior foram implantadas subcutaneamente na pele dorsal dos camundongos, a fim de se obter o modelo de tumor sólido S180 (FANG et al., 2015). Após 10 dias de inoculação do líquido ascítico, contendo células tumorais, o tumor sólido formado foi removido e dissociado em condições assépticas, lavado e centrifugado (500 g, 5 min, 4° C) para obtenção do *pellet* celular. Em seguida as células de S-180 do *pellet* formado, foram contadas em câmara de Neubauer e concentração de células ajustada ( $1 \times 10^6$  células/mL) e incubadas em meio de cultura RPMI 1640 (1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina). Foram mantidas em estufa a 37°C, por 72h, concomitantemente com a substância teste e controles.

### 2.3 Viabilidade celular por azul de Tripan em cultura primária de S-180

A viabilidade celular foi analisada com a aplicação do teste de exclusão por azul de Tripan, de acordo com Strober (2015). Após 72 horas de tratamento com CIT (2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ), controle negativo (Células não tratadas) e controle positivo (Doxorrubicina 3,7  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ), 90  $\mu\text{L}$  da suspensão de células foram retirados das culturas e acrescidos de 10  $\mu\text{L}$  do azul de Tripan. As células não viáveis foram contadas por sua coloração azulada, sendo consideradas como células mortas. Em contraste, as células viáveis não



apresentam esta coloração devido às suas capacidades de expulsarem o azul de Tripán. As diferenciações celulares foram observadas em microscopia óptica com o aumento de 400X, com o auxílio da câmara de Neubauer.

#### **2.4 Ensaio cometa**

A versão alcalina do ensaio foi realizada conforme descrito por Speit e Rothfuss (2012). Amostras de 10  $\mu\text{L}$  de suspensão celular de S180 ( $0,5 \times 10^6$  células/mL) tratadas com CIT (2, 4 e 8  $\mu\text{M/mL}$ ), controle negativo (Células não tratadas) e controle positivo (Doxorrubicina 3,7  $\mu\text{M/mL}$ ), foram misturadas com uma fina camada de agarose de baixo ponto de fusão 0,75% (90  $\mu\text{L}$ ) e colocadas sobre lâminas pré-cobertas com agarose normal 1,5%. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris, pH 10, com adição de 1% Triton X-100 e 10% de DMSO na hora do uso), por até 72 horas a 4°C. Após esse período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH>13) por 20 minutos; e, logo em seguida, expostas a uma corrente elétrica de 300 mA e 25 V (0,90 V/cm) por 20 minutos em cuba de eletroforese. Por fim, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M e pH 7,5) e coradas com solução de nitrato de prata. As lâminas foram analisadas quanto ao perfil fotomicrográfico das células (aumento de 400X em microscópio óptico) e os resultados foram expressos em índice de danos (ID) e frequência de danos (FD) de 100 células em duplicata. O ID foi calculado por meio da fórmula:  $\text{ID} = \Sigma (\text{número de células em determinada classe de dano} \times \text{classe de dano})$ , que variou de 0 a 400 e FD pela seguinte fórmula:  $\text{FD} = 100 - \text{n}^\circ \text{ de células classe } 0$ .

#### **2.5 Teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese (CBMN)**

O teste de CBMN foi realizado de acordo com Fenech (2007), com adaptações. Em frascos de cultura contendo 2 mL de meio RPMI 1640 (fitohemaglutinina A GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], 1 mM/L L-glutamina GIBCO® [Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA], suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA] e 1% (p/v) de penicilina/estreptomicina Sigma-Aldrich [St. Louis, MO, EUA]) foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de suspensão celular de S180 ( $0,5 \times 10^6$  células/mL). Em cada frasco de cultura foram acrescentadas CIT (2, 4 e 8  $\mu\text{M/mL}$ ), controle negativo (Células não tratadas) e controle positivo (Doxorrubicina 3,7  $\mu\text{M/mL}$ ). As células foram incubadas por 44h a  $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ . Após este período, foram

adicionados às culturas 6 µg/mL de Citocalasina B (Sigma, St. Louis, MO), retornando os frascos à incubação por mais 28h. Ao final de 72h, a cultura foi transferida para tubos falcon e centrifugada a 800 rpm por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o *pellet* celular foi levemente agitado, para nova centrifugação após a adição de 5 mL de fixador (metanol: ácido acético, 5:1) e 3 gotas de formaldeído em cada tubo. O procedimento foi repetido por 2 vezes utilizando fixador 3:1 e sem o formaldeído. Por fim, o sobrenadante foi descartado e 2 a 4 gotas da suspensão celular foram gotejadas sobre lâminas, as quais foram coradas com solução de Giemsa 5% por 7 minutos. As lâminas, previamente codificadas, foram analisadas em teste cego, com auxílio de microscópio óptico (1000X), considerando os danos citogenéticos presentes em 1000 células por lâmina em duplicata. O índice de divisão nuclear (IDN) foi calculado por meio da seguinte fórmula:  $IDN = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4) / N$ , onde M1-M4, representa o número de células viáveis com 1-4 núcleos e N\*, o número total de células viáveis. Além disso, o índice de divisão nuclear considerando citotoxicidade (IDNC) foi calculado de acordo com a seguinte equação:  $IDNC = (Ap + Nec + M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4))/N^*$ , onde Ap representa o número de células em apoptose; Nec, o número de células em necrose; M1-M4, o número de células viáveis com 1-4 núcleos; e N\*, o número total de células viáveis e não viáveis, de acordo com Fenech (2000).

## 2.6 Análises estatísticas

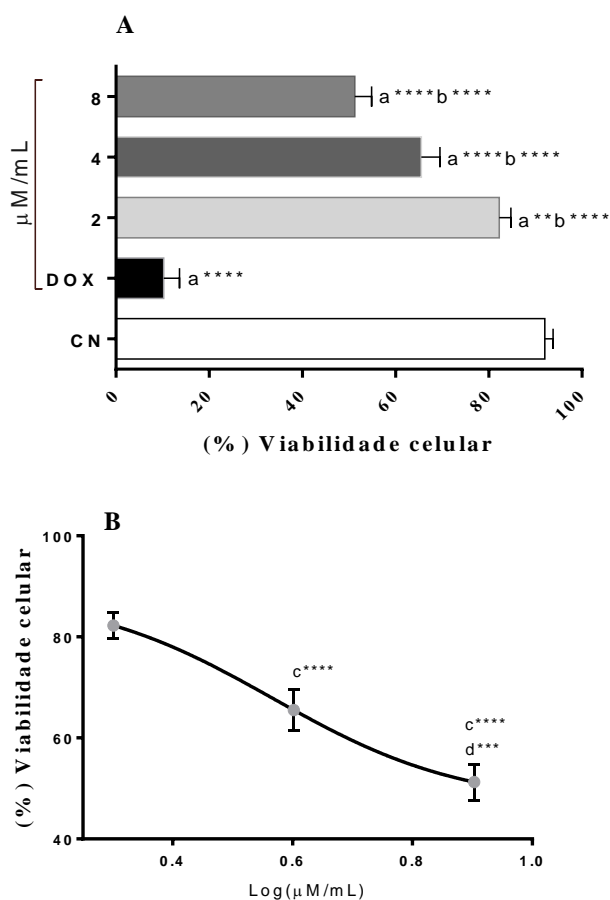
Para definir as diferenças entre os tratamentos, dados expressos como a média ± desvio padrão foram comparados por análise de variância (ANOVA), de duas vias, seguido pelo teste de Tukey (Considerando valores significantes de \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001), por meio do programa *Graphpad Prism* (v. 6.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphPad.com](http://www.graphPad.com)). Para este estudo, a viabilidade celular foi transformada para porcentagem, as concentrações foram transformadas em logaritmo e submetidas a uma regressão não linear a fim de ser encontrado a CI<sub>50</sub>.

### 3 RESULTADOS

#### 3.1 Viabilidade celular pelo ensaio de exclusão de azul de tripan

**CIT** nas concentrações avaliadas induziu citotoxicidade pela redução da viabilidade celular em relação ao CN, com  $CI_{50}$  de  $8,12 \mu\text{M}/\text{mL}$  [IC:  $6,98\text{-}9,34$ ]. Nenhuma concentração foi tão citotóxica quanto a **DOX** (**Figura 1A**). Foi possível observar um aumento significativo da citotoxicidade com o aumento da concentração do composto analisado (**Figura 1B**).

**Figura 1: Determinação da  $CI_{50}$  e viabilidade celular pelo ensaio de exclusão por azul de tripan em S180 após 72 h de exposição a CIT. Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes. A: análise da variância entre grupos. B: CN: células não tratadas. DOX: doxorubicina ( $3,7 \mu\text{M}/\text{mL}$ ). CIT: citrinitina ( $2, 4$  e  $8 \mu\text{M}/\text{mL}$ ). ANOVA, one-way seguido de Tukey. Valores significantes de  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$  comparado ao grupo CN (a), DOX (b),  $2 \mu\text{M}/\text{mL}$  (c) e  $4 \mu\text{M}/\text{mL}$  (d).**

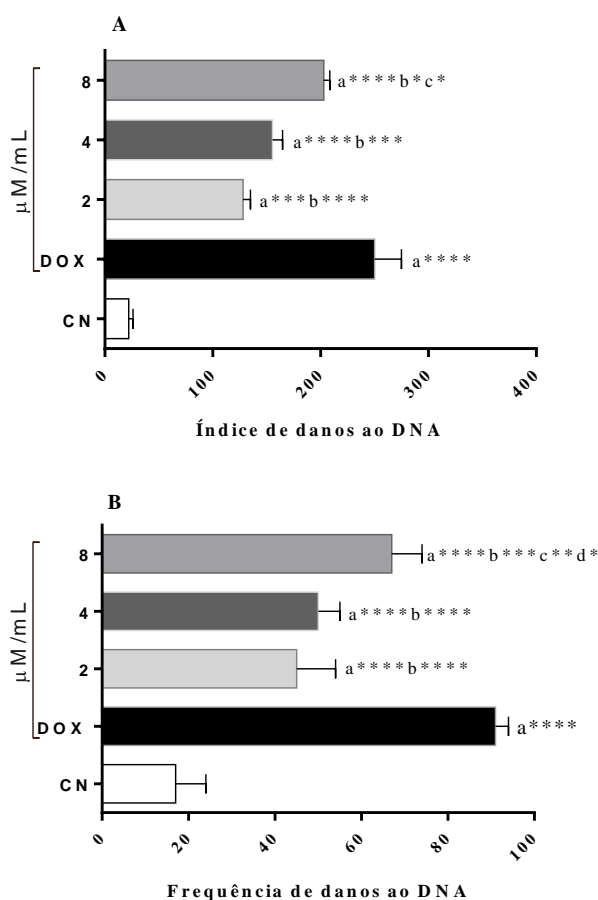


$CI_{50}$ :  $8,12 \mu\text{M}/\text{mL}$  [IC:  $6,98\text{-}9,34 \mu\text{M}/\text{mL}$ ] /  $R^2$ : 0,934

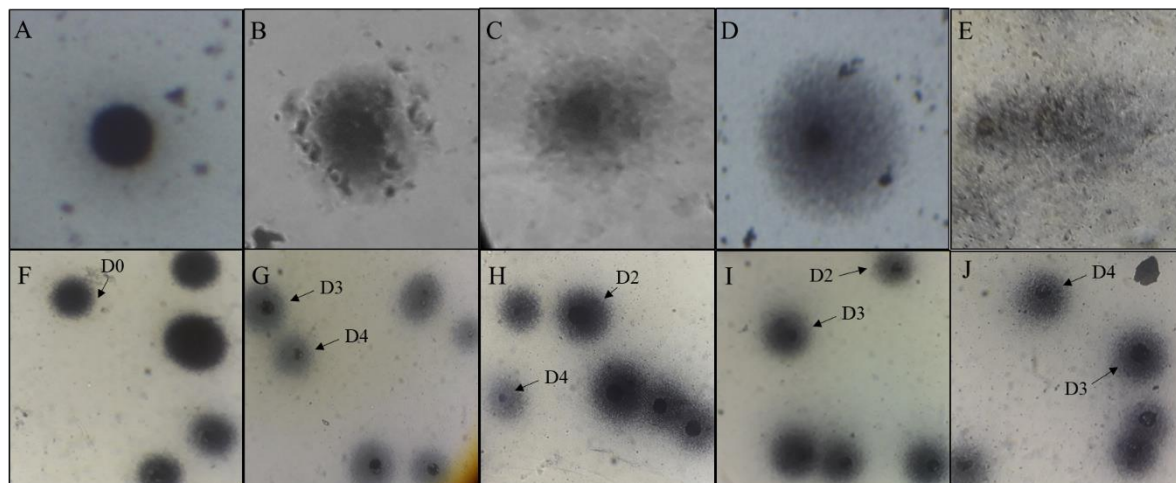
### 3.2 Efeitos genotóxicos da CIT em cultura primária de S180

Todas as concentrações de CIT foram genotóxicas em células de S180, pelo aumento do índice e frequência de danos ao DNA, em relação as células não tratadas (CN). Como esperado DOX induziu maior índice e frequência de danos em relação a todos os grupos analisados (**Figura 2**). Foi possível observar que CIT induziu maiores efeitos genotóxicos com o aumento da concentração utilizada (**Figura 2**). Esse efeito foi melhor observado pelo aumento de células com danos causados por esse composto como apresentado na Figura 3.

**Figura 2.** Genotoxicidade em cultura primária de S180 após 72 h de exposição. **A:** Índice de Danos. **B:** Frequência de Danos. Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes. CN: células não tratadas. CP: Doxorrubicina (Dox) 3,7  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . CIT: Citrinina (2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). ANOVA, one-way seguido de Tukey. Valores significantes de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparado ao grupo CN (a), DOX (b), 2 $\mu\text{M}/\text{mL}$  (c) e 4 $\mu\text{M}/\text{mL}$  (d).



**Figura 3:** Perfil fotomicrográfico de cultura primária de S180 no ensaio cometa. A: dano 0 (D0). B: dano tipo 1 (D1). C: dano tipo 2 (D2). D: dano tipo 3 (D3). E: dano tipo 4 (D4) F: CN células sem tratamento. G: CP: doxorubicina (DOX) 3,7  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . H: CIT 2  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . I: CIT 4  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . J: CIT 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ . Coloração com prata. Aumento de 400X.



### 3.3 Efeitos citogenéticos e morte celular da CIT em cultura primária de S180 avaliados pelo teste de micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN)

CIT induziu mutagenicidade pelo aumento no número de micronúcleos em relação ao CN. Além disso, em todas as concentrações foi observado o aumento de outras anormalidades nucleares preditivas de efeitos mutagênicos como pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares, com destaque para a maior concentração (8  $\mu\text{M}/\text{ml}$ ) em comparação com as células não tratadas (CN). Todas as concentrações obtiveram menor valor nas alterações nucleares avaliadas nesse estudo, em relação a DOX (**Tabela 1**).

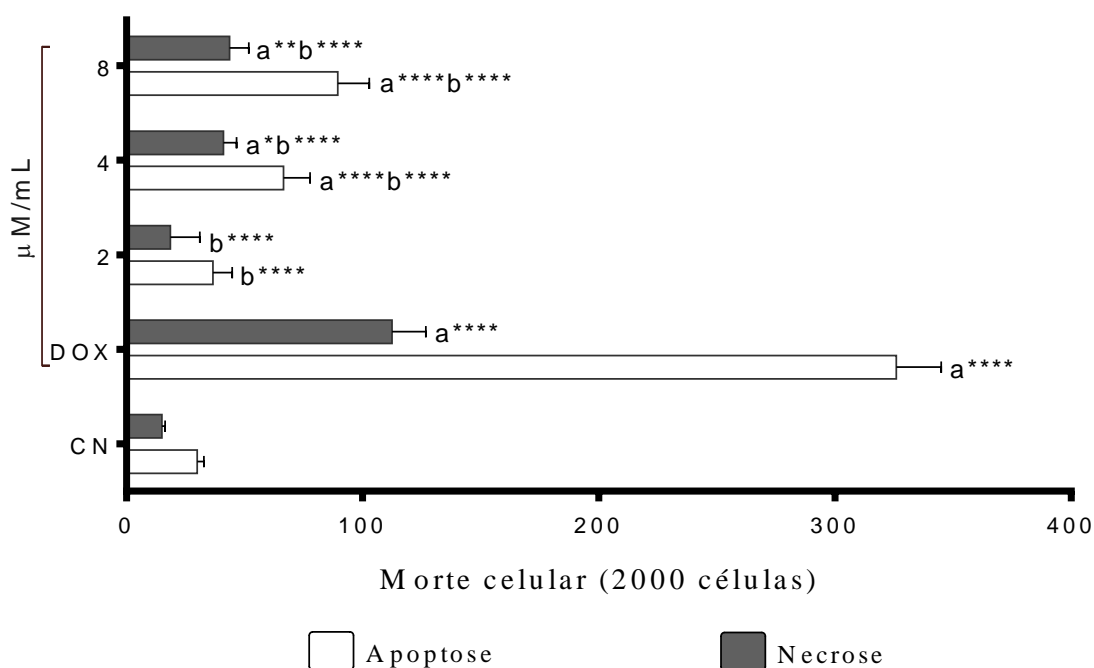
**Tabela 1:** Avaliação do índice de divisão nuclear (IDN), índice de danos nucleares indicativos de citotoxicidade (IDNC) e danos citogenéticos induzidos por CIT avaliados células de S180 após 72h de exposição pelo teste de micronúcleos com bloqueio de citocinese.

Tratamento	Danos citogenéticos			Citotoxicidade	
	Micronúcleos	Pontes	Brotos	IDN	IDNC
<b>Sarcoma 180</b>					
CN	2,75 ± 1,02	2,80 ± 0,41	1,70 ± 0,12	1,65 ± 0,07	1,60 ± 0,003
DOX 3,7µM/mL	36,5 ± 0,35 <sup>a</sup>	35,5 ± 3,53 <sup>a</sup>	17,0 ± 1,41 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,08 ± 0,05 <sup>a</sup>
CIT 2 µM/mL	12,5 ± 4,13 <sup>ab</sup>	7,5 ± 2,9 <sup>ab</sup>	8,3 ± 1,5 <sup>ab</sup>	1,47 ± 0,05 <sup>ab</sup>	1,41 ± 0,02 <sup>ab</sup>
CIT 4 µM/mL	14,0 ± 2,44 <sup>ab</sup>	13,5 ± 1,7 <sup>ab</sup>	12,0 ± 1,3 <sup>ab</sup>	1,42 ± 0,002 <sup>ab</sup>	1,14 ± 0,08 <sup>ab</sup>
CIT 8 µM/mL	19,5 ± 2,1 <sup>ab</sup>	16,0 ± 2,8 <sup>ab</sup>	25,2 ± 2,7 <sup>ab</sup>	1,21 ± 0,06 <sup>a b</sup>	1,02 ± 0,004 <sup>a</sup>

Valores representam a média ± desvio padrão de quatro experimentos independentes. S180: sarcoma 180. CN: células não tratadas. DOX (Doxorrubicina 3,7 µM/mL). CIT: citrina (2,4 e 8 µM/mL). ANOVA, One-way, seguido de pós-teste de Tukey. <sup>a</sup> p<0,05 comparado ao grupo CN, <sup>b</sup> p<0,05 comparado ao grupo DOX.

Foi possível observar que CIT induziu citotoxicidade em todas as concentrações testadas, tanto pela redução do índice de divisão nuclear (IDN) quanto pelo índice de divisão nuclear considerando morte celular (IDNC) (**Tabela 1**). CIT induziu aumento de apoptose e necrose nas maiores concentrações (4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ) em relação ao CN (**Figura 4**). Portanto esses resultados apontam que os efeitos citotóxicos da CIT ocorrem por danos citogenéticos observados pelo aumento de alterações nucleares mutagênicas, que podem levar a instabilidade genética e causar morte celular.

**Figura 4:** Apoptose e necrose induzida por CIT em cultura primária de S180 após 72h de exposição. Valores representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos independentes. S180: sarcoma 180. CN: células não tratadas. DOX (Doxorrubicina 3,7  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). CIT: (2, 4 e 8  $\mu\text{M}/\text{mL}$ ). ANOVA, one-way seguido de Tukey. Valores significantes de \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  comparado ao grupo CN (a), DOX (b).



## 4 DISCUSSÃO

Produtos naturais podem ser definidos como o conjunto de moléculas derivadas do ambiente que não estão envolvidas no metabolismo primário, mas são principalmente codificados geneticamente e produzidos por vias metabólicas secundárias. Estima-se de forma variável, que produtos naturais fornecem ou serviram como base para o desenvolvimento de entre 50% e 70% de todos os agentes atualmente em uso clínico (NEWMAN; CRAG, 2014; PYE et al., 2017). Produtos naturais são uma rica fonte de diversidade química para a descoberta de compostos com propósitos farmacêuticos (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Nesse cenário micotoxinas são produzidas como metabólitos secundários em diversos fungos (SULAIMAN et al., 2017). Essas micotoxinas possuem diversos mecanismos de toxicidade, o que as torna alvo de investigação para a sua capacidade de agir como agentes antitumorais (BOPPANA et al., 2017).

A citrinina (CIT) é um metabólito produzido por várias espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* (EFSA, 2012; DE OLIVEIRA-FILHO et al., 2017). Esse composto é conhecido principalmente por suas propriedades tóxicas (FLAJS; PERAICA et al., 2009; DEGEN; ALI; GUNDERT-REMY, 2018). No presente estudo CIT, induziu efeitos citotóxicos em cultura primária de S180, pela redução da viabilidade celular em baixas concentrações, com uma CI50 de 8,12  $\mu\text{M}/\text{mL}$  (**Figura 1**). No estudo de Yao et al. (2011) o efeito citotóxico de CIT em células tumorais foi demonstrado, pela redução da viabilidade celular em linhagens cancerígenas de mama (MCF-7), próstata (LNCap) e pulmão (LU-1) com CI50 entre 16 e 369  $\text{ng}/\text{mL}$ . Também foi observado citotoxicidade em células de adenocarcinoma hepático (HepG2) com CI50 de 38,7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (GAYATHRI et al., 2015), de câncer cervical (HeLa), carcinoma oral (KB), carcinoma ovariano (SKOV-3), carcinoma colorretal (HCT-116), adenocarcinoma alveolar com CI50 entre 0,250-2,5  $\text{ng}/\text{mL}$  (DU et al., 2011).

A citotoxicidade de CIT também foi apontada pela redução dos parâmetros IDN e IDNC pelo ensaio CMBN (**Tabela 1**). Em concentrações entre 12,5–25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , CIT ativa a parada do ciclo celular na fase G2 da mitose pela inibição da polimerização de tubulina e formação de fuso mitótico em células de rim embrionário humano (HEK293) (CHANG et al., 2011). Outros estudos descrevem que CIT induz morte celular por meio das vias ERK1 e ERK2, além da indução da parada do ciclo celular pelas vias de sinalização p53 e p21 (IWAHASHI et al., 2007; CHANG et al., 2009;



CHANG et al., 2011). Após aplicação de CIT em camundongos, o aumentando EROs, induziu a parada do ciclo celular na fase G0 / G1, sugerindo morte celular apoptótica (KUMAR et al., 2011).

Outros estudos apontam para o estresse oxidativo como um dos mecanismos de toxicidade e citotoxicidade em sistemas biológicos (RIBEIRO et al., 1997; JOHANNESSEN; NILSEN; LØVIK, 2007), pelo acúmulo de espécies reativas do oxigênio (EROs) com estímulo a formação do ânion superóxido, como observado em células renais de hamster (BHK-21), o que resultando em severas alterações a nível mitocondrial e morte celular (CHAGAS et al., 1994). A indução de morte celular por apoptose por CIT foi descrita em células leucêmicas humanas (HL-60) e em células renais porcina (PK15) pela ativação das caspases 3, 6, 7 e 9 (YU et al., 2006, KLARIĆ et al., 2012). A indução da apoptose é um procedimento chave no mecanismo de ação dos agentes quimioterápicos contra células tumorais (FU et al., 2018; ALKHATIB; AL-OTAIBI; WALI, 2018; CHAUHAN et al., 2018). Portanto, a indução a apoptose por CIT, converge para a via mitocôndrial (HUANG et al., 2009; KUMAR et al., 2011; MÁTÉ et al., 2014). Além disso CIT induziu necrose em células hepáticas (MEHDI; CARLTON; TUIITE,1983). Esses estudos são compatíveis com os dados de morte celular induzida por CIT nesse estudo, analisados através ensaio CBMN (**Figura 4**).

O ensaio cometa tem larga aplicação na toxicologia para avaliar o efeito genotóxico de produtos químicos. É considerada uma técnica versátil por sua adaptabilidade a uma variedade de células (CAMPOS; FERNANDES; ANDRÉ, 2017; MARONPOT; HOBBS; HAYASHI, 2018). Em sua versão alcalina, permite avaliar danos genômicos, pela quebra de fita simples, dupla e exposição de sítios álcalis-lábeis no DNA (IMANIKIA et al., 2016; QUINET et al., 2017; MØLLER, 2018). A análise por meio do ensaio cometa demonstrou que CIT induziu aumento do índice de danos e frequência de danos ao DNA em células de S180 (**Figura 2**). A genotoxicidade induzida por CIT foi descrita em vários sistemas teste. O aumento de danos ao DNA foi observado após 24 h de exposição em células Vero (BOUSLIMI et al., 2008). Após a ingestão de 15 mg / kg de alimento por 60 dias, CIT causou a fragmentação nuclear em células epiteliais intersticiais e proximais nos rins de coelhos, com a formação de peroxidação lipídica (KUMAR et al., 2014).

Diversos autores apontam para o estresse oxidativo como principal causa de lesões ao DNA induzidas por CIT. De Oliveira-Filho et al. 2017 descreve possíveis vias de ação cito-genotóxicas de CIT, que em concentrações mais altas, é capaz de regular

positivamente os níveis de genes de resposta ao estresse oxidativo (AADs, FLR1, OYE3, GRE2, MET17) e marcadores da inflamação (iNOS, IL-6, IL-8, COX-2 $\alpha$ ), levando a perturbações dependentes do tempo de exposição nos níveis celulares de antioxidantes como o GSH. Além disso, outros estudos apontam que CIT induz danos ao DNA mediado por EROs, pela elevação significativa de radicais peróxido (MÁTÉ et al., 2014; GAYATHRI et al., 2015). Pelicano et al. (2003) cita que CIT causa disfunção mitocondrial por inibição do complexo mitocondrial, com bloqueio da cadeia de transporte de elétrons e acúmulo do radical ânion superóxido.

A instabilidade genômica provém de estresse genotóxico, por ação endógena, por agentes externos ou pode ser o resultado de uma patologia celular. Essa instabilidade possui um papel fundamental na tumorigênese (AGUILERA; GARCÍA-MUSE, 2013). Dependendo dos mecanismos envolvidos, a instabilidade do genoma pode resultar em mutações, incluindo mutações pontuais, instabilidade de microssatélites e variações no número de cromossomos causadas por falhas durante a segregação cromossômica, incluindo rearranjos cromossômicos (ADMIRE et al., 2016; AGUILERA; GÓMEZ-GONZÁLEZ, 2008; GARCÍA-MUSE, 2012).

Nesse contexto, alterações cromossômicas contribuem para a formação de micronúcleos, um marcador biológico do câncer (ADHIRAKI; DE, 2018; AMIN, 2018; BALANIS, GRAEBER, 2018). O micronúcleo e outras anomalias nucleares, como as pontes nucleoplásmicas e as brotos nucleares, são biomarcadores indicativos de efeitos genotóxicos e manifestações de instabilidade cromossômica observadas no câncer (GASHI et al., 2018). Essas anomalias nucleares fornecem medidas válidas para quebras de DNA mal reparadas, bem como a separação defeituosa de cromátides irmãs na anáfase e amplificação gênica (FENECH et al., 2011). No nosso estudo, CIT induziu efeitos mutagênicos pelo aumento no número micronúcleos, bem como por outras alterações nucleares, como brotos e pontes nucleoplásmicas em células de S180 (**Tabela 1**). Estudos evidenciam o aumento na formação de micronúcleos por CIT em linfócitos do sangue periférico humano (PBMCs) (DÖNMEZ-ALTUNTAS et al., 2007) e em células tumorais hepáticas (HepG2) (KNASMLLER et al., 2004). Além disso, CIT induz formação de aberrações cromossômicas por efeitos clasteogênicos (JESWAL, 1996; LIU et al., 2003; BOUSLIMI et al., 2008), bem como efeito aneugênico (Thust e Kneist, 1979; CHANG et al., 2011).

A literatura ressalta a atividade anticâncer e quimiopreventiva de uma infinidade de agentes naturais que já passaram por ensaios clínicos que se mostraram promissores

sozinhos como em terapia combinada quando administradas juntamente com agentes quimioterápicos padrões. Portanto o desenvolvimento acelerado de quimiopreventivos e quimioterápicos a partir de fontes naturais são de grande importância (BISHAYEE; SETHI, 2016). Micotoxinas com ênfase para citrinina são uma fonte a serem explorada nesse sentido (NASKAR; CHAKRAVERTY; GHOSH, 2015). Portanto, mediante a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade evidenciadas em nosso estudo, a CIT deve ser analisada a fundo para a possível integração do arsenal quimioterápico fornecendo novas armas que podem impactar a guerra em curso contra o câncer.

## 5 CONCLUSÃO

Verificou-se que CIT demonstrou capacidade antitumoral ao reduzir a viabilidade celular em S180, bem como pela redução do IDN e IDNC. Foi observado um aumento na indução de morte celular por apoptose por CIT, provavelmente pela indução de estresse genotóxico com a indução de instabilidade genômica evidenciada pelo aumento de biomarcadores citogenéticos de genotoxicidade e mutagenicidade, tais como micronúcleos e outras anomalias nucleares (brotos e pontes nucleoplasmáticas). Portanto, esses resultados sugerem que o potencial antitumoral da micotoxina CIT, deve ser melhor avaliado como um possível recurso a ser explorado em terapias oncológicas.

## REFERÊNCIAS

ABOU-ZEID, A. M. Review on Citrinin: Synthetic methods, molecular biosynthesis and effect of plant extracts. **British Microbiology Research Journal**, v. 2, n. 2, p. 108, 2012.

ABRAMSON, D.; HULASARE, R.; WHITE, N. D. G.; JAYAS, D. S.; MARQUARDT, R. R. Mycotoxin formation in hullless barley during granary storage at 15 and 19% moisture content. **Journal of Stored Products Research**, v. 35, n. 3, p. 297-305, 1999.

ADHIKARI, A.; MADHUSNATA, D. E. Effect of Black Tea on Micronuclei (Oral Cancer Biomarker) Among Indian Population. **International Journal of Clinical Oncology and Cancer Research**. v. 2, n. 1, p. 7-9, 2017. doi: 10.11648/j.ijcocr.20170201.12. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/314950717\\_Effect\\_of\\_Black\\_Tea\\_on\\_Micro\\_nuclei\\_Oral\\_Cancer\\_Biomarker\\_Among\\_Indian\\_Population](https://www.researchgate.net/publication/314950717_Effect_of_Black_Tea_on_Micro_nuclei_Oral_Cancer_Biomarker_Among_Indian_Population)>. Acesso em: 10 jul. 2018.

ADMIRE, A.; SHANKS, L.; DANZL, N.; WANG, M.; WEIER, U.; STEVENS, W.; WEINERT, T. Cycles of chromosome instability are associated with a fragile site and are increased by defects in DNA replication and checkpoint controls in yeast. **Genes & development**, v. 20, n. 2, p. 159-173, 2006.

AGUILERA, A.; GARCÍA-MUSE, T. Causes of genome instability. **Annual review of genetics**, v. 47, p. 1-32, 2013.

AGUILERA, A.; GARCÍA-MUSE, T. R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. **Molecular cell**, v. 46, n. 2, p. 115-124, 2012.

AGUILERA, A.; GÓMEZ-GONZÁLEZ, B. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, n. 3, p. 204, 2008.

ALKHATIB, M. H.; AL-OTAIBI, W. A.; WALI, A. N. Antineoplastic activity of mitomycin C formulated in nanoemulsions-based essential oils on HeLa cervical cancer cells. **Chemico-biological interactions**, v. 1, n. 291, p. 72-80, 2018. DOI: 10.1016/j.cbi.2018.06.009 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29908166>>. Acesso em: 19 jul. 2018.

AMIN, S. Micronuclei in buccal smears: A potential tool to assess genotoxic DNA damage due to tobacco which may lead to oral cancer. **International Journal of Molecular and Immuno Oncology**, v. 3, n. 1, p. 34-34, 2018.

BALANIS, N. G.; GRAEBER, T. G. Making Mistakes Empowers Cancer Cells. **Trends in Cancer**. v. 4, n.7, p. 461-463, jul. 2018. DOI: 10.1016/j.trecan.2018.05.001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29937042>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

BISHAYEE, A.; SETHI, G. Bioactive natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. In: **Seminars in cancer biology**. v.40-41, p. 1-3, 2016. DOI: 10.1016/j.semcan.2016.08.006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27565447>>. Acesso em: 20 jul. 2018.

BOUSLIMI, A.; BOUAZIZ, C.; AYED-BOUSSEMA, I.; HASSEN, W.; BACHA, H. Individual and combined effects of ochratoxin A and citrinin on viability and DNA fragmentation in cultured Vero cells and on chromosome aberrations in mice bone marrow cells. **Toxicology**, v. 251, n. 1-3, p. 1-7, 2008.

BRAY, F. Transitions in human development and the global cancer burden. **World cancer report**, v. 2014, p. 54-68, 2014.

CAMPOS, M. A. A.; FERNANDES, A. P. S. M.; ANDRÉ, L. C. Comet assay as a biomarker of genotoxicity to assess occupational exposure to benzene in gas-station attendants and fuel analysts. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 42, 2017.

CHAGAS, G. M.; KLÜPPEL, M. L. W.; DE PAIVA CAMPELLO, A.; DE FREITAS BUCHI, D.; DE OLIVEIRA, M. B. M. Alterations induced by citrinin in cultured kidney cells. **Cell structure and function**, v. 19, n. 2, p. 103-108, 1994.

CHANG, C. H.; YU, F. Y.; WU, T. S.; WANG, L. T.; LIU, B. H. Mycotoxin citrinin induced cell cycle G2/M arrest and numerical chromosomal aberration associated with disruption of microtubule formation in human cells. **Toxicological Sciences**, v. 119, n. 1, p. 84-92, 2010.

CHANG, C. H.; YU, F. Y.; WANG, L. T.; LIN, Y. S.; LIU, B. H. Activation of ERK and JNK signaling pathways by mycotoxin citrinin in human cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, p. 281-287, 2009.

CHAUHAN, A.; KIM, J. T.; WEISS, H.; ANTHONY, L.; EVERS, M. Potentiating mTOR's Antineoplastic Effects with RovalpituzumabTesirate in Neuroendocrine Tumors. In: **PANCREAS. TWO COMMERCE SQ, 2001 MARKET ST, PHILADELPHIA, PA 19103 USA: LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS**, p. 335-335, 2018.

CUI, Q.; YANG, D. H.; CHEN, Z. S. Special Issue: Natural Products: Anticancer and Beyond. **Molecules**, v. 23, n.6, p. 1246, 2018.

DE OLIVEIRA FILHO, J. W. G., ISLAM, M. T., ALI, E. S., UDDIN, S. J., DE OLIVEIRA SANTOS, J. V., DE ALENCAR, M. V. O. B., ... & SHAW, S. A comprehensive review on biological properties of citrinin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 110, p. 130-141, 2017.

DEGEN, GISELA H.; ALI, NURSHAD; GUNDERT-REMY, URSULA. Preliminary data on citrinin kinetics in humans and their use to estimate citrinin exposure based on biomarkers. **Toxicology letters**, v. 282, p. 43-48, 2018.

DÖNMEZ-ALTUNTAS, H.; DÜMLUPINAR, G.; IMAMOGLU, N.; HAMURCU, Z.; LIMAN, B. C. Effects of the mycotoxin citrinin on micronucleus formation in a cytokinesis-block genotoxicity assay in cultured human lymphocytes. **Journal of Applied Toxicology: An International Journal**, v. 27, n. 4, p. 337-341, 2007.

DU, L., LIU, H. C., FU, W., LI, D. H., PAN, Q. M., ZHU, T. J., ... & GU, Q. Q. Unprecedented citrinin trimer tricitinol B functions as a novel topoisomerase II $\alpha$  inhibitor. **Journal of medicinal chemistry**, v. 54, n. 16, p. 5796-5810, 2011.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). **Panel on Contaminants in the Food Chain Scientific Opinion on the risks for public and animal health related to the presence of citrinin in food and feed.** *EFSA J.*, v. 10, p. 2605, 2012.

FANG, J.; LIAO, L.; YIN, H.; NAKAMURA, H.; SUBR, V.; ULBRICH, K.; MAEDA, H. Photodynamic therapy and imaging based on tumor-targeted nanoprobe, polymer-conjugated zinc protoporphyrin. **Future science OA**, v. 1, n. 3, 2015.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **NatureProtocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FENECH, M., KIRSCH-VOLDERS, M., NATARAJAN, A. T., SURRALLES, J., CROTT, J. W., PARRY, J.; THOMAS, P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International journal of cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-E386, 2015.

FLAJS, D.; PERAICA, M. Toxicological properties of citrinin. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, n. 4, p. 457-464, 2009.

FU, X.; DUAN, Y.; SHEN, H.; ZOU, Y.; PAN, C.; LU, D.; ZHANG, S. Antineoplastic effects of Endostar combined with combretastatin A4 phosphate in vitro. **Translational Cancer Research**, 2018.

GASHI, G.; MAHOVLIĆ, V.; MANXHUKA-KERLIU, S.; PODRIMAJ-BYTYQI, A.; GASHI, L.; ELEZAJ, I. R. The association between micronucleus, nucleoplasmic bridges, and nuclear buds frequency and the degree of uterine cervical lesions. **Biomarkers**, v. 23, n. 4, p. 364-372, 2018.

GAYATHRI, L.; DHIVYA, R.; DHANASEKARAN, D.; PERIASAMY, V. S.; ALSHATWI, A. A.; AKBARSHA, M. A. Hepatotoxic effect of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination, and protective effect of vitamin E: In vitro study in HepG2 cell. **Food and chemical toxicology**, v. 83, p. 151-163, 2015.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111, 2015.

HUANG, Y. T.; LAI, C. Y.; LOU, S. L.; YEH, J. M.; CHAN, W. H. Activation of JNK and PAK2 is essential for citrinin-induced apoptosis in a human osteoblast cell line. **Environmental Toxicology**, v. 24, n. 4, p. 343-356, 2009.

IMANIKIA, S.; GALEA, F.; NAGY, E.; PHILLIPS, D. H.; STÜRZENBAUM, S. R.; ARLT, V. M. The application of the comet assay to assess the genotoxicity of environmental pollutants in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 45, p. 356-361, 2016.

IWAHASHI, H.; KITAGAWA, E.; SUZUKI, Y.; UEDA, Y.; ISHIZAWA, Y.; NOBUMASA, H.; KUBOKI, Y.; HOSODA, H.; IWAHASHI, Y. Evaluation of

Toxicity of the Mycotoxin Citrinin Using Yeast ORF DNA Microarray and Oligo DNA Microarray. **BMC Genomics**, v. 8, n. 95, 2007.

JOHANNESSEN, L. N.; NILSEN, A. M.; LØVIK, M. Mycotoxin-induced depletion of intracellular glutathione and altered cytokine production in the human alveolar epithelial cell line A549. **Toxicology letters**, v. 168, n. 2, p. 103-112, 2007.

KLARIĆ, M. Š.; ŽELJEŽIĆ, D.; RUMORA, L.; PERAICA, M.; PEPELJNJAK, S.; DOMIJAN, A. M. A potential role of calcium in apoptosis and aberrant chromatin forms in porcine kidney PK15 cells induced by individual and combined ochratoxin A and citrinin. **Archives of toxicology**, v. 86, n. 1, p. 97-107, 2012.

KUMAR, M.; DWIVEDI, P.; SHARMA, A. K.; SANKAR, M.; PATIL, R. D.; SINGH, N. D. Apoptosis and lipid peroxidation in ochratoxin A-and citrinin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Toxicology and industrial health**, v. 30, n. 1, p. 90-98, 2014.

KUMAR, R.; DWIVEDI, P. D.; DHAWAN, A.; DAS, M.; ANSARI, K. M. Citrinin-generated reactive oxygen species cause cell cycle arrest leading to apoptosis via the intrinsic mitochondrial pathway in mouse skin. **Toxicological sciences**, v. 122, n. 2, p. 557-566, 2011.

MARONPOT, R. R.; HOBBS, C. A.; HAYASHI, Shim-mo. Role of pathology peer review in interpretation of the comet assay. **Journal of toxicologic pathology**, v. 31, n. 3, p. 155-161, 2018

MÁTÉ, G.; GAZDAG, Z.; MIKE, N.; PAPP, G.; PÓCSI, I.; PESTI, M. Regulation of oxidative stress-induced cytotoxic processes of citrinin in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Toxicon**, v. 90, p. 155-166, 2014.

MEHDI, N. A. Q.; CARLTON, W. W.; TUIE, J. Acute toxicity of citrinin in turkeys and ducklings. **Avian Pathology**, v. 12, n. 2, p. 221-233, 1983.

MØLLER, P. The comet assay: ready for 30 more years. **Mutagenesis**, v. 33, n. 1, p. 1-7, 2018.

NASKAR, S.; CHAKRAVERTY, R.; GHOSH, A. Mycotoxin: An alternate source of anticancer drug. **Int Res J Phamaceut Biosci**, v. 2, p. 31-41, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

PELICANO, H.; FENG, L.; ZHOU, Y.; CAREW, J. S.; HILEMAN, E. O.; PLUNKETT, W.; HUANG, P. Inhibition of mitochondrial respiration a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 39, p. 37832-37839, 2003.

PÓCSI, I.; KIRÁLY, G.; BÁNFALVI, G. Antineoplastic potential of mycotoxins. **Acta microbiologica et immunologica Hungarica**, p. 1-41, 2018.

PYE, C. R.; BERTIN, M. J.; LOKEY, R. S.; GERWICK, W. H.; LININGTON, R. G. Retrospective analysis of natural products provides insights for future discovery trends. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 22, p. 5601-5606, 2017.



QUESADA, J.; AMATO, R. The molecular biology of soft-tissue sarcomas and current trends in therapy. **Sarcoma**, v. 12, p. 849-856, 2012.

QUINET, A.; CARVAJAL-MALDONADO, D.; LEMACON, D.; VINDIGNI, A. DNA Fiber Analysis: Mind the Gap! In: **Methods in enzymology**. Academic Press, p. 55-82, 2017.

RIBEIRO, S. M.; CHAGAS, G. M.; CAMPELLO, A. P.; KLUPPEL, M. L. W. Mechanism of citrinin-induced dysfunction of mitochondria. V. Effect on the homeostasis of the reactive oxygen species. **Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease**, v. 15, n. 3, p. 203-209, 1997.

SPEIT, G.; ROTHFUSS, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol.* v. 314, p. 275-86, 2006, In: **DNA Repair Protocols**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 79-90, 2012.

STROBER, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 111, n. 1, p. A3. B. 1-A3. B. 3, 2015.

SULAIMAN, M. R.; CHYE, F. Y.; HAMID, A. A.; YATIM, A. M. The occurrence of aflatoxins in raw shelled peanut samples from three districts of Perak, Malaysia. **Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry**, v. 6, n. 5, p. 2045-2052, 2007.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013.

YAO, G.; SEBISUBI, F. M.; VOO, L. Y. C.; HO, C. C.; TAN, G. T. CHANG, L. C. Citrinin derivatives from the soil filamentous fungus *Penicillium* sp. H9318. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1125-1129, 2011.

YU, F. Y.; LIAO, Y. C.; CHANG, C. H.; LIU, B. H. Citrinin induces apoptosis in HL-60 cells via activation of the mitochondrial pathway. **Toxicology letters**, v. 161, n. 2, p. 143-151, 2006.